HAL
open science

Étude de l'implication du métabolisme du cholestérol dans la pathogénèse des amyotrophies spinales infantiles

Léo Houdebine

▶ **To cite this version:**

Léo Houdebine. Étude de l'implication du métabolisme du cholestérol dans la pathogénèse des amyotrophies spinales infantiles. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB154 . tel-03284274

HAL Id: tel-03284274

https://theses.hal.science/tel-03284274

Submitted on 12 Jul 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.

Université Paris Descartes – Paris V

Discipline : neurosciences

Ecole doctorale Médicament Toxicologie Chimie Imagerie ED 563

Thèse de doctorat présentée par

Mr. Léo HOUDEBINE

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

Etude de l'implication du métabolisme du cholestérol dans la pathogénèse des Amyotrophies Spinales Infantiles

Membres du jury :

Président du jury : Pr. Charbel Massaad

Rapporteur : Dr. Jocelyne Caboche

Rapporteur : Dr. Cécile Martinat

Examinatrice : Dr. Gaëlle Bruneteau

Directeur de thèse : Pr. Frédéric Charbonnier

Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

mtci
Ecole Doctorale
Médicament - Toxicologie
Chimie - Imageries

UNIVERSITÉ
PARIS
DESCARTES

Remerciements

Ces quelques lignes seront les seules de ce document qui ne seront pas guidées par les codes établis de l'écriture scientifique que je me suis efforcé de respecter au maximum. Elles vont me permettre d'adresser mes remerciements à celles et ceux qui m'ont tant apporté avant et pendant ma thèse.

De ce fait, mes premiers remerciements vont pour **mes parents**. Sans eux, je ne serais évidemment pas là où j'en suis aujourd'hui. Vous m'avez toujours poussé à faire ce que j'aimais et à me donner les moyens de réussir. Chacun à votre manière, vous m'avez apporté une façon d'aborder les difficultés que j'ai pu rencontrer. Je suis tellement fier de vous et de ce que vous m'avez transmis. Merci pour tout. Je pense également à toi **ma didoune**, qui crapahute partout dans le monde. Tu es pour moi, un exemple de réussite et d'accomplissement personnel. Je te remercie de m'avoir soutenu tout au long de ces 3 années et partagé tes expériences de vie qui m'ont redonnées du baume au cœur quand c'était nécessaire. De ma famille, je veux aussi remercier **Sarah**. Même de (très) loin, tu t'es toujours tenue au courant de l'avancement de ma thèse et de mon bien-être. J'espère qu'on te rejoindra bientôt en Australie pour nos projets futurs ! Un grand merci également, à mes grands-parents et au reste de ma famille d'avoir été à mes côtés tout au long de cette aventure.

Evidemment, je dois mille mercis à mon **Pout-Pout**. Tu as été d'un soutien infaillible du début à la fin. Tu as su me redonner confiance lorsque j'en avais besoin et au contraire me faire redescendre sur terre quand c'était nécessaire. J'envie souvent cette force qui t'anime, qui te fait avancer, ne rien lâcher, jamais. C'est bientôt ton tour, et je serai évidemment là dès que tu en auras besoin, toujours.

Mes potes **Alex C**, **Fab**, **Mehdi**, **Alex P**, **Johann**. Je n'ai pas été beaucoup disponible pour vous, merci d'avoir été là, d'être toujours au top et de rendre tout plus facile.

La première personne à avoir déclenché chez moi un vif intérêt pour la recherche scientifique est mon professeur de SVT au lycée **Vincent Bonneau**. Je lui suis reconnaissant de m'avoir guidé dans cette voie et de m'avoir donné l'envie de transmettre et partager.

A mon arrivée en Licence, j'ai eu l'occasion de rencontrer **Claire Legay** qui m'a offert l'opportunité de faire un stage de découverte dans son laboratoire. Grâce à elle j'ai pu faire mes premiers pas dans un laboratoire de recherche et découvrir concrètement ce qu'est la science. Merci de m'avoir donné cette chance.

I would never forget the opportunity that **Duncan Mackenzie**, **Jenny Mackenzie** and **Felicity Jackson** offered me to come to New Zealand for a 1 month internship at the Food and Nutrition department of Massey University. Apart from the amazing journey, it has been an outstanding experience to work in this lab, to see how things can work differently in a foreign country but that we are pursuing the same goal. Thank you so much.

Je souhaite sincèrement remercier mon directeur de thèse **Frédéric Charbonnier** pour m'avoir accueilli dans son équipe. L'aventure a commencé en L3 avec le groupe d'étudiants, **Julien**, **Andréane**, **Marie**, **Céline** et **Farah** puis en M2 et enfin en thèse. Tu as donné beaucoup de ton temps pour m'apprendre à être plus rigoureux dans mes manipes, plus critique dans mes réflexions, et me montrer comment m'organiser dans mon travail. Tu as toujours été à l'écoute de mes doutes, de mes remarques ou mes propositions. Je suis encore impressionné par le talent avec lequel tu as mené notre équipe et les

projets que tu portes. Je te suis mille fois reconnaissant de m'avoir transmis toutes les clés pour réussir aussi bien dans la recherche que dans le reste de mes projets.

Je dois énormément à mon collègue et ami **Olivier Biondi**. Toi aussi, tu en as passé du temps pour me former à tout un tas de techniques, à la réflexion et l'analyse des manipes. Toujours voir plus loin, ne pas s'inhiber, ne fermer aucune porte. Grâce à toi j'ai appris à mieux me connaître et à identifier mes forces et mes faiblesses. Tu m'as donné l'opportunité de participer à beaucoup de projets, la préparation du colloque Evanescence, la mise en place des outils d'analyse de la motricité sur la plateforme du 6ème étage, la visite des patients ASI à Garches, et beaucoup d'autres. Sans oublier les coups de téléphone « Léo tu peux me remplacer en TD, je suis bloqué dans le train j'arrive dans 30min » à 16h40 pour 16h45 sur un TD que je connaissais à peine ! Merci pour tout ce que tu m'as apporté, vraiment.

L'équipe 9 ne serait pas la même sans la RNA queen, **Laure Weill**. Je te remercie de m'avoir transmis une partie de tes connaissances, surtout concernant les ARN, l'importance de travailler dans un environnement absolument nickel ! Je suis évidemment déçu que nos expériences de RIP n'aient pas pu révolutionner le projet, mais grâce à ça je me suis éclaté et j'ai beaucoup appris ! Je continuerai encore à chanter « chandelier » à fond, partout où j'irai en pensant à toi et je vais continuer de perfectionner mon mime de descente d'escalier ;) Je te suis reconnaissant d'avoir été à mon écoute et de m'avoir apporté un autre regard sur mon projet et mes résultats.

Domenico D'amico, maintenant que tu es quasiment bilingue en français, tu pourras lire ce texte sans difficultés. Je te remercie d'avoir pu m'épauler pendant et surtout à la fin de ma thèse et prendre en charge une grosse partie des manipes que je n'avais plus le temps de faire ! Merci également de m'avoir donné le secret pour réaliser des pâtes « a la carbonnara » à l'italienne ! Sans crème, c'est promis !

J'ai également eu le privilège d'encadrer et/ou de partager le bureau avec beaucoup d'étudiants, **Mélodie**, **Valentin**, **Rafael**, **Erica**, **Ilaria**, **Alexandra**, **Zoé**, **Lise,** sans oublier mon **Johann** ! J'ai été heureux de faire votre connaissance, travailler avec vous a été super agréable et franchement on s'est bien marrés !

Je voudrais aussi remercier **Céline Desseille** qui a été l'une des premières à me former au labo. J'ai pu assister à ta préparation pour la soutenance de thèse, c'est maintenant mon tour. Merci de m'avoir montré le chemin.

Je souhaite également remercier les autres membres de l'équipe 9, pour leur aide, leurs conseils avisés, et leur partage. Je pense à **Christophe Chanoine**, **Suzie Lefebvre**, **Perrine Delers**, **Delphine Sapaly** et anciennement **Anne-Sophie Armand** et **Tristan Goncalves**. Une pensée particulière pour mon **Joel Coppé** pour ses conseils de vie le matin à 7h30 autour d'un cappuccino, quelle meilleure façon de commencer la journée ? Dommage qu'on ne se croise pas en Guadeloupe cet hiver ! J'ai également partagé pendant quasiment 4 années, les locaux derrière la porte H330 avec l'équipe 8 : « les charbeleux » : **Merhnaz Jafarian-Terani**, **Julien Grenier**, **Delphine Meffre**, **Anne Simon**, **Céline Becker, Sophie Bernard** et sans oublier **Françoise Courtin** ! Et tous les étudiants passés et actuels : **Gemma**, **Elena**, **Mehdi**, **GG**, **Rasha**, **Nirmal**, **Venkat, Alex**. Merci d'avoir partagé avec moi vos connaissances et techniques scientifiques ainsi que vos différentes cultures ! Vous participez tous à l'ambiance si particulière qui m'a tout de suite séduite dans ce labo.

J'aimerais aussi adresser mes remerciements à tous les membres de l'unité UMR-S 1124 qui m'ont apporté leur aide pendant ma thèse. Je pense notamment à **Cendra Aguhlon, Fatima Djouadi, Jean Bastin, Laury Soupraya, Chafia Outerbah, François Etienne, Ludmila Juricek et Zohra Boufrara.**

Je n'oublie pas **Antonin Lamazière** de l'hôpital Saint-Antoine pour sa gentillesse et l'aide qu'il m'a apporté pour les analyses lipidomiques. Je me vois encore t'appeler 15 min avant le concours pour la bourse de l'école doctorale pour te poser des questions sur le fonctionnement des statines ! Je souhaite aussi remercier **Gaetan Depres**, pour le temps qu'il a consacré afin de m'aider à préparer et analyser les échantillons pour la GC-MS.

Enfin, je remercie les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. En particulier Dr. **Jocelyne Caboche** et le Dr. **Cécile Martinat** pour leurs remarques pertinantes et nécessaires lors de la correction de mon manuscrit. Le président Pr. **Charbel Massaad** et mon examinatrice Dr. **Gaëlle Bruneteau**.

Table des matières

Introduction 12
1. Les amyotrophies spinales 12
1.1. Découverte 12
1.2. Classification des différentes formes d'amyotrophie spinale 12
1.2.1. L'amyotrophie spinale infantile de type 0 14
1.2.2. L'amyotrophie spinale infantile de type 1 14
1.2.3. L'amyotrophie spinale infantile de type 2 16
1.2.4. L'amyotrophie spinale infantile de type 3 16
1.2.5. L'amyotrophie spinale de type 4 16
1.3. Epidémiologie 17
1.3.1. Prévalence et incidence 17
1.4. Caractéristiques génétiques 18
1.4.1. Les gènes SMN1 et SMN2 18
1.4.2. Les gènes NAIP et p44 20
1.4.3. Les porteurs sains 21
1.4.4. Les promoteurs de SMN 22
1.4.5. L'origine des différences de sévérité de la maladie 22
1.5. La protéine SMN 23
1.5.1. Structure de la protéine SMN 23
1.5.2. Expression et localisation de la protéine SMN 26
1.5.3. Fonctions de la protéine SMN 27
1.5.3.1. Assemblage des snRNP 27
1.5.3.2. Transport des ARNm et remodelage du cytosquelette 28
1.5.3.3. Transcription 28
1.5.3.4. Apoptose 29
1.6. Animaux modèles de l'amyotrophie spinale 29
1.6.1. Les modèles murins 29
1.6.1.1. Les modèles « Taïwanais » 30
1.6.1.2. Les modèles « américains » 30
1.6.1.3. Les modèles issus de la stratégie Cre-LoxP 31
1.6.2. Les autres modèles animaux 32
1.6.2.1. Caenorhabditis elegans 32
1.6.2.2. La drosophile 32

1.6.2.3. Le Zebrafish 33
1.6.2.4. Les modèles cellulaires 33
1.7. Les traitements 34
1.7.1. Augmenter le taux de protéine SMN 34
1.7.1.1. Oligonucléotides modificateurs d'épissage 34
1.7.1.2. Les longs ARN non codants 35
1.7.1.3. Les petites molécules 37
1.7.2. Les thérapies géniques 38
1.7.3. Les thérapies cellulaires 38
1.8. Les recherches du laboratoire sur l'exercice physique et l'amyotrophie spinale infantile 39
1.8.1. Voie de signalisation du NMDA et amyotrophie spinale 40
2. L'IGF-1 et le récepteur IGF-1R 40
2.1. La voie IGF-1 et l'amyotrophie spinale infantile 42
2.2. Les voies de signalisation et cholestérol 43
2.3. Cavéolin-1 et SMN 44
2.4. Mécanismes d'internalisation de l'IGF-1R 44
3. Le Cholestérol 45
3.1. La molécule 45
3.2. Synthèse du cholestérol 46
3.3. Cholestérol dans le SNC 48
3.3.1. Synthèse du cholestérol dans le SNC 48
3.3.2. Les oxystérols dans le SNC 49
3.3.2.1. Signalisation dépendante des oxystérols 50
3.3.3. Transport du cholestérol dans le SNC 51
3.3.4. Elimination du cholestérol dans les neurones 51
3.4. Stockage 52
3.5. Régulation de la synthèse 53
3.5.1. La voie SREBP2 53
3.6. Stockage de cholestérol 54
3.7. L'enzyme DHCR24 ou Seladin-1 54
3.7.1. Fonctions de la protéine DHCR24 55
3.7.2. Régulation de DHCR24 57
3.8. Cholestérol et neuropathologies 57
3.8.1. Cholestérol dans la maladie de Parkinson 57
3.8.2. Cholestérol dans la maladie d'Alzheimer 58
3.8.3. Cholestérol dans la maladie d'Huntington 59

3.8.4. Cholestérol dans la sclérose latérale amyotrophique 60
Problématique 61
Résultats 64
1. Article 1 64
1.1. Introduction à l'article 1 64
1.2. Conclusion de l'article 1 82
2. Article 2 83
2.1. Introduction à l'article 2 83
2.2. Conclusion de l'article 2 124
2.3. Résultats complémentaires aux articles 1 et 2 125
2.3.1. Matériel et Méthodes 134
Discussion 139
Perspectives 151
Bibliographie 153
Annexes 174
1. Liste des abbreviations utilisées dans le manuscrit 174
2. Liste des publications 176
3. Article 3 177
4. Article 4 200
5. Article 5 209
Résumé 227

Liste des illustrations

Figure 1: Représentation des postures hypotonique dîtes « enfant mou » chez l'enfant atteint l'amyotrophie spinale de type 1. 15
Figure 2: Construction génétique des transcrits SMN 18
Figure 3: Représentation des différences d'épissage entre les gènes SMN1 et SMN2. 19
Figure 4: Les différents mécanismes d'épissages entres les transcrits provenant des gènes SMN1 ou SMN2 20
Figure 5: Les différentes configurations génétiques des porteurs sains de la maladie. 22
Figure 6: Structure de la protéine SMN et ses différents domaines d'interaction 23
Figure 7: Structure de la protéine SMN et des différentes régions codées par les exons 24
Figure 8: Modèle de la formation d'un homodimère ou d'un oligomère de la protéine SMN. 24
Figure 9: Représentation des différents transcrits générés depuis les gènes SMN. 25
Figure 10: Localisation subcellulaire de la protéine SMN. 26
Figure 11: (G) Co-localisation de la protéine SMN avec la protéine P80 coilin dans des cellules COS. (H) Co-localisation de la protéine SMN avec la protéine Gemin 2 27
Figure 12 : Représentation du complexe SMN. 27
Figure 13: Fonction de SMN dans l'assemblage des snRNP. 28
Figure 14: Phénotypes des souris mimant une ASI 30
Figure 15: Construction génétiques permettant la réduction ou l'augmentation de l'expression de la protéine SMN 31
Figure 16: Etudes possibles et applications thérapeutiques des iPSCs de patients ASI. 34
Figure 17 : Correction de l'épissage des transcrits SMN2 par le SSO Spinraza 35
Figure 18: Thérapies des ARN anti-sens combinés avec les oligonucléotides modificateurs d'épissages. 36
Figure 19: Le récepteur à l'IGF-1 et deux des trois cascades de signalisations associées. 42
Figure 20: Représentation des différents mécanismes d'internalisation 45
Figure 21: Structure chimique du cholestérol 45
Figure 22: Première étape de la voie de biosynthèse du cholestérol 46
Figure 23: Deuxième étape de la voie de biosynthèse du cholestérol 47
Figure 24: Les voies de biosynthèse de Bloch et de Kandutsch-Russel permettant à la formation de cholestérol 48
Figure 25: Régulation transcriptionnelle par l'hétérodimère LXR/RXR. 51
Figure 26: Dialogue entre les astrocytes et les neurones 52
Figure 27: Balance d'activation de SREBP2 en fonction de la concentration en cholestérol. 54
Figure 28: Structure de la protéine DHCR24 et son ancrage dans la membrane du réticulum endoplasmique 55
Figure 29: Schéma hypothétique du lien entre l'activation de la voie ERK, la surexpression de l'IGF-1R et l'altération du métabolisme du cholestérol 141
Figure 30: La modulation du niveau d'expression de l'IGF-1R est suffisante pour restaurer le profil d'activation des voies de signalization AKT/CREB et ERK/Elk-1, induisant une augmentation de l'expression de SMN chez la souris 143
Figure 31: Schéma récapitulant le mécanisme possible par lequel la surexpression de DHCR24 induirait une augmentation de l'expression de SMN dans les fibroblastes de patient ASI. 149

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des différents types d'amyotrophie spinale. 14
Tableau 2: Prévalence de la maladie selon le type et la région étudiée 17
Tableau 3: Résumé des différentes études ayant relaté un lien entre les taux de stérols (cholestérol et oxystérol) et la maladie de Parkinson (Doria et al. 2016). 58

Préambule

Les travaux réalisés ces dernières années au laboratoire ont démontrés que la pratique d'un exercice physique quotidien est bénéfique pour des modèles murins mimant une amyotrophie spinale infantile (ASI) de type 2 (Biondi et al., 2008; Grondard, 2005). Un protocole de course en roue permet d'augmenter significativement la durée de vie, l'activité spontanée et les capacités motrices des animaux ASI entrainés par rapport aux animaux ASI sédentaires. Il a également été constaté que l'exercice physique permet de diminuer la mort des motoneurones lombaires et d'augmenter l'expression de la protéine SMN dans la moelle épinière des souris ASI.

L'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents permettrait de trouver des cibles pharmacologiques potentielles pour le traitement de l'ASI. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la voie de l'Insulin-Growth-Factor 1 (IGF-1), connue pour être un médiateur majeur des effets de l'exercice physique sur le système nerveux central. Il a été démontré que la pratique de l'exercice physique induit une augmentation de l'apport en IGF-1 au niveau cérébral (Carro et al., 2000), qui exerce de nombreux effets neuroprotecteurs. Notamment, l'augmentation de la plasticité neuronale, la neurogénèse ou encore la protection des neurones suite à des dommages cérébraux (Carro et al., 2001, 2003). Ainsi, nous avons cherché à caractériser la voie de signalisation liée à l'IGF-1 et évalué l'effet d'une modulation du niveau d'expression du récepteur à l'IGF-1R dans l'ASI.

Les résultats obtenus dans cette première étude ont permis d'identifier, entre autres, que la diminution d'expression de l'IGF-1R par l'exercice physique ou par invalidation génétique partielle induit une activation de la voie AKT/CREB et une diminution d'activation de la voie ERK/Elk-1 dans la moelle épinière des souris associées à une augmentation de l'expression de SMN.

Il a été démontré que le niveau d'activation de la voie de signalisation ERK/Elk-1 est plus important que celui de la voie AKT/CREB dans la moelle épinière de souris ASI de type 2. Stimuler l'activation de la voie AKT/CREB avec du NMDA ou inhiber la voie ERK/Elk-1 avec un agent pharmacologique permet d'augmenter le niveau d'expression de SMN (Biondi et al., 2010; Branchu et al., 2013). Le fonctionnement des voies de signalisation AKT/CREB et ERK/Elk-1 est dépendant d'une architecture membranaire correctement établie (Couet et al., 1997; Huang et al., 2016; Wu et al., 1997). En particulier, les cavéoles, riches en cholestérol sont indispensables pour la signalisation de voies dépendantes activées par des récepteurs membranaires tels que l'IGF-1R (Couet et al., 1997; Parton and Simons, 2007; Strippoli et al.,

2015). Le cholestérol participe à l'élaboration de plateformes de signalisation et aux mécanismes de transmission de signaux intracellulaires. De plus, des altérations de l'homéostasie du cholestérol sont d'ailleurs souvent associées à des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Giudetti et al., 2016), la maladie de Niemann-Pick type C (Rosenbaum and Maxfield, 2011), la maladie d'Huntington (Valenza et al., 2005) ou encore la maladie de Parkinson (Doria et al., 2016). Cependant, aucune étude de l'homéostasie du cholestérol n'a été réalisée dans l'ASI à ce jour. Dans un second temps, mon projet de thèse s'est donc axé sur l'étude de l'homéostasie du cholestérol dans différents modèles d'ASI.

Nous avons identifié diminution de la quantité de cholestérol et une altération de la concentration de plusieurs intermédiaires du cholestérol dans la moelle épinière de souris ASI de type 2 et une diminution du niveau d'expression de plusieurs enzymes participant à la biosynthèse du cholestérol. Nous montrons également, qu'in vitro, moduler l'activité ou le niveau d'expression de l'enzyme DHCR24 est capable de moduler l'expression de SMN ainsi que sa localisation nucléaire.

Les thérapies actuelles pour les patients atteints d'ASI consistent à augmenter l'expression d'une protéine SMN fonctionnelle dans la moelle épinière. Les approches visant à utiliser les oligonucléotides modificateurs d'épissages comme le « nusinersen » sont certes efficaces mais sont limitées aux patients pour lesquels l'augmentation de l'expression de SMN est encore efficace. Il est donc nécessaire de trouver des approches thérapeutiques permettant de traiter l'ensemble des patients atteints de la maladie. C'est notamment, une meilleure compréhension de la physiologie de l'ASI qui permettrait d'agir sur la pathologie de manière indépendante de l'expression de SMN et sur l'ensemble de l'organisme.

Introduction

1. Les amyotrophies spinales

1.1. Découverte

Les premières descriptions de la maladie et son association avec le terme d'amyotrophie ont été rapportées par l'autrichien Guido Werdnig en 1891 (Werdnig, 1971). Il évoque une atteinte des muscles du cou, du dos et des membres qui survient chez les jeunes enfants et dont l'évolution est fulgurante. En effet, les patients meurent avant l'âge de 6 ans, visiblement de détresse respiratoire.

C'est ensuite entre 1893 et 1900 que Johann Hoffmann est confronté à plusieurs cas d'enfants déclarant aux cours des six premiers mois de la vie une faiblesse musculaire et qui évolue progressivement. Il donne à la pathologie le nom de maladie de Werdnig-Hoffmann (Hoffmann, 1893). En 1902, Beevor évoque des cas de mères enceintes qui ont remarqué une faible activité motrice de leur enfant pendant la grossesse (Beevor, Brain, 1902).

La connaissance de la maladie s'améliore entre 1954 à 1956 grâce à Kugelberg et Welander qui décrivent des formes moins précoces débutant entre 2 et 17 ans généralement après l'acquisition de la marche et dont l'évolution est plus lente que la maladie de Werdnig-Hoffmann (Kugelberg and Welander, 1956).

Les années 90' sont marquées par les progrès de la recherche qui permettent d'établir un lien génétique entre les maladies de Werdnig Hoffmann et Kugelberg-Welander avec notamment la localisation, puis l'identification en 1995, du gène Survival of Motor Neuron (SMN) impliqué dans 95 à 98% des cas, de la maladie (Gilliam et al., 1990; Lefebvre et al., 1995; Melki et al., 1990).

Enfin, c'est en 2000 que sont mis au point les premiers modèles d'étude comme la souris, le poisson zèbre ou encore les cultures cellulaires de motoneurones. Ces intermédiaires sont indispensables pour le développement des nouvelles thérapies et sont aujourd'hui à l'origine de la découverte de traitements très prometteurs pour les amyotrophies spinales.

1.2. Classification des différentes formes d'amyotrophie spinale

Les amyotrophies spinales sont des maladies génétiques caractérisées par une dégénérescence des motoneurones et qui présentent une grande hétérogénéité phénotypique. Elles peuvent survenir dès l'enfance, à l'adolescence ou encore à l'âge adulte et sont à l'origine d'une faiblesse musculaire progressive, souvent symétrique ainsi que d'une

amyotrophie sans implication des neurones sensitifs ou bien du faisceau cortico-spinal (Hoffmann, 1893; Kugelberg and Welander, 1956).

L'amyotrophie spinale bulbaire est une forme de la maladie qui atteint les motoneurones des nerfs crâniens bulbaires : glossopharyngé (IX), vague (X) et hypoglosse (XII). Les patients atteints de cette forme de la maladie présentent principalement une faiblesse progressive des muscles proximaux, associée à une insensibilité aux androgènes. L'origine de la maladie est une expansion de triplets CAG (>40 répétitions) dans l'exon 1 du gène Androgen Receptor (AR) dont la taille est corrélée à la sévérité de la maladie (La Spada et al., 1991, 1992).

L'amyotrophie spinale distale (ou encore neuropathie motrice héréditaire) est caractérisée par une atrophie des muscles des jambes et des chevilles. Les patients atteints de cette forme de la maladie présentent donc des difficultés à articuler, déglutir et parfois des faiblesses des muscles proximaux. Depuis 2001, plus d'une dizaine de gènes ont été identifiés pour cette forme de la maladie (Dierick et al., 2008; Wee et al., 2010).

Les amyotrophies spinales proximales sont les formes les plus représentées de la maladie. Elles sont caractérisées par une grande diversité phénotypique et pronostique. Ce sont les muscles du tronc et proches du tronc qui sont majoritairement atteints d'un déficit moteur. On distingue une forme adulte et quatre formes survenant dès l'enfance que l'on appelle donc les amyotrophies spinales infantiles (ASI) et qui constituent l'objet d'étude de cette thèse. Le terme anglosaxon Spinal Muscular Atrophies (SMA) regroupe les formes infantiles et la forme adulte de la maladie.

Il existe de nombreuses classifications pour les amyotrophies spinales proximales, comme celle de Dubowtiz basée sur l'évaluation de capacités motrices (capacité de l'enfant à se tenir debout, marcher, etc) ou encore celle de la Garchoise. Cependant, une classification a été établie en 1991 par le consortium international SMA et repose sur l'âge d'apparition des premiers symptômes, l'évolution des capacités motrices (faiblesses musculaires, perte de la marche) et la gravité de la maladie.

	Amyotrophie Spinale Infantiles					Amyotrophie Spinale Adulte
Type de SMA	**Type 0**	**Type 1a et 1b (Werdnig-Hoffmann)**	**Type 2 (Intermédiaire)**	**Type 3a (Kugelberg-Welander)**	**Type 3b (Kugelberg-Welander)**	**Type 4**
Apparition des symptomes	In utéro	Avant 6 mois	Entre 6 et 12 mois	Avant 18 mois	Après 18 mois	Après 40 ans
Phénotype moteur	Mouvements in utéro diminués	Posture assise jamais acquise	Marche jamais acquise	Marche jusqu'à 20ans	Plusieurs années de marche	Plusieurs années de marche
Evolution	Durée de vie rarement supérieure à 1 mois	Durée de vie inférieure à 2 ans	Durée de vie entre 2 et 40 ans	Durée de vie supérieure à 40ans	Normale	Normale

Tableau 1 : Classification des différents types d'amyotrophie spinale : de la forme la plus sévère l'ASI de type 0 à la forme la moins sévère l'ASI de type 4.

1.2.1. L'amyotrophie spinale infantile de type 0

MacLeod et ses collègues ont décrit des cas de forme très sévère d'amyotrophie spinale caractérisée par des mouvements *in utéro* diminués, une asphyxie et des faiblesses musculaires conséquentes dès la naissance. Les muscles intercostaux sont systématiquement affectés précipitant rapidement les enfants dans des détresses respiratoires. Pour certains cas les plus sévères, la mort survenait *in utero* (Dubowitz, 1999; MacLeod et al., 1999). Plus tard, ce type d'amotrophie spinale infantile très précoce a été nommé amyotrophie spinale intfantile de type 0.

1.2.2. L'amyotrophie spinale infantile de type 1

L'amyotrophie spinale de type 1, aussi appelée Werdnig-Hoffmann, est une forme sévère de la maladie la plus répandue (Verhaart et al., 2017). Bien que les premiers symptômes apparaissent généralement de manière progressive durant le deuxième semestre de la vie, d'autres peuvent survenir et évoluer rapidement brutalement comme la paralysie de certains muscles. On distingue généralement le sous type 1a si les premiers symptômes surviennent avant 3 mois et 1b s'ils apparaissent après 3 mois.

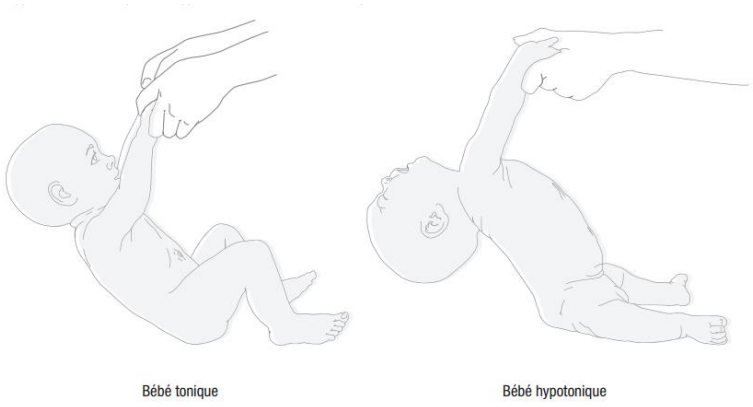


Figure 1: Représentation des postures hypotonique dîtes « enfant mou » chez l'enfant atteint l'amyotrophie spinale de type 1.

Ces symptômes sont caractérisés par une paralysie périphérique d'intensité et de localisation variable et hypotonie qui donne à l'enfant une absence totale de tenue (« enfant mou »).

Ces atteintes sont généralement bilatérales et symétriques d'abord caractérisées par une réduction des mouvements spontanés. En raison de l'atteinte des muscles cervicaux, les enfants sont incapables de tenir leur tête et d'adopter une posture droite en position assise sans assistance matérielle. Les paralysies contraignent également les fonctions locomotrices et gestuelles et entrainent ainsi des déformations ostéo-articulaires.

D'autres fonctions sont également impactées telles que la déglutition et le contrôle de la langue ce qui rend la prise alimentaire complexe. Les enfants ont des difficultés à mastiquer en raison de la dégénérescence de certains noyaux des nerfs crâniens et le système digestif est aussi affecté pouvant entrainer déshydratations, acidoses et autres troubles métaboliques (Tizzano et al., 1998).

La dégénérescence des motoneurones peut remonter jusqu'aux structures bulbaires du contrôle de la ventilation. Dans ce cas, peuvent survenir des périodes d'apnée ou encore des arrêts ventilatoires. Il y a de manière quasi-systématique une atteinte des motoneurones contrôlant les muscles intercostaux et abdominaux, ce qui entraine un retard de développement des poumons mais également de la cage thoracique aboutissant à des déformations de l'appareil respiratoire (Iannaccone, 2007). La sévérité des troubles observés pour la l'ASI de type 1 réduit la durée de vie à moins de deux ans. (Dietschy and Turley, 2004)

1.2.3. L'amyotrophie spinale infantile de type 2

L'amyotrophie spinale de type 2 aussi appelée « intermédiaire » est distinguée par une apparition des premiers symptômes après l'acquisition de la station assise aux alentours de 18 mois chez l'enfant. D'un point de vue phénotypique, les enfants atteints de la maladie présentent une faiblesse des quatre membres et du tronc les empêchant d'acquérir la marche autonome une fois la maladie déclarée. Les troubles associés aux atteintes bulbaires, comme les difficultés de mastications ou de déglutition sont moins retrouvées dans ce type d'ASI.

Les atteintes musculaires commencent au niveau de la ceinture pelvienne, puis s'étendent au tronc. Si ces déficits musculaires ne sont pas correctement pris en charge, ils peuvent aboutir à des rétractions musculaires et accentuer les déformations ostéo-articulaires.

En raison de l'apparition plus tardive des symptômes, le développement des voies respiratoires se fait de manière quasi-normale. Cependant, une fois la maladie mise en place, les paralysies des muscles intercostaux et abdominaux entrainent un syndrome restrictif. Si aucune prise en charge n'est effectuée ce syndrome peut évoluer et aboutir à une aggravation en insuffisance respiratoire chronique (Commare et al., 1994).

1.2.4. L'amyotrophie spinale infantile de type 3

La forme infanto-juvéline de d'ASI de type 3 aussi appelée maladie de Kugelbereg-Welander, apparaît entre 2 et 17 ans. Elle survient après l'acquisition de la marche. Son évolution est lente, bilatérale et symétrique. Une fois la maladie déclarée, les patients éprouvent de plus en plus des difficultés à marcher, avec des chutes fréquentes. On distingue les sous-types 3a et 3b en fonction de l'âge d'apparition des premiers symptômes et de la durée de conservation de la marche (Tableau 1). On note une hypertrophie des mollets et un tremblement des mains. La marche peut être conservée de 10 à 30 ans en fonction des patients. Ce sont les muscles de la ceinture pelvienne et des cuisses qui sont d'abord touchés puis ceux du tronc et du cou. On constate une aggravation brutale généralement au cours de la puberté. L'espérance de vie est majoritairement dépendante de l'atteinte respiratoire et le pronostic vital engagé à l'âge adulte mais certains patients peuvent avoir une durée de vie normale.

1.2.5. L'amyotrophie spinale de type 4

L'amyotrophie spinale de type 4 ou « adulte » est la forme la moins sévère, qui se différencie des autres types d'amyotrophies spinales dites « infantiles » car elle survient à l'âge adulte aux alentours des 30 ans. Cette forme peut passer inaperçue durant les premières années de la vie, certains patients ayant même pu réaliser leur service militaire sans difficulté. Tout comme pour le type 3, on constate une hypertrophie des mollets, une faiblesse

musculaire proximale et une absence de réflexe rotulien. L'espérance de vie est quasi-normale et il n'y a pas d'atteinte des muscles respiratoires.

Pour toutes les formes d'amyotrophie spinale, il semblerait qu'une affectation des fonctions intellectuelles soit très rarement associée.

1.3. Epidémiologie

Il n'existe que très peu de relevés épidémiologiques pour l'amyotrophie spinale. La majorité des études ont été réalisées avant 1995, en utilisant des approches cliniques plutôt que génétiques comme critère d'inclusion. (Dietschy and Turley, 2004)

1.3.1. Prévalence et incidence

La prévalence pour les amyotrophies spinales infantiles confondues est de 1-2 pour 100,000. Cependant, certaines études donnent des chiffres plus élevés notamment en Italie ou encore en Scandinavie où elle peut atteindre respectivement 6,56 pour 100,000 et 4,18 pour 100,000. Il y a cependant beaucoup de facteurs à prendre en compte dans l'interprétation de ces données : la taille restreinte de la population, la région étudiée ou le fait que seuls des enfants ont été pris en compte. Or la maladie peut se déclarer en fin d'adolescence ou à l'âge adulte. Néanmoins cela indiquerait une différence régionale dans l'incidence de la maladie (Dietschy and Turley, 2004; Verhaart et al., 2017).

Pays	Prévalence ASI de type 1	Prévalence ASI de type 2	Prévalence ASI de type 3	Prévalence ASI type 1+2+3	Référence
Norvège	0.17	3.66	0.35	-	(Tangsrud and Halvorsen, 1988)
Suède	0.28	1.11	1.39	-	(Darin and Tulinius, 2000)
Royaume-Uni	0.10	0.57	1.20	-	(Norwood et al., 2009)
Italie	-	-	-	6.56	(Merlini et al., 1992)
Chine	4.42	0.67	1.05	-	(Chung et al., 2003)
Scandinavie	-	-	-	4.18	(Arkblad et al., 2009)

Tableau 2: Prévalence de la maladie selon le type et la région étudiée. «- » les données ne sont pas fournies.

L'incidence pour les amyotrophies spinale infantiles est de 8 naissances pour 100,000. De même que pour la prévalence, certaines études donnent des valeurs différentes qui dépendent de la région ou de l'origine ethnique, la plupart des études ayant été réalisée en Europe. (Dietschy and Turley, 2004)

1.4. Caractéristiques génétiques

Les amyotrophies spinales sont un groupe de maladies à transmission autosomique récessive. Le gène dont la mutation est responsable de 95% des cas d'apparition de la maladie, a été localisé pour la première fois en 1990 grâce au clonage positionnel (Brzustowicz et al., 1990; Gilliam et al., 1990; Melki et al., 1994) sur le bras long du chromosome 5 dans la région 5q11.2-q13.3.. C'est par la suite, grâce à une carte de liaisons génétiques entre un marqueur génétique familial et le locus du gène que la zone génétique a pu être affinée (Melki et al., 1994). Ces avancées majeures dans la localisation du gène ont permis de réaliser un diagnostic génétique chez les patients soupçonnés d'être atteint d'amyotrophie spinale à partir de 1992.

1.4.1. Les gènes SMN1 et SMN2

En 1995, les gènes SMN sont identifiés dans une région complexe dupliquée et inversée de 500kb du chromosome 5 (Lefebvre et al., 1995). Il est composé de 9 exons dont 3 sont alternatifs, les exons 3,5 et 7, pour une taille totale de 29kb et codant pour une protéine de 32kDa (Lefebvre et al., 1995). L'exon 8 est non-codant.

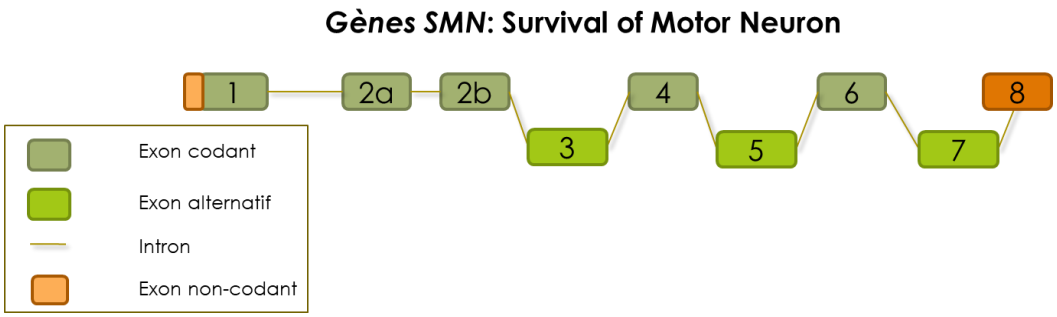


Figure 2: Construction génétique des transcrits SMN. Les transcrits SMN sont composés de 9 exons dont 3 sont alternatifs : les exons 3.5 et 7. L'exon 8 est non-codant.

Chez l'Homme, il existe deux gènes SMN : le gène SMNt (ou SMN1) qui se situe sur la partie télomérique du locus et le gène SMNc (ou SMN2) sur la partie centromérique du locus. La copie SMN2 du gène est retrouvée dans 95% de la population contrôle, et son absence n'entraine pas l'apparition de la maladie. Aucun individu n'a été identifié avec une absence des gènes SMN1 et SMN2 de manière simultanée, ce type de configuration génétique n'étant probablement pas viable. Il existe à ce jour 27 mutations qui ont été identifiées pour les gènes SMN et des délétions qui retirent la quasi-totalité du gène SMN1 sont souvent associées aux formes les plus sévères de la maladie (Lefebvre et al., 1995).

Le gène SMN1 code majoritairement pour un transcrit de forme complète, et qui produit une protéine SMN fonctionnelle. Il existe cinq différences nucléotidiques entre SMN1 et SMN2 dont une se situe dans l'exon 7 du gène et l'autre dans l'exon non-codant 8. Les autres différences se situent dans les introns du gène.

Le gène SMN2, produit environ 90% de transcrits dont l'exon 7 est excisé par épissage alternatif. Or l'exon 7 code pour le domaine d'oligomérisation de la protéine SMN. L'absence de l'exon 7 rend la protéine instable et moins fonctionnelle, elle est plus rapidement adressée au protéasome (Lorson et al., 1999).

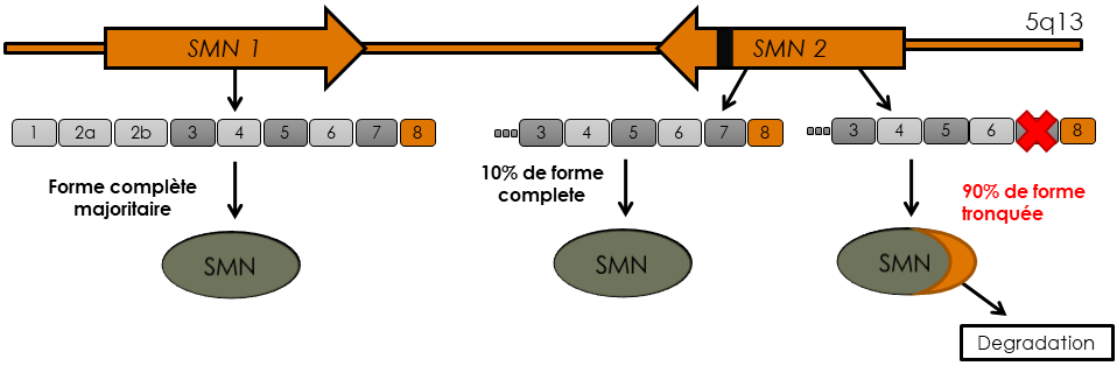


Figure 3: Représentation des différences d'épissage entre les gènes SMN1 et SMN2.Le gène SMN1 abouti majoritairement à la formation d'un transcrit de taille complète tandis que le gène SMN2 produit environ 90% de transcrits dont l'exon 7 est excisé, aboutissant à la traduction d'une protéine SMN instable et rapidement dégradée.

C'est une substitution silencieuse d'une cytosine pour une thymine en position +6 de l'exon 7 du gène SMN2 qui est responsable de l'excision de celui-ci. Au centre de l'exon 7 du gène SMN1 existe un site activateur d'épissage (ESE) qui va favoriser la fixation de protéines riches en arginine-sérine (SR) et des facteurs d'épissages tel que hTra2B (Sumner, 2007) qui vont promouvoir l'inclusion de l'exon dans le transcrit final en recrutant les facteurs d'épissage U1 snRNP et U2AF. La substitution nucléotidique dans le gène SMN2 entraine la formation d'un site Exonic Splicing Silencer (ESS) qui va, au contraire, recruter des facteurs favorisant l'excision de l'exon comme les protéines hnRNPA1 ou sam68 (Pedrotti et al., 2010). Sur les transcrits provenant du gènes SMN2, les facteurs favorisant l'inclusion et les facteurs favorisant l'exclusion de l'exon 7 sont en compétition, ce qui induit l'excision de l'exon 7 dans environ 90% des transcrits provenant du gène SMN2 (Cartegni and Krainer, 2002; Pagliarini et al., 2015; Pedrotti et al., 2010).

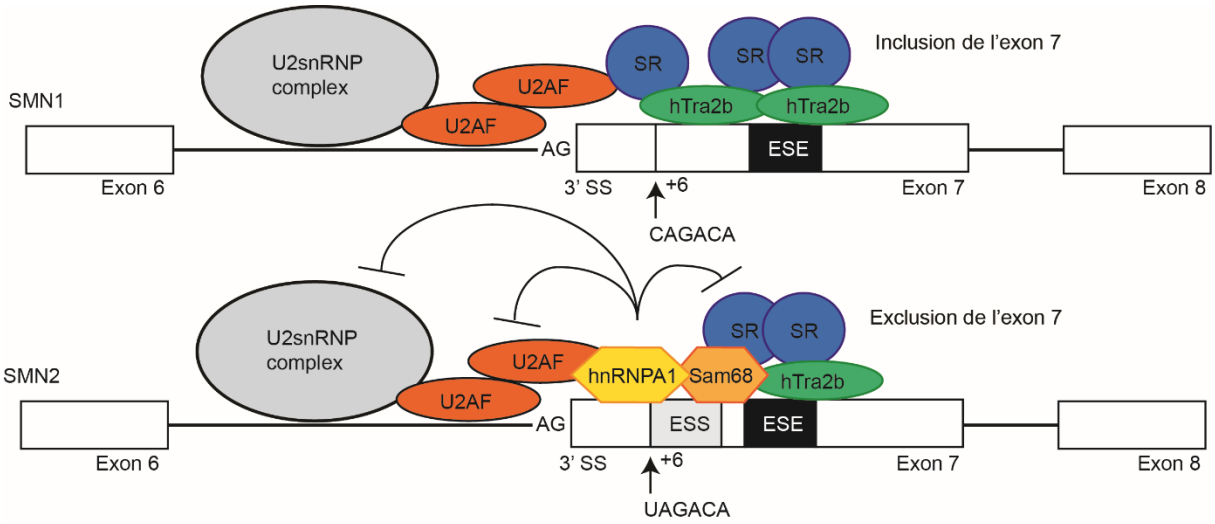


Figure 4: Les différents mécanismes d'épissages entres les transcrits provenant des gènes SMN1 ou SMN2. Dans l'exon 7 des transcrits SMN1, la présence d'un ESE favorise le recrutement de facteurs impliqués dans l'inclusion (hTra2b, SR). La substitution d'une cytosine pour une thymine en position +6 du gène SMN2 entraine la formation d'un ESS dans les transcrits SMN2 qui entraine le recrutement de facteurs impliqués dans l'excision (hnRNPA1, Sam68) qui vont entrer en compétition les protéines SR, hTra2b et entrainer l'excision de l'exon 7 dans la majorité des transcrits SMN2. D'après (Kashima and Manley, 2003)

L'origine du phénotype de la maladie est, dans 95% des cas, une délétion homozygote de l'exon 7 du gène *SMN1*. Le reste des individus (5%) présentent des mutations intra-géniques dans l'exon 2a, l'exon 3 ainsi que l'exon 6 du gène SMN1 (Sun et al., 2005). La perte de fonction du gène *SMN1* entraine un déficit en protéine SMN que le gène *SMN2* ne parvient pas à compenser puisque seulement 10% des transcrits aboutissent à la traduction d'une protéine SMN stable et fonctionnelle.

1.4.2. Les gènes NAIP et p44

Dans la même région chromosomique que les gènes SMN, il existe deux autres gènes NAIP et P44 qui pourraient intervenir dans la modulation de la sévérité de l'amyotrophie spinale.

Le gène NAIP est initialement appelé « Neuronal Apoptosis Inhbitor Protein » car il a été impliqué dans la protection des neurones de la mort cellulaire. Il interagit avec une protéine senseur du calcium pour limiter l'activation des voies d'apoptose (Mercer et al., 2000). Il est ensuite renommé « NLR family, apoptosis inhibitory protein » pour son implication dans d'autres types de cellules comme les macrophages (Ting et al., 2008). Une grande proportion de patients SMA de type I possède une délétion d'une grande partie de la région 5q11.2-q13.3 qui emporte également le gène NAIP.

Le gène p44 code pour une sous-unité facteur de transcription TFIIH qui intervient dans le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Le gène est dupliqué dans la région 5q11 du chromosome 5 et les protéines issues des deux gènes (p44t et p44c) ont 3 acides aminés de différences. Les patients atteints d'amyotrophie spinale de type I présentent souvent une délétion du gène codant la protéine p44t mais la formation du facteur de transcription ou bien son activité de réparation de l'ADN ne semble pas être affectée, suggérant que le gène p44t n'est pas essentiel au développement de la pathologie (Bürglen et al., 1997).

1.4.3. Les porteurs sains

L'amyotrophie spinale est une maladie récessive, ce qui implique que de nombreux individus sont porteurs de l'allèle muté mais en raison de la présence d'un allèle sain, ils ne déclarent pas la maladie.

Il existe plusieurs types de configurations génétiques permettant d'être porteur sain. Le cas le plus fréquent est le « 1+0 », les individus possèdent un allèle sain et un allèle muté. Une catégorie moins représentée est « 2+0 », il existe deux copies du gène sain sur un même allèle, sur l'autre, le gène SMN1 est muté. Enfin, deux autres cas nettement plus rares peuvent se présenter, le « $1+1^{D}$ » et « $2+1^{D}$ ». Les individus possèdent une ou deux copies de SMN non muté sur un allèle, et sur l'autre, le gène est présent non fonctionnel en raison d'une mutation ponctuelle ou une micro délétion (Dietschy and Turley, 2004; Verhaart et al., 2017). Les porteurs sains ne déclarent pas de symptômes mais certaines études ont rapporté que des individus porteurs d'un nombre anormal de copies de SMN1 ou bien de délétions du gène SMN2 présentent des risques accrus de déclarer une sclérose latérale amyotrophique (SLA) sporadique. Cependant, les mécanismes impliqués n'ont pas été élucidés (Butchbach, 2016).

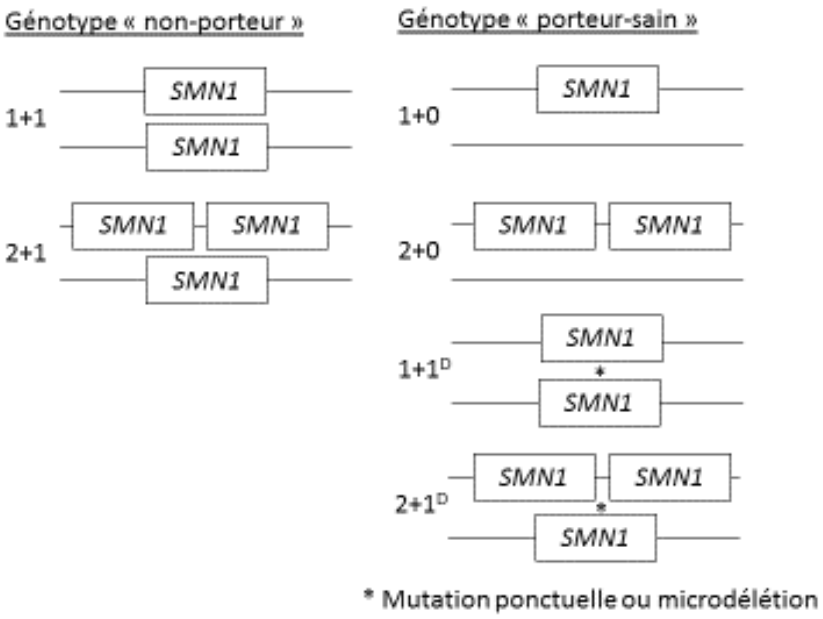


Figure 5: Les différentes configurations génétiques des porteurs sains et non-porteurs de la maladie. Les porteurs sains peuvent présenter une délétion du gène SMN sur un allèle uniquement (1+0), la présence de deux copies SMN1 sur un allèle seulement (2+0), une ou deux copies du gène SMN1 sur un allèle et une mutation ponctuelle sur le gène SMN1 de l'autre allèle. D'après (Verhaart et al., 2017)

1.4.4. Les promoteurs de SMN

Les promoteurs des gènes SMN1 et SMN2 possèdent des séquences très similaires et leurs activités sont quasi-identiques (Monani et al., 1999). Ils se trouvent 4.6 kb en amont du 5' des régions des gènes SMN. Il existe sur ces promoteurs des sites de liaisons aux facteurs de transcriptions CREB (c-AMP-Response-Element-Binding-protein) et aux interférons, tous deux capables de moduler l'expression des gènes SMN (Baron-Delage et al., 2000).

1.4.5. L'origine des différences de sévérité de la maladie

Les patients ayant une mutation du gène SMN1, ne possèdent comme seule source de production de protéine SMN que le gène SMN2 qui produit majoritairement des protéines SMN tronquées (SMN∆7) qui sont rapidement dégradées. Cependant, il est avéré que plus un patient possède un grand nombre de copies de ce gène moins la sévérité de la maladie est importante.

Généralement, les patients atteints des formes les plus sévères de SMA possèdent peu de copies du gène SMN2. En 2002, Harada et coll. montrent que sur la cohorte de patient

étudiée, tous les patients de SMA de type II et III possédaient 3 copies ou plus alors que les patients atteints de SMA de type I n'en possédaient que une ou deux (Harada et al., 2002). Cependant, cette corrélation n'explique pas tous les phénotypes. Dans certains cas, des personnes possèdent 4 copies de SMN2 et déclarent tout de même la maladie, tandis que des personnes avec une mutation homologue du gène SMN1 et qui ne possèdent que 2 copies du gène SMN2 ne présentent pas de signes cliniques. C'est donc qu'il existe d'autres mécanismes qui modulent la sévérité de la maladie (Harada et al., 2002).

Toutes les copies du gène SMN2 ne sont pas équivalentes d'un individu à l'autre. Certains patients présentent une substitution d'une cytosine pour une guanidine dans l'exon 7 du gène SMN2 qui permet de créer un nouvel ESE. Comme décrit précédemment, l'ESE va permettre d'augmenter le taux d'inclusion de cet exon dans les transcrits provenant du gène SMN2 et donc la proportion de protéine SMN stable par rapport à la protéine SMNΔ7 (Prior et al., 2009).

De nombreux cas de conversion génique de SMN1 en SMN2 chez des patients de type III ou IV ont été rapportés. Pour ces individus, ce n'est pas la mutation dans l'exon 7 du gène SMN1 qui est responsable de la maladie mais le changement de SMN1 en SMN2 et sa faible production de protéine SMN fonctionnelle. Les patients originaires d'Afrique du Sud sont particulièrement touchés par ce phénomène (Labrum et al., 2007).

1.5. La protéine SMN

L'importance de la protéine SMN a été découverte avec l'impact des mutations causant l'ASI. Il y a un lien entre la quantité de protéine produite et la sévérité de la maladie. Chez les patients atteints des formes sévères, la réduction d'expression s'élève à 80-95% par rapport à des patients sains tandis que chez les patients de type II cette diminution se situe entre 30% et 80% dans des cellules lymphoïdes. Par ailleurs, on retrouve des taux de protéine SMN quasi-normaux pour les personnes atteinte d'un type 3 (Lefebvre et al., 1997).

1.5.1. Structure de la protéine SMN

Il s'agit d'une protéine de 294 acides aminés pour une taille de 38kDa et qui ne présente pas d'homologie avec d'autres protéines connues à ce jour. Elle possède un domaine d'interaction avec la protéine Gemin 2 du côté N-Terminal suivi d'un domaine riche en lysine qui participe à la liaison avec les acides nucléiques (Liu et al., 1997; Lorson and Androphy,

Figure 6: Structure de la protéine SMN et ses différents domaines d'interaction (Singh et al., 2017). En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

1998). L'exon 3 code pour un domaine tudor impliqué dans l'interaction avec des protéines possédant les motifs RGG/RG telles que la Fibrinarin, hnRNP Q, hnRNP R ou encore les

protéines Sm participant à la formation du complexe SMN (Pellizzoni et al., 2001; Rossoll et al., 2002; Sabra et al., 2013; Shafey et al., 2010). Les 16 derniers acides aminés codés par l'exon 7 ainsi que le motif tyrosine glycine codé par l'exon 6 facilitent l'oligomérisation de la protéine. En absence d'exon 7, l'homodimérisation ne se fait plus correctement, la protéine est très instable et n'est pas correctement adressée dans les différents compartiments cellulaires (Lorson et al., 1998; Narayanan et al., 2004). Il existe un domaine particulièrement conservé au cours de l'évolution en C-Terminal de la protéine qui participe à la liaison de la protéine à l'ARN et qui est retrouvé dans d'autres espèces comme la levure, le poisson-zèbre ou encore la souris suggérant l'importance de cette structure.

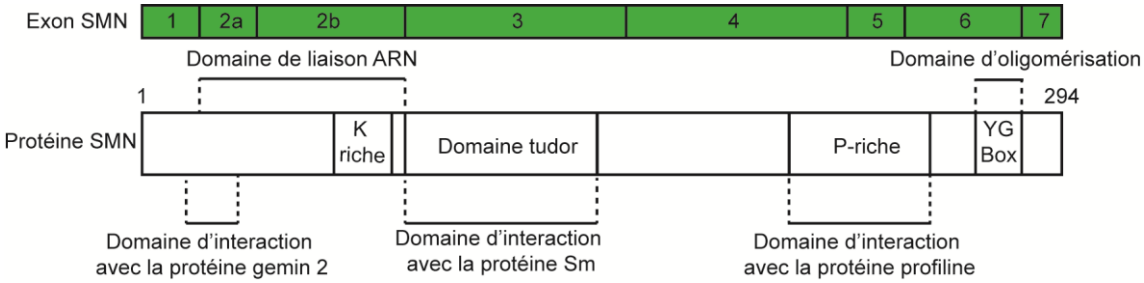


Figure 7: Structure de la protéine SMN et des différentes régions codées par les exons. Les exons 2a et 2b codent pour un domaine d'interaction avec les ARN, l'exon 3 code pour un domaine d'interaction avec la protéine sm. Les exons 6 et 7 codent pour le domaine d'oligomérisation de la protéine SMN. D'après (Singh et al., 2017)

Les régions codées par les exons 2a/2b, 4 et 6 de la protéine SMN interagissent entre elles et permettent la formation d'un homodimère. Elle est également capable de former un oligomère en liant deux domaines d'associations codées par les exons 2b et 6 (Young et al., 2000a).

Figure 8: Modèle de la formation d'un homodimère ou d'un oligomère de la protéine SMN. (a) Formation d'un dimère entre deux protéines SMN s'associant grâce à l'interaction entre les exons 2b et 6. (b) Formation d'un oligomère en associant plusieurs dimères SMN (Young 2000). En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

La protéine SMN possède plusieurs isoformes, principalement issues de l'épissage du gène SMN1. Les transcrits de forme complète, contenant les exons alternatifs 3, 5 et 7, représentent la majorité des transcrits produits par le gène SMN1.

L'isoforme SMN∆7 traduite à partir des transcrits provenant majoritairement du gène SMN2 est tronquée pour le domaine d'oligomérisation codé par l'exon 7, ce qui la rend instable. Il a été démontré qu'in vitro, la protéine SMN∆7 a une durée de vie deux fois plus courte que la protéine SMN de taille complète car elle est rapidement adressée au

protéasome (Burnett et al., 2009). Bien que SMNΔ7 ne soit pas capable d'assurer le même niveau de fonctionnalité que la protéine complète, des arguments semblent indiquer un rôle de cette isoforme dans la modulation de la sévérité (Le et al., 2005). Croiser des souris modèles d'une ASI sévère, et donc avec une très faible quantité de protéine SMN fonctionnelle, avec des souris surexprimant la forme SMNΔ7 permet d'augmenter leur durée de vie. En effet, alors que le modèle sévère a une durée de vie de 5,2 jours en moyenne, elle passe à 13,3 jours lorsque les souris expriment une quantité plus importante de protéine SMNΔ7. Ainsi, augmenter la quantité de protéine SMNΔ7 produite dans un modèle sévère d'ASI permet de suffit à diminuer la sévérité (Le et al., 2005). L'un des mécanismes proposés pour expliquer ce phénomène est la faible capacité de la protéine SMNΔ7 à s'associer avec la protéine complète SMN Full-Length (SMN-FL) pour former un oligomère SMN-FL/ SMNΔ7 ce qui permet de stabiliser SMNΔ7. Ainsi, l'expression de l'isoforme SMNΔ7 augmente la quantité d'oligomères SMN qui assurent la fonction de SMN. Par conséquent, le gène SMN2 parvient à diminuer la sévérité du phénotype de l'ASI en augmentant la quantité de protéines SMN-FL et SMNΔ7 produite et leur fonctionnalité (Le et al., 2005).

Setola et coll. ont identifié une isoforme nommée a-SMN encodée uniquement par les exons 1 à 3 du transcrit SMN en raison de la présence d'un codon stop dans l'intron 3. Cette isoforme est retrouvée spécifiquement dans les axones des motoneurones pendant les phases de développement puis son expression diminue à l'âge adulte chez le rat. La surexpression de la protéine a-SMN dans des cellules NSC34 stimule l'axogénèse (Burghes, 2008; Setola et al., 2007). Une autre étude a démontré que la demi-vie de cette protéine est deux fois moins importante que celle de la protéine SMN de taille complète, probablement en raison de l'absence d'une partie du domaine d'oligomérisation de la protéine codé par l'exon 7 (Locatelli et al., 2015).

Récemment une isoforme, SMN6B a été mise en évidence. Un nouvel exon 6B est généré par exonisation d'une séquence intronique Alu-like des transcrits SMN dans des conditions de stress cellulaire. La protéine résultante est plus stable que la protéine SMNΔ7 et est localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau (Seo et al., 2016).

Figure 9: Représentation des différents transcrits générés depuis les gènes SMN. Le transcrit SMNΔ7 produit majoritairement par le gène SMN2, le transcrit a-SMN contenant les exons 1 à 3 en raison de la présence d'un codon stop dans l'intron 3 et le transcrit SMN6B généré par la transformation d'un intron en exon et contenant un codon stop après l'exon 6 (Singh et al., 2017). En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

La fonction et l'expression des isoformes de la protéine SMN issues de l'épissage des exons alternatifs 3 et 5 restent, pour l'heure, peu connues.

1.5.2. Expression et localisation de la protéine SMN

La protéine SMN a une expression ubiquitaire, elle est retrouvée dans le foie, les reins, le tissu nerveux, etc…Cependant, elle est présente en quantité importante dans la moelle épinière et le tissu musculaire (Battaglia et al., 1997). L'expression de la protéine SMN n'est pas constante au cours du développement. Bien qu'elle varie selon les tissus, elle est fortement exprimée durant la période embryonnaire puis diminue progressivement de la naissance jusqu'à l'âge adulte (Gabanella et al., 2005). Les motoneurones sont les cellules qui expriment le plus fortement la protéine même après la naissance suggérant un rôle crucial pour leur croissance mais surtout le maintien de ces cellules au cours du temps.
Dans la moelle épinière de patients atteints de formes sévères d'ASI, on peut mesurer une quantité de protéine SMN de l'ordre de cent fois inférieure à celle d'une personne saine.

Bien que l'abondance de la protéine SMN dans les compartiments subcellulaires soit dépendante du type de cellule (Zhang et al., 2007), la protéine est majoritairement localisée dans le cytoplasme péri-nucléaire et dans le noyau. Dans certains types cellulaires tels que les neurones, la protéine SMN peut être particulièrement localisée dans des granules des cônes de croissance axonaux ou encore à la jonction neuromusculaire (Kariya et al., 2014; Setola et al., 2007).

Dans le noyau, on retrouve la protéine SMN dans des structures particulières appelée gems « gemini of coiled bodies » (Liu and Dreyfuss, 1996). Les gems font entre 0.1 et 1µm de diamètre et sont assemblés et désassemblés pendant les phases du cycle cellulaire. Ils contiennent les composants du complexe SMN et serviraient de lieu de stockage de la protéine SMN nécessaire lors des étapes d'assemblage du splicéosome (Young et al., 2000b). Dans les motoneurones de la moelle épinière de patients, les gems co-localisent avec une autre structure nucléaire : les corps de Cajal (CB) (Young et al., 2001).

Figure 10: Localisation subcellulaire de la protéine SMN. (A) Localisation de la protéine SMN par immunofluorescence (B) Les gems sont les structures denses pointées par les flèches noires (Liu and Dreyfuss, 1996). En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

On retrouve dans le noyau des structures apparentées aux gems nommées corps de Cajal (CB), qui sont riches en ribonucleoprotéines (RNPs) importées depuis le cytoplasme (Renvoisé et al., 2012) et dans lesquelles on détecte également la protéine SMN. La protéine WRAP53 favorise la translocation de SMN à travers la cellulaire. Après avoir lié la protéine SMN dans le cytoplasme, WRAP53 entraine son transport dans le noyau puis son adressage

aux CBs en facilitant l'interaction de SMN avec la protéine Coilin exprimée spécifiquement dans les CB (Mahmoudi et al., 2010). Cette structure nucléaire est majoritairement impliquée dans la maturation, le stockage et le transport des snRNPs.

Figure 11: (G) Co-localisation de la protéine SMN avec la protéine P80 coilin dans des cellules COS. (H) Co-localisation de la protéine SMN avec la protéine Gemin 2 (Renvoisé et al., 2006)
En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Dans des fibroblastes de patients ASI, une diminution du nombre de gems dans le noyau est corrélée avec la sévérité de la maladie (Coovert et al., 1997). Une déplétion en protéine SMN telle que l'on peut observer chez les patients ASI est proportionnelle à une diminution de la quantité de ces corps nucléaires qui nécessitent la présence de la protéine pour se former. Ce n'est pas le cas pour les CB, qui sont présents de le noyau de cellules de patient ASI de type 1 n'exprimant que très peu de protéine SMN (Young et al., 2000b).

1.5.3. Fonctions de la protéine SMN

Le rôle le mieux décrit de la protéine SMN est sa participation dans le métabolisme des ARN. Cependant la protéine SMN ne participe pas seule à ces processus, elle s'associe avec plusieurs protéines pour former le complexe SMN.

Le complexe SMN est composé d'oligomères de protéines SMN, des protéines gemins 2 à 7 et de la protéine Unrip (Kolb et al., 2007). Les gemins et SMN co-localisent dans le cytoplasme tandis que seule gemin 4 co-localise avec SMN dans le noyau au niveau des gems d'où provient leur nomenclature (Charroux et al., 2000). Les gemins 2, 3, 5 et 7 interagissent directement avec SMN alors que les gemins 4 et 6 interagissent indirectement par leur liaison aux gemins 3 et 7 respectivement. Le complexe SMN est très stable et est essentiel pour l'ensemble des cellules. Il est principalement impliqué dans l'assemblage des composants du spliceosome (Pellizzoni et al., 2001). Cependant, d'autres fonctions lui sont également associées comme la transcription ou l'épissage des ARN.

Figure 12 : Représentation du complexe SMN. La protéine SMN interagit directement avec les gemins 2,3,5 et 7 et indirectement avec les gemins 4 et 6 (Gubitz et al., 2004).
En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

1.5.3.1. Assemblage des snRNP

L'assemblage des composants du splicéosome est la fonction la plus étudiée de la protéine SMN. Les spliceosomes sont de gros complexes multi-protéiques assemblés dans le

cytoplasme qui migrent dans le noyau pour se fixer aux ARN messagers et assurer leur épissage. Ils sont composés de small nuclear ribonucleoproteins (snRNP), eux-même rassemblant des petits ARN pré messagers, les small nuclear RNA (snRNA) U1, U2, U4/6 et U5 et un anneau de protéine Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F et G).

Figure 13: Fonction de SMN dans l'assemblage des snRNP. Dans le cytoplasme, 7 protéines Sm sont assemblées (a) et associé au complexe SMN (b). Dans le noyau, les snRNA sont transcrits puis liés au complexe d'export pour ensuite rejoindre le cytoplasme (c). Le complexe SMN associe les protéines Sm avec le snRNA pour former un snRNP (d) qui est ensuite hyperméthylé sur une guanosine du snRNA ce qui induit son import dans le noyau où il rejoint les corps de cajal pour subir une dernière étape de maturation (e) (Burghes and Beattie, 2009). En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

C'est dans le noyau que les gènes codant pour les snRNA sont transcrits par la polymérase II puis ils subissent une méthylation en 5' (m^7G-cap) et la partie 3 ' de l'ARN est clivée, générant un pre-snRNA (Figure 13 c). Un complexe d'export composé des protéines CBP120, CPB80, PHAX, Xpo et RanGTP va ensuite transporter cet ARN dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, le complexe d'export est désassemblé et la protéine gemin5 du complexe SMN reconnait un site spécifique du pre-snRNA et l'associe avec l'anneau de protéine Sm (Figure 13 d). Chaque snRNP est formé à partir d'un seul snRNA pour U1, U2 et U5 ou de deux snRNA pour U4/6 ainsi que de 7 protéines Sm. Survient ensuite une étape d'hyperméthylation du m^7G-cap par TGS1. Cet ensemble ARN-protéine est adressé au noyau grâce à l'hyperméthylation et aux protéines Sm qui servent de signal de localisation nucléaire. Cet import est notamment facilité par les protéines Importin-β et WRAP53 qui vont également permettre au complexe de rejoindre les corps de Cajal pour subir la dernière étape de maturation (Figure 13 e) (Singh et al., 2017). Les snRNP interviennent notamment dans la reconnaissance de sites introniques d'épissage des d'ARN pré-messagers et participe avec le splicéosome à l'excision des introns pour former les ARNm matures.

1.5.3.2. Transport des ARNm et remodelage du cytosquelette

La protéine SMN intervient dans la croissance axonale en modulant le trafic des ARN messagers. En s'associant avec hnRNP R, la protéine contribue à la localisation des ARN messagers de la β-actine dans les cônes de croissance (Rossoll et al., 2003). D'autre part, SMN participerait à l'ancrage de ribosomes inactifs à la membrane au niveau de domaines riches en cavéolines. Lors des phases de remodellage du cytosquelette, il semblerait que la protéine SMN participe à la libération des ribosomes séquestrés qui pourront assurer la traduction locale de protéines du cytosquelette comme l'actine favorisant ainsi le développement des protusions membranaires (Gabanella et al., 2016).

1.5.3.3. Transcription

La protéine SMN est capable de lier plusieurs molécules qui modulent l'activité transcriptomique. En effet, SMN interagit avec le domaine carboxiterminal de l'ARN polymérase II, suggérant son rôle potentiel dans l'initiation, l'élongation ou la terminaison de la transcription (Li et al., 2014). De plus, SMN lie la protéine P53 qui est un facteur de transcription possédant plusieurs domaines de liaison à l'ADN pour former un complexe qui co-localise dans le noyau dans les gems (Young et al., 2002). L'expression d'un mutant de SMN entraine une inhibition de la transcription mais également une accumulation des partenaires de SMN dans les CB et les gems (Li et al., 2014). Ces données indiqueraient donc une implication de la protéine avec la machinerie de transcription et post-transcriptionnelle.

1.5.3.4. Apoptose

Il a été mis en évidence que la protéine SMN est capable de lier deux protéines participant aux processus apoptotiques : Bcl-2 (B-cell leukemia oncogen-2) et P53, mentionné précédemment. Iwahasi et coll. ont démontré qu'une co-expression de SMN et Bcl-2 permet de lutter efficacement contre l'apoptose. La forme SMN∆7 n'a pas la même synergie dans la modulation de l'apoptose et agit comme un dominant négatif sur la forme complète de SMN (Iwahashi et al., 1997). La protéine SMN lie P53 grâce à un domaine codé par l'exon 2, les deux protéines co-localisent dans les CBs en cas d'activation de P53. Dans un contexte d'ASI, la faible quantité de protéine SMN empêcherait la séquestration de P53 par SMN dans les CBs. P53 est alors présent de manière plus importante dans le nucléoplasme et déclencherait son activité pro-apoptotique, ce qui constituerait une mécanisme potentiel de la mort des motoneurones (Young et al., 2002).

1.6. Animaux modèles de l'amyotrophie spinale

Bien que restrictifs et souvent assez éloignés de l'homme d'un point de vue phylogénique, la création de modèles animaux qui miment l'amyotrophie spinale a été nécessaire pour étudier la maladie car il n'existe pas de mutation spontanée du gène SMN chez les animaux.

1.6.1. Les modèles murins

Les souris ne possèdent qu'un seul gène Survival Motor Neuron, apparenté à Smn1, sur le chromosome 13 et la délétion de celui-ci entraine une mort cellulaire au stade blastocyste du développement (Schrank et al., 1997). La fonction de la protéine SMN murine est essentielle puisqu'une invalidation neuronale ou musculaire entraine respectivement une mort des motoneurones ou une nécrose des tissus avec paralysie (Forss-Petter et al., 1990; Iyer et al., 2015).

1.6.1.1. Les modèles « Taïwanais »

Le premier modèle murin a été créé par le Dr. Hung Li en 2000 (Hsieh-Li et al., 2000). Les souris sont invalidées génétiquement pour l'exon 7 du gène *Smn* murin par intégration d'une cassette Hypaxanthine Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) dans la séquence du gène. Les souris homozygotes pour cette invalidation (*Smn* Δ7/Δ7) meurent avant la naissance à des stades très précoces du développement (E3.5 et E6.5). Pour modéliser la maladie, un transgène correspondant à une région du génome humain de 115kb contenant le gène *SMN2* complet ainsi que ces régions avoisinantes ont été intégrés dans le génome des souris invalidées pour l'exon 7 du gène Smn murin (*Smn* Δ7/Δ7, *SMN2*). Les souris hétérozygotes pour l'invalidation de l'exon 7 (*Smn* Δ7/+, *SMN2*) ne présentent pas de signes cliniques.

A partir de ce modèle murin, il est possible d'obtenir des formes plus ou moins sévères en variant, par croisement, le nombre de copies du transgène humain (Hsieh-Li et al., 2000). Les souris qui ne possèdent que 2 copies du transgène *SMN2* miment une ASI de type 2 ; et celles qui en possèdent 3 ou plus, une ASI de type 3. La durée de vie des animaux mimant l'amyotrophie de type 2 ont une durée de vie d'environ 13 jours et présentent des symptômes et atteinte neuronale similaire aux patients ASI type 2.

Figure 14: Phénotypes des souris mimant une ASI. b) Souris ASI de type 2 (droite) et contrôle (gauche). c) nécrose de la queue de souris ASI de type 3 (gauche). d) Souris ASI de type 3 (haut) et contrôle (bas) En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Les moelles épinières des souris mimant l'ASI de type 2 présentent une forte perte des motoneurones de large diamètre dans la corne antérieure. De plus, l'expression de la protéine SMN est fortement réduite dans ces cellules. Les muscles présentent également une diminution du diamètre des fibres musculaires ainsi qu'une atrophie des faisceaux musculaires. Les souris qui miment une ASI de type 3, développent une nécrose de la queue imputée à un défaut de vascularisation et une hypoxie locale (Hsieh-Li et al., 2000).

1.6.1.2. Les modèles « américains »

Les souris de ce modèle sont invalidées pour l'exon 2 du gène *Smn* murin. Ceci a pour conséquence l'absence totale de protéine produite par ce gène. Dans ce modèle, le transgène humain SMN2 a été inséré en entier avec son promoteur (Monani et al., 2000). Deux types de sévérité ont été créés, la première pour les souris qui possèdent entre une et deux copies du transgène humain et l'autre moins sévère qui en possèdent 8. Le modèle le plus sévère a une durée de vie de 1 à 3 jours en moyenne, les souris sont plus petites que les contrôles et présentent une perte de 35% des motoneurones spinaux. Le modèle moins sévère est

caractérisé par un phénotype similaire à celui des souris contrôles, sans perte de motoneurones spinaux (Monani et al., 2000).

1.6.1.3. Les modèles issus de la stratégie Cre-LoxP

Dans ce modèle murin, l'exon 7 du gène murin *Smn* est entouré de deux séquences LoxP. L'enzyme Cre est exprimée sous le contrôle d'un promoteur spécifique permettant de réaliser cette délétion uniquement dans certains types cellulaires. Dans le cas d'une expression de la Cre sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire comme le cytomégalovirus, les souris homozygotes $Smn^{\Delta 7/\Delta 7}$ issues de cette technique meurent très tôt dans leur développement à E9 (Frugier et al., 2000).

En croisant des souris contenant les séquences LoxP entourant l'exon 7 du gène *Smn* avec des souris exprimant l'enzyme Cre sous le contrôle du promoteur neuronal de l'énolase, on obtient des souris qui présentent une durée de vie moyenne de 25 jours. Elles sont atteintes de déficits moteurs et de tremblements associés à des atrophies musculaires mais sans mort des motoneurones, suggérant l'importance de l'environnement cellulaire pour la survie de ces cellules (Forss-Petter et al., 1990).

Dans le modèle murin $Smn^{-/-}$; $SMN2^{+/+}$; $SMN\Delta 7^{+/+}$ (Le et al., 2005), McGovern et all, ont diminué ou restauré l'expression de la protéine SMN dans les motoneurones en utilisant le système Cre-LoxP. Pour diminuer l'expression de SMN, les auteurs ont utilisé une séquence du gène Smn (*Smn*F7 sur la Figure 15) dont l'exon 7 est entouré de deux sites LoxP. Sous l'action de l'enzyme Cre, l'exon 7 est excisé (SmnD7 sur la Figure 15) aboutissant à la production d'une protéine SMNΔ7. Pour restaurer l'expression de la protéine SMN, une cassette comprenant l'exon 7 humain (IN6-EX7-IN7 sur la Figure 15) codant une protéine SMN tronquée est fusionnée avec une séquence inversée de l'exon 7 murin (in6-ex7-in7 sur la Figure 15) codant une protéine SMN fonctionnelle. Ces deux cassettes sont insérées dans un allèle du gène *Smn* murin. Si l'enzyme Cre n'est pas exprimée, le gène code pour une protéine tronquée et peur fonctionnelle. Lors de la recombinaison homologue par l'enzyme Cre, la cassette entière est inversée (SmnRe sur la Figure 15) permettant le transcription du gène codant la séquence in6-ex7-in7 murine et l'expression de la protéine SMN fonctionnelle (McGovern et al., 2015).

Figure 15: Construction génétiques permettant la réduction ou l'augmentation de l'expression de la protéine SMN. La délétion de l'exon 7 est assuré par le clivage des sites Loxp entourant l'exon 7 dans le transcrit SMNF7 par la Cre. Le remplacement de SMN est assuré par l'inversion de la cassette « IN6-EX7-IN7 » humaine codant une protéine SMN tronquée par la cassette « inv-ex7-in7 » murine codant pour une protéine SMN fonctionnelle suite à la l'action de la Cre (McGovern et al., 2015) En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Alors que la déplétion en protéine SMN dans les motoneurones induit une perte de la fonction de l'unité motrice, sa restauration permet de la protéger. Cependant la protection des motoneurones uniquement n'est pas suffisante pour augmenter la survie des animaux. Des expériences consistant à augmenter l'expression de la protéine SMN dans les motoneurones (sous le contrôle des promoteurs de la Choline AcetylTransferase), les cellules gliales et les neurones (sous le contrôle du promoteur de la Nestine) a permis d'augmenter considérablement la survie des animaux, voire de les sauver puisque 30% des souris ont dépassé les 100 jours de survie (McGovern et al., 2015). Les auteurs supposent que la restauration de SMN dans le système nerveux autonome par le promoteur de la Nestine permet de protéger les neurones innervant les muscles cardiaques connus pour être altérés dans les modèles murins d'ASI (Biondi et al., 2012; Heier et al., 2010). D'autre part, restorer l'expression de SMN dans les astrocytes est bénéfique pour les souris modèles d'ASI, ce type cellulaire semble donc jouer un rôle majeur dans la modulation du phénotype.

Le système Cre/LoxP a également été utilisé pour étudier le rôle de la protéine SMN dans le muscle. Dans un modèle murin *Smn* $^{\Delta 7/\Delta 7}$ et contenant plusieurs copies du transgène humain SMN2, des chercheurs ont également aboli l'expression du gène Smn uniquement dans le muscle. Le déficit important de protéine SMN dans le muscle n'a pas eu d'effet sur la physiologie de l'animal ou sur les fibres musculaires. Par ailleurs, une restauration de l'expression de SMN uniquement dans le muscle n'a pas d'effet sur la survie des souris. Ces données suggèrent que chez les souris modèles ASI, la faible quantité de protéine SMN produite par le gène *SMN2* suffit à maintenir l'intégrité du muscle (Iyer et al., 2015).

1.6.2. Les autres modèles animaux

1.6.2.1. Caenorhabditis elegans

Le nématode C. Elegans ne possède qu'un seul gène orthologue à *SMN*, smn-1, avec lequel il partage 36% de ressemblance *(Babin et al., 2014)*. Un siARN contre le gène smn-1 est létal suggérant le rôle crucial, de même que chez l'homme, de la protéine SMN pour le ver (Miguel-Aliaga et al., 1999).

Ce modèle a été utilisé notamment pour identifier des gènes susceptibles de pouvoir moduler le phénotype des C.Elegans déficients pour smn-1. C'est le cas du Riluzole qui, en activant les canaux potassiques sensibles aux concentrations de calcium, améliorent les fonctions motrices chez le nématode (Dimitriadi et al., 2013).

1.6.2.2. La drosophile

De même que chez C.Elegans, la drosophile ne possède qu'un orthologue au gène *SMN* avec une homologie de séquence de 41% (Miguel-Aliaga et al., 2000). La présence de la protéine SMN est également nécessaire à la viabilité de cet organisme. La drosophile est beaucoup utilisée pour étudier l'effet de différentes mutations du gène SMN sur la régulation de la fonction motrice mais aussi les éventuels partenaires impliqués dans la régulation des gènes SMN comme les membres de la voie de signalisation BMP et les impliqués dans l'endocytose (Dimitriadi et al., 2010).

Une combinaison de criblage génétique et d'analyse bioinformatique a permis d'identifier plus de 300 gènes candidats capables de modifier le phénotype de drosophiles déficientes pour la protéine SMN. Parmi ceux-là, plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des ARN, la transcription ou encore le transport des ARN (Sen et al., 2013).

1.6.2.3. Le Zebrafish

Le zebrafish ou Danio rerio est un très bon modèle d'étude pour les recherches neurobiologiques grâce à son système nerveux très proche de celui des vertébrés. De plus, on peut simplement aboutir à la création d'animaux transgéniques et leur phénotype est rapidement observable. La peau des embryons étant transparente, l'accès aux motoneurones est facilité ce qui permet de faire de l'imagerie in vivo, de l'électrophysiologie ou encore des expériences de comportement.

Le génome du zébrafish étant quasiment séquencé, de nombreuses techniques sont applicables, la transgénèse, l'activation ou l'inactivation de gènes par injection d'ARN antisens ou encore la manipulation génétique par des systèmes CRISPR-Cas. La réduction d'expression de la protéine SMN à l'aide d'oligomorpholino chez ce poisson entraine une altération du développement des axones, ce qui a pour conséquence de provoquer la mort des motoneurones (McWhorter et al., 2003). De plus, la jonction neuromusculaire est également altérée mais sans effet sur la morphologie ou le développement des muscles (Boon et al., 2009; McWhorter et al., 2003).

1.6.2.4. Les modèles cellulaires

L'étude des motoneurones est facilitée par l'utilisation des cellules souches. Il est possible de reprogrammer des cellules de patients atteints d'ASI en cellules souches pluripotentes (iPSCs) ou bien d'utiliser des cellules souches embryonnaires (hESCs), puis d'induire leur différenciation en cellules neuronales, notamment des motoneurones (Ebert et al., 2009; Frattini et al., 2015; Takahashi and Yamanaka, 2006). L'avantage des iPSCs étant qu'il est possible de les obtenir depuis des fibroblastes de la peau de patients ASI tandis que les hESCs nécessitent d'avoir recourt à des embryons fertilisés. Il a été démontré que l'on

peut produire des motoneurones crâniens ou spinaux en utilisant différentes concentrations d'une combinaison de plusieurs molécules comme Wnt, l'acide rétinoïque, le fibroblast growth factor, un inhibiteur de GSK-3 (Chir-99021) ou hedgehog (Maury et al., 2014).

Ces modèles cellulaires ont permis de démonter, entre autre, un stress oxydatif mitochondrial dans les motoneurones issus de cellules embryonnaires invalidées pour le gène *SMN1* (Zhang et al., 2013) Une autre étude suggère une activation des voies apoptotiques plus importante dans des motoneurones issus d'iPSCs de patients ASI de type 1 que chez le contrôle (Lafont et al., 2010; Sareen et al., 2012).

Figure 16: Etudes possibles et applications thérapeutiques des iPSCs de patients ASI. Des fibroblastes de patients ASI peuvent être reprogrammés pour obtenir des iPSCs. Ces cellules peuvent ensuite servir au screening de molécules thérapeutiques, à l'étude des motoneurones en induisant leur différenciation ou encore à la transplantation de cellules saines chez les patients (Frattini et al., 2015). En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

1.7. Les traitements

Depuis la découverte en 1995 du gène responsable de la maladie, beaucoup de voies thérapeutiques ont été proposées pour traiter l'amyotrophie spinale. C'est notamment le cas des thérapies géniques, cellulaire ou des molécules pharmacologiques

1.7.1. Augmenter le taux de protéine SMN

L'une des principales stratégies thérapeutiques est d'augmenter la quantité de protéine SMN de forme complète, déficiente chez les patients atteints d'amyotrophie spinale. En effet, la restauration de la fonction de SMN est l'enjeu majeur car cela permettrait de protéger les motoneurones et d'ainsi de réduire les altérations du système moteur. Pour ce faire, il existe deux possibilités : augmenter la transcription du gène SMN2 et donc la quantité totale des transcrits SMN ou bien de moduler la proportion de transcrits qui contiennent l'exon 7 et donc la quantité de protéine SMN fonctionnelle produite. Parvenir à combiner augmenter à la fois la transcription du gène SMN2 et l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN serait d'autant plus bénéfique.

1.7.1.1. Oligonucléotides modificateurs d'épissage

Les oligonucléotides antisens modificateurs d'épissage ou Splice-Switching Oligonucleotides (SSOs) sont des molécules synthétiques d'ARN non-codants qui peuvent interférer avec la machinerie d'épissage endogène. Ils sont capables d'exciser des exons d'un ARN pré-messager comme cela a été réalisé pour la maladie de Duchenne (Pires et al., 2017;

Shabanpoor et al., 2015), ou bien dans le cas de la d'ASI, d'inclure des exons dans le transcrit final. En effet, il existe une séquence ISS pour intron splicing silencer (ISS) dans l'ARN pré-messager SMN2, qui favorise l'excision de l'exon 7 des transcrit. Le SSO utilisé dans l'ASI est capable de se fixer et inhiber sur l'ISS de l'ARN *SMN2*, ce qui augmente la quantité de transcrits SMN2 matures contenant l'exon 7 et donc la quantité de protéine SMN fonctionnelle.

Figure 17 : Correction de l'épissage des transcrits SMN2 par le SSO Spinraza. L'ARN anti-sens spinraza se fixe sur l'ISS du transcrits SMN2 et réprime son activité permettant d'augmenter le taux d'inclusion de l'exon 7 dans le transcrit SMN2 final (Wan and Dreyfuss, 2017) En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Cette stratégie thérapeutique est particulièrement efficace pour les patients atteints d'amyotrophie spinale et qui possédent un grand nombre de copies du gène *SMN2*. La protéine résultante est identique à celle produite à partir du gène *SMN1*. L'efficacité des oligonucleotides antisens est prouvée d'un point de vue fonctionnel (Shabanpoor et al., 2015), cependant ils sont incapables de traverser la barrière hématoencéphalique, ce qui implique de devoir effectuer des injections répétées de la molécule dans la moelle épinière des patients.

Plusieurs essais cliniques de ce traitement ont eu lieu notamment chez des patients d'ASI de type 1 et 2 avec la molécule Spinraza (aussi appelée Isis 396443, SMN_{Rx} ou Nusinersen) démontrant son efficacité aux Etats-Unis (Essai clinique NCT02292537). Ce SSO est désormais en cours de développement en Europe pour une cohorte de patient de type I.

1.7.1.2. Les longs ARN non codants

Les ARN non-codants anti-sens sont des régulateurs naturels de l'expression de gènes codants des protéines. Ils interagissent avec des protéines comme Polycomb repressive complex-2 (PRC2) qui lient la chromatine et méthylent les histones sur la lysine 27, un répresseur de la transcription (Margueron and Reinberg, 2011). Il existe un ARN antisens non codant nommé « SMN-AS1 » issu de la région centrale de l'intron 1 des gènes SMN et qui est exprimé majoritairement au niveau neuronal. En recrutant la protéine PRC2, cet ARN antisens va réprimer la transcription des gènes SMN1 et SMN2. C'est pour cette raison que des chercheurs ont élaboré des oligonucleotides antisens ou « antisens oligonucleotides » (ASO) de SMN-AS1 qui vont dissocier PRC2 du promoteur de SMN et augmenter l'activité transcriptionelle du gène (d'Ydewalle et al., 2017). La dégradation de l'ARN antisens endogène SMN-AS1 par l'ARN antisens synthétique a permis d'augmenter l'expression des transcrits SMN2 de taille complète de plus de 50% dans le système nerveux central d'un modèle sévère de souris mimant l'ASI.

L'intérêt majeur de d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques réside aussi dans la possibilité de combiner plusieurs traitements afin de créer une synergie et ainsi enrayer d'autant plus la progression de la maladie. C'est le cas de l'utilisation conjointe des ARN

antisens ASO et des oligonucléotides modificateurs d'épissage SSOs. Les premiers vont augmenter la transcription du gène SMN2 en inhibant l'effet répresseur de SMN-AS1 tandis que les SSO vont permettre de favoriser l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN et par conséquent la quantité de protéine SMN fonctionnelle produite (d'Ydewalle et al., 2017).

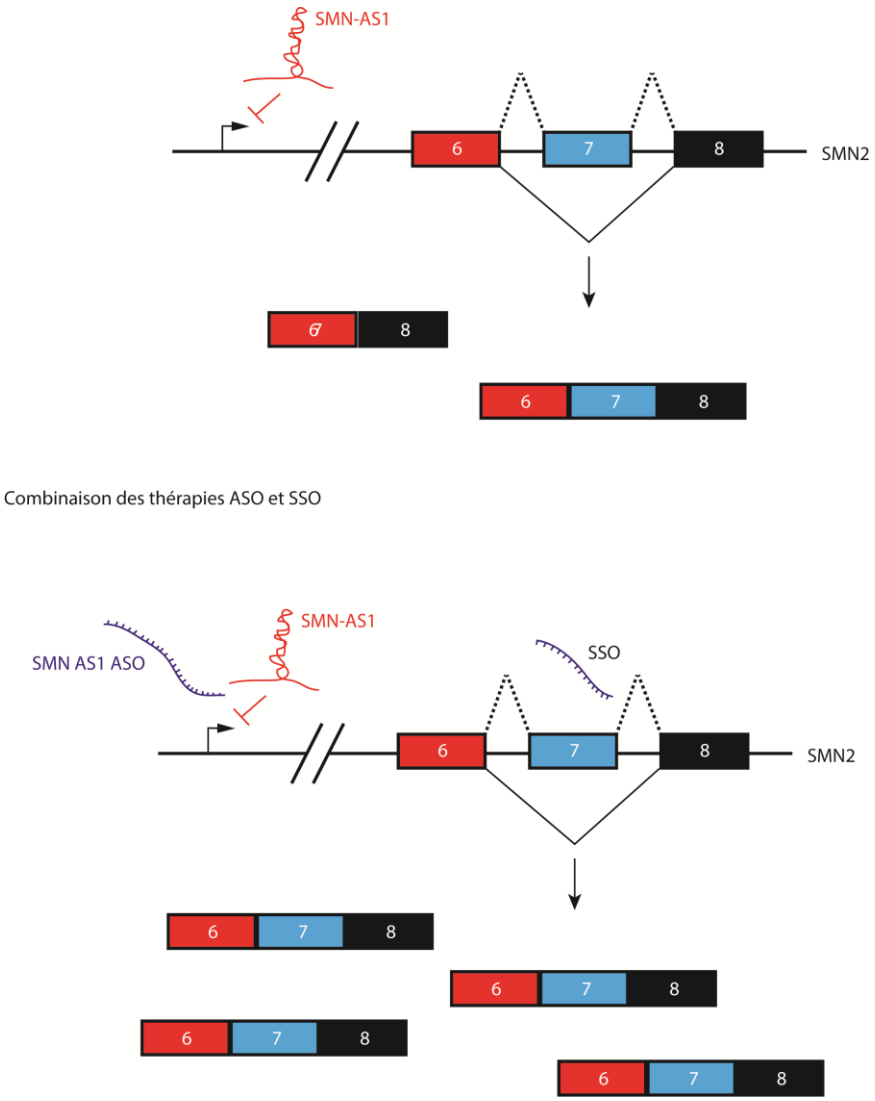


Figure 18: Thérapies des ARN anti-sens combinés avec les oligonucléotides modificateurs d'épissages. L'utilisation de l'ARN antisens (SMN AS1 ASO) permet d'inhiber la répression qu'exerce l'ARN antisens sens andogène (SMN AS1) sur la transcription du gène SMN. L'oligonucléotide modificateur d'épissage (SSO) permet d'augmenter le taux d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN. Ainsi, d'une part SMN AS1 ASO augmente le nombre de transcrits SMN et d'autre part le SSO augmente l'inclusion de l'exon 7 dans ces transcrits ce qui permet de potentialiser les effets et d'augmenter d'autant plus la quantité de protéine SMN fonctionnelle (D'après D'Ydewalle et al., 2017).

1.7.1.3. Les petites molécules

Des agents pharmacologiques capables d'augmenter la quantité de protéine SMN de forme complète ont été développés. Ils agissent par différents mécanismes comme la transactivation du promoteur de SMN2 ou bien le décalage du cadre de lecture du transcrits pour aboutir à une protéine SMN plus stable.

Les molécules qui inhibent l'activité des histones deacétylases (HDAC) sont capables d'activer la transcription. Le niveau d'acétylation des histones va moduler l'accessibilité des gènes à la transcription. Plus une séquence d'ADN sera acétylée, plus elle sera accessible à la machinerie de transcription. En 2005, Kermochan et al démontrent que HDAC 2 est capable d'interagir avec le promoteur de *SMN* et de moduler son expression (Kernochan et al., 2005). Les HDAC sont donc des cibles thérapeutiques de choix pour l'ASI.

C'est le cas du sodium phenylbutyrate (Andreassi et al., 2004), de l'acide valproic (Garbes et al., 2009) et de l'hydroxyuria (Xu et al., 2011) (Essais cliniques : NCT00485511; NCT00568698; NCT00528268; NCT00439218; NCT00439569; NCT00227266) . Cependant, bien que leur efficacité ait été démontrée dans des modèles murins, les essais cliniques se sont montrés peu encourageants avec peu voire pas d'effets bénéfiques.

D'autres molécules sont capables de modifier la lecture d'un transcrit par les ribosomes. Les aminoglycosides comme le TC007 forcent la lecture du codon stop des transcrits SMNΔ7 par les ribosomes, aboutissant à la traduction d'une protéine SMN qui contient le domaine d'oligomérisation, et donc beaucoup plus stable que celle provenant du transcrit natif. Dans un modèle murin d'ASI de sévérité intermédiaire, l'injection de la molécule TC007 directement dans le système nerveux central a induit une augmentation de l'expression de la protéine SMN, de la durée de vie et du nombre de cellules dans la partie ventrale de la moelle épinière de souris (Mattis et al., 2009). De plus, le traitement de motoneurones obtenus à partir de cellules de patients ASI avec le TC007 permet également d'augmenter la quantité de protéine SMN (Mattis et al., 2009).

D'autres composés capables d'augmenter l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN2 ont récemment été développées et ont prouvé leur efficacité chez la souris et les patients ASI. C'est le cas de la molécule SMN-C3, qui administrée oralement, permet d'augmenter la durée de vies de souris modèles d'ASI, leurs capacités motrices et le nombre de motoneurones dans la moelle épinière lombaire par rapport aux souris traitées avec la solution vehicule. Cette molécule a la particularité de pénétrer l'ensemble des tissus et d'augmenter le niveau d'expression dans l'ensemble de l'organisme. SMN-C3 serait capable d'interagir avec la strucutre primaire ou secondaire d'ARN pré-messager SMN2 ou avec des complexes ARN-protéines complexes (Naryshkin et al., 2014). Une version reformulée de la molécule par le groupe pharmaceutique Roche est actuellement en phase 2 d'essai clinique

chez des patients ASI de type 1 (FIREFISH; NCT02913482), type 2 et 3 (SUNFISH; NCT02908685) pour tester son efficacité et sa tolérance.

Une autre molécule de la famille des pyridazine, NVS-SM1, se fixe sur la structure de l'ARN pré-messager SMN2, augmente l'affinité du complexe d'épissage U1 snRNP pour la région 5' SS de l'exon 7 et induit une augmentation de son inclusion dans les transcrits SMN2. Le traitement de souris modèles d'ASI avec le composé NVS-SM1 a permis d'augmenter la durée de vie de 62% (Palacino et al., 2015). En avril 2015, un essai clinique de cette molécule a été lancé en europe mais le recrutement des patients a été intérrompu en raison d'un potentiel effet toxique du composé (NCT02268552).

La société TROPHOS a développé une nouvelle molécule appelée Olesoxime dont la structure moléculaire s'apparente à celle du cholestérol et qui induit une neuro-protection dans des modèles in vitro mais également in vivo (Bordet et al., 2007). Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas clairement identifiés, cependant il semblerait que ce composé soit capable de se fixer sur un canal ionique voltage dépendant et à une protéine de translocation (ou récepteur périphérique à la benzodiazepine). Ces deux composant modulant la perméabilité membranaire (Bordet et al., 2007). La molécule est actuellement en essai clinique de phase II pour les patients ASI de type 2 et 3 et semblerait stabiliser le déclin des fonctions motrices et l'état clinique global après un traitement sur 2 ans (OLEOS; NCT02628743)

1.7.2. Les thérapies géniques

L'ASI étant une maladie monogénique, elle est une bonne candidate pour les thérapies utilisant des vecteurs viraux remplaçant le gène manquant. Les injections de particules virales contenant le gène SMN peuvent se faire par le système vasculaire ou cérébral. Les études qui ont utilisé ce type de thérapie ont montré une neuro-protection des motoneurones à la fois dans les modèles murins mais aussi chez le primate (Passini et al., 2014).

Parmi les vecteurs viraux couramment utilisé, l'adénovirus associé 9 (AAV9) est l'un des plus efficace car il peut traverser la barrière séparant la moelle épinière de la circulation sanguine après une injection intraveineuse (Meyer et al., 2015). Ce vecteur a été choisi pour une étude dans un hôpital aux États-Unis chez des enfants atteints d'ASI de type 1 (Essai clinique NCT02122952). Cette étude consiste à injecter en intraveineux le virus contenant le gène SMN à des titrations différentes afin d'évaluer la dose la plus efficace. Les premiers résultats sont attendus pour le mois de décembre 2017.

1.7.3. Les thérapies cellulaires

Outre la modulation de la quantité de protéine SMN présente chez les patients, une autre approche thérapeutique consiste à protéger les motoneurones de la mort cellulaire.

La transplantation de cellules souches pour restaurer la perte de cellules neuronales ou bien apporter des facteurs neuro-protecteurs constituent une autre approche de traitement pour l'ASI. L'une des méthodes consiste à recueillir des cellules souches depuis la moelle épinière d'un individu sain et de les implanter dans l'hôte malade. Les cellules vont ensuite migrer dans le parenchyme et se différenciern notamment en motoneurones sous l'influence des facteurs de différenciation présents dans le tissu. Cette manipulation est efficace chez souris, augmentant de manière significative la durée de vie et les capacités motrices (Corti et al., 2008). Cependant, son application chez l'homme est difficilement envisageable en raison du caractère invasif d'un prélèvement de cellules souches dans la moelle épinière. Afin de contourner ce problème, une autre approche consiste à utiliser des cellules somatiques reprogrammées génétiquement pour donner des cellules souches pluripotentes qui sont transplantées dans la moelle épinière (Wichterle et al., 2002). En revanche, ce type de procédé nécessiterait un traitement immuno-supresseur pour éviter tout rejet du greffon. Ce type de thérapie n'a cependant pas encore été encore approuvé par la FDA.

1.8. Les recherches du laboratoire sur l'exercice physique et l'amyotrophie spinale infantile

Mon laboratoire d'accueil s'est intéressé aux effets de l'exercice physique dans un contexte d'ASI (Grondard, 2005). Des études ont démontré les effets bénéfiques de l'exercice sur les maladies neurodégénératives et en particulier sur une maladie neuromusculaire comme la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Kirkinezos et al., 2003; Mahoney et al., 2004) mais aucune étude n'avait été réalisée pour l'ASI. Le modèle murin « Taiwanais» mimant une ASI de type 2 (Hsieh-Li et al., 2000) a été utilisé pour réaliser un protocole d'exercice de course en roue. Ce protocole d'entrainement physique a permis d'augmenter la durée de vie des souris de 57,3%, la prise de poids et un gain des capacités motrices observées dans l'open field et les expériences de grip test (Grondard, 2005). De plus, les souris ASI entrainées présentent une augmentation du nombre de motoneurones dans la corne ventrale de la moelle épinière des en comparaison des souris sédentaires. Les effets neuroprotecteurs observés sont associés à une augmentation du taux d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits issus du gène *SMN2*.

Par la suite, une autre étude du laboratoire visant à évaluer les bénéfices de différents protocoles d'exercice physique a démontré que soumettre un modèle murin de ASI de type 3 à des exercices de nage ou de course pendant 10 mois permettait d'induire une neuro-

protection des motoneurones, d'augmenter l'excitabilité neuromusculaire et de diminuer la fatigue musculaire sans modification du niveau d'expression de la protéine SMN (Chali et al., 2016).

L'ensemble des résultats obtenus au laboratoire concernant les effets bénéfiques de l'exercice physique dans un contexte d'ASI (Biondi et al., 2008; Chali et al., 2016; Grondard, 2005) ont permis de démarrer une étude clinique (NCT02061189) qui a deux objectifs. Premièrement, évaluer les effets bénéfiques de la pratique d'un exercice physique à haute intensité en piscine pendant 6 mois, 3 fois par semaine, sur une cohorte de patients ASI de type 2 et 3 âgés de 5 à 10 ans. Deuxièmement, mettre en place une nouvelle échelle de mesure pour évaluer les fonctions motrices des patients ASI. La mise en place de cette échelle à lieu à la plateforme d'expérimentation de la sensori-motricité de l'Université Paris Descartes.

1.8.1. Voie de signalisation du NMDA et amyotrophie spinale

Par la suite, Biondi et coll ont démontré que les effets bénéfiques de l'exercice physique étaient dépendants de l'activité du récepteur au NMDA (NMDA-R). En effet, l'expression de la sous-unité activatrice du NMDA-R est augmentée suite au protocole de course alors qu'elle est sous-exprimée dans la moelle épinière des souris ASI de type 2 en comparaison des souris contrôles. Par ailleurs, l'inhibition de l'activité du NMDA-R abolit les effets protecteurs de l'exercice physique (Biondi et al., 2008).

En 2010, l'équipe a démontré qu'un traitement de NMDA injecté directement dans la moelle épinière (intrathécal) chez des souris ASI de type 2 et de type 1 permet d'accélérer la maturation de l'unité motrice, de limiter l'apoptose dans la moelle épinière et d'augmenter la quantité de protéine SMN. La régulation positive de l'expression de SMN a été attribuée à une activation de la voie de signalisation CAMKII/AKT/CREB (cAMP response element-binding protein) par l'injection de NMDA (Biondi et al., 2010).

Plus récemment, un décryptage des voies de signalisation a permis de mettre en évidence un mécanisme de compétition entre les voies de signalisation MEK/ERK/Elk-1 et PI3k/AKT/CREB pour la régulation de l'expression du transgène *SMN2* dans la moelle épinière de souris ASI de type 1. En effet, l'inhibition pharmacologique de la voie MEK/ERK/Elk-1 promeut l'activation de la voie AKT/CREB, ce qui entraine une augmentation de l'expression de SMN et est associée à une durée de vie augmentée de 2,8 fois des souris ASI de type 1. Le dialogue entre ces deux voies de signalisation et l'augmentation d'expression de SMN impliquent une modulation calcique de l'activité de CAMKII (Branchu et al., 2013).

2. L'IGF-1 et le récepteur IGF-1R

Les insuline-like growth factor (IGFs) sont des hormones polypeptidiques qui possèdent une structure très proche de l'insuline dont elles tirent leur nom. Il en existe deux, IGF-1 et IGF-2, qui sont sécrétés majoritairement par les cellules du foie mais également dans le CNS par les cellules gliales ou encore dans les fibres musculaires. Ils sont des acteurs de l'axe somatotrope agissant sous le contrôle de l'hormone de croissance (GH) qui va stimuler leur expression. L'IGF-1 est crucial pour le développement post-natal et l'IGF-2 intervient de manière plus importante dans le développement prénatal (Han and Carter, 2000). Que ce soit dans la circulation ou dans les tissus, les IGF sont liés avec une grande affinité aux IGF-binding proteins (IGFBPs). Les IGFBPs modulent l'interaction entre les ligands IGFs et les récepteurs IGF-Rs. L'IGF-1 et son récepteur ont fait l'objet d'étude d'une partie de cette thèse, contrairement à l'IGF-2 qui ne sera pas introduit d'avantage.

Les phases de développement embryonnaires nécessitent la présence de l'IGF-1 qui stimule la croissance axonale et la formation de synapses moto-neuronales (Ozdinler and Macklis, 2006). Durant la période post-natale, l'IGF-1 agit comme un modulateur de l'activité des enzymes acide glutamate décarboxylase (GAD) et Choline Acetyl Transferase (ChAT) régulant ainsi l'activité des motoneurones (Brass et al., 1992). A la périphérie, l'IGF-1 peut agir sur la différenciation ou la prolifération des cellules musculaire (Duan et al., 2010).

Des souris transgéniques surexprimant l'IGF-1 présentent une prise de poids du cerveau associée à un poids total du corps plus importante que les souris contrôles (Mathews et al., 1988). A l'inverse, des souris n'exprimant pas l'IGF-1 développent un retard de croissance et une diminution de poids de 40% en comparaison des contrôles (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993).

L'IGF-1 se fixe sur le récepteur Insuline-like Growth Factor Receptor (IGF-R). Le récepteur est un homodimère à activité tyrosine kinase. Il est premièrement synthétisé sous la forme d'un polypeptide qui est clivé pour former deux sous-unités a et b. Chaque monomère est composé d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité b reliée par un pont di-sulfure. A la surface des cellules, l'IGF-1 fixe la sous-unité alpha qui va entrainer l'auto-phosphorylation du récepteur et déclencher une série de phosphorylation sur l'insulin receptor substrate 1 (IRS1) et recruter la protéine src homoly 2 domain containing (SHC) (Chitnis et al., 2008; Sasaoka et al., 1996). Ces sites phosphorylés sont responsables de l'activation de plusieurs voies de signalisation dont la voie canonique PI3K-Akt (D'Mello et al., 1997; Párrizas et al., 1997), la voie ERK (Nguyen et al., 2000) ainsi que la voie JAK/STAT (Yadav et al., 2005).

Figure 19: Le récepteur à l'IGF-1 et deux des trois cascades de signalisations associées. L'activation de l'IGF-1R par l'IGF-1 entraine l'autophosphorylation du récepteur qui phoshoryle la protéine IRS et recrute la protéine Shc qui est également phosphorylée. La phosphorylation des protéines IRS et Shc vont déclencher des cascades de phosphorylation intracellulaire et activer des réponses cellulaires comme la prolifération, la synthèse protéique ou des modifications métaboliques (Cruden et al., 2015) En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Des souris présentant une délétion complète pour le gène de l'IGF-1R sont caractérisées par un retard de croissance au stade E11. Cette invalidation provoque une diminution de la taille du cerveau, de la croissance axonale ainsi que du nombre de cellules neuronales. On constate une forte mortalité post-natale imputable à un développement insuffisant des poumons qui induit une insuffisance respiratoire (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993) . Une délétion hétérozygote de l'IGF-1R chez des souris contrôles (*Igf1r* +/-) permet de prolonger leur durée de vie de 26% et augmente leur résistance au stress oxydatif (Holzenberger et al., 2003).

Plus récemment, Corro et coll. ont démontré que l'IGF-1 augmente le clivage de l'ameloid protein precursor (APP) en stimulant les alpha-sécrétases et contribue ainsi à la réduction du peptide toxique β-amyloïde (Carro et al., 2002). Par ailleurs, des études portant sur des souris modèles de la maladie d'Alzheimer et pour lesquelles le récepteur à l'IGF-1R a été génétiquement invalidé ont montré des effets bénéfiques sur l'inflammation, l'accumulation du peptide b-amyloïde et le comportement de ces souris (Gontier et al., 2015).

2.1. La voie IGF-1 et l'amyotrophie spinale infantile

La surexpression d'un transgène de l'IGF-1 exprimée uniquement dans le muscle squelettique (Musarò et al., 2001) dans un modèle murin sévère d'ASI (Smn -/- ; SMNΔ7 ; SMN2) permet d'atténuer les symptômes de la pathologie. En effet, les souris présentent une augmentation de leur durée de vie de 40% ainsi que de la taille des fibres musculaires en comparaison des souris contrôles. En revanche, les capacités motrices n'ont pas été impactées par l'augmentation de la production de l'IGF-1 dans le muscle (Bosch-Marcé et al., 2011). Deux études démontrent par ailleurs, une surexpression de l'IGF-1R dans le quadriceps de souris (Bosch-Marcé et al., 2011) et dans du tissu musculaire de patients ASI de type 1 (Millino et al., 2009).

Une étude plus récente a démontré que l'administration d'adeno-associated virus (AAV) exprimant l'IGF-1 humain dans le noyau profond du cervelet de souris mimant une ASI de type 3 permet de moduler les niveaux d'activité des acteurs de l'apoptose tels que Bax et Bcl-2 et de limiter les processus apoptotiques dans les motoneurones. Cependant, les motoneurones ainsi protégés de l'apoptose ne sont pas fonctionnels puisqu'ils n'innervent pas correctement

les muscles. (Tsai et al., 2012). Les même auteurs ont administré par injection intraveineuse l'AAV exprimant l'IGF-1 humain dans un modèle sévère d'ASI et rapportent une diminution de la neurodégénérescence, une augmentation de l'innervation de fibres musculaires et une augmentation de la durée de vie des souris injectées (Tsai et al., 2014). Ces résultats indiquent qu'une augmentation de l'expression de l'IGF-1 dans tout l'organisme est nécessaire pour protéger l'ensemble de l'unité motrice.

2.2. Les voies de signalisation et cholestérol

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de la protéine SMN peut être modulée par une activation ou une inhibition des voies de signalisation majeures comme les voies MAPK, Rho/Rock ou AKT (Biondi et al., 2010; Bowerman et al., 2007; Branchu et al., 2013) qui sont toutes dépendantes de l'architecture membranaire de la cellule pour fonctionner correctement. Il existe des structures membranaires, les rafts lipidiques, riches en cholestérol et en sphingolipides qui séquestrent certaines protéines essentielles à la signalisation intracellulaire de ces voies comme les récepteurs aux neurotransmetteurs et hormones de croissance (Navarro et al., 2014; Strippoli et al., 2015; Wu et al., 1997). Ces rafts lipidiques participent aux phénomènes d'endocytose essentiels pour la neurotransmission, la transduction des signaux et la régulation de la dynamique membranaire (Simons and Toomre, 2000).

Il existe différents types d'internalisation de micro-domaines membranaires. L'internalisation de molécules à la membrane peut se faire par un mécanisme nécessitant l'invagination de microdomaines membranaires recouverts de protéines appelées clatherines, ou bien par d'autres mécanismes faisant intervenir, entre autre, les cavéoles.

Des structures apparentées aux rafts lipidiques sont spécialisés dans l'invagination de la membrane plasmique, les cavéoles. Elles participent à de nombreuses fonctions comme l'endocytose ou la signalisation calciques (Parton and Simons, 2007). Les constituants majeurs des cavéoles sont les protéines de la famille de protéines de recouvrement : les cavéolines. Il existe trois cavéolines : Cav1, son homologue Cav2 et la protéine Cav3 qui est exprimée spécifiquement dans le muscle. Elles interagissent avec d'autres partenaires lipidiques tels que les sphingolipides, phospholipides et phosphoinositides et protéiques tels que PACSIN-2 (Senju et al., 2011), EHD2 (Ludwig et al., 2013) à la membrane pour former et organiser des nanodomaines impliqués dans l'invagination mais également dans l'élaboration de plateformes de signalisation (Simons and Toomre, 2000). En effet, la protéine Cav1 est responsable de l'internalisation de molécules de signalisation comme le récepteur à l'insuline (Nystrom et al., 1999), à l'EGF (Couet et al., 1997) ou encore au TGF-b (Strippoli et

al., 2015) en interagissant directement avec eux. Les cavéoles ont été également associées à la signalisation des MAP et Src kinases, AKT ou Rho (Parton and Simons, 2007).

Alors que chaque cavéole contient environ 144 molécules de cavéolines les molécules de cholestérol sont cent fois supérieures, indiquant l'importance de ce lipide pour le maintien et le fonctionnement de ces structures (Ortegren et al., 2004). Des cellules surexprimant Cav1 augmentent le niveau de cholestérol dans les cavéoles ainsi que son export de la cellule, à l'inverse des souris déficientes pour Cav1 présentent une diminution du métabolisme du cholestérol (Wang et al., 2014). De plus, il a été démontré que Cav1 co-immunoprécipite avec le transporteur de cholestérol ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1). La réduction d'expression de Cav1 dans des macrophages entraine une réduction de l'efflux de cholestérol de la cellule dépendant d'ABCG1 (Gu et al., 2014).

2.3. Cavéolin-1 et SMN

Une étude a démontré que les protéines SMN et Cav1 peuvent s'associer. Des évènements cellulaires aboutissant à des expansions membranaires augmentent l'interaction entre ces deux protéines. La fonction de cette interaction a été abordée dans le chapitre 1.5.3.2. Par ailleurs, des protéines impliquées dans l'endocytes dont Cav1 sont prédominantes dans les analyses de gènes capables de modifier l'expression de SMN (Gabanella et al., 2016). D'autre part, il a été observé que dans un modèle sévère d'ASI, le système d'endocytose à la jonction neuromusculaire est dérégulé, suggérant une implication éventuelle de la protéine SMN dans le bon fonctionnement des cavéoles et des réarrangements du cytosquelette (Kong et al., 2009).

2.4. Mécanismes d'internalisation de l'IGF-1R

Il a été démontré que l'internalisation du récepteur à l'IGF-1 pouvait se faire par des mécanismes d'endocytose clathrine ou cavéoline-dépendants. L'endocytose la plus étudiée est sans doute l'endocyte clathrine dépendante. Lorsque le récepteur ou molécule « cargo » est reconnu à la membrane, des complexes adaptateurs cytosoliques «adaptine » vont recruter un réseau de protéines composé essentiellement de protéine de clathrine pour former une « cage de clathrine » autour des molécules cargo. Une fois recouverte de cette « cage de clathrine », la membrane plasmique s'invagine et forme une structure vésiculaire qui va être libérée dans la cellule (McMahon and Boucrot, 2011).

Plus récemment, les cavéoles ont été identifiées comme médiateurs de l'internalisation du récepteur à l'IGF-1R. La phosphorylation de la cavéoline-1 induit l'internalisation du récepteur. Le récepteur actif internalisé est ensuite libéré de son ligand pour être soit dégradé soit recyclé à la membrane (Salani et al., 2010).

Figure 20: Représentation des différents mécanismes d'internalisation. Un premier système d'endocytose dépend de puits membranaires recouverts d'un manteau de protéine clathrine qui forme une cage autour de la molécule cargo et facilite son internalisation. Un autre mécanisme repose sur des microdomaines membranaires, les cavéoles contenant, notamment la protéine Cav1. Suite à la phosphorylation de la Cav1, la molécule cargo est internalisée (McMahon and Boucrot, 2011). En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

3. Le Cholestérol

Les lipides sont des molécules hydrophobes qui sont majoritairement représentés par les acides gras, les triglycérides, les phospholipides ou le cholestérol. Ces molécules participent à diverses fonctions cellulaires essentielles comme la formation de la membrane cellulaire, la synthèse d'hormones stéroïdes ou encore le métabolisme énergétique. En tant que composant majeur des membranes chez les eucaryotes supérieurs, le cholestérol intervient dans la genèse d'une barrière semi-perméable entre les compartiments cellulaires et la régulation de la fluidité membranaire. Il agit également dans la transduction de signaux transmembranaires (Huang et al., 2016; Luchetti et al., 2016).

3.1. La molécule

La découverte de la molécule du cholestérol remonte à plus de 200 ans. C'est en 1758 que le français François Poulletier de La Salle identifie une forme solide des calculs biliaires. Puis M.E Chevreul publie son étude sur ce qu'il nomme la « substance cristallisée des calculs biliaires humains ». En 1928, l'allemand Adolf Windaus établit la structure moléculaire du cholestérol et enfin en 1964, Bloch et Lynen élucident sa biosynthèse et son métabolisme. Le prix Nobel de médecine de 1985 est décerné à Goldstein et Brown pour la découverte du mode de contrôle du métabolisme du cholestérol et l'identification des gènes qui en sont responsables.

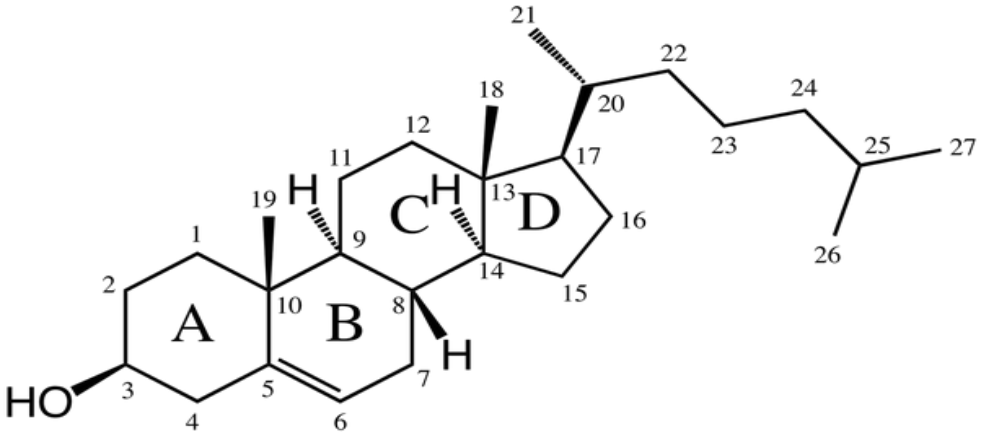


Figure 21: Structure chimique du cholestérol. La molécule de cholestérol possède 27 carbones dont le 3ème possède un groupement hydroxyl.

Le cholestérol est une molécule possédant une structure unique formée de quatre cycles carbonés désignés par les lettres A, B, C, et D. Il est composé au total de 27 carbones, dont le numéro 1 du cycle A sert de départ pour la nomenclature des autres.

Le cholestérol est intégré à la famille des stérols car il provient de la combinaison d'un alcool et d'un stéroïde. Il possède en effet un groupement hydroxyl–OH sur le carbone 3 (C3) qui constitue la tête polaire hydrophile de cholestérol. Cette fonction peut néanmoins subir une estérification par un acide gras qui a pour conséquence de rendre la molécule insoluble dans l'eau. Cette forme estérifiée appelée stérides permet de transporter ou stocker le cholestérol au sein des cellules, en particulier dans le foie, la moelle épinière et le cerveau.

3.2. Synthèse du cholestérol

La synthèse de cholestérol nécessite une vingtaine d'étapes successives ayant lieu principalement dans le réticulum endoplasmique. De même que pour la synthèse de plusieurs lipides, elle débute par la condensation d'acetyl-CoA et d'acetoacetyl-CoA grâce à l'enzyme HMG-CoA Synthase.

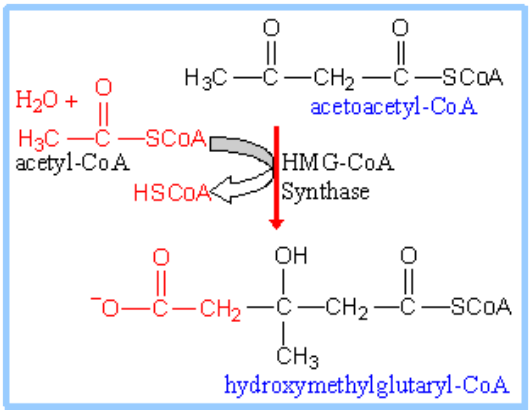


Figure 22: Première étape de la voie de biosynthèse du cholestérol.
Condensation d'acetyl-CoA et Acetoacetyl-CoA en hydroxymethylglutaryl-CoA

L'étape suivante est limitante et irréversible, il s'agit de la réduction en mévalonate d'HMG-CoA grâce à deux molécules de NADPH, la réaction est catalysée par la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMGCR).

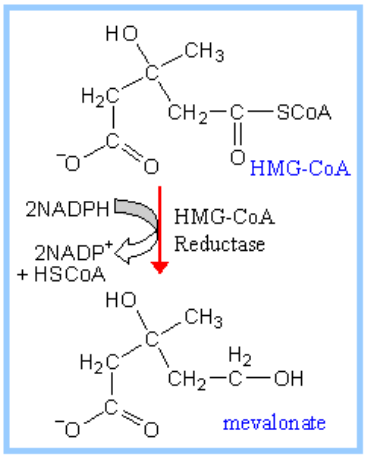


Figure 23: Deuxième étape de la voie de biosynthèse du cholestérol. Réduction en mévalonate d'HMG-CoA, réaction nécessitant 2 molécules de NADPH

Par la suite, le mévalonate subit une double phosphorylation nécessitant 2 molécules d'ATP, puis la Squalene Synthase catalyse la condensation de deux molécules de farnesyl pyrophosphate en squalène avec la réduction de NADPH. C'est ensuite plusieurs réactions qui aboutissent à la cyclisation du substrat pour obtenir le produit lanostérol.

A partir du lanostérol, deux voies de réactions peuvent aboutir à la synthèse de cholestérol. La voie de Bloch et de Kandutsch-Russel. Ces deux voies sont parallèles, elles ont la même séquence de réaction, sauf celle d'entrée et de sortie. Dans la voie de Kandutsch-Russel, la chaîne latérale est réduite par l'enzyme 3β-hydroxysterol Δ24-reductase (DHCR24) en début de réaction pour la voie de Kandutsch-Russel tandis qu'elle l'est en fin de réaction pour la voie de Bloch.

La voie de Bloch aboutit à la formation de cholestérol en réduisant la double liaison du carbone C-24 du desmostérol. La voie de Kandutsch-Russel aboutit à la formation de cholestérol en transformant le 7-déhydrocholestérol en cholestérol.

3.3. Cholestérol dans le SNC

Le poids du cerveau est constitué à plus de la moitié par des lipides, suggérant l'importance de ce type de molécules pour le développement, le fonctionnement et le maintien de cet organe. Parmi les lipides, le cholestérol dans le système nerveux central (SNC) représente 25% du cholestérol total alors qu'il n'est responsable que de 3% de la masse totale du corps.

Figure 24: Les voies de biosynthèse de Bloch et de Kandutsch-Russel permettant à la formation de cholestérol L'entrée dans la voie de biosynthèse de Kandutsch-Russell est catalysée par l'enzyme DHCR24 tandis que cette même enzyme catalyse la dernière réaction de la voie de Bloch (Zerenturk et al,. 2013) En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Le développement du cerveau nécessite une importante réserve de cholestérol afin, notamment, de myéliniser les axones des neurones. Après la naissance, le système nerveux central va devoir augmenter fortement la synthèse de ce stérol afin de poursuivre la croissance axonale, et la synaptogénèse. On estime que la production post-natale de cholestérol est quatre fois supérieure à la période de grossesse (Björkhem and Meaney, 2004).

Au niveau périphérique, l'apport en cholestérol est assuré par deux mécanismes : soit une capture par la cellule du cholestérol circulant dans le sang au sein de lipoprotéines issus d'une synthèse hépatique soit par une synthèse de novo intracellulaire. Le système nerveux central ne peut pas fonctionner sur ce modèle puisque la plupart des lipoprotéines sont incapables de traverser la barrière hématoencéphalique. Ainsi, le cerveau ne dispose comme seul apport en cholestérol une synthèse de novo assurée majoritairement par les astrocytes et oligodendrocytes (Nieweg et al., 2009).

3.3.1. Synthèse du cholestérol dans le SNC

Certaines études suggèrent que les neurones perdraient, au cours du développement, leur capacité à synthétiser le cholestérol afin de dédier leur métabolisme vers d'autres fonctions telle que la transmission nerveuse (Dietschy and Turley, 2004; Pfrieger, 2003). En effet, in vitro, les astrocytes et les oligodendrocytes synthétisent deux à trois fois plus de cholestérol

que les neurones, ce qui leur permettrait de dédier une partie de leur production à l'approvisionnement des neurones (Saito et al., 1987). Les neurones contiennent majoritairement des précurseurs du cholestérol appartenant à la voie de Kandutsch-Russel, comme le 7-dehydrocholestérol (7-DHC) et le lathostérol tandis que les astrocytes contiennent des précurseurs de la voie de Bloch come le desmostérol (Nieweg et al., 2009). Les neurones et les astrocytes utiliseraient donc différentes voies de biosynthèse du cholestérol. Une étude consistant à étudier le devenir de précurseurs radioactifs du cholestérol a démontré que 40% des espèces radioactives ont été incorporées dans le lanostérol pour les neurones tandis que pour les astrocytes la majorité des espèces radioactives ont été incorporées dans le cholestérol (Nieweg et al., 2009). Les neurones synthétiseraient préférentiellement le lanostérol plutôt que le cholestérol.

Les astrocytes, oligodendrocytes et neurones ne possèdent pas les mêmes équipements enzymatiques de la voie de biosynthèse du cholestérol. Le niveau d'expression des enzymes Squalene Synthase (SQS) et NAD(P)-dependant steroid dehydrogenase-like (NSDHL) est significativement plus bas dans les neurones que dans les astrocytes chez le rat. De plus, une diminution de la concentration en cholestérol induit une augmentation de l'expression des enzymes SQS et NSDHL de manière plus importante dans les astrocytes que les neurones et une augmentation d'expression de l'enzyme DHCR24 n'est mesurée que dans les astrocytes (Nieweg et al., 2009). Ces résultats démontrent qu'il existe un profil d'expression des enzymes de la biosynthèse du cholestérol différent entre les astrocytes. Les astrocytes semblent répondre plus efficacement à une modification de l'homéostasie du cholestérol dans le SNC.

Comme les neurones renouvellent environ 20% de leur contenu en cholestérol chaque jour (Nieweg et al., 2009), des mécanismes de régulation de la production et de transport de cholestérol doivent être finement régulés entre cellules gliales et neurones (Dietschy and Turley, 2004; Nieweg et al., 2009).

3.3.2. Les oxystérols dans le SNC

Une accumulation de cholestérol cellulaire entraine la formation d'oxystérols (Björkhem, 2009). Les oxystérols sont produits par l'oxydation du cholestérol à la fois de manière spontanée par auto oxydation ou par une réaction d'oxydation catalysée majoritairement par des enzymes à cytochrome P450. La durée de vie de ces dérivés oxydés est relativement courte et leur concentration est très faible par rapport au cholestérol lui-même. Cependant, ils exercent de nombreuses fonctions de régulation, signalisation et de transport.

L'oxydation des chaines latérales stéroïdes du cholestérol rend les oxystérols polaires, ce qui facilite leur transport à travers les membranes. Ainsi, alors que le cholestérol dépend de transporteurs pour entrer ou sortir des cellules, les oxystérols peuvent quitter les cellules

sans avoir recours aux transporteurs et s'affranchissent ainsi des mécanismes de régulation métabolique. Il existe plusieurs oxystérols particulièrement impliqués dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol : le 25-hydroxycholestérol (25-OHC), 24S-hydroxycholestérol (24-OHC) ou le 27-hydroxycholestérol (27-OHC) (Björkhem, 2013; Björkhem et al., 1998; Brzeska et al., 2016)

3.3.2.1. Signalisation dépendante des oxystérols

Les oxystérols peuvent moduler l'homéostasie sur cholestérol selon trois mécanismes : en interagissant avec les SREBPs, en activant le récepteur nucléaire Liver-X-Receptor (LXR) ou en entrainant une dégradation des enzymes impliquées dans la synthèse de cholestérol.

Le 25-hydroxycholestérol, qui présente un groupement hydroxyl-OH sur le carbone 25, peut se fixer sur la protéine Insig, qui va s'associer à Scap et retenir le complexe Scap/SREBP2 dans le réticulum endoplasmique pour inhiber la translocation du facteur de transcription dans le noyau et donc la transcription des enzymes HMGCR et DHCR24 (Radhakrishnan et al., 2007).

Les LXR ont été les premiers récepteurs identifiées pour les oxystérols (Janowski et al., 1996). Ce sont des récepteurs nucléaires qui lient l'ADN en formant un hétérodimère avec un autre récepteur nucléaire : le Retinoic-X-Receptor (RXR). Il existe deux isoformes LXRα et LXRβ qui ne sont pas exprimées de la même manière dans tous les tissus. Le sous-type dominant LXRα est exprimé majoritairement dans le foie mais également dans l'intestin, les reins et les surrénales. Le LXRb est plus largement exprimé dans tous les tissus (Bookout et al., 2006). Les LXR peuvent être activés par des ligands endogènes comme les dérivés oxydés du cholestérol (oxystérols), les précurseurs du cholestérol (i.e. desmostérol) ou des stérols végétaux (Janowski et al., 1999; Oberkofler et al., 2003; Spann et al., 2012) qui se fixent sur le ligand-binding domain (LBD). La fixation de ses ligands sur le LBD entraine un changement de conformation du récepteur qui diminue l'affinité du LXR pour les protéines co-repressives de la transcription (NCOR1 et NCOR2) et augmente l'affinité pour les protéines co-activatrices (Nuclear receptor co-activator 1 et activating signal co-integrator 2) et initie l'activation transcriptionelle d'un gène (Jakobsson et al., 2012). Les gènes cibles de l'hétérodimère LXR/RXR sont essentiellement ceux impliqués dans la modulation de l'homéostasie du cholestérol (ABCA1, ApoE, LDLR) mais également dans le recrutement des macrophages, l'apoptose ou la myélinisation du SNC (Hong and Tontonoz, 2014; Lee and Tontonoz, 2015; Meffre et al., 2015).

Figure 25: Régulation transcriptionnelle par l'hétérodimère LXR/RXR. En absence de ligand, le LXR est associé à un complexe qui réprime la transcription du gène sur lequel il est fixé. La fixation d'un ligand entraine la levée de l'inhibition et le recrutement d'un complexe activateur de la transcription (Schulman, 2017). En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Dans le cadre du contrôle de l'homéostasie du cholestérol, l'activation du LXR va favoriser la transcription de protéines favorisant l'efflux du cholestérol : les « ATP binding cassette » A1 et G 2 (ABCA1 et ABCG1), et la protéine Idol qui est une E3 ligase dégradant le récepteur aux LDL (LDLR). Par conséquent, le surplus de cholestérol est exporté de la cellule par les transporteurs ABCA1 et ABCG1 tandis que l'apport est diminué par la dégradation des LDLR pour restaurer l'homéostasie du cholestérol (Pfeifer et al., 2011).

Lorsque le cholestérol est en excès, la production d'un autre oxystérol : le 27-hyroxycholestérol, est accrue. Un mécanisme de rétrocontrôle se met en place : cet oxystérol est impliqué dans la régulation de HMGCR sans passer par la voie SREBP2 mais par une dégradation de l'enzyme par la machinerie de dégradation du réticulum endoplasmique (ERAD), ce qui va avoir pour conséquence de diminuer l'activité enzymatique globale et donc réduire la voie de biosynthèse (Lange et al., 2008)

3.3.3. Transport du cholestérol dans le SNC

Les astrocytes synthétisent et chargent le cholestérol dans des complexes lipido-protéiques apparentés aux high density lipoprotéines (HDL) retrouvées en périphérie. Ces complexes sont formés d'apolipoprotéines, de cholestérols et de phospholipides. L'ApoE est l'apolipoprotéine la plus exprimée du cerveau (Dietschy and Turley, 2004), qui peut se fixer sur des récepteurs de la famille des Low Density Lipoprotein Receptor (LRP) pour internaliser le cholestérol. Parmi ces récepteurs, le LRP1 semble être celui qui possède la plus grande capacité de transport pour ApoE. Des délétions du gène Lrp1 dans des neurones ont d'ailleurs été associées à une neuro-dégénérescence (Lane-Donovan et al., 2014). Une fois le ligand fixé au récepteur, le cholestérol est ensuite endocyté pour être libéré dans la cellule, où il est adressé à la membrane ou alors stocké sous forme estérifiée par l'enzyme ACAT.

3.3.4. Elimination du cholestérol dans les neurones

Dans les neurones, si la quantité de cholestérol dépasse le seuil limite, le cholestérol est oxydé en 24-OHC par l'enzyme à cytochrome P450 CYP46A1 (Björkhem et al., 1998). Cet

oxystérol a plusieurs fonctions. Premièrement, la molécule de cholestérol ne pouvant pas traverser la barrière hématoencéphalique et rejoindre la circulation sanguine pour être éliminé par le foie, il est transformé en 24-OHC qui, lui est capable de traverser cette barrière. D'autre part, il existe un dialogue entre astrocytes et neurones pour réguler l'homéostasie du cholestérol neuronal. L'excès de cholestérol dans les neurones est transformé en 24-OHC, qui va exercer un rétrocontrôle sur le chargement de molécules de cholestérol sur les lipoprotéines (Apo-E) par les astrocytes. Comme décrit dans le chapitre 4.3.2.1, la fixation du 24-OHC sur le LXR va activer la transcription de gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol (ABCA1, ABCAG1, ApoE), ce qui permet d'augmenter la disponibilité du cholestérol circulant dans le SNC et d'approvisionner ainsi les neurones (Chen et al., 2013; Karasinska and Hayden, 2011).

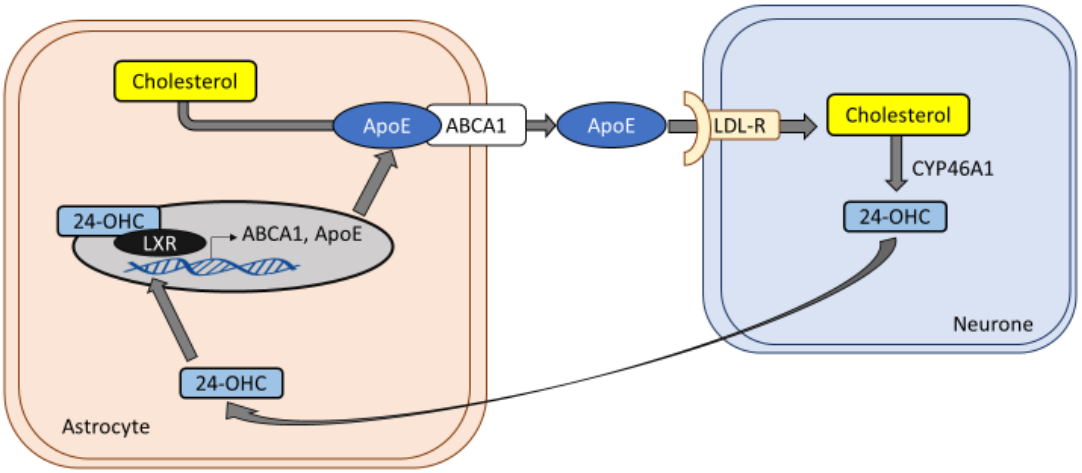


Figure 26: Dialogue entre les astrocytes et les neurones. L'excès de cholestérol neuronal est oxydé en 24-OHC par l'enzyme CYP46A1 qui agit sur les astrocytes en se fixant sur le LXR. L'activation du LXR entraine l'augmentation d'expression des protéines ApoE et ABCA1 qui vont enrichir les lipoprotéines ApoE en cholestérol pour permettre d'approvisionner les neurones en cholestérol (D'après Karasinska and Hayden, 2011).

Le niveau de 24-OHC dans le plasma sanguin ainsi que celui du liquide céphalorachidien pourrait constituer un bon indicateur du renouvellement du cholestérol cérébral (Lund et al., 2003).

3.4. Stockage

Quand la quantité de cholestérol présent dans la membrane plasmique dépasse un seuil limite, l'enzyme Acetyl-CoA Acetyltransferase (ACAT-1) assure l'estérification du surplus en esters de cholestérol qui constituent une forme inactive de stockage de la molécule (Chang et al., 2009). Il semblerait que ce soit préférentiellement le cholestérol provenant des membranes plasmiques qui soit estérifié.

3.5. Régulation de la synthèse

Si l'on considère l'importance du cholestérol pour le bon fonctionnement des cellules, les mécanismes qui assurent le maintien de son homéostasie se doivent être nombreux et efficaces. Cette régulation fait intervenir plusieurs protéines « senseurs » qui ont pour rôle de d'évaluer si la cellule est un excès ou un déficit de cholestérol et d'induire les réponses cellulaires adéquates. Les mécanismes de régulation agissent à différents niveaux, aussi bien sur les enzymes responsables de la synthèse du cholestérol que sur son import/export ou encore sa transformation en ester afin de le stocker.

Il existe un flux constant de cholestérol entre la membrane plasmique et celle du réticulum endoplasmique (Das et al., 2014), permettant aux protéines « senseurs » d'établir si la concentration de la membrane plasmique est suffisante. Des variations de la concentration en cholestérol de la membrane plasmique peuvent induire des variations vingt fois supérieures dans le RE en raison du niveau de cholestérol maintenu très bas dans cette organelle, permettant une réponse cellulaire rapide (Radhakrishnan et al., 2008).

3.5.1. La voie SREBP2

Les acteurs principaux de l'homéostasie du cholestérol sont les facteurs de transcription « sterol regulatory element-binfing proteins » (SREBPs) qui comprennent SREBP1a et SREBP1c, issus de l'épissage du gène SREBF1 et SREBP2 qui est codé par le gène SREBF2. Tandis que SREBP2 est spécialement impliqué dans la régulation de la synthèse de cholestérol, SREBP1c régule la synthèse d'acides gras (Horton et al., 2003) et SREBP1a intervient sur les deux voies (Shimano et al., 1996). Il existe sur le promoteur de plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse du cholestérol dont HMGCR et DHCR24, des éléments de réponses Sterol Regulatory Element (SRE) au facteur de transcription SREBP2 permettant de réguler leur transcription suite à des variations de l'homéostasie du cholestérol (Lloyd and Thompson, 1995).

Les SREBPs sont associés via leur domaine C-Terminal avec les domaines WD40 répétés de la protéine Scap juste après leur synthèse dans le réticulum endoplasmique (Sakai et al., 1997). Scap possède 8 domaines transmembranaires ancrés dans le RE ainsi qu'un domaine « senseur » de stérol (SSD).

Dans un contexte d'excès de cholestérol, la protéine Insig fixe le domaine SSD de Scap et séquestre le complexe Scap/SREBP dans le réticulum endoplasmique, empêchant son transport vers le Golgi puis vers le noyau et aboutissant à l'inhibition de l'activité de SREBP2 (Yang et al., 2002). Radhakrishnan et coll, ont évalué que le transport de SREBP2 du RE vers le Golgi était aboli si la quantité de cholestérol dépassait 5% de la quantité de lipides totale (Radhakrishnan et al., 2008).

A l'inverse, si la concentration en cholestérol chute, SREBP2 n'est plus séquestré par Insig, est transporté vers l'appareil de Golgi où il subit deux clivages pour être adressé au noyau où il fixe un SRE qui active la transcription de gènes responsable de la synthèse de cholestérol tels que *HMGCR, DHCR24* et *SQLE* ainsi que de son import avec le gène *LDLR*. (Brown and Goldstein, 1997; Brown et al., 2002; Najem et al., 2016; Zerenturk et al., 2012a).

L'activation ou l'inactivation de la voie SREBP est donc essentiellement dépendante de l'interaction entre les protéines Insig et Scap qui est très finement contrôlée par le taux de cholestérol présent dans la membrane du réticulum endoplasmique.

3.6. Stockage de cholestérol

Quand la quantité de cholestérol présent dans la membrane plasmique dépasse le seuil limite, outre les mécanismes de régulations présentés, des enzymes assurent l'estérification du surplus en esters de cholestérol qui sont une forme inactive de stockage de la molécule. (Chang et al., 2009). Il semblerait que ce soit préférentiellement le cholestérol provenant des membranes plasmiques qui soit estérifié.

Figure 27: Balance d'activation de SREBP2 en fonction de la concentration en cholestérol (Radhakrishnan et al., 2008). En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

3.7. L'enzyme DHCR24 ou Seladin-1

L'enzyme 3β-hydroxysterolΔ24-reductase est une oxidoreductase flavine adenine dinucleotide dépendante (FAD), impliquée non seulement dans le métabolisme du cholestérol mais également dans la réponse au stress oxydatif et à l'inflammation (Crameri et al., 2006; Greeve et al., 2000; Kuehnle et al., 2008).

L'identification du gène chez l'homme a été faite en 2000 dans la maladie d'Alzheimer par l'équipe de M.Nitshch (Greeve et al., 2000). Dans leur article, les auteurs ont cherché à identifier des gènes de susceptibilité pour la maladie dont l'expression était altérée dans des

régions du cerveau post-mortem de patients atteints de la maladie. Ils ont découvert que le niveau d'expression de DHCR24 était diminué dans les neurones présents dans les lobes temporaux inférieurs, qui sont particulièrement affectés dans la maladie d'Alzheimer (Greeve et al., 2000). C'est pour cette raison que l'enzyme possède également le nom de Selective Alzheimer Disease Indicator 1 (Seladin-1). C'est en 2001 qu'une autre équipe (Waterham et al., 2001), rapportent que des mutations faux-sens de l'enzyme DHCR24 sont responsables de l'apparition d'une maladie rare liée à une perturbation du métabolisme du cholestérol, la desmostérolose. Cette maladie caractérisée par des taux anormalement élevé de desmostérol dans tout l'organisme, a une incidence dramatique sur le développement, ce qui aboutit à des malformations, des microcéphalies et qui engage le pronostic vital très tôt après la naissance (Waterham et al., 2001).

Des souris invalidées génétiquement pour l'enzyme DHCR24 présentent très peu de cholestérol dans le plasma ainsi que dans tous les tissus et une accumulation de desmostérol. Ces animaux sont 25% plus petits que les contrôles meurent rapidement après la naissance en raison d'une dermopathie associée à une rétention d'eau dans la peau (Mirza et al., 2006, 2008).

Le gène *DHCR24* code pour un transcrit de 9 exons. L'expression de la protéine est ubiquitaire mais elle est fortement exprimée dans les glandes surrénales, le foie, les poumons, le pancréas, la prostate et le tissu nerveux, en particulier la moelle épinière (Greeve et al., 2000). DHCR24 est une protéine de 60kDa, qui contient un domaine FAD très conservé essentiel pour son activité enzymatique.

Les prédictions de structure indiquent que la partie N-Terminale de la protéine constituerait le domaine transmembranaire et que la partie C-Terminale serait dans le cytoplasme pour laisser un libre accès aux substrats.

Figure 28: Structure de la protéine DHCR24 et son ancrage dans la membrane du réticulum endoplasmique. Il existe des domaines de liaison pour les protéines MDM2 et P53 sur la partie cytoplasmique de la protéine ainsi qu'un domaine FAD impliqué dans l'activité enzymatique de DHCR24 (Kuehnle et al., 2008). En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

3.7.1. Fonctions de la protéine DHCR24

Dans la biosynthèse du cholestérol, DHCR24 peut avoir 2 substrats : le lanostrérol qu'elle réduit en di-hydrocholestérol pour rentrer dans la voie de Kandutsch-Russel ou le desmostérol, dernier intermédiaire de la voie de Bloch, avant de former le cholestérol. Cependant, bien que ces substrats aient une affinité bien moindre, DHCR24 peut intervenir

dans la réduction de n'importe quel intermédiaire de la voie de biosynthèse contenant la double liaison C24.25 (Bae and Paik, 1997).

De plus en plus d'études attribuent à l'enzyme DHCR24, des fonctions de protection contre le stress oxydant. Les mécanismes n'ont pas été clairement identifiés mais il semblerait que cette réponse puisse se faire de trois manières différentes.

Dans une condition de stress oxydant sévère, l'expression de l'enzyme est augmentée et va induire une production plus importante de cholestérol. Ce cholestérol ainsi produit va pouvoir rejoindre les membranes et favoriser leur dynamique en recrutant les composants des rafts lipidiques (Crameri et al., 2006). Ces micro-domaines membranaires sont impliqués dans la réponse au stress oxydatif. En effet, la signalisation des voies anti-apoptotiques Akt et ERK est dépendante d'une bonne concentration en cholestérol dans la membrane plasmique (Li et al., 2006; Yang et al., 2006a). Ainsi, DHCR24 protège la cellule du stress oxydant en stimulant la voie de biosynthèse du cholestérol qui va permettre d'activer des voies de signalisation impliquées dans la réponse anti-apoptotique (Kuehnle et al., 2008).

L'enzyme DHCR24 est également capable de transformer directement le peroxyde d'oxygène via sa fonction oxydo-réductrice, bien que l'efficacité de cette enzyme soit cinq fois inférieure à l'enzyme la catalase, spécialisée dans cette élimination (Lu et al., 2008a).

Enfin, il existe dans la séquence de la protéine, un domaine de liaison pour la protéine suppresseur de tumeur P53 ainsi que pour l'ubiquitine ligase mouse double minute 2 homolog (mdm2) qui interviennent dans la réponse oncogénique et au stress oxydant. En 2004, Wu et coll., ont démontré que l'expression de DHCR24 était augmentée en cas d'activation de l'oncogène Ras mais également en condition de stress oxydant et de manière indépendante de l'activité enzymatique. Cette surexpression induirait une interaction favorisée entre P53 et DHCR24 tout en diminuant l'action de l'ubiquitine ligase mdm2 sur P53. Par conséquent, P53 va s'accumuler et initier l'arrêt du cycle cellulaire protégeant ainsi la cellule d'un développement cancéreux (Wu et al., 2004). Les réponses au stress oxydant sont également corrélées à la localisation subcellulaire de la protéine. La localisation de la protéine à l'état basal est périnucléaire (dans la membrane du réticulum endoplasmique) mais se concentre dans le noyau après un stress oxydant ou oncogénique (Wu et al., 2004).

Une autre fonction neuro-protectrice être attribuée à cette enzyme, celle de protection contre la mort cellulaire par apoptose. Pendant les phases d'apoptoses, DHCR24 peut servir de substrat pour la caspase 3 car elle dispose de deux sites de clivage protéolytiques. Un variant de DHCR24 issu du clivage apoptotique produit une protéine de 40kDa cytoplasmique qui pourrait promouvoir la survie cellulaire en inhibant caspase 3 (Greeve et al., 2000).

Enfin, une étude visant à identifier de nouvelles protéines liant les ARN (RBP), a révélé que DHCR24 se fixer sur des séquences d'ARN messagers, suggérant son implication éventuelle dans la régulation des ARN (Castello et al., 2012).

3.7.2. Régulation de DHCR24

La protéine DHCR24 peut être régulée au niveau de sa transcription. Il existe sur le promoteur de DHCR24 la présence de deux site Sterol Regulatory Element (SRE) en -300 et -100 sur lesquels le facteur de transcription SREBP2 peut se fixer pour transactiver le gène en coopération avec les co-facteurs Sp1 et NF-Y (Zerenturk et al., 2012a). Ainsi, de même que pour l'enzyme HMGCR, SREBP2 va détecter une chute du taux de cholestérol membranaire qui va entrainer son clivage et son entrée dans le noyau pour activer la transcription des gènes responsables de la biogénèse du cholestérol. D'autre part, le promoteur de DHCR24 est également sujet à des méthylations et acétylations sur les histones régulant le degré d'activation de la transcription (Drzewinska et al., 2011). Enfin, des stéroïdes sexuels comme les œstrogènes et androgènes sont des régulateurs positifs de DHCR24 car ils peuvent fixer des récepteurs nucléaires sur le promoteur du gène qui régulent son activité (Benvenuti et al., 2005; Luciani et al., 2008).

Au niveau post-traductionnel, l'oxystérol 24(S),25-epoxycholestérol est capable d'inhiber l'activité de l'enzyme DHCR24 sans affecter la quantité de protéine. Cet oxystérol qui n'est pas synthétisé directement à partir de cholestérol possède une structure proche du desmostérol. Il entraine une accumulation de desmostérol dans les cellules traitées, en entrant probablement en compétition avec l'un de substrat naturel de l'enzyme (Zerenturk et al., 2012b).

3.8. Cholestérol et neuropathologies

3.8.1. Cholestérol dans la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie souvent sporadique, caractérisée par une neurodégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire. Le diagnostique de la maladie est réalisé suite à l'apparition des trois signes cardinaux : un tremblement au repos, une bradykinésie et une rigidté musculaire.

Bien que des perturbations des niveaux de cholestérol aient été rapportées chez des patients atteints de la maladie, le déficit n'est pas clairement établi. En effet, plusieurs études se contredisent sur les résultats obtenus, dépendant vraisemblablement des cohortes de patients et des régions analysées.

Table 1
Current studies linking sterols (cholesterol and oxysterols) to PD—*in vitro, in vivo*, and human studies.

Sterol involved	Experimental system	Comments	References
Cholesterol	*In vitro studies*	– Statins reduce α-synuclein aggregation	– Bar-On et al., 2008 [37]
		– Cholesterol-lowering agents induce accumulation of α-synuclein	– Bar-On et al., 2006 [40]
		– α-synuclein contains cholesterol-binding domain	– Fantini et al., 2011 [41]
	In vivo studies	– Lovastatin ameliorates α-synuclein accumulation	– Koob et al., 2010 [39]
		– Hypercholesterolemia+oxidative stress increase plasma concentrations of 27-OHC, leading to induction of LXR and accumulation of α-synuclein	– Marwarha et al., 2014 [72] – Ong et al., 2003 [73]
		– An increase in cholesterol upregulates 7KC levels, which induce neuronal injury	
	Human studies	– Lower levels of cholesterol in PD patients/controls	– Guo et al., 2014 [33]
		– Relationship between intake of cholesterol and risk of PD	– Tan et al., 2015 [34]
		– No association between cholesterol and PD	– Gudala et al., 2013 [35]
		– Simvastatin associated with reduced incidence of PD	– Wolozin et al., 2007 [38]
		– Cholesterol levels increased in the visual cortex	– Cheng et al., 2011 [36]
24S-OHC	*In vitro studies*	– 24S-OHC increases tyrosine hydroxylase expression	– Rantham Prabhakara et al., 2008 [65]
	Human studies	– 24S-OHC levels in CSF correlate with duration of the disease	– Björkhem et al., 2013 [71]
27-OHC	*In vitro studies*	– Upregulation of α-synuclein expression via LXR	– Cheng et al., 2008 [66]
		– 27-OHC increases levels of α-synuclein and induces apoptosis	– Rantham Prabhakara et al., 2008 [65]
		– Downregulation of tyrosine hydroxylase via ERβ	– Marwarha et al., 2011 [68]
	Human studies	– 27-OHC levels are increased in the CSF of some patients	– Björkhem et al., 2013 [71]

Tableau 3: Résumé des différentes études ayant relaté un lien entre les taux de stérols (cholestérol et oxystérol) et la maladie de Parkinson (Doria et al. 2016).

Il semblerait cependant que les oxystérol formés depuis l'auto-oxydation du cholestérol et par réaction enzymatique pourraient jouer un rôle prépondérant de la pathogénèse de la maladie. Des études in vitro ont montré que des niveaux élevés d'oxystérols 24-OHC et 27-OHC induisent une augmentation de l'agrégation de l'α-synucleine (Bosco et al., 2006) et la mort cellulaire par apoptose (Rantham Prabhakara et al., 2008).

3.8.2. Cholestérol dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative responsable d'environ 70% des troubles démentiels diagnostiqués en France. Elle est caractérisée par une altération des fonctions cognitives principalement causée par un dépôt de la forme soluble du peptide amyloïde (Aβ) qui est issu du clivage protéolytique de la protéine amyloid precusor protein (APP) par l'α-sécrétase (Olsson et al., 2003). L'un des facteurs de susceptibilité génétique pour cette maladie concerne l'homéostasie du cholestérol.

L'ApoE est l'apolipoprotéine la plus répandue dans le SNC. Elle possède 3 isoformes (E2, E3 et E4) qui sont impliquées dans plusieurs mécanismes dont le transport des lipides. L'ApoE peut également lier l' Aβ pour former un complexe qui est internalisé par les cellules pour être ensuite transporté et dégradé dans les lysosomes (Tokuda et al., 2000). Cependant, l'isoforme E4, est connue pour diminuer l'efficacité de dégradation de l' Aβ (Deane et al., 2008; LaDu et al., 1994).

L'isoforme E4 est surreprésentée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Par conséquent, l'Aβ n'est pas correctement éliminé et s'accumule. A terme, l' Aβ précipite et

forme des plaques d' Aβ, caractéristiques de la maladie (Huynh et al., 2017; Mahley and Rall, 2000).

D'autre part, des études ont révélé des diminution de 24-OHC dans le plasma et le fluide cérébrospinal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Bretillon et al., 2000; Kölsch et al., 2004). Cartier et coll. ont démontré que dans l'hippocampe de souris mimant la maladie d'Alzheimer il y a une chute du 24-OHC ainsi que de l'expression de l'enzyme catalysant sa transformation à partir du cholestérol, la CYP46A1. Restaurer l'expression de la CYP46A1 permet non seulement de retrouver des niveaux de 24-OHC semblables aux souris contrôles mais également de contrer les déficits cognitifs classiquement observés dans ce modèle (Burlot et al., 2015).

Les oxystérols seraient capables de modifier l'élimination de l' Aβ en agissant sur l'expression du transporteur ABCA1 au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui stimulerait l'évacuation de l' Aβ vers la périphérie (Gosselet et al., 2014). De plus, l'activation du LXR par les oxystérols peut moduler l'expression des enzymes responsables du clivage de l'APP (Schweinzer et al., 2011).

3.8.3. Cholestérol dans la maladie d'Huntington

La maladie d'Huntington est une maladie d'origine génétique et caractérisée par l'expansion d'une répétition du trinucléotide CAG dans le gène codant pour la protéine huntingtin (HTT) aboutissant progressivement à une neurodégénérescence des neurones du striatum. Des études ont démontré des dérégulations de l'homéostasie du cholestérol et cherchent à cerner son implication dans la maladie (Boussicault et al., 2016; Leoni et al., 2011; Valenza et al., 2007, 2015).

Parmi ces dérégulations, nous pouvons citer une altération de la biosynthèse du cholestérol et une réduction de la production de 24-OHC (Leoni et al., 2008, 2011; Valenza et al., 2005). Dans certaines régions du cerveau comme le noyau caudé et dans des neurones en culture, une accumulation de cholestérol dans la membrane a été rapportée (del Toro et al., 2010).

Pour expliquer ces altérations, plusieurs mécanismes ont été proposés. L'expression de la protéine huntingtin mutée dans des cellules ST14A entraine une altération du processus de clivage de SREBP et donc de la régulation de l'homéostasie du cholestérol (Harjes and Wanker, 2003; Valenza et al., 2005). Dans le cerveau post-mortem de patients atteints de la maladie d'Huntington, les niveaux d'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol HMGCR, 7-dehydrocholestérol reductase ou encore CYP51 sont diminués (Valenza et al., 2005). La diminution de leur expression serait responsable d'une chute de la production de cholestérol. Une diminution de la synthèse de cholestérol serait responsable de

l'inhibition de l'efflux de la molécule afin de maintenir l'homéostasie. La protéine huntingtin mutante inhibe l'expression de l'enzyme HMGCR, ce qui entraine une chute de la production de cholestérol. Par conséquent, les neurones diminueraient l'expression de l'enzyme CYP46A1 qui oxyde le cholestérol en 24-OHC afin de compenser la chute de la synthèse de cholestérol, ce qui entrainerait une accumulation de cholestérol à la membrane. Une étude visant à rétablir l'expression de l'enzyme CYP46A1 dans le striatum de souris mimant la maladie d'huntington a démontré que cela permettait non seulement de restaurer des niveaux normaux de cholestérol et ses intermédiaires mais que cela permet d'induire une neuroprotection. Ces travaux démontrent ainsi que restaurer le métabolisme du cholestérol dans un contexte de neuro-dégénérescence, peut être bénéfique (Boussicault et al., 2016).

3.8.4. Cholestérol dans la sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie caractérisée par une neurodégénérescence progressive des motoneurones et dont les origines sont très hétérogènes. Plusieurs études portent sur la recherche de nouveaux biomarqueurs sensibles au développement de la maladie afin de pouvoir ajuster les thérapies et identifier de nouvelles cibles pharmacologiques. Des analyses du métabolisme lipidique ont permis d'identifier plusieurs molécules qui pourraient servir de biomarqueurs. Le métabolisme du cholestérol semble prometteur car plusieurs études dirigent leurs recherches vers des molécules liées à cette voie de biosynthèse. Notamment, la diminution d'ester de cholestérol pourrait moduler le stress oxydant dans les motoneurones de souris mimant la SLA (Cutler et al., 2002). D'autre part, l'enzyme CYP27A1 qui catalyse une des première étape de la transformation de cholestérol en acide biliaire et donc le produit est l'oxystérol 27-hydroxycholestérol est présentée comme un gène de susceptibilité pour la SLA (Diekstra et al., 2012). Plus récemment, une équipe a relevé des niveaux de cholestérol plus élevé dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patient atteint de SLA que chez des patients sains. De plus, l'analyse des produits d'efflux du cholestérol cérébral comme le (25R)26-hydroxycholesterol sont eux, réduits dans le CSF. Ces résultats indiqueraient que les patients de SLA seraient incapables d'excréter correctement l'excès de cholestérol du système nerveux central (Abdel-Khalik et al., 2017).

Problématique

L'une des thématiques majeures de recherche du laboratoire porte sur l'étude des effets de l'exercice physique dans des modèles de pathologies neurodégénératives. Il a été démontré que des protocoles d'entrainement physique sont bénéfiques dans des modèles murins de sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Deforges et al., 2009) et d'amyotrophie spinale infantile (ASI) (Grondard, 2005; Biondi et al., 2008; Chali et al., 2016). En effet, soumettre des souris mimant la SLA à un entrainement de nage (Deforges et al., 2009) ou des souris mimant l'ASI à des entrainements de course (Grondard, 2005) réguliers permet de prolonger la durée de vie des souris malades et d'induire une neuro-protection des motoneurones de la moelle épinière. Dans l'ASI, l'exercice physique a permis d'augmenter l'expression de la protéine SMN, responsable de la maladie (Grondard, 2005). Plus récemment, l'étude des mécanismes potentiellement impliqués dans l'amélioration du phénotype des souris ASI a permis d'identifier une dérégulation dans la balance d'activation des voies de signalisation AKT/CREB et ERK/Elk-1 (Biondi et al., 2008, 2010). Dans la moelle épinière et les muscles des souris ASI de type 2, la voie de signalisation ERK/Elk-1 est activée tandis que la voie AKT/CREB est inhibée. Le protocole d'exercice physique a induit une modification de la balance d'activation de ces voies de signalisation au profit de l'activation d'AKT/CREB et l'inhibition de la voie ERK/Elk-1. Ces évènements moléculaires ont conduits à l'augmentation de la fixation de CREB et à la diminution de la fixation de Elk-1 sur le promoteur du gène *SMN2* et à l'augmentation de l'expresion de SMN (Résultats non-publiés).

La pratique de l'exercice physique est connue pour augmenter le niveau circulant de l'hormone de croissance IGF-1 (Scheinowitz et al., 2003). Le récepteur à l'IGF-1 est connu pour moduler l'activité des voies de signalisation AKT/CREB, ERK/Elk-1 (D'Mello et al., 1997; Lu et al., 2008b). De plus, plusieurs travaux ont démontré que l'IGF-1 est l'un des médiateurs de la survie neuronale en activant les cascades intracellulaires liée au récepteur IGF-1R, notamment AKT (Neff et al., 1993; Ozdinler and Macklis, 2006). Par ailleurs, Holzenberger et coll. ont démontré que la diminution de l'expression de l'IGF-1R chez la souris contrôle prolonge l'espérance de vie et induit des effets neuroprotecteurs (Holzenberger et al., 2003). Enfin,des études ont montré des altérations de la signalisation de l'IGF-1 dans l''ASI. Dans des biopsies de muscles patients SMA de type I, les niveaux d'expression de l'IGF-1R sont augmentés par rapport à des patients contrôle et restent inchangés suite à une augmentation du taux d'IGF-1 circulant (Millino et al., 2009).

L'ensemble de ces données ont orienté nos recherches sur l'implication de la voie de l'IGF-1 dans la pathologie de l'ASI d'une part et dans les effets bénéfiques de l'exercice dans

l'ASI d'autre part. Nous avons cherché à identifier le rôle de l'IGF-1R dans la modulation des voies de signalisation AKT/CREB et ERK/Elk-1 et le contrôle de l'expression de SMN.

Pour aborder ces questions, nous avons analysé l'effet d'une invalidation partielle du récepteur à l'IGF-1R dans le modèle murin ASI mimant une amyotrophie spinale de type 2 (Hsieh-Li et al., 2000) en croisant les souris invalidées partiellement pour l'IGF-1R (*Igf1r* $^{+/-}$) avec les souris ASI (*Smn*$^{\Delta 7/\Delta 7}$, *hSMN2*). Nous avons d'abord évalué les modifications phénotypiques et histologiques des souris ASI invalidés partiellement pour l'IGF-1R (*Smn*$^{\Delta 7/\Delta 7}$, *hSMN2, Igf1r* $^{+/-}$) par rapport aux souris ASI (*Smn*$^{\Delta 7/\Delta 7}$, *hSMN2, Igf1r* $^{+/+}$). Puis, nous avons décrypté les mécanismes moléculaires liés au changement dans la balance d'activation des voies AKT et ERK suite à la réduction de l'expression de l'IGF-1R.

La transduction du signal liée à la fixation de l'IGF-1 sur son récepteur repose grandement sur l'intégrité de la membrane plasmique et l'élaboration de plateformes de signalisation (Lu et al., 2008b). Une déplétion en cholestérol membranaire est délétère pour la signalisation de l'IGF-1R. En effet, une étude a montré in vitro qu'une diminution du cholestérol membranaire ou une diminution d'expression de la protéine Cav-1 entrainent (1) une diminution de la co-localisation de l'IGF-1R avec Cav-1 et (2) une chute de la phosphorylation d'AKT (Lu et al., 2008b). Dans le SNC, le cholestérol joue un rôle crucial pour la survie, la croissance et signalisation neuronale (Funfschilling et al., 2012). Son homéostasie nécessite donc d'être parfaitement régulée afin de ne pas perturber le fonctionnement cellulaire. Des altérations de l'homéostasie du cholestérol sont d'ailleurs souvent associées à des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Giudetti et al., 2016) ou d'Huntington (Leoni et al., 2011).

A ce jour, aucune étude de l'homéostasie du cholestérol et son implication dans l'ASI n'a été réalisée. Nous nous sommes donc interrogés sur l'implication de l'homéostasie du cholestérol dans la pathogénèse de l'ASI.

Pour y répondre, nous avons d'abord évalué les niveaux de cholestérol et des intermédiaires participant à sa synthèse dans la moelle épinière du modèle murin mimant une amyotrophie spinale de type 2 ainsi que dans le sérum de patients ASI. Nous avons mis en évidence une diminution de la concentration en cholestérol et une altération du niveau de plusieurs métabolites associés au cholestérol dans la moelle épinière. Nous avons cherché à comprendre l'origine de ces dérégulations. Pour cela, nous avons analysé la chaine de production et de régulation du cholestérol dans la moelle épinière de souris ASI et in vitro dans des fibroblastes de patients ASI type 1.

Nous avons mis en évidence que la réduction d'expression de l'IGF-1R permet d'activer la voie AKT/CREB et d'inhiber la voie ERK/Elk-1. Ce changement d'activation des voies intracellulaires est associé à une augmentation de l'expression de SMN. De plus, nous avons identifié que les niveaux d'expression de plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse

du cholestérol sont augmentés dans la moelle épinière de souris ASI (*Smn*$^{\Delta 7/\Delta 7}$, *hSMN2, Igf1r* $^{+/-}$).

Nous nous sommes demandé si une modification de la voie de biosynthèse du cholestérol pouvait moduler l'expression de la protéine SMN. Pour répondre à cette question nous avons utilisé un modèle cellulaire de fibroblastes de patients ASI de type 1 et contrôles pour surexprimer ou inhiber l'enzyme DHCR24, qui est une enzyme clé de voie de biosynthèse du cholestérol. Nous ensuite analysé l'expression et la localisation de SMN dans ces cellules.

Résultats

1. Article 1

1.1. Introduction à l'article 1

Il a été démontré qu'un protocole de course en une roue pendant 5 jours à partir du dixième jour post-natal prolongeait la durée de vie et la fonction motrice d'un modèle sévère d'amyotrophie spinale. L'exercice physique a induit neuro-protection des motoneurones qui est associée à une augmentation du taux d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits provenant du gène SMN2 et ainsi de la quantité de protéine SMN complète produite (Grondard, 2005). Des études ultérieures ont mis en évidence une compétition dans l'activation des voies de signalisation MEK/ERK /Elk-1 et AKT/CREB et leur contrôle sur l'expression de SMN (Biondi et al., 2008, 2010, 2010). En effet, dans la moelle épinière des souris ASI, la voie MEK/ERK /Elk-1 est suractivée et réprime la transcription du transgène SMN2. L'exercice physique ou l'injection de NMDA active la voie CAMKII/AKT/CREB et augmente la transcription de SMN2 via la fixation du facteur de transcription CREB sur le promoteur de SMN (Branchu et al., 2013).

Parmi les facteurs neurotrophiques, l'IGF-1 est connu pour son rôle dans la protection des motoneurones (Jiménez Garduño et al., 2017; Krieger et al., 2014; Lunn et al., 2015). Il se trouve que des altérations de la quantité d'IGF-1 ont été rapportées dans le muscle de patients ASI ainsi que dans des modèles murins (Millino et al., 2009; Murdocca et al., 2012). Par ailleurs, les niveaux d'expression du récepteur à l'IGF-1 sont surélevés dans l'ASI comme cela est observé dans le muscle de patients de souris ASI (Bosch-Marcé et al., 2011; Millino et al., 2009). Parmi les trois voies de signalisation sous l'IGF-1R (ERK/Elk-1, AKT/CREB, JAK/STAT), la cascade ERK/Elk-1 est spécifiquement activée dans la moelle épinière des souris ASI tandis que l'activation de la voie AKT/CREB est diminuée (Biondi et al., 2010; Millino et al., 2009). De plus, l'invalidation génétique partielle du gène codant pour l'IGF-1R a démontré, (1) un effet protecteur contre le stress oxydant chez la souris (Holzenberger et al., 2003) et (2) une neuroprotection dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Cohen et al., 2009).

Nous avons donc porté notre intérêt sur l'effet d'une invalidation génétique partielle du récepteur à l'IGF-1 sur les voies AKT/CREB et ERK/Elk-1 et sur l'expression de SMN. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle murin mimant une amyotrophie spinale de type 2 de Hsieh-Li (Hsieh-Li et al., 2000), que nous avons croisé avec des souris hétérozygotes pour IGF-1R (Holzenberger et al., 2003) et analysé le phénotype de souris résultantes.

Neurobiology of Disease

IGF-1R Reduction Triggers Neuroprotective Signaling Pathways in Spinal Muscular Atrophy Mice

Olivier Biondi,[1]* Julien Branchu,[1]* Amina Ben Salah,[1] Léo Houdebine,[1] Lise Bertin,[1] Farah Chali,[1] Céline Desseille,[1] Laure Weill,[1] Gabriel Sanchez,[2] Camille Lancelin,[1] Saba Aïd,[3] Philippe Lopes,[1,4] Claude Pariset,[1] Sylvie Lécolle,[1] Jocelyn Côté,[2] Martin Holzenberger,[3] Christophe Chanoine,[1] Charbel Massaad,[1] and Frédéric Charbonnier[1]

[1]Université Paris Descartes and INSERM Unité Mixte de Recherche Scientifique 1124, F-75270 Paris Cedex 06, France, [2]Centre for Neuromuscular Disease and Department of Cellular and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada K1H 8M5, and [3]INSERM and Sorbonne Universities, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, and [4]Université d'Evry-val-d'Essonne, Evry 91025, France

Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disease characterized by the selective loss of spinal motor neurons due to the depletion of the survival of motor neuron (SMN) protein. No therapy is currently available for SMA, which represents the leading genetic cause of death in childhood. In the present study, we report that insulin-like growth factor-1 receptor (*Igf-1r*) gene expression is enhanced in the spinal cords of SMA-like mice. The reduction of expression, either at the physiological (through physical exercise) or genetic level, resulted in the following: (1) a significant improvement in lifespan and motor behavior, (2) a significant motor neuron protection, and (3) an increase in SMN expression in spinal cord and skeletal muscles through both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. Furthermore, we have found that reducing IGF-1R expression is sufficient to restore intracellular signaling pathway activation profile lying downstream of IGF-1R, resulting in both the powerful activation of the neuroprotective AKT/CREB pathway and the inhibition of the ERK and JAK pathways. Therefore, reducing rather than enhancing the IGF-1 pathway could constitute a useful strategy to limit neurodegeneration in SMA.

Key words: gene expression; IGF-1R; model mice; signaling pathways; SMN; spinal muscular atrophy

Significance Statement

Recent evidence of IGF-1 axis alteration in spinal muscular atrophy (SMA), a very severe neurodegenerative disease affecting specifically the motor neurons, have triggered a renewed interest in insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway activation as a potential therapeutic approach for motor neuron diseases. The present study challenges this point of view and brings the alternative hypothesis that reducing rather than enhancing the IGF-1 signaling pathway exerts a neuroprotective effect in SMA. Furthermore, the present data substantiate a newly emerging concept that the modulation of IGF-1 receptor expression is a key event selectively determining the activation level of intracellular pathways that lie downstream of the receptor. This aspect should be considered when designing IGF-1-based treatments for neurodegenerative diseases.

Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal-recessive disease occurring in early childhood for which no specific therapy exists. SMA is characterized by the specific loss of spinal motor neurons, leading to a progressive muscular weakness and subsequent death when vital muscles are affected (Crawford and Pardo, 1996). SMA is caused by mutation of the *Survival of Motor Neuron 1* (*SMN1*) gene (Lefebvre et al., 1995), leading to a defective SMN protein expression. The disease severity is modulated by the expression of *SMN2*, a *SMN1* gene copy. *SMN2* produces only a small amount of full-length *SMN* transcripts due to the alternative splicing of exon 7, leading to a small amount of stable SMN protein (Lorson and Androphy, 2000). Despite two decades

Received Feb. 13, 2015; revised July 13, 2015; accepted July 27, 2015.

Author contributions: F. Charbonnier designed research; O.B., J.B., A.B.S., L.H., L.B., F. Chali, C.D., L.W., G.S., C.L., and S.A. performed research; O.B., J.B., L.W., P.L., S.L., J.C., M.H., C.C., C.M., and F. Charbonnier analyzed data; C.P. and F. Charbonnier wrote the paper.

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies. J.B. is the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. J.C. is a Canada Research Chair (Tier 2) in RNA Metabolism funded through an operating grant from the Canadian Institutes for Health Research (Grant MOP-86746). G.S. is the recipient of a postdoctoral fellowship from Association Française contre les Myopathies. We thank S. Lefebvre for antibodies against SMN, K. Mamchaoui and V. Mouly (Human Cell Culture Platform of the Myology Institute, Paris, France) for providing the human cells from SMA patients, and C. Mader for animal care.

The authors declare no competing financial interests.

*O.B. and J.B. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Frédéric Charbonnier, Université Paris Descartes and INSERM UMR_S 1124, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France. E-mail: frederic.charbonnier@parisdescartes.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0608-15.2015

Copyright © 2015 the authors 0270-6474/15/3512063-17$15.00/0

of research, the specific sensitivity of motor neurons to defects of the ubiquitous SMN protein that is involved in essential cell processes such as mRNA metabolism (Fischer et al., 1997; Pellizzoni et al., 1998) remains poorly understood. Microarray analyses unexpectedly failed to identify the specific misexpression of some essential genes in motor neurons after SMN depletion (Zhang et al., 2008). This may suggest that the selective degeneration of motor neurons in SMA results from alterations of systemic pathways that would ultimately target motor neurons.

Although multiple neurotrophic factors are implicated in neuron survival, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is a critical factor for the maintenance and the survival of motor neurons (Neff et al., 1993; Ozdinler and Macklis, 2006). Interestingly, several recent investigations pointed toward an IGF-1 signaling pattern-alteration in SMA. First, the levels of circulating IGF-1 and *Igf-1* hepatic mRNA expression were shown to display a marked reduction in a severe type of SMA-like model mice (Hua et al., 2011; Murdocca et al., 2012). Second, in skeletal muscles from type 1 SMA patients (Millino et al., 2009) or from SMA mice (Bosch-Marcé et al., 2011), the IGF-1 receptor (IGF-1R) was found to be overexpressed. The level of this overexpression in human biopsies correlated with the severity of the disease (Millino et al., 2009). Interestingly, increasing IGF-1 availability for mouse SMA mouse muscles had no effect on IGF-1R expression (Bosch-Marcé et al., 2011), suggesting that IGF-1R overexpression was constitutive and not the result of a compensatory mechanism for a putative decrease in serum IGF-1 concentration. Unfortunately, data on the IGF-1R expression in SMA mouse CNS are presently lacking. Third, among the three intracellular signaling pathways known to lie downstream of IGF-1R, the ERK1/2, JAK/STAT3, and AKT pathways (D'Mello et al., 1997; Párrizas et al., 1997; Yadav et al., 2005), the ERK cascade was found to be constitutively overactivated in the spinal cord and muscles (Millino et al., 2009; Biondi et al., 2010). In contrast, the AKT pathway was found to be underactivated in SMA mouse spinal cords (Biondi et al., 2010; Kye et al., 2014).

Interestingly, IGF-1R overexpression was reported in the CNS and muscles from patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Wilczak et al., 2003; Lunetta et al., 2012), another fatal motor neuron disease, contrasting with nearly identical serum IGF-1 concentration (Corbo et al., 2010). Moreover, recent data demonstrated that the reduction of IGF-1 signaling through *Igf-1r* gene partial inactivation (*Igf-1r*$^{+/-}$) resulted in an increase in lifespan; a greater resistance to oxidative stress (Holzenberger et al., 2003); and a reduction in behavioral impairment, neuroinflammation, and neuronal and synaptic loss in a mouse model of Alzheimer's disease (Cohen et al., 2009). Therefore, one could ask whether enhancing or depressing IGF-1 related signaling pathway results in a beneficial or detrimental effect on SMA motor neurons. To address this question directly, we generated an SMA mouse model harboring only one functional allele for *Igf-1r* (*Igf-1r*$^{+/-}$) and analyzed the hallmarks of SMA pathogenesis.

Materials and Methods

Mice and treatments. The knock-out transgenic type 2 SMA-like mice (FVB/NRj-*Smn*$^{\Delta 7/\Delta 7}$ *SMN2*) derived from mice obtained from the Institute of Molecular Biology (Hsieh-Li et al., 2000; Academia Sinica). To standardize the type 2 phenotype, male and female mutant mice with a weight ranging from 3 to 4 g at 8 d of age were used for this study, as described previously (Biondi et al., 2008). We generated a new mouse strain by crossing FVB/NRj-*Smn*$^{+/\Delta 7}$ *SMN2* mice with *Igf1r*$^{+/-}$ mice (B6.129-*Igf1r*tm1.2Mhz/Orl, strain EM00115 from the EMMA mouse repository; (Holzenberger et al., 2003). After the crossing between FVB/NRj-*Smn*$^{+/\Delta 7}$ *SMN2 and* B6.129-*Igf1r*tm1.2Mhz/Orl strains, the double mutant carriers were backcrossed for 10 generations to the FVB/NRj strain (Janvier Labs) to purify the genetic background of the mice. Among the different genotypes generated in offspring, the original parental genotypes (*Smn*$^{\Delta 7/+}$ *SMN2 Igf-1r*$^{+/+}$; $n = 74$) mice and (*Smn*$^{\Delta 7/+}$ *SMN2 Igf-1r*$^{+/-}$; $n = 65$) mice were referred to as "control" and "*Igf-1r*$^{+/-}$ control," respectively, and the SMA-like mice (*Smn*$^{\Delta 7/\Delta 7}$ *SMN2 Igf-1r*$^{+/+}$; $n = 62$) and *Smn*$^{\Delta 7/\Delta 7}$ *SMN2 Igf-1r*$^{+/-}$ ($n = 61$) mice were designated as "SMA" and "*Igf-1r*$^{+/-}$ SMA," respectively. Male and female were used for this study. Body weight and lifespan recording were performed daily until animal death. The animals were considered to be dead when they were no longer able to stand up after having been placed on their sides for 1 min. The care and treatment of animals followed the national authority (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France) guidelines for the detention, use, and ethical treatment of laboratory animals.

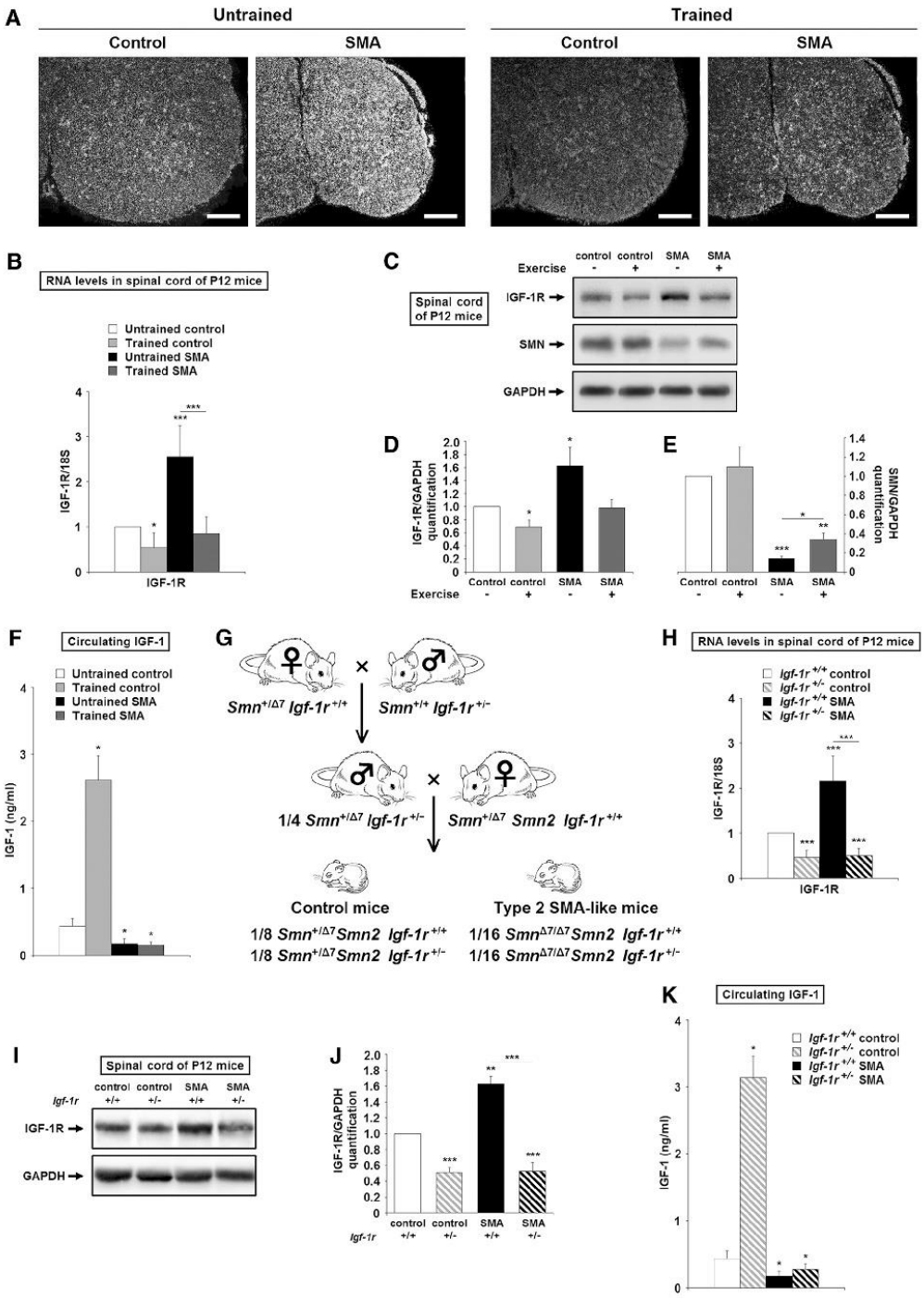
Training protocol. Exercise was performed in a wheel with a controlled speed as described previously (Grondard et al., 2005). The protocol was started from 8 d of age (postnatal day 8, P8). The mice in the trained group were progressively accustomed to wheel training for 2 d (the first day, 4 periods of 5 min running with a rest period of 30 min; the second day, 2 periods of 10 min running with a rest period of 30 min). Next, mice were individually and continuously trained for 20 min/d. The speed was fixed at 1 m/min for the first 3 d and then increased by successive steps of 2 m/min, finally reaching 5 m/min (maximal speed).

Behavioral evaluation. The grip strength was performed in the forelimb of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice and *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ type 2 SMA-like mice from P8 to death. The time spent holding onto a thin metal rod suspended in midair was calculated. Each mouse was subjected to five successive attempts separated by a 10 min rest period.

The ambulatory behavior was assessed in an open-field test for all groups. The apparatus consisted of a wooden box measuring 28 × 28 × 15 cm. The floor of the arena was divided into 16 7 × 7 cm squares. The mice were tested individually and the open field was washed after each session. Each mouse initially placed in the center of the open field was allowed to move freely for 5 min. The behavioral measures recorded manually during these 5 min were the number of peripheral and central square crossings.

IGF-1 ELISA. Mice were anesthetized with 1% pentobarbital solution (6 μl/g) diluted in 0.9% saline buffer by intraperitoneal injection. A 400 μl blood sample was taken from the right ventricle with a 1 ml syringe mounted with a 22 gauge needle, both coated with heparin (5000 UI/ml; Pan Pharma Luitré). The blood sample was centrifuged at 1500 × *g* for 10 min at +4°C. The serum was frozen, stored at −80°C, and used within 1 month. The quantity of IGF-1 was determined on 100 μl of serum in duplicate using the Murine IGF-1 ELISA kit (900-K170; Peprotech) and following the manufacturer's instructions.

In situ *hybridization.* To detect *Igf-1r* mRNAs, antisense oligonucleotide probes were synthesized as described previously (Oshima et al., 2002; Fukaya et al., 2005): forward 5′-CACAGTCATCCGTGGCTGGA-3′ and reverse 5′-CGCTTCCCACACACACTTGG-3′. Under deep pentobarbital (40 mg/kg) anesthesia, spinal cords were obtained from P12 SMA-like mice. Frozen sections (14 μm thickness) were mounted on glass slides coated with 3-aminopropyltriethoxysilane. Each section was fixed immediately after cutting by immersion for 20 min in 2% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Sections were then rinsed three times in PBS, dipped in water, and dehydrated with a graded ethanol series (70%, 95%, and 100%). The sections were then air-dried and stored at −80°C until further use. The hybridization mixture contained 50% formamide, 4× standard saline citrate (SSC), 1× Denhardt's solution, 0.25 mg/ml yeast tRNA, 0.25 mg/ml sheared salmon sperm, 0.25 mg/ml polyA, 10% dextran sulfate, 100 mM DTT, and [^{35}S]-dATP-labeled oligonucleotide probes (4.5 × 10^6 dpm/ml). One hundred microliters of hybridization mixture was placed on each section. The sections were then covered with a Parafilm coverslip and incubated in a humidified chamber at +43°C for 20 h. After hybridization, the sections were washed successively twice in 1× SSC containing 0.01 M DTT and twice in 0.5× SSC containing 0.01 M DTT for 15 min at +55°C and finally in 0.5× SSC containing 0.1 M DTT for 15 min at room temperature.


A
Untrained
Trained
Control
SMA
Control
SMA
B
RNA levels in spinal cord of P12 mice
Untrained control
Trained control
Untrained SMA
Trained SMA
IGF-1R/18S
IGF-1R
C
Exercise
control control SMA SMA
Spinal cord of P12 mice
IGF-1R
SMN
GAPDH
D
IGF-1R/GAPDH quantification
Control control SMA SMA
Exercise
E
SMN/GAPDH quantification
Control control SMA SMA
F
Circulating IGF-1
Untrained control
Trained control
Untrained SMA
Trained SMA
IGF-1 (ng/ml)
G
Smn+/Δ7 Igf-1r+/+
Smn+/+ Igf-1r+/-
1/4 Smn+/Δ7 Igf-1r+/-
Smn+/Δ7 Smn2 Igf-1r+/+
Control mice
Type 2 SMA-like mice
1/8 Smn+/Δ7Smn2 Igf-1r+/+
1/8 Smn+/Δ7Smn2 Igf-1r+/-
1/16 SmnΔ7/Δ7Smn2 Igf-1r+/+
1/16 SmnΔ7/Δ7Smn2 Igf-1r+/-
H
RNA levels in spinal cord of P12 mice
Igf-1r+/+ control
Igf-1r+/- control
Igf-1r+/+ SMA
Igf-1r+/- SMA
IGF-1R/18S
IGF-1R
I
Spinal cord of P12 mice
control control SMA SMA
Igf-1r +/+ +/- +/+ +/-
IGF-1R
GAPDH
J
IGF-1R/GAPDH quantification
control control SMA SMA
Igf-1r +/+ +/- +/+ +/-
K
Circulating IGF-1
Igf-1r+/+ control
Igf-1r+/- control
Igf-1r+/+ SMA
Igf-1r+/- SMA
IGF-1 (ng/ml)

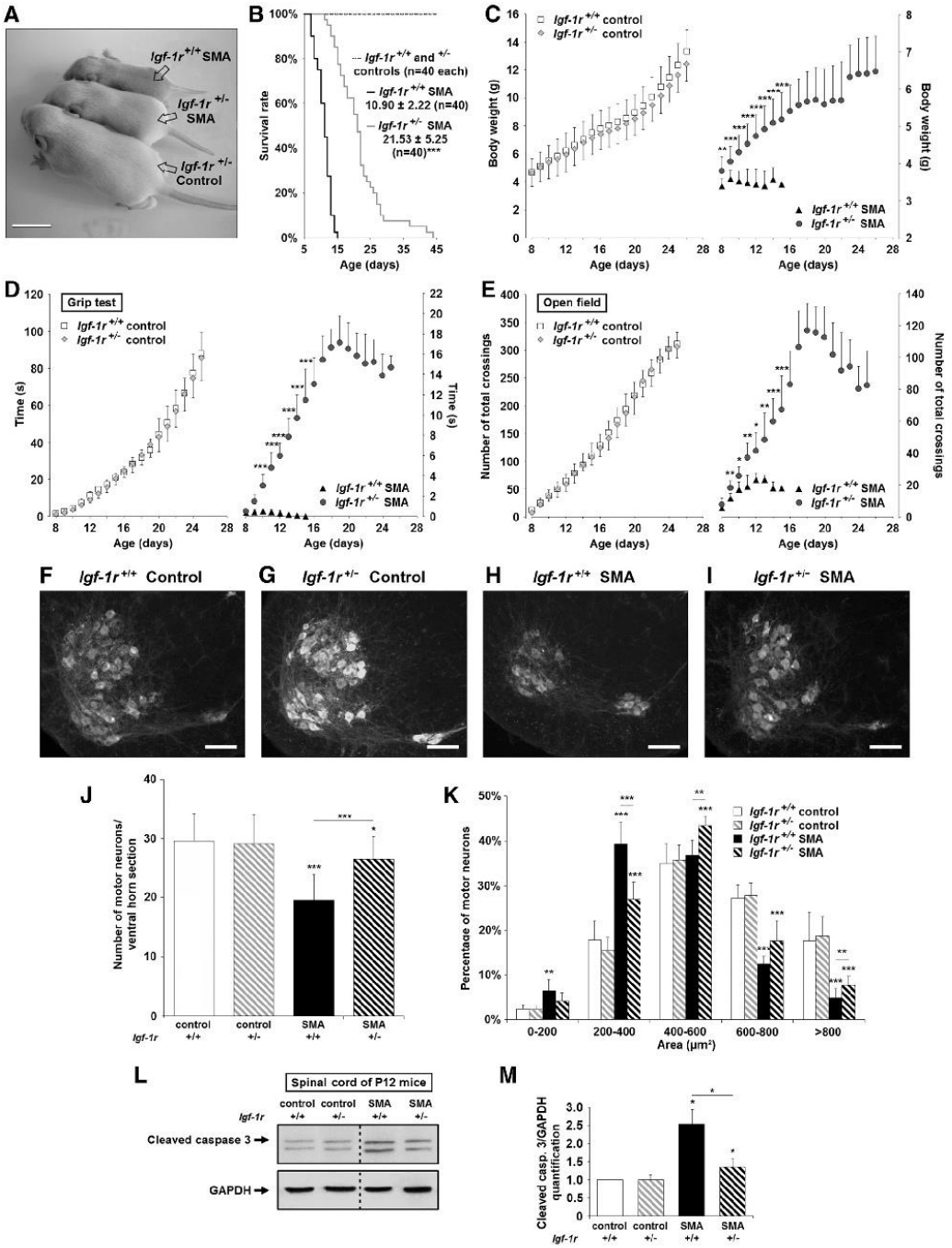


Figure 2. Genetic reduction of IGF-1R expression extends survival and motor behavior and promotes neuroprotection in SMA mice. ***A***, Phenotype of *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with SMA mice and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age. Scale bar, 1 cm. ***B***, Lifespan of *Igf-1r*$^{+/+}$ compared with *Igf-1r*$^{+/-}$ control and SMA mice ($n = 40$). (*Figure legend continues.*)

Sections were exposed to Nuclear Track emulsion (NTB-2; Kodak) for 8 weeks.

Histological and immunohistochemical analysis. For motor neuron studies, anesthetized animals were submitted to an intracardial perfusion of 40 ml of PBS solution at 1.2 ml/min followed by 40 ml of 4% PFA solution diluted in PBS solution at the same flow. Then, spinal cords were dissected, incubated overnight in 4% PFA solution, and washed twice for 2 h with PBS. The lumbar spinal cords (L1 to L5) were cut using a vibratome VT-1000S (Leica) on the whole length of the sample at 50-μm-thick cross sections. One of every five sections was processed for immunohistochemical analysis as described previously (Branchu et al., 2013).

For SMN immunostaining, spinal cords were dissected from anesthetized animals and immediately frozen in cold isopentane solution (−80°C). The lumbar spinal cords (L1 to L5) were cut selectively using a cryostat microtome (CM3050S; Leica) at 14-μm-thick cross sections. One of every 10 sections (40 sections examined) was processed for immunohistochemical analysis as described previously (Grondard et al., 2005).

All types of sections were then incubated for 1 h at room temperature in a blocking solution (7% normal donkey serum with 1% Triton X-100 and 0.5% Tween 20 in TBS). Incubations in corresponding primary antisera, namely polyclonal goat anti-choline acetyltransferase (ChAT; 1:400; Millipore) and polyclonal rabbit anti-SMN clone 502 (1:400; obtained from Suzie Lefebvre, Paris, France) primary antibodies, were then performed for 3 d at +4°C in the blocking solution. Sections were washed in TBS buffer with 0.5% Tween 20 and subsequently incubated with polyclonal Cy3-conjugated donkey anti-goat (1:400; Jackson ImmunoResearch) and/or polyclonal Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit (1:400; Jackson ImmunoResearch) antibodies for 1 h at room temperature in the blocking solution. The sections were washed in TBS and mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories). The staining specificity was checked incubating sections in absence of the primary antibody.

For motor end-plate labeling, whole-mount preparations of muscle fibers were stained using Alexa Fluor 568-conjugated α-bungarotoxin (4 mg/ml in PBS with 4% bovine serum albumin), monoclonal rabbit anti-neurofilament light protein (NN18, 1:500; Millipore), and synaptophysin (1:5; Invitrogen Life Technologies). The whole-mount preparations were subsequently incubated with an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:400; Invitrogen) for 1 h at room temperature as described previously (Branchu et al., 2013). The different developmental synapse shapes were determined according to Sanes and Lichtman (1999) and visualized using α-bungarotoxin staining for innervated neuromuscular junctions (NMJs). The acetylcholine receptor (AChR) clusters appearing elliptical and uniform or with some low AChR density but without perforation were defined as "uniform-plaques." Elliptical AChR clusters displaying at least one perforation but maintaining a peripheral continuity were defined as "perforated-plaques." Finally, AChR cluster displaying an important number of perforations and a loss of peripheral continuity were defined as "pretzel-like plaques," the only shape for which we could observe a more precise spatial correspondence between nerve terminals and AChR clusters. The proportions of each type of plaque were determined from a minimum of 100 NMJs per muscle and per mouse and expressed as percentage of total counted NMJs.

For muscle typology, cryostat sections (one transversal medial section per muscle and per animal, which represented ~4000, 6000, and 12,000 muscle fibers in the soleus, the plantaris, and the tibialis, respectively, for each experimental point) were either stained or processed for immunochemistry. For the staining protocol, muscles sections were dried for 30 min at room temperature and then stained with an H&E classical protocol. For the immunochemistry protocol, muscles sections were fixed with acetone for 20 min at room temperature and washed three times in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBST). Slices were then incubated with mouse monoclonal antibodies raised against myosin heavy chains (MyHCs): (1) embryonic (F1.652; University of Iowa, Iowa City, IA), (2) neonatal (N3.36; University of Iowa), (3) slow type I (NCL-MyHCs), (4) all fast type II (NCL-MyHCf; Leica), and (5) intermediate type IIa MyHC isoforms (A4.74) at a dilution of 1:20 for 1 h at room temperature and washed three times in PBST. Sections were then incubated at room temperature with a rabbit anti-mouse Ig conjugated with FITC (1:20; Sigma-Aldrich) for 1 h. After washing with PBS, sections were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). The percentage of fast IIx/b fibers were determined as the difference between the total number of type II and type IIa fibers.

All counts were performed using ImageJ software version 1.46. Color images were tinted, also using ImageJ, and identical brightness, contrast, and color balance adjustments were applied to all groups.

Microscopy. All immunofluorescence images were collected with a CMOS camera (ORCA Flash 2.8; Hamamatsu Photonics) mounted on a Zeiss Z1 AxioObserver using ZEN 2012 software with 100× [10× Zeiss Plan NeoFluar numerical aperture (NA) 0.3], 200× (20× Zeiss EC-Plan-Apo NA 0.8), and 630× (63× Zeiss Plan-Apo Oil NA 1.4) magnifications.

Silencing of IGF-1R with siRNA in cell cultures. MN-1 (Motoneuron-1) cells have been derived from the spinal cords of E18 control mice and immortalized (Salazar-Grueso et al., 1991). These cells only harbor the two alleles of the murine *Smn* genes. MN-1 cells have been provided by J. Côté (Ottawa University, Canada) and were plated at 5000 cells/cm^2 at +37°C in 5% CO_2 in a 6 well plate with DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 1% of penicillin/streptomycin (P/S) growth medium (GM).

Human primary culture of myogenic precursor cells was derived from SMA patient biopsies. Muscle biopsies were obtained from the Bank of Tissues for Research (a partner in the European Union network EuroBioBank) in accordance with European recommendations and French legislation. Satellite cells were isolated from biopsies and grown as described previously (Bigot et al., 2009). The myogenic purity of the population was monitored by immunocytochemistry using desmin as a marker. Myoblast cells were plated at 10,000 cells/cm^2 in 6 well plates at +37°C in 5% CO_2 in DMEM Glutamax (Invitrogen) supplemented with 20% FBS (Invitrogen), 1% Ultroser G (Pall), and 1% P/S (5000 U; Invitrogen) for 2 d. Then, differentiation was induced with DMEM supplemented with 5% horse serum (Invitrogen) and 1% P/S (5000 U; Invitrogen) differentiation medium (DM) for 10 d.

MN-1 cells at 50% confluence were transfected with Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen) in antibiotic-free GM with either ON-TARGETPlus nontargeting siRNA (D-001810–01; GE Healthcare) as a negative control or ON-TARGETPlus mouse *Igf-1r* siRNA (L-056843; GE Healthcare) at 50 nM, following the manufacturer's instructions. Human myotubes were transfected with Dharmafect 3 transfection reagent (GE Healthcare) in antibiotic-free DM with either the same nontargeting siRNA or with ON-TARGETPlus human *IGF-1R* siRNA (L-003012; GE Healthcare) at 50 nM following the manufacturer's

←

Figure 1. The IGF-1 axis is altered in the spinal cords of severe SMA-like mice. ***A***, *In situ* hybridization on *Igf-1r* mRNA for the localization of expression in the lumbar spinal cords (L1–L5) of untrained control and type 2 SMA-like mice (left) compared with trained control and type 2 SMA-like mice (right) at 12 d of age ($n = 4$). Scale bar, 100 μm. ***B***, Quantification by real-time qRT-PCR of *Igf-1r* transcripts normalized by 18S transcripts in the ventral lumbar spinal cords of untrained control and type 2 SMA-like mice compared with trained control and type 2 SMA-like mice at 12 d of age ($n = 10$). ***C–E***, Western blot analysis (***C***) and quantification of IGF-1Rβ (***D***) and SMN (***E***) protein expression in the ventral lumbar spinal cords of untrained control and type 2 SMA-like mice compared with trained control and type 2 SMA-like mice at 12 d of age ($n = 4$). ***F***, Quantification of circulating IGF-1 concentration by ELISA in the serum of untrained control and type 2 SMA-like mice compared with trained control and type 2 SMA-like mice at 12 d of age ($n = 4$). ***G***, Schematic representation of the crossings yielding to *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice. ***H***, Quantification by real time qRT-PCR of *Igf-1r* transcripts normalized by 18S transcripts in the ventral lumbar spinal cords of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 10$). ***I, J***, Western blot analysis (***I***) and quantification (***J***) of IGF-1Rβ protein expression in the ventral lumbar spinal cords of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 5$). ***K***, Quantification of circulating IGF-1 concentration by ELISA in the serum of *IGF-1R*$^{+/+}$ and *IGF-1R*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 4$). Data are represented as mean ± SEM and significance is reported versus untrained or *Igf-1r*$^{+/+}$ control mice, respectively (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

instructions. Transfection medium was replaced by GM or DM after 16 h. Cells were harvested 56 h later in cold 1× PBS (Invitrogen) and centrifuged at 200 × *g* for 3 min. Then, supernatants were removed and pellets frozen at −80°C.

Protein and Western blot analysis. The ventral part of frozen spinal cords was selectively dissected by razor blade at −20°C. A furrow appears in the middle of the ventral part and dorsal root ganglia and can be seen on the dorsal part of the spinal cord. Frozen pellets of MN-1 and human primary culture myotubes were homogenized in 50 μl of ice-cold RIPA buffer [50 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP40, 5 mM EDTA, pH 8.0, 2 mM PMSF (Sigma-Aldrich), 50 μg/ml leupeptin, 50 μg/ml pepstatin A, and 50 μg/ml aprotinin] for 2 wells of a 6 well plate; ventral lumbar spinal cord samples were homogenized in 100 μl of ice-cold RIPA buffer for 5 mg of tissue. Protein concentration of the clarified homogenates (+4°C, 15 min, 13,500 revolutions/min) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Bio-Rad). Then, 10 μg protein samples for SMN analysis and 30 μg samples for other analysis of each homogenate were submitted to 12.5% SDS-PAGE electrophoresis (1.5 M Tris, pH 8.3, 12.5% acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.06% TEMED). The separated proteins were transferred on PVDF membranes (Bio-Rad; Towbin et al., 1984). Equal loading of samples was checked by Ponceau dye staining of the transferred gels. Western blot analysis was performed on membranes incubated overnight at +4°C in 4% BSA, 0.1% Tween 20, and TBS, pH 7.4. Each of the following primary antibodies, including monoclonal mouse anti-SMN (1:5000; Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit anti-Ser^{473} phospho-AKT (1:1000; Cell Signaling Technology), polyclonal rabbit anti phospho-ERK1/2 (1:500; Cell Signaling Technology), polyclonal rabbit anti-Ser^{133} phospho-CREB (1:1000; Millipore), monoclonal mouse anti-Ser^{183} phospho-Elk-1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal mouse anti-Tyr^{705} phospho-STAT3 (1:500; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal rabbit anti-cleaved caspase 3 (ref.9661, 1:1000; Cell Signaling Technology), and polyclonal rabbit anti-IGF-1Rβ (3027; 1:1000; Cell Signaling Technology), was incubated overnight at +4°C in the above blocking medium. Membranes were rinsed in 0.1% Tween 20 in TBS for 3 × 10 min at room temperature and then incubated in horseradish peroxidase-conjugated goat secondary antibody directed against mouse immunoglobulins (1:5000; Bio-Rad) and directed against rabbit immunoglobulins (1:20,000; Jackson ImmunoResearch) in 0.1% Tween 20 in TBS for 1 h at room temperature. Bound antibody complexes were developed using the ECL system (GE Healthcare) and exposed to hyperfilm ECL-plus x-ray film (GE Healthcare).

In some instances, membranes were stripped after immunoblotting with phospho-AKT, phospho-ERK1/2, phospho-CREB, phospho-Elk-1, and phospho-STAT3 by incubation in stripping buffer (100 mM β-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) for 30 min at +55°C with agitation and membranes were then blocked and reprobed with polyclonal rabbit anti-AKT (1:1000; Cell Signaling Technology), polyclonal rabbit anti-ERK1/2 (1:500; Cell Signaling Technology), polyclonal rabbit anti-CREB (1:1000; Millipore), monoclonal mouse anti-Elk-1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit anti-STAT3 (1:500; Cell Signaling Technology) and monoclonal mouse anti-GAPDH (1:2000, sc-32233, Santa Cruz Biotechnology). The optical density (OD) of each specific band was quantified with ImageJ, subtracted to the background, and divided by the OD of corresponding GAPDH bands. The values for respective controls were set as 1 and the values for the other groups were normalized by the control and expressed as fold change. The number of animals in each group (*n*) was obtained by performing independent experiments using different membranes in which each group was compared with the control.

ChIP. Ventral lumbar spinal cord samples were chopped into small pieces with a scalpel and fixed for 15 min in 1% formaldehyde. Tissues were washed 3 times in cold PBS containing protease inhibitors (2 mM PMSF, 50 μg/ml leupeptin, 50 μg/ml pepstatin A, and 50 μg/ml aprotinin) and collected by centrifugation. Cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 300 μl of 85 mM KCl, 0.5% NP-40, 5 mM piperazine-N,N′-bis(2-ethanosulfonic acid; PIPES), pH 8.0, in the presence of protease inhibitors (2 mM PMSF, 50 μg/ml leupeptin, 50 μg/ml pepstatin A, and 50 μg/ml aprotinin). After incubation on ice for 10 min, cells were sonicated 6 times for 30 s using Bioruptor (Diagenode). Lysates were cleared by centrifugation and DNA concentration was determined by nanodrop spectrophotometer. ChIP-Adembeads (Ademtech) were incubated for 15 min at room temperature with blocking buffer on a rotating wheel. Beads were resuspended in 125 μl of ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1% Triton X100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1) and, after 1 h of incubation, equal amounts of DNA diluted 10 times in dilution buffer were added. DNA was incubated overnight at +4°C on a rotating wheel with 1 μg of the following antibodies: polyclonal rabbit anti-Ser^{133} phospho-CREB (Millipore), monoclonal mouse anti-Ser^{183} phospho-Elk-1 (Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit anti-acetyl-histone H3 (Millipore), and polyclonal rabbit-acetyl-histone H4 Lys8 (Millipore). Beads were washed sequentially in 150 mM NaCl TSE (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, with 500 mM NaCl TSE), buffer A (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-Hcl, pH 8.1), and 2 times with Tris-EDTA, pH 8.1, and then selectively eluted with 200 μl of 1% SDS and 0.1 M $NaHCO_3$. Cross-links were reversed by heating at +65°C for 4 h after adding NaCl at a 200 mM final concentration. After treatment with proteinase K (50 μg/ml) for 1 h at +37°C, DNA was purified using Geneclean Turbo Kit (Q-Biogene; MP Biomedicals). Real-time qRT-PCR analysis of inputs or immunoprecipitated DNAs was performed.

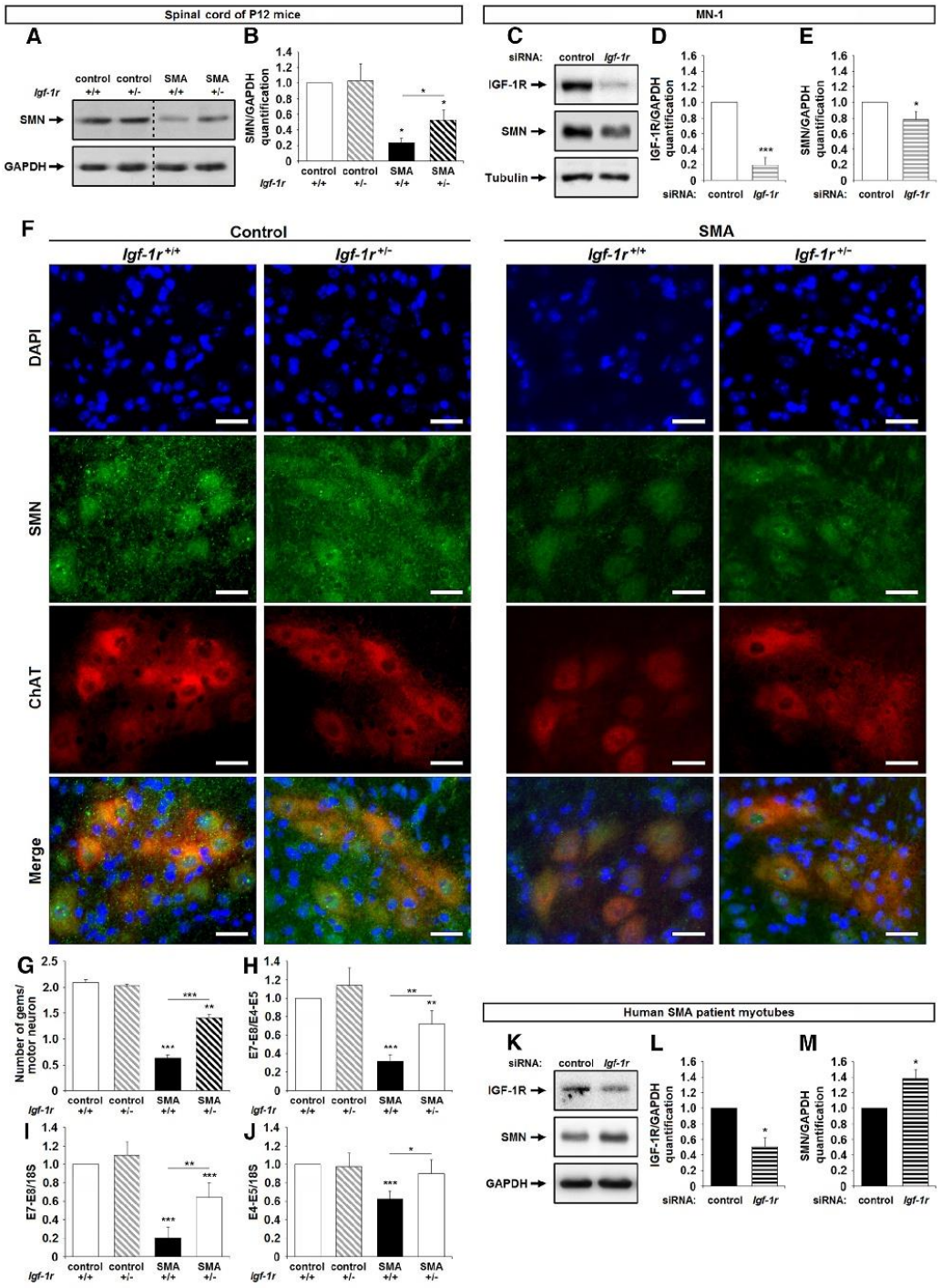
qRT-PCR analysis. Ventral lumbar spinal cord samples were chopped into small pieces with a scalpel and RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen). Each RNA preparation was treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega). One microgram was reverse transcribed with random primers (Promega) and reverse transcriptase M-MLV-RT (Invitrogen).

qRT-PCR was performed with standard protocols using SYBRGreen ROX Mix (ABgene) as a fluorescent detection dye in an ABI Prism 7000 in a final volume of 10 μl, which also contained 300 nM of the following primers (Operon): *SMN2* exon 4–exon 5 segment forward: 5′-TGTGTTGTGGTTTACACTGG-3′; *SMN2* exon 4–exon 5 segment reverse: 5′-TATTTCCAGGAGACCTGGAG-3′; *SMN2* exon 7–exon 8 segment forward: 5′-AAAAAGAAGGAAGGTGCTCAC-3′; *SMN2* exon 7–exon 8 segment reverse: 5′-GCCTCACCACCGTGCTGG-3′; *Igf-1r* forward: 5′-GCATCTGATCATTGCTCTG-3′; *Igf-1r* reverse: 5′-GCCCAACCTGCTGTTATTTC-3′; *18S* forward: 5′-GTAACCCGTTGAACCCCATT-3′; *18S* reverse: 5′-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3′; *SMN2* promoter site 1 [−2667nu to −2401nu] forward: 5′-GAGAGAGTTCCAGGAGTCAA-3′; *SMN2* promoter site 1 [−2667nu to −2401nu] reverse: 5′-GTCTCAAACTCGGTTGCTT-3′; *SMN2* promoter site 2 [+160nu to +503nu] forward: 5′-TCGTAGAAAGCGTGAGAAGT-3′; *SMN2* promoter site 2 [+160nu to +503nu] reverse: 5′-AAAACGCGGACCACAACTC-3′. The relative amounts of DNA in samples were determined on the basis of the threshold cycle for each PCR product (Ct).

Statistical analysis. All values are displayed as mean ± SEM within each group (Systat version 8.0; SPSS). A Kolmogorov–Smirnov normal distribution analysis was performed on all data, followed by either a Student's *t* test for normally distributed data or a nonparametric Kruskal–Wallis

←

(*Figure legend continued.*) ***C***, Weight curve of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control (left) and SMA (right) mice until SMA death ($n = 40$). ***D***, Grip time of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control (left) and SMA (right) mice until SMA death (***D***; $n = 20$). ***E***, Total number of squares crossings during 5 min in the open-field test for *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control (left) and SMA (right) mice until SMA death (***E***; $n = 20$). ***F–I***, Immunodetection of ChAT-positive motor neurons in the lumbar spinal cord (L1–L5) of *Igf-1r*$^{+/+}$ (***F***) and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice (***G***) compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ (***H***) and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice (***I***) at 12 d of age ($n = 10$. Scale bar, 50 μm. ***J, K***, Quantitative analysis of the number (***J***) and the cell body area (***K***) of motor neurons per ventral horn in the ventral lumbar spinal cord of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 10$). ***L, M***, Western blot analysis (***L***) and quantification (***M***) of cleaved caspase-3 protein expression in the ventral lumbar spinal cord of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 4$). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. Data are represented as mean ± SEM and significance is reported versus *Igf-1r*$^{+/+}$ control mice (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).


Spinal cord of P12 mice
MN-1
A
B
C
D
E
F
Control
SMA
Igf-1r+/+
Igf-1r+/-
DAPI
SMN
ChAT
Merge
G
H
I
J
K
L
M
Human SMA patient myotubes
IGF-1R
GAPDH
Tubulin
siRNA:
control
Igf-1r
SMN/GAPDH quantification
IGF-1R/GAPDH quantification
Number of gems/ motor neuron
E7-E8/E4-E5
E7-E8/18S
E4-E5/18S

test to verify significant differences between groups. Survival analysis was performed using Kaplan–Meier analysis.

Results

The IGF-1R is overexpressed in the spinal cords of SMA-like mice

We first analyzed the distribution of *Igf-1r* transcripts using *in situ* hybridization in the spinal cords of SMA-like and control mice at P12 (Fig. 1*A*, left). We found that *Igf-1r* mRNAs were significantly overexpressed in the spinal cords of SMA-like mice throughout the cord, including the motor column cells. We next analyzed the *Igf-1r* expression level by qRT-PCR in the ventral horn of the lumbar spinal cords of SMA-like mice and controls. There was a 2.5-fold increase in *Igf-1r* expression in SMA spinal cords compared with controls (Fig. 1*B*). *Igf-1r* mRNA overexpression in SMA mouse spinal cords was confirmed at the protein level with a 1.6-fold increase (Fig. 1*C*,*D*).

We then recorded the evolution of IGF-1R expression levels in a physiological neuroprotective paradigm for SMA-like mice based on physical exercise (Grondard et al., 2005). Submitting control and SMA-like mice to a daily running protocol led to a significant reduction in IGF-1R overexpression in the spinal cords of SMA-like mice (Fig. 1*A*, right, *B*–*D*). Because the reduction in IGF-1R expression could be the direct consequence of the exercise-induced enhancement of the ligand expression, we measured the circulating IGF-1 concentrations through ELISA quantifications (Fig. 1*F*). We found that, in striking contrast to controls, the level of circulating IGF-1 remained significantly lower in SMA compared with control mice, with no detectable change in trained compared with untrained SMA-like mice.

Most interestingly, SMN protein expression levels were inversely proportional to IGF-1R expression levels in the spinal cords of sedentary and trained SMA-like mice (Fig. 1*C*–*E*).

Strategy for genetically reducing IGF-1R expression in SMA-like mice

To determine whether the IGF-1R expression level might be involved in SMA pathogenesis, we created a new SMA-like mouse model in which one allele of the *Igf-1r* gene was inactivated ($Smn^{\Delta 7/\Delta 7}$ *SMN2* $Igf\text{-}1r^{+/-}$; Fig. 1*G*). In this new mouse strain, IGF-1R expression was reduced by 4-fold in the SMA spinal cord, reaching a level comparable to $Igf\text{-}1r^{+/-}$ controls, as evidenced by qRT-PCR and Western blot (Fig. 1*H*–*J*). We next investigated whether altering IGF-1R expression would change circulating IGF-1 concentrations through ELISA quantifications (Fig. 1*K*). We found that, in striking contrast to controls, the level of circulating IGF-1 remained significantly lower in SMA regardless of the IGF-1R expression level.

Genetically reducing IGF-1R expression strikingly prolongs survival and improves the motor behavior of SMA mice

The impact of IGF-1R reduction on the life span of SMA mice was then investigated. As expected in this new strain, SMA mice lived no longer than 15 d (Fig. 2*A*, *B*), as reported for the original severe SMA-like mouse strains (Hsieh-Li et al., 2000). Reducing IGF-1R expression significantly increased survival of SMA mice (Fig. 2*A*, *B*). The mean survival increased from 10.9 ± 2.2 d for SMA mice to 21.5 ± 5.3 d for the $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA, which represented a 2-fold increase in lifespan. Furthermore, the IGF-1R reduction, in striking contrast to controls (data not shown), led to a significant and progressive increase in the body weight of $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA mice until death (Fig. 2*C*). All these effects were similar regardless of sex.

We then questioned whether the reduction in IGF-1R expression would improve the motor behavior of the SMA mice. We tested all groups of mice on both the grip strength and the open field tests. We found that, in contrast to SMA mice, which were unable to grip the metal rod efficiently, the grip time of $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA progressively increased up to 17 ± 3 s at P19 and then stabilized until death (Fig. 2*D*). Again, whereas SMA mice displayed a strongly reduced exploratory activity compared with age-matched controls, the $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA mice displayed a progressive increase in exploratory behavior until P20, decreasing thereafter until death (Fig. 2*E*).

Reducing IGF-1R expression protects motor neurons in SMA mice

We next compared the number of ChAT-positive motor neurons in the ventral spinal cords of SMA, $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA, control and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ control mice at P12 (Fig. 2*F*–*J*). As observed in the original SMA mouse strain (Hsieh-Li et al., 2000), we found a 34% loss of motor neurons in spinal cords of SMA mice compared with controls (Fig. 2*J*). In contrast, $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA mice only showed a 10% reduction in the number of motor neurons, suggesting that reducing IGF-1R expression significantly reduced the extent of motor neuron death in SMA mice. Furthermore, the evaluation of motor neuron cell body area provided evidence of a persistent atrophy of the motor neurons in the ventral horn of the spinal cords in SMA mice compared with control mice at P12 (Fig. 2*K*). In contrast, the extent of atrophy was significantly reduced in $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA mice. No difference could be observed in the number and size of motor neurons in control and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ control mice at the same age (Fig. 2*J*,*K*).

To determine whether the reduction of IGF-1R level interfered with the apoptotic process in the spinal cords of SMA mice, we evaluated the activation of the caspase-3 in the ventral spinal cords of SMA and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA mice. As shown in Fig. 2, *L* and *M*, the IGF-1R reduction reduced the extent of the apoptotic process in SMA mouse spinal cords.

←

Figure 3. Genetic reduction of IGF-1R expression promotes SMN expression in mouse SMA spinal cords. ***A***, ***B***, Western blot analysis (***A***) and quantification (***B***) of SMN protein expression in the ventral lumbar spinal cords of $Igf\text{-}1r^{+/+}$ and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ control mice compared with $Igf\text{-}1r^{+/+}$ and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 4$). ***C***–***E***, Western blot analysis (***C***) and quantification of IGF-1Rβ (***D***) and SMN (***E***) protein expression in MN-1 cell culture transfected with either a nonrelevant siRNA (siRNA Control) or an siRNA against *Igf-1r* (siRNA *Igf-1r*; $n = 3$). ***F***, Immunodetection of SMN protein (SMN, green) in the nucleus (DAPI, blue) of ChAT-positive motor neurons (red) in the lumbar spinal cord (L1–L5) of $Igf\text{-}1r^{+/+}$ and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ control mice (left) compared with $Igf\text{-}1r^{+/+}$ and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA mice (right) at 12 d of age ($n = 4$). Scale bar, 25 μm. ***G***, Number of Gems per nucleus of ChAT-positive motor neurons in the ventral lumbar spinal cord of $Igf\text{-}1r^{+/+}$ and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ control mice compared with $Igf\text{-}1r^{+/+}$ and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age (100 motor neurons per mouse; $n = 4$). ***H***–***J***, Quantification by real-time 1RT-PCR of the E7–E8 segment containing *SMN* transcripts normalized either by the E4–E5 segment containing *SMN* transcripts (***H***) or by 18S transcripts (***I***) and of total E4–E5 segment *SMN* transcripts normalized by 18S transcripts (***J***) in the ventral lumbar spinal cord of $Igf\text{-}1r^{+/+}$ and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ control mice compared with $Igf\text{-}1r^{+/+}$ and $Igf\text{-}1r^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 10$). ***K***–***M***, Western blot analysis (***K***) and quantification of IGF-1Rβ (***L***) and SMN (***M***) protein expression in primary culture of myotubes from human SMA patient transfected with either a nonrelevant siRNA (siRNA Control) or an siRNA against *IGF-1R* (siRNA *IGF-1R*; $n = 3$). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. Data are represented as mean ± SEM and significance is reported versus $Igf\text{-}1r^{+/+}$ control mice or siRNA control MN-1 or siRNA control myotube-transfected cells, respectively (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

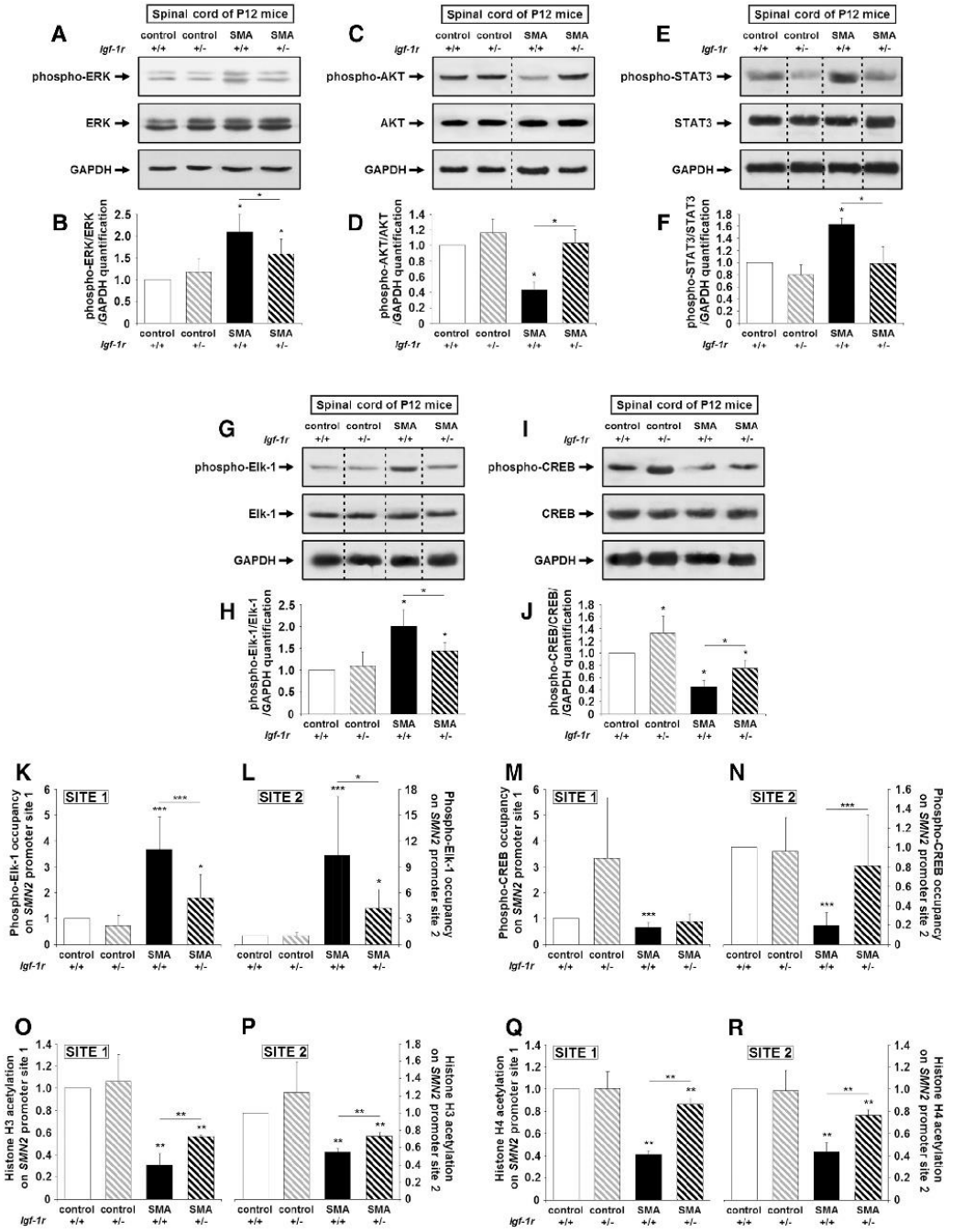


Figure 4. Genetic reduction of IGF-1R expression restores intracellular pathway activation profile and promotes phospho-CREB-binding on *SMN2* promoter in the spinal cords of SMA mice. ***A***, ***B***, Western blot analysis (***A***) and quantification (***B***) of ERK protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cords of *Igf-1r* $^{+/+}$ and *Igf-1r* $^{+/-}$ control mice compared (*Figure legend continues.*)

Reducing IGF-1R expression enhances SMN protein expression in the spinal cords of SMA mice and in human myotubes

We next analyzed the impact of IGF-1R reduction on the SMN expression profile in the spinal cords of all four groups at P12. The increase in SMN protein level induced by IGF-1R reduction was clearly evidenced by the Western immunoblot analysis performed at the lumbar spinal cord level (Fig. 3*A*,*B*). A 2-fold increase in SMN expression level was observed in *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice compared with SMA mice, but it remained 50% lower than controls. Unexpectedly, IGF-1R reduction was unable to enhance SMN expression in controls, as shown in the spinal cords of *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ control mice, but also in MN1 culture, which arbors only the two alleles of the murine *Smn* gene and for which *Igf-1r* depletion by a specific siRNA resulted in a slight decrease in SMN (Fig. 3*C*–*E*).

To investigate whether the IGF-1R reduction-induced increase in SMN expression in SMA spinal cords occurred in motor neurons, we compared the number of Gemini of coiled-bodies (Gems) per nucleus in ChAT-positive neuron within the ventral spinal cords of SMA, *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA, control and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice at P12 (Fig. 3*F*,*G*). Consistent with the values we found in the original SMA mouse strain (Hsieh-Li et al., 2000; Grondard et al., 2005), from 0 to 1 Gems per nucleus (0.6 ± 0.1 on the average) could be counted in SMA, contrasting with up to 2.0 ± 0.1 in control. Therefore, reducing IGF-1R expression increased the number of Gems per nucleus by almost 1, reaching 1.4 ± 0.1 in *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA motor neurons (Fig. 3*G*).

To determine whether the increased SMN protein level resulted from an increase in *SMN* transcript steady-state levels and/or from a modulation of the exon-7 inclusion in *SMN* transcripts, we quantified the fraction of exon-7-containing mRNA inside the population of *SMN* transcripts using qRT-PCR aimed at amplifying either the exon 4–exon 5 segment (E4–E5) or the E7–E8 segment in the ventral spinal cords of SMA, *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA, controls and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice at P12 (Fig. 3*H*–*J*). We found that the reduction of IGF-1R did increase both the steady-state level of SMN transcripts (Fig. 3*J*) and also the relative level of exon-7-containing *SMN* transcripts (Fig. 3*H*,*I*).

Finally, in agreement with our findings in mice, the siRNA-induced depletion of *IGF-1R* transcripts in a myotube culture of paravertebral muscles from type 2 SMA patient resulted in a significant SMN expression increase (Fig. 3*K*–*M*).

Genetically reducing IGF-1R expression shifts the equilibrium among ERK, JAK, and AKT signaling pathways in SMA spinal cords

To investigate whether the modulation of IGF-1R expression level affected the activation profile of the intracellular pathways downstream of the receptor, we analyzed the phosphorylation status of ERK, STAT3, and AKT in the spinal cords in all four groups at P12 (Fig. 4*A*–*F*). We found that, in the spinal cords of SMA mice, ERK (Fig. 4*A*,*B*) and STAT3 (Fig. 4*E*,*F*) phosphorylation status were consistently higher and those of AKT (Fig. 4*C*,*D*) were consistently lower compared with controls. Reducing IGF-1R expression in the spinal cords of SMA mice resulted in a >2-fold increase in AKT phosphorylation (Fig. 4*C*,*D*), a 25% decrease of ERK phosphorylation (Fig. 4*A*,*B*), and a 2-fold decrease of STAT3 phosphorylation (Fig. 4*E*,*F*). Accordingly, the p-AKT/total AKT ratio increased and the p-ERK/total ERK, pSTAT-3/total STAT3 ratios decreased in the spinal cords of *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice, reflecting an increase in the activity level of AKT and conversely a decrease in the activity level of ERK and JAK pathways. Unexpectedly, IGF-1R reduction had no effect on the activation profile of ERK and AKT pathways in control spinal cords, contrasting with the previous data in mouse *Igf-1r*$^{+/-}$ fibroblasts (Holzenberger et al., 2003).

We next investigated whether this shift from ERK to AKT, induced by IGF-1R reduction, could influence SMN expression. Indeed, phospho-ERK and phospho-AKT activate by phosphorylation the transcription factors Elk-1 and CREB, respectively, resulting in their binding to their specific sites on *SMN2* gene promoter and thus altering SMN expression in SMA spinal cords (Branchu et al., 2013). In the SMA background, activated Elk-1 was thought to exert a repressive role on *SMN2* gene transcription, contrasting with the activating role of CREB (Branchu et al., 2013). As expected, we found that the activation level of Elk-1 and CREB paralleled those of their respective activating kinases in the spinal cords of all four groups (Fig. 4*G*–*J*). Furthermore, the level of Elk-1 binding on the *SMN2* promoter, which was originally found to be higher in SMA compared with controls, was significantly lowered by IGF-1R reduction, as evidenced by ChIP analysis (Fig. 4*K*,*L*). In contrast, the level of CREB binding on the *SMN2* promoter, originally found to be lower in SMA compared with controls, was significantly increased by IGF-1R reduction (Fig. 4*M*,*N*). Expectedly, the CREB binding on the *SMN2* promoter was correlated with a significant increase in histone H3 and H4 acetylation (Fig. 4*O*–*R*), suggesting a chromatin remodeling at the *SMN2* promoter level.

Reducing IGF-1R expression improves the NMJ phenotype in SMA mice

Because alteration of the NMJ development is at present considered to be a hallmark of SMA pathogenesis in patients (Kariya et al., 2008) and in mouse models (Biondi et al., 2008; Kariya et al., 2008; Kong et al., 2009), we analyzed shape and surface of the NMJs, as described previously (Sanes and Lichtman, 1999; Biondi et al., 2008). The developmental changes in the synapse shape from an immature, uniform plaque of AChRs (Fig. 5*A*) to a perforated large plaque of AChRs (Fig. 5*B*) that eventually adopts a pretzel-like form (Fig. 5*C*) were determined for innervated NMJs using α-bungarotoxin staining of the two extensor

←

(*Figure legend continued.*) with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 5$). ***C***, ***D***, Western blot analysis (***C***) and quantification (***D***) of AKT protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cords of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 5$). ***E***, ***F***, Western blot analysis (***E***) and quantification (***F***) of STAT3 protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cords of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 5$). ***G***, ***H***, Western blot analysis (***G***) and quantification (***H***) of Elk-1 protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cords of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 5$). ***I***, ***J***, Western blot analysis (***I***) and quantification (***J***) of CREB protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cords of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 5$). ***K***–***N***, ChIP analysis of phospho-Elk-1 (***K***, ***L***) and phospho-CREB (***M***, ***N***) in the ventral lumbar spinal cords of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age. Real-time qRT-PCR was performed to detect the *SMN2* promoter site 1 (***K***, ***M***) and site 2 (***L***, ***N***; $n = 12$). ***O***–***R***, ChIP analysis of Histone H3 (***O***, ***P***) and H4 (***Q***, ***R***) acetylation in the ventral lumbar spinal cords of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age. Real-time qRT-PCR was performed to detect *SMN2* promoter site 1 (***O***, ***Q***) and site 2 (***P***, ***R***; $n = 12$). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. Data are represented as mean ± SEM and significance is reported versus *Igf-1r*$^{+/+}$ control mice (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

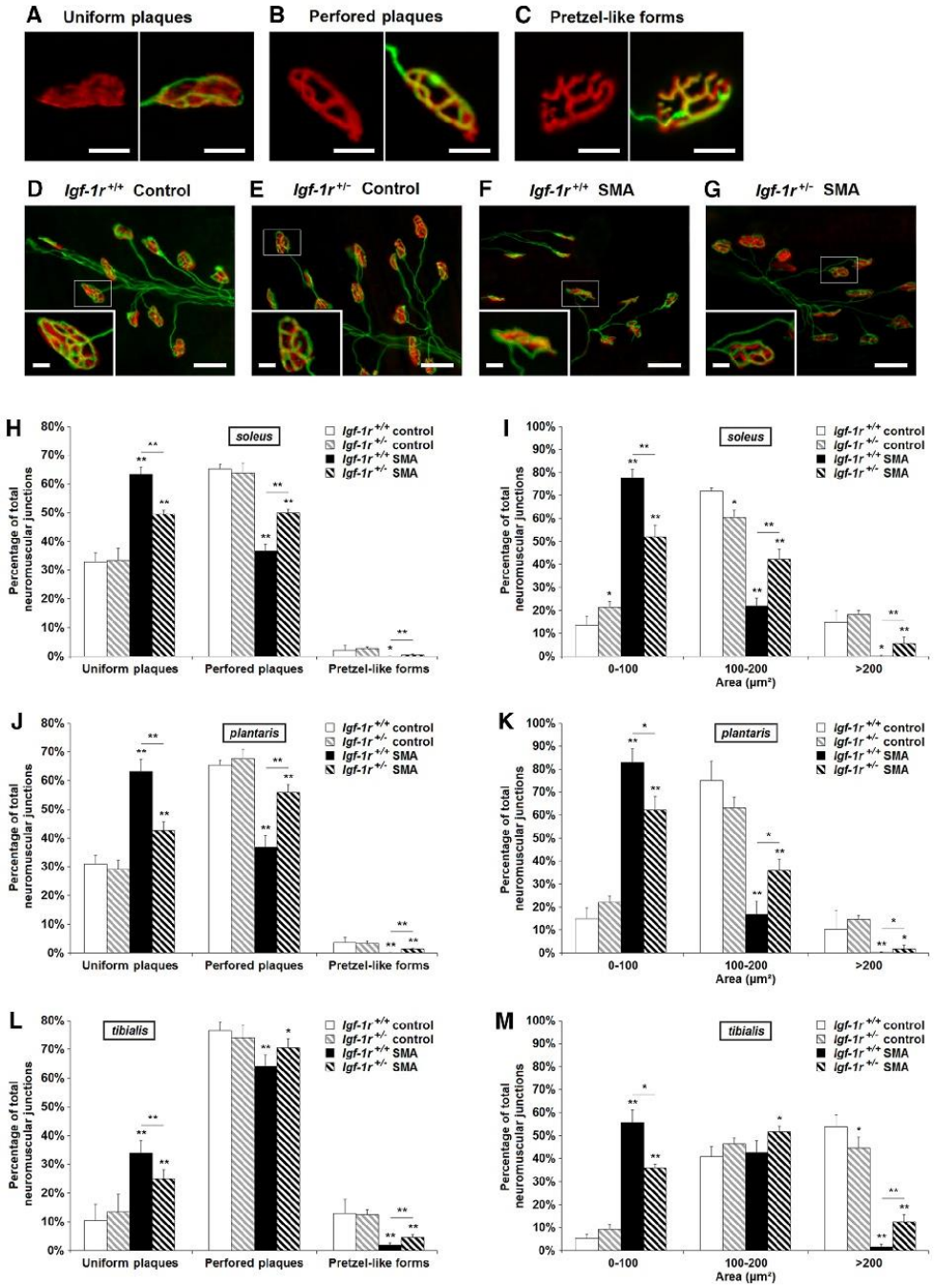


Figure 5. Genetic reduction of IGF-1R expression accelerates NMJ maturation in SMA mice. ***A–G***, Motor end-plate labeling with α-bungarotoxin (left) and anti-neufilament plus anti-synaptophysin antibodies (right), representing "Uniform-plaque" (***A***), "Perforated-plaque" (***B***), and "Pretzel-like plaque" (***C***), in the soleus of *Igf-1r*$^{+/+}$ (*Figure legend continues.*)

muscles, the slow-twitch soleus (Fig. 5*D–G*) and fast-twitch plantaris and the flexor fast-twitch tibialis in all four groups of mice at P12. We found that up to 63% of the NMJs were elliptical, made of uniform plaques of AChRs, in the two extensors muscles of SMA mice at P12 (Fig. 5*H,J*). As expected for a flexor muscle at this age (Biondi et al., 2008), NMJs in the tibialis were more advanced in terms of maturation, with only 34% of immature NMJs in SMA mice (Fig. 5*L*). In contrast, only 32% and 11% of immature NMJs were found in extensor and flexor muscles of controls, respectively, with a number of pretzel-like form NMJs between 2% and 5% for the extensors and 10% for the flexor, as found previously in the former SMA-like mice (Biondi et al., 2008; Fig. 5*H,J,L*). IGF-1R reduction improved NMJ morphology in the three muscles in SMA mice, as demonstrated by the increase in NMJ perforation (Fig. 5*H,J,L*) and enlargement (Fig. 5*I,K,M*) of the NMJs on the muscle fibers. These effects of IGF-1R reduction on NMJ maturation were only evidenced in SMA mice.

Reducing IGF-1R expression improves the muscle phenotype in SMA mice

Finally, we examined in all four groups of mice at P12 whether the IGF-1R reduction could alleviate SMA-induced muscular impairments, including muscle aplasia, atrophy, and typology alteration. As evidenced by the phenotypic analysis of H&E-stained soleus, plantaris, and tibialis (Fig. 6*A–D*), reducing IGF-1R expression in SMA mice was sufficient to counteract muscle aplasia (Fig. 6*E*) and to reduce muscle atrophy significantly by 50% in soleus and plantaris and by 100% in tibialis (Fig. 6*F*). We then looked at the muscle maturation rate through the analysis of the different MyHC distribution, including the embryonic; neonatal; and adult I, II IIa, and IIx/IIb isoforms (Fig. 6*G–L*). In SMA mice, consistent with our previous results in the original SMA mouse strain (Biondi et al., 2008), we found an increase in embryonic (20%, 13%, and 10% for soleus, plantaris, and tibialis, respectively) and type I (5% and 13% for soleus and plantaris, respectively) MyHC-expressing myofibers compared with control mice. These alterations were associated with a decrease in myofibers expressing the neonatal (15%, 20%, and 12% for soleus, plantaris, and tibialis, respectively) and type II (5% and 15% for soleus and plantaris, respectively) isoforms, suggesting, as expected, an overall muscle maturation delay (Fig. 6*I,J*). Reducing IGF-1R expression in SMA mice resulted in a rebalancing of the percentage of embryonic versus neonatal MyHC-expressing myofibers (Fig. 6*K*) and of type I versus type II, as well as among the different type II-MyHC-expressing myofibers (Fig. 6*L*). These data suggested that IGF-1R reduction in SMA muscles is sufficient to override the major characteristic muscular impairments of the disease.

Because a decrease of AKT activation has been reported in atrophic muscles of severe ALS patients (Yin et al., 2012), we analyzed the phosphorylation status of ERK and AKT in the tibialis of SMA, *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA, control and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice at P12 (Fig. 7*A–D*). As in the spinal cord, reducing IGF-1R expression shifted the balance of ERK and AKT activation patterns, leading to a shift in the activation level of the transcription factors Elk-1 and CREB (Fig. 7*E–H*) and finally to a significant SMN expression increase in SMA muscles at the protein level (Fig. 7*I,J*). Interestingly, as found in the spinal cord, the IGF-1R reduction led to an increase of both the *SMN* transcript steady-state level and the proportion of exon-7-containing transcripts (Fig. 7*K–M*).

Discussion

This study provides the first lines of evidence that, regardless of the circulating IGF-1 level, which remained dramatically low in SMA compared with controls, the reduction of IGF-1R expression, be it at the physiological (through physical exercise) or genetic level, significantly protects motor neurons from SMA-induced cell death. Unexpectedly, reducing the first steps of IGF-1 axis activation, instead of resulting in an unselective depression of the three intracellular pathways known to lie downstream the receptor, exerted a specific effect on each pathway, leading to an alteration of the overall activation balance. These results suggest a crucial role of the surface receptor expression levels in the selective activation or depression of a given downstream intracellular pathway. In the specific case of SMA, IGF-1R reduction led to AKT/CREB pathway activation, which was associated with ERK and JAK inhibition in the spinal cord and skeletal muscle, both events contributing to the significant increase of SMN expression. This was most notable in in motor neurons, as revealed by *Gem* counts, neuroprotection, and subsequent benefits for SMA-like mice in terms of lifespan and motor behavior (Fig. 8).

On the basis of accumulating *in vitro* evidence, it is well known that all types of cells in the CNS are targeted by IGF-1, including motor neurons (Kaspar et al., 2003; Rabinovsky et al., 2003; Dobrowolny et al., 2005; Ozdinler and Macklis, 2006). Whereas, for many years, canonical signaling through the IGF-1 receptors was considered to include the PI3K/AKT, Ras/ERK, and, more recently, the JAK/STAT pathways (Himpe and Kooijman, 2009), the signaling network elicited by IGF-1 is likely to be differentially activated depending on the cell context, making it difficult to predict the pathway that will ultimately be triggered and thus which biological effect will result. The present data suggest that there are some cell-specific events in which intracellular signaling routes triggered downstream of IGF-1R might depend on the expression levels of the receptor at the cell surface. Reducing IGF-1R expression results in the shift from both ERK and JAK to the AKT pathway and in a parallel alteration of their signaling cascade, leading to Elk-1, STAT, and CREB phosphorylation, respectively. This IGF-1R reduction-induced shift in intracellular pathways occurred only in SMA tissues and not in controls, regardless of tissue origin (e.g., human or murine, spinal cord or muscle). The reasons underlying this discrepancy remain unknown. However, in all of the conditions explored here, an IGF-1R reduction effect on the intracellular pathway activation profile was only found when these pathways were constitutively imbalanced (i.e., ERK overactivation and AKT underactivation). This imbalance could be essential for an IGF-1R reduction effect in restoring the selective pathway activation, ultimately resulting in SMN expression increase. In addition, and most unexpectedly, the IGF-1R reduction in control spinal cords and muscles did not result in half of the activation rate of ERK and AKT, as was reported previously in fibroblasts (Holzenberger et al., 2003), sug-

←

(*Figure legend continued.*) control mice (***D***), *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice (***E***), *Igf-1r*$^{+/+}$ SMA mice (***F***), and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice (***G***) at 12 d of age. Scale bars, 10 μm for high magnifications, 25 μm for low magnifications, and 5 μm for crops. ***H, I***, Determination of the NMJ maturation (***H***) and area (***I***) in the soleus muscle from *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 5$). ***J, K***, Determination of the NMJ maturation (***J***) and area (***K***) in the plantaris muscle from *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 5$). ***L, M***, Determination of the NMJ maturation (***L***) and area (***M***) in the tibialis muscle from *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 5$). Data are represented as mean ± SEM and significance is reported versus *Igf-1r*$^{+/+}$ control mice (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

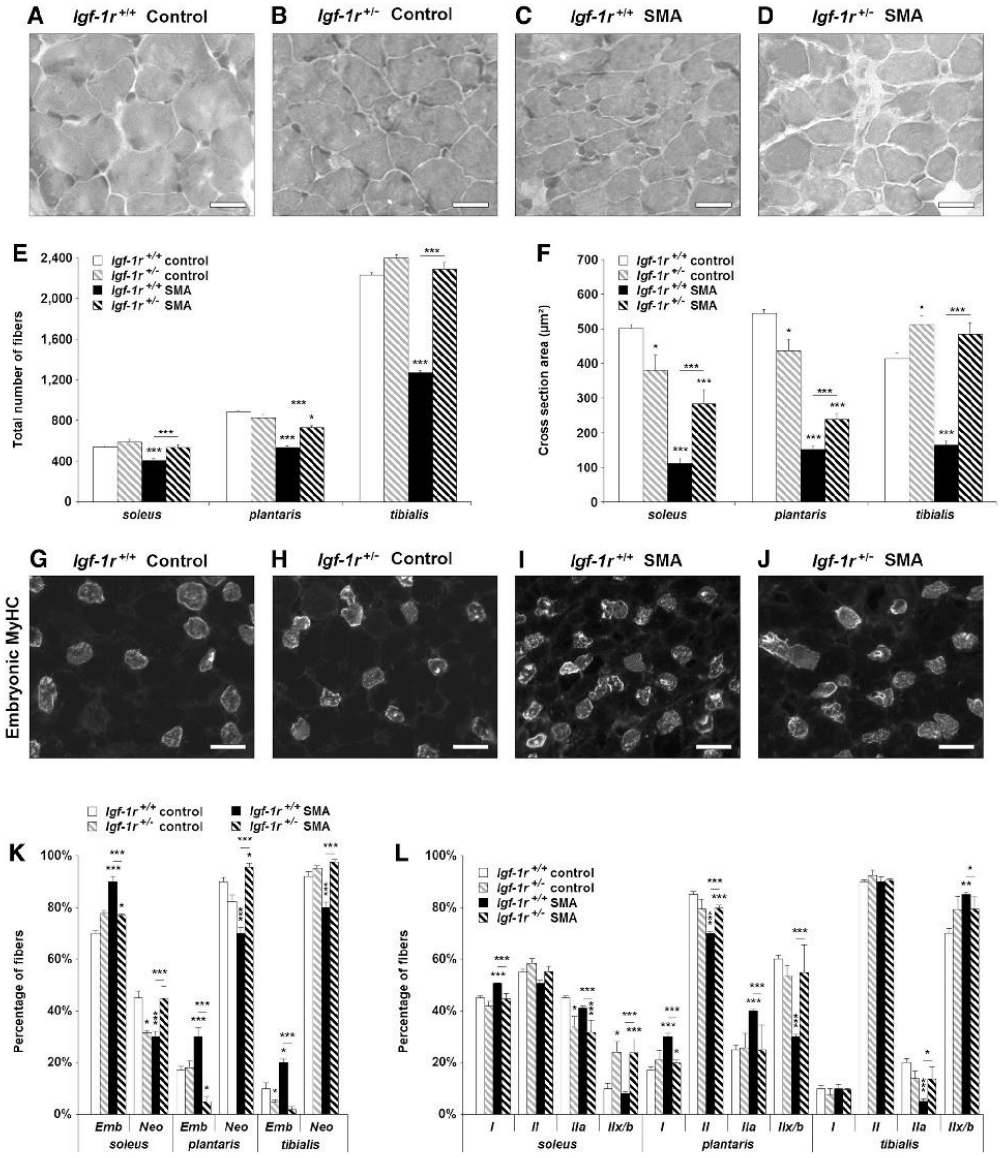


Figure 6. Genetic reduction of IGF-1R expression limits muscle impairments and accelerates muscle maturation in SMA mice. ***A–D***. H&E staining on the tibialis of *Igf-1r*$^{+/+}$ control mice (***A***), *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice (***B***), *Igf-1r*$^{+/+}$ SMA mice (***C***), and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice (***D***) at 12 d of age. Scale bar, 25 μm. ***E, F***, Total number (***E***) and cross-sectional area (***F***) of myofibers in the soleus, plantaris, and tibialis muscles from control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 4$). ***G–J***, Immunodetection of embryonic MyHC in the soleus of *Igf-1r*$^{+/+}$ control mice (***G***), *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice (***H***), *Igf-1r*$^{+/+}$ SMA mice (***I***), and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice (***J***) at 12 d of age. Scale bar, 50 μm. ***K, L***. Analysis of developmental (i.e., embryonic and neonatal; ***K***) and adults (i.e., I, II, IIa and IIx/IIb; ***L***) MyHC isoforms typology of the soleus, plantaris, and tibialis of control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 4$). Data are represented as mean ± SEM and significance is reported versus *Igf-1r*$^{+/+}$ control mice (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

gesting a cell-specific adaptation to the modulation of IGF-1R expression.

Whatever the molecular mechanism of the signal transduction switch, IGF-1R reduction results in the activation of the AKT/CREB pathway and the inhibition of the ERK/Elk-1 pathway in SMA tissues. In all likelihood, the resulting CREB activation led to its increased binding to the *SMN2* promoter and, conversely, the Elk-1 inhibition to its binding decrease. This shift

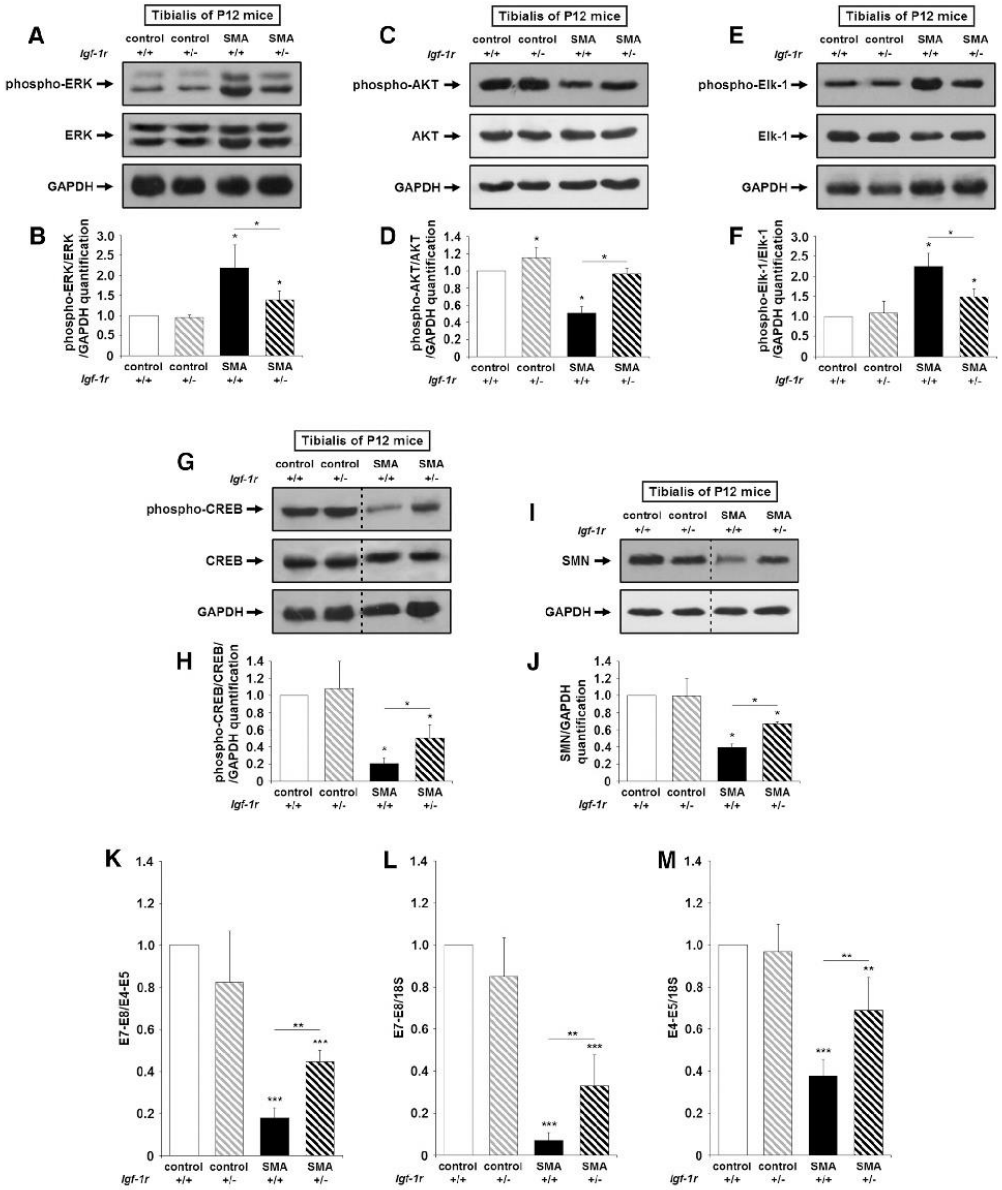


Figure 7. Genetic reduction of IGF-1R expression restores the intracellular pathway activation profile in the skeletal muscle tibialis in SMA mice. ***A***, ***B***, Western blot analysis (***A***) and quantification (***B***) of ERK protein phosphorylation in the tibialis muscle of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 4$). ***C***, ***D***, Western blot analysis (***C***) and quantification (***D***) of AKT protein phosphorylation in the tibialis muscle of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 4$). ***E***, ***F***, Western blot analysis (***E***) and quantification (***F***) of Elk-1 protein phosphorylation in the tibialis muscle of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 4$). ***G***, ***H***, Western blot analysis (***G***) and quantification (***H***) of CREB protein phosphorylation in the tibialis muscle of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 4$). ***I***, ***J***, Western blot analysis (***I***) and quantification (***J***) of SMN protein expression in the tibialis muscle of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 4$). ***K–M***, Quantification by real-time qRT-PCR of the E7–E8 segment containing *SMN2* transcripts normalized either by the E4–E5 segment containing *SMN2* transcripts (***K***) or by *18S* transcripts (***L***) and of total E4–E5 segment *SMN2* transcripts normalized by *18S* transcripts (***M***) in the tibialis muscle of *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ control mice compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA mice at 12 d of age ($n = 8$). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. Data are represented as mean ± SEM and significance is reported versus *Igf-1r*$^{+/+}$ control mice (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

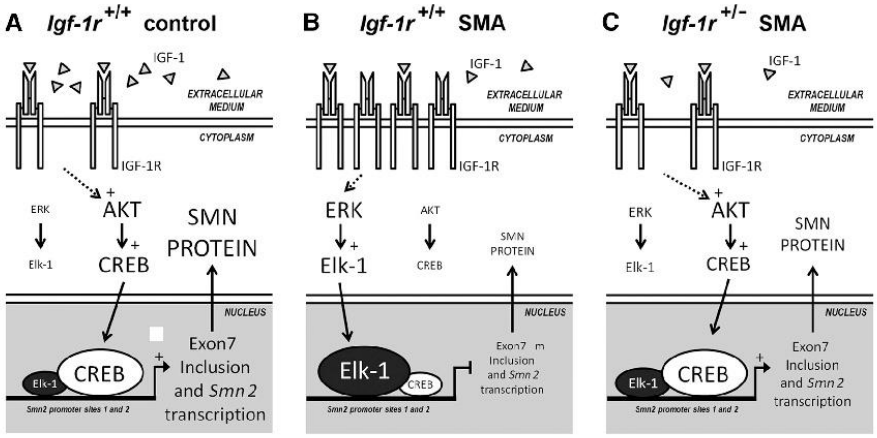


Figure 8. The modulation of IGF-1R expression levels is sufficient to restore the AKT/CREB and ERK/Elk-1 intracellular signaling pathway activation profile, resulting in SMN expression increase in SMA mice. ***A–C***, Proposed mechanisms involved in the increase of SMN expression induced by the genetic reduction of IGF-1R expression in severe SMA-like mice. Modulation of the activation profile of ERK/Elk-1 and AKT/CREB signaling pathways in control (***A***) compared with *Igf-1r*$^{+/+}$ (***B***) and *Igf-1r*$^{+/-}$ SMA (***C***) mice at 12 d of age. Large characters indicate activated molecules.

in transcription factor binding was followed by increased acetylation of H3 and H4 histones on sites that are involved in the control of *SMN2* transcription (Majumder et al., 2004; Branchu et al., 2013), ultimately resulting in a significant increase in SMN expression. All of these molecular events resulting from the IGF-1R reduction occurred only in SMA and not in controls, in which the intracellular signaling pathways are not altered after IGF-1R expression decrease. Therefore, in SMA only, the IGF-1R reduction correlated with both an increase in SMN steady-state level, strongly suggesting an *SMN2* transcriptional activation, and an increase in exon-7 inclusion in *SMN2* transcripts, suggesting a modulation of the splicing process. This dual effect on *SMN2* gene expression, both transcriptional and posttranscriptional, is unexpected in this mouse model at this age when one considers the effects of NMDA receptor activation in (*Smn*$^{\Delta 7/\Delta}$ *SMN2*) mice at P12. In that case, the NMDA-induced activation of the AKT/CREB pathway specifically enhanced exon-7 inclusion in *SMN* transcripts without any observable effect on *SMN* steady-state levels (Biondi et al., 2010). A probable effect on the *SMN2* gene transcription upon CREB phosphorylation induced either by NMDA receptor activation (Biondi et al., 2010) or ERK inhibition (Branchu et al., 2013) was only found during the first week (P6) in another severe mouse model of SMA. Clearly, identifying the mechanisms underlying IGF-1R reduction effects on the control of *SMN2* expression may provide new tools aimed at modulating *SMN2* gene expression trough transcriptional and posttranscriptional mechanisms.

Furthermore, whereas the ERK/Elk-1, JAK/STAT, and AKT/CREB pathways have all been correlated to neuroprotection, it is today widely admitted that IGF-1-mediated neuroprotection occurs through activation of the AKT/CREB pathway (D'Mello et al., 1997; Párrizas et al., 1997; Yadav et al., 2005). Furthermore, in the specific case of cerebellar granule neurons, IGF-1-induced neuroprotection results from both the activation of AKT and the inhibition of MEK-ERK1/2 through the AKT pathway (Subramaniam et al., 2005). Similarly, the neuroprotection induced by IGF-1R reduction in SMA spinal cords, as evidenced by the relative persistence of the motor neuron population and the reduced activation of caspase-3, might result from both an increased SMN protein expression and the presence of the two powerful anti-apoptotic molecules, AKT and CREB, at the activated state. Although no role has been reported to date for the JAK/STAT pathway in SMA pathogenesis, the fact that it parallels the activation profile of ERK, in contrast to AKT, suggests a detrimental role of this pathway in SMA.

The present results help to predict the consequences of the dramatic overexpression of IGF-1R in muscles of severe type 1 SMA patients compared with the IGF-1R down-expression in less severe type 3 SMA patients (Millino et al., 2009) in terms of intracellular signalization, SMN expression, cell survival, and muscle maintenance. Furthermore, it could be speculated considering the present results that the constitutive underactivation of AKT recently found in the muscles of ALS patients (Yin et al., 2012) might result from muscular IGF-1R overexpression (Lunetta et al., 2012). The fact that the expression of IGF-1R was found to be dramatically increased in these two genetic motor neuron diseases is puzzling and suggests that an alteration of the IGF-1/IGF-1R equilibrium might be directly involved in motor unit destabilization, ultimately resulting in specific motor neuron death. Over the past 20 years, compelling lines of evidence have accumulated throughout the literature designating IGF-1 as one of the most powerful anti-apoptotic agents for neurons. Several groups subsequently attempted to test the potential effects of IGF-1 in alleviating the symptoms in a variety of neurodegenerative diseases including ALS (Sakowski et al., 2009) and SMA (Bosch-Marcé et al., 2011; Murdocca et al., 2012; Tsai et al., 2012). When tested in different mouse models of SMA, treatments with IGF-1 (Bosch-Marcé et al., 2011; Tsai et al., 2012) or the IGF-1/IGF-BP3 complex (Murdocca et al., 2012) gave rise to disappointing results in terms of SMA mouse survival. Moreover, clinical trials using IGF-1 treatment failed to reduce ALS symptoms in humans (Sorenson et al., 2008; Howe et al., 2009). This paradoxical lack of IGF-1 effects might be due to an aberrant expression of IGF-1R in diseased tissues. More precisely, its overexpression might result in the activation of other, as yet unsuspected pathways that would restrict the beneficial effects of IGF-1. This newly emerging concept involving the modulation of the IGF-1R expression seems to be key for the selection of intra-

cellular pathways and should be taken into account when designing IGF-1-based treatments for neurodegenerative diseases.

References

Bigot A, Klein AF, Gasnier E, Jacquemin V, Ravassard P, Butler-Browne G, Mouly V, Furling D (2009) Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. Am J Pathol 174:1435–1442. CrossRef Medline

Biondi O, Grondard C, Lécolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C, Charbonnier F (2008) Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. J Neurosci 28:953–962. CrossRef Medline

Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, Pariset C, Lécolle S, Côté J, Chanoine C, Charbonnier F (2010) In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. J Neurosci 30:11288–11299. CrossRef Medline

Bosch-Marcé M, Wee CD, Martinez TL, Lipkes CE, Choe DW, Kong L, Van Meerbeke JP, Musarò A, Sumner CJ (2011) Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice. Hum Mol Genet 20:1844–1853. CrossRef Medline

Branchu J, Biondi O, Chali F, Collin T, Leroy F, Mamchaoui K, Makoukji J, Pariset C, Lopes P, Massaad C, Chanoine C, Charbonnier F (2013) Shift from extracellular signal-regulated kinase to AKT/cAMP response element-binding protein pathway increases survival-motor-neuron expression in spinal-muscular-atrophy-like mice and patient cells. J Neurosci 33:4280–4294. CrossRef Medline

Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E, Dillin A (2009) Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. Cell 139:1157–1169. CrossRef Medline

Corbo M, Lunetta C, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Adobbati L, Silani V (2010) Free insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding proteins-2 and -3 in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. Eur J Neurol 17:398–404. CrossRef Medline

Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. Neurobiol Dis 3:97–110. CrossRef Medline

D'Mello SR, Borodezt K, Soltoff SP (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. J Neurosci 17:1548–1560. Medline

Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musarò A (2005) Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. J Cell Biol 168:193–199. CrossRef Medline

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

Fukaya M, Hayashi Y, Watanabe M (2005) NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. Eur J Neurosci 21:1432–1436. CrossRef Medline

Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lécolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F (2005) Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. J Neurosci 25:7615–7622. CrossRef Medline

Himpe E, Kooijman R (2009) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. BioFactors 35:76–81. CrossRef Medline

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nature 421:182–187. CrossRef Medline

Howe CL, Bergstrom RA, Horazdovsky BF 2009 Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. Neurology 73:1247; author reply 1247–1248. Medline

Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. Nat Genet 24:66–70. CrossRef Medline

Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, Krainer AR (2011) Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. Nature 478:123–126. CrossRef Medline

Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT, Monani UR (2008) Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet 17:2552–2569. CrossRef Medline

Kaspar BK, Lladó J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH (2003) Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. Science 301:839–842. CrossRef Medline

Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marcé M, Griffin JW, Rich MM, Sumner CJ (2009) Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. J Neurosci 29:842–851. CrossRef Medline

Kye MJ, Niederst ED, Wertz MH, Gonçalves Ido C, Akten B, Dover KZ, Peters M, Riessland M, Neveu P, Wirth B, Kosik KS, Sardi SP, Monani UR, Passini MA, Sahin M (2014) SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway. Hum Mol Genet 23:6318–6331. CrossRef Medline

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

Lorson CL, Androphy EJ (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. Hum Mol Genet 9:259–265. CrossRef Medline

Lunetta C, Serafini M, Prelle A, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Sassone J, Colciago C, Moggio M, Corbo M, Silani V (2012) Impaired expression of insulin-like growth factor-1 system in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. Muscle Nerve 45:200–208. CrossRef Medline

Majumder S, Varadharaj S, Ghoshal K, Monani U, Burghes AH, Jacob ST (2004) Identification of a novel cAMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. J Biol Chem 279:14803–14811. CrossRef Medline

Millino C, Fanin M, Vettori A, Laveder P, Mostacciuolo ML, Angelini C, Lanfranchi G (2009) Different atrophy-hypertrophy transcription pathways in muscles affected by severe and mild spinal muscular atrophy. BMC Med 7:14. CrossRef Medline

Murdocca M, Malgieri A, Luchetti A, Saieva L, Dobrowolny G, de Leonibus E, Filareto A, Quitadamo MC, Novelli G, Musarò A, Sangiuolo F (2012) IPLEX administration improves motor neuron survival and ameliorates motor functions in a severe mouse model of spinal muscular atrophy. Mol Med 18:1076–1085. Medline

Neff NT, Prevette D, Houenou LJ, Lewis ME, Glicksman MA, Yin QW, Oppenheim RW (1993) Insulin-like growth factors: putative muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival. J Neurobiol 24:1578–1588. CrossRef Medline

Oshima S, Fukaya M, Masabumi N, Shirakawa T, Oguchi H, Watanabe M (2002) Early onset of NMDA receptor GluR epsilon 1 (NR2A) expression and its abundant postsynaptic localization in developing motoneurons of the mouse hypoglossal nucleus. Neurosci Res 43:239–250. CrossRef Medline

Ozdinler PH, Macklis JD (2006) IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. Nat Neurosci 9:1371–1381. CrossRef Medline

Párrizas M, Saltiel AR, LeRoith D (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3′-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. J Biol Chem 272:154–161. CrossRef Medline

Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. Cell 95:615–624. CrossRef Medline

Rabinovsky ED, Gelir E, Gelir S, Lui H, Kattash M, DeMayo FJ, Shenaq SM, Schwartz RJ (2003) Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. FASEB J 17: 53–55. Medline

Sakowski SA, Schuyler AD, Feldman EL (2009) Insulin-like growth factor-I for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler 10:63–73. CrossRef Medline

Salazar-Grueso EF, Kim S, Kim H (1991) Embryonic mouse spinal cord motor neuron hybrid cells. Neuroreport 2:505–508. CrossRef Medline

Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. Annu Rev Neurosci 22:389–442. CrossRef Medline

Sorenson EJ, Windbank AJ, Mandrekar JN, Bamlet WR, Appel SH, Armon C, Barkhaus PE, Bosch P, Boylan K, David WS, Feldman E, Glass J, Gutmann L, Katz J, King W, Luciano CA, McCluskey LF, Nash S, Newman DS, Pascuzzi RM, et al. (2008) Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. Neurology 71:1770–1775. CrossRef Medline

Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberté C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker K (2005) Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. J Neurosci 25: 2838–2852. CrossRef Medline

Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG, Rosenfelder G (1984) Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. J Immunol Methods 72:471–479. CrossRef Medline

Tsai LK, Chen YC, Cheng WC, Ting CH, Dodge JC, Hwu WL, Cheng SH, Passini MA (2012) IGF-1 delivery to CNS attenuates motor neuron cell death but does not improve motor function in type III SMA mice. Neurobiol Dis 45:272–279. CrossRef Medline

Wilczak N, de Vos RA, De Keyser J (2003) Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 361:1007–1011. CrossRef Medline

Yadav A, Kalita A, Dhillon S, Banerjee K (2005) JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3. J Biol Chem 280:31830–31840. CrossRef Medline

Yin F, Ye F, Tan L, Liu K, Xuan Z, Zhang J, Wang W, Zhang Y, Jiang X, Zhang DY (2012) Alterations of signaling pathways in muscle tissues of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 46:861–870. CrossRef Medline

Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, Dreyfuss G (2008) SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. Cell 133:585–600. CrossRef Medline

1.2. Conclusion de l'article 1

Cet article a permis de démontrer que la réduction de l'expression de l'IGF-1R, indépendamment du taux circulant d'IGF-1, protège les motoneurones d'un modèle murin d'ASI de type 2. En effet, le nombre de motoneurones a été significativement augmenté dans la moelle épinière lombaire des souris ASI *Igf-1r* +/-, ce qui a limité le retard de maturation de la jonction neuromusculaire classiquement retrouvée dans l'ASI. Ces résultats rejoignent ceux obtenus dans un modèle murin mimant la maladie d'Alzheimer démontrant que la réduction de l'expression de l'IGF-1R offre une protection contre la perte neuronale (Cohen et al., 2009). La surexpression de l'IGF-1R dans la moelle épinière des souris ASI, est responsable de la suractivation de la voie ERK/Elk-1 et de la répression de la transcription du transgène SMN2 (Biondi et al., 2010; Branchu et al., 2013). Nous montrons que la réduction du niveau d'expression de l'IGF-1R est suffisante pour modifier la balance d'activation des voies de signalisation AKT/CREB et ERK/Elk-1. Nous rapportons une activation de la voie AKT/CREB et une réduction de l'activation de la voie ERK/Elk-1 dans le muscle et la moelle des souris ASI *Igf1r* +/-. L'activation résultante de CREB augmente sa fixation sur le promoteur du gène SMN2, à l'inverse nous rapportons une diminution de la fixation de Elk-1 sur le promoteur du gène SMN2.

Ces évènements moléculaires aboutissent à une augmentation de l'expression de SMN uniquement dans les souris ASI Igf1r +/-. La réduction de l'IGF-1R chez les souris contrôles n'a pas modifié pas la balance d'activation des voies AKT/CREB et ERK/Elk-1 ni l'expression de la protéine SMN. Il semblerait donc qu'un changement dans le niveau d'activation des voies intracellulaires suite la diminution d'expression de l'IGF-1R soit dépendant de l'hyperactivation de la voie ERK/Elk-1 et la diminution d'activation de la voie AKT/CREB retrouvée dans l'ASI. L'augmentation de la fixation de CREB sur le promoteur du gène SMN2 est associée à une augmentation du taux de transcrits SMN ainsi que du taux d'inclusion de l'exon 7 dans ces transcrits. Il serait intéressant d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de l'augmentation de l'épissage du transgène SMN2 suite à l'invalidation de l'IGF-1R.

Cet article démontre l'implication du niveau d'expression de l'IGF-1R dans le contrôle sélectif de l'activation des voies de signalisation AKT/CREB et ERK/Elk-1 dans un contexte ASI et dans le contrôle du niveau d'expression de SMN. Ainsi, diminuer l'activation de la voie de l'IGF-1 pourrait constituer une voie thérapeutique pour protéger les motoneurones dans l'ASI.

2. Article 2

2.1. Introduction à l'article 2

Nous avons évalué les effets d'une réduction de l'expression du récepteur à l'IGF-1 suite à un protocole d'entrainement physique ou par l'invalidation partielle du gène *Igf-1r* dans un modèle murin mimant une amyotrophie spinale de type 2 (Article 1). Ces deux conditions ont induit une augmentation de la durée de vie des souris ainsi que de leurs fonctions motrices, une neuro-protection des motoneurones et le rétablissement des voies de signalisations AKT/CREB et ERK/Elk-1. Ces effets sont également associés à une augmentation de la transcription du gène et de l'épissage des transcrits SMN2, cependant les mécanismes impliqués n'ont pas été élucidés.

La transmission des signaux transmembranaires et l'activation des voies de signalisation reposent sur l'architecture de la membrane plasmique qui s'organise en micro-domaines (Couet et al., 1997; Huang et al., 2016; Wu et al., 1997). En particulier, les cavéoles, riches en cholestérol sont indispensables pour la signalisation de voies dépendantes activées par des récepteurs membranaires tels que l'IGF-1R (Couet et al., 1997; Parton and Simons, 2007; Strippoli et al., 2015). La protéine SMN est capable d'interagir avec une protéine présente dans les cavéoles : Cavéoline 1. Une déplétion en protéine SMN induit une altération de la dynamique de la membrane plasmique (Gabanella et al., 2016). Le cholestérol est nécessaire au développement du SNC, il intervient dans la croissance des neurites, la synaptogénèse ou la myélinisation des axones (Funfschilling et al., 2012; Pfrieger, 2003). Une perturbation de l'homéostasie du cholestérol est souvent associée à des pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, d'Huntington ou encore dans une maladie neuromusculaire, la sclérose latérale amyotrophique (Abdel-Khalik et al., 2017; Giudetti et al., 2016; Valenza et al., 2005). Par ailleurs, la restoration de la voie de biosynthèse du cholestérol présente des effets neuroprotecteurs tel qu'observé dans la maladie d'Huntington (Boussicault et al., 2016) ou d'Alzheimer (Crameri et al., 2006).

A ce jour, aucune étude n'a fait de lien entre l'ASI et une perturbation de l'homéostasie ducholestérol. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'implication du métabolisme du cholestérol dans la pathologie des amyotrophies spinales infantiles. Pour répondre à cette problématique nous avons utilisé le modèle murin mimant l'amyotrophie spinale de type 2 développé par l'équipe de H.Li qui présente une durée de vie de 12 jours en moyenne (Hsieh-Li et al., 2000) et des sérums de patients pour évaluer l'homéostasie du cholestérol et sa biosynthèse. Après avoir identifié les dérégulations de ce métabolisme nous avons cherché à savoir si une modulation de ce métabolisme était capable de moduler le niveau d'expression de la protéine SMN dans des fibroblastes de patients contrôles et ASI de type I.

24-dehydrocholesterol reductase DHCR24/Seladin-1 is a therapeutic target for spinal muscular atrophy

Léo Houdebine[1,2], Olivier Biondi[1,2], Laure Weill[1,2], Antonin Lamazière[3], Domenico D'Amico[1,2], Bruno della Gaspera[1,2], Brigitte Estournet[5], Suzanna Quijano-Roy[5], Philippe Lopes[1,2,4], Charbel Massaad[1,2] and Frédéric Charbonnier[1,2#].

1 : Université Paris Descartes, faculté des sciences fondamentales et biomédicales, Paris, France.

2 : INSERM UMR_S 1124, Paris, France.

3 : Sorbonne University-Pierre and Marie Curie University, INSERM ERL 1157 Plateform of Mass spectrometry and lipid metabolism, CNRS UMR 7203 Laboratoire des BioMolécules (LBM), CHU Saint-Antoine, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Département PM^2.

4 : Université d'Evry-val-d'Essonne, Evry, France.

5 : Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France.

: Correspondence to Pr. Frederic Charbonnier :

INSERM/UMR-S 1124 Université Paris Descartes-Paris 5, 45 rue des Saints-Pères 75006 France

E-mail :frederic.charbonnier@parisdescartes.fr

Abbreviated title**: DHCR24/Seladin-1 role in SMA**

ABSTRACT

Spinal Muscular Atrophy (SMA), the leading genetic cause of death in childhood, is a neuromuscular disease, which is characterized by the selective loss of spinal motor neurons (MNs) due to the depletion of the survival of motor neuron (SMN) protein. However, SMA is not restricted to MNs. Indeed, SMN depletion is known to perturb the functioning of many cells and tissues, inside and even outside the nervous system, suggesting that still-to-be-discovered basic molecular mechanisms are commonly disrupted in SMA cells. In the present study, we report that cholesterol homeostasis is compromised in SMA. The concentrations of cholesterol and its derivatives are imbalanced in the spinal cord of type 2 SMA-like mice and in SMA patient's serum. These defects concur with abnormal cholesterol enzyme expression levels in the spinal cord of three different SMA mouse strains and in SMA patient's fibroblasts. Moreover, the upstream transcriptional regulation of cholesterol biosynthesis enzyme equipment is also affected by SMN depletion, with the expression of the sterol-regulated element binding protein 2 (SREBP2) transcription factor clearly impaired in SMA spinal cord. Most importantly, we indicate that DHCR24/Seladin-1, a key cholesterol biosynthesis enzyme, known for additional roles in oxidative stress regulation,, directly or indirectly controls SMN expression. We particularly found the nucleo-cytoplasmic traffic of DHCR24/Seladin-1, which was shown crucial for its regulation roles, altered in SMA mouse MNs. Furthermore, inhibiting DHCR24/Seladin-1 activity in control fibroblasts resulted in a significant SMN expression decrease at both transcriptional and protein levels. Most interestingly, restoring DHCR24/Seladin-1 expression in SMA patient cells led to 1) an increase in SMN mRNA steady state and protein levels, which were associated with an increase in DHCR24/Seladin-1 expression in the nucleus, 2) a significant increase in Gems number in the nucleus of transfected cells, suggesting the recovery of SMN function in RNA metabolism. Therefore, enhancing DHCR24/Seladin-1 could constitute a useful strategy to limit neurodegeneration in severe and mild forms of SMA.

Keywords: Spinal Muscular Atrophy – DHCR24 – Cholesterol – Neuroprotection – Metabolism

Abbreviations:

24OHC : 24-hydroxycholesterol

BBB : Blood brain barrier

CNS : Central Nervous System

CYP51: cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase

DHCR24: 24-dehydrocholesterol reductase

DHCR7: 7-dehydrocholesterol reductase

GEMS: Gemini of coiled bodies

HMGCR: hydroxy-methyl-glutaryl-Coenzyme A reductase

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

MN(s): Motor neuron(s)

MVD: mevalonate diphosphate decarboxylase

NSDHL: NAD(P) Dependent Steroid Dehydrogenase-Like

Rock: Rho-associated protein kinases

SMA: Spinal Muscular Atrophy

SMN: Surival of Motor Neuron

SQLE: Squalene monooxygenase

SREBP2: Sterol Regulatory Binding Protein 2

INTRODUCTION.

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is a very severe autosomal recessive disease in childhood, characterized by a specific loss of spinal motor neurons (MNs) leading to severe muscular weakness and irremediable death when vital muscles are affected (Crawford and Pardo, 1996). SMA is caused by mutation of the Survival-of-Motor-Neuron 1 (*SMN1*) gene (Lefebvre et al., 1995) leading to a deficiency in the expression of the Survival-of-Motor-Neuron (SMN) protein. All patients retain one or more copies of *SMN2*, a gene copy of *SMN1*, which modulates the disease severity by allowing only a small amount of full-length *SMN* transcripts and stable SMN protein to be produced (Lorson and Androphy, 2000). Indeed, the predominant SMN protein isoform encoded by *SMN2* lacks its C-terminus domain because of the exon 7 skipping (Lorson and Androphy, 2000; Monani et al., 1999), which results in an unstable protein (Lorson and Androphy, 2000) that cannot oligomerize efficiently (Lorson et al., 1998). SMN being a ubiquitous-expressed protein involved in essential cell functions, such as mRNA splicing, maturation, transport and translation (Meister et al., 2002; Pellizzoni et al., 2002; Rossoll et al., 2003; Sanchez et al., 2013), SMA is not restricted to MNs, but induces alteration of many components of the sensory-motor system (Imlach et al., 2012; Mentis et al., 2011), and even outside the nervous system (Nash et al., 2016). These observations strongly suggest that common molecular mechanisms are disrupted following SMN depletion, with in the forefront several basic intracellular signaling pathways, including the MAPK pathway (Biondi et al., 2010; Millino et al., 2009), the Rho/Rock pathway (Bowerman et al., 2007) and the AKT pathway (Biondi et al., 2010). One common trait of all these signaling pathways is their dependence on the plasma membrane appropriate architecture with, in particular, the correct organization of caveolae, which are cholesterol-enriched membrane micro-domains involved in receptor-mediated signaling (Navarro et al., 2014; Wu et al., 1997). Recently, SMN was shown to directly interact with CAVEOLIN-1, an essential caveolae protein, at the vicinity of the plasma membrane and SMN depletion altered plasma membrane dynamics (Gabanella et al., 2016). However, the cholesterol pathway status has never been investigated in SMA.

Cholesterol is a crucial structural component of cell membranes and has important roles in the central nervous system (CNS), including synaptogenesis, dendrite outgrowth, vesicle transport and

exocytosis at synaptic levels (Funfschilling et al., 2012). Cholesterol content in the brain is about ten-fold higher than in any other organ and represents about 25% of the total body cholesterol. It is mainly present in its unesterified form and distributed between myelin (70%), glial cells (20%) and neurons (10%). While peripheric cholesterol homeostasis is mainly dependent on dietary uptake, in the brain it essentially depends on *de novo* synthesis and recycling (Dietschy and Turley, 2001). The cholesterol cannot cross blood–brain barrier (BBB) but, in case of excess production, can be converted into more polar oxysterols in order to maintain the cholesterol homeostasis in the CNS. The conversion into the 24S-hydroxycholesterol (24OHC), the most abundant oxysterol in the CNS (Lange et al., 1995; Meaney et al., 2002), leads to its excretion to plasma through the BBB, for further elimination by the liver. Perturbation of cholesterol metabolism is known to exert devastating effects on developing and adult neurons both *in vivo* and *in vitro*. Depending on the time point, this includes neural tube closure defects, holoprosencephaly, neuronal cell death, reduction of dendritic outgrowth, and the inhibition of dendritic and synaptic maturation (Haas and Muenke, 2010). In the adult brain, defects of cholesterol homeostasis are linked to neurodegenerative diseases, such as Niemann-Pick type C disease (Blanchette-Mackie et al., 1988), Alzheimer's disease (Vance, 2012) or even to general synaptic degeneration (Koudinov and Koudinova, 2005).

The cholesterol biosynthesis pathway is an endoplasmic-reticulum multi-step pathway starting with condensation of acetyl-coenzymeA, proceeding to the formation of mevalonate and then to lanosterol. Lanosterol is the substrate of the two branches of the terminal biosynthesis pathway, one via zymosterol and desmosterol (Bloch pathway), and the other via zymosterol and lathosterol (Kandutsch-Russel pathway) (Fig. 1). The tissue levels of intermediate sterols (lanosterol, lathosterol and desmosterol) reflect the rate of cholesterol synthesis (Mitsche et al., 2015). Actively participating in cholesterol homeostasis, the expression levels of key enzymes of the cholesterol biosynthesis are finely tuned, through transcriptional and post-transcriptional regulation. Indeed, the sterol-regulated element binding protein 2 (SREBP2) transcription factor activated upon low cholesterol concentration (Edwards and Ericsson, 1999; Yang et al., 1994), stimulates the expression of hydroxy-methyl-glutaryl-Coenzyme A reductase (HMGCR) and 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24)/Seladin-1 (Brown and

Goldstein, 1997; Zerenturk et al., 2012), which respectively catalyze the first and the last steps of the biosynthesis pathway. In addition, *HMGCR* expression is regulated by sterol-dependent alternative splicing. Indeed, high sterol level induces the skipping of *HMGCR* exon-13, which leads to a weak enzyme activity (Medina et al., 2011).

Importantly, the expression of several genes involved in the cholesterol biosynthesis, including *HMGCR*, is reduced in post-mortem cortical tissue from Huntington Disease patients (Valenza et al., 2005; Valenza et al., 2007). In addition, DHCR24/Seladin-1 expression is down-regulated in the brain of Alzheimer Disease patients (Greeve et al., 2000; Iivonen et al., 2002) and the up-regulation of DHCR24/Seladin-1 in neurons leads to the reduction of β-amyloid accumulation and apoptosis (Ishida et al., 2013).

In the present study, we report that the expression levels of the main enzymes of the cholesterol biosynthesis pathway, including HMGCR and DHCR24/Seladin-1, are decreased in the spinal cord of severe and mild SMA mice as well as in SMA patient cells. These defects in SMA mice are associated with a reduction in cholesterol itself and with an imbalance in the concentration of several intermediate sterols, notably an accumulation of desmosterol, the DHCR24/Seladin-1 substrate producing cholesterol. More importantly, we unraveled an unexpected role of DHCR24/Seladin-1 in the control of SMN expression. Enhancing DHCR24/Seladin-1 expression in SMA patient cells resulted in a significant increase in SMN expression and, conversely, inhibiting DHCR24/Seladin-1 in wild-type cells induced a decrease in SMN expression. Taken together, the present data provide the first lines of evidence that restoring DHCR24/Seladin-1 function may be beneficial for SMA, regardless of disease severity.

MATERIAL AND METHODS

SMA patient samples.

Plasma from type 1 SMA patients aged between 3 and 15 months were collected in EDTA coated tubes according to the TROPHOS program and kindly provided by Brigitte Estournet. Plasma samples from non-SMA control patients aged between 3 and 15 months were collected from routine nutritional lipid follow-up (Clinical metabolic department PM^2, Saint Antoine Hospital, AP-HP).

Mice and treatment.

The type 1 SMA-like mice (FVB/NRj-*Smn*$^{-/-,}$ *huSMN2*$^{+/+}$) harboring two human *SMN2* transgenes and knocked-down for the murine *Smn* purchased from The Jackson Laboratory and genotyped as previously described (Monani et al., 2000). Control mice were heterozygous knocked-out for *Smn* and harboring the human *SMN2* transgene (*Smn*$^{-/+}$, *huSMN2*$^{+/+}$). The knock-out transgenic type 2 SMA-like mice (FVB/NRj-*Smn*$^{\Delta7/\Delta7}$, *huSMN2* $^{+/-}$) derived from mice obtained from the Institute of Molecular Biology (Hsieh-Li et al., 2000) (Academia Sinica, Taipei, Taiwan). All SMA-like mice were standardize to a specific phenotype with a weight ranging from 3 to 4g at 8 days of age as previously described (Biondi et al., 2008). The control mice were heterozygous knocked-out for *Smn* and harboring the human *SMN2* transgene (*Smn*$^{+/\Delta7}$, *huSMN2*$^{+/-}$). The knock-out transgenic type 3 SMA-like mice (FVB/NRj-*Smn*$^{\Delta7/\Delta7}$, *huSMN2*$^{+/+}$) derived from mice obtained from the Institute of Molecular Biology (Hsieh-Li et al., 20002000) (Academia Sinica, Taipei, Taiwan). The control mice were heterozygous knocked-out for *Smn* and homozygous for the human *SMN2* transgene (*Smn*$^{+/\Delta7}$, *huSMN2*$^{+/+}$). For the type 3 SMA-like model mouse, only males were kept for experimentation to standardize the analyses. All the experiments were performed in a blind systematic manner to minimize bias. The care and treatment of animals followed the national authority (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France) guidelines for the detention, use, and ethical treatment of laboratory animals.

Plasmid cloning.

Human DHCR24/Seladin-1 full length Coding sequence (NM_014762) was amplified by standard PCR techniques from reverse transcriptase (RT) product using Phusion® High Fidelity

DNA polymerase (Thermofisher) and cloned in BamHI and HindIII restriction site of the pFlag-CMV2 vector (sigma).

RT-qPCR analysis.

Ventral lumbar spinal cord were homogenized using a TissueLyser system (Qiagen, Courtaboeuf, France) while cells were homogenized using electrical potter in 1mL of TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) to extract total RNAs. Each RNA sample was submitted to DNAse treatment using RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Charbonnieres les bains, France) and one microgram was reverse transcribed using an oligo dT_{15} primer with the ImpromII reverse transcription system (Promega) for tissue or Superscript III reverse transcription system for cell culture (Invitrogen).

qPCR were performed with a standard protocol in SYBERGreen ROX Mix (Thermo Fisher Scientific) using a ABI Prism 7000 in a final mix volume of 7 µl. The primers (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) sequences used to amplify selected cDNA are listed in supplementary table 1. The relative quantity of cDNA in each sample were determined on the basis of the threshold cycle for each PCR product (Ct) and the ΔΔCt method was applied to establish fold change expression compared to the relative controls.

Protein and Western blot analysis.

Frozen pellets of human primary culture of type 1 SMA patient fibroblasts were homogenized in 40µl of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 5 mM EDTA, pH 8.0) for 2 wells of a 6 well plate while ventral lumbar spinal cord were homogenized in 20µl of ice-cold lysis buffer for 1 mg of tissue using electrical potter. Protein concentration of the clarified homogenate (+4°C, 10min, 17,000 rcf) was determined on all samples using the Lowry method (Lowry et al., 1951). Then, 10 µg protein samples for SMN, 40 µg for DHCR24/Seladin-1 or 80 µg for HMGCR and SREBP2 analysis of each homogenate were submitted to 10% (HMGCR and SREBP2) or 12,5% (SMN and DHCR24/Seladin-1) SDS-PAGE electrophoresis. Antibodies incubations were performed on PVDF membranes overnight at +4°C in 4% BSA, 0.05% Tween 20, and TBS, pH 7.4 with a polyclonal Seladin-1/DHCR24 rabbit antibody (10471-1-P, 1:1000, Proteintech, Manchester, UK), a polyclonal HMGCR rabbit antibody (sc-33827, 1:500, Santa Cruz biotechnology, Heidelberg, Germany) or

polyclonal SREBP2 rabbit antibody (ab28482, 1:1000, Abcam, Cambridge, UK), monoclonal SMN mouse antibody (610646, 1:5000, BDBiosciences, San José, USA), a polyclonal b-actin rabbit antibody (ab8227, 1:10.000, Abcam) or monoclonal a-tubulin mouse antibody (T6074, 1:10.000, Sigma). The following day, membranes were washed 3 times with TBS 0.1% Tween 20, and then incubated 1h at room temperature with either polyclonal goat anti-mouse antibody (1706516, 1:5000, Biorad) or polyclonal goat anti-rabbit antibody (111-035-003, 1:10000, Jackson Immunoresearch).

Bound antibody complexes were revealed using the ECL system (GE Healthcare, France) and captured using a CCD camera and a bright wide-aperture FUJINON™ ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). The optical density (OD) of each specific band was quantified with ImageJ, subtracted to the background and divided by the OD of corresponding endogenous control (β-actin or α-tubulin) bands. The values were expressed as fold change compared to respective controls.

Histological and immunohistofluorescence analysis.

All spinal cord immunohistofluorescence analyses were performed on type 2 SMA-like mice and age matched controls at 12 days post-natal. Anesthetized animals were submitted to an intracardial perfusion of 10 mL of PBS solution at 0.5mL/min. Then, spinal cords were dissected and incubated overnight in a 4% formaldehyde solution diluted in PBS. The day after, spinal cords were washed twice with PBS with 0.01% of sodium azide. The lumbar part of the spinal cords (L1 to L5) were cut using a vibratome (VT-1000S, Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) at 50µm thick cross sections.

All sections were permeabilized for 30 min in TBS buffer with 1% Triton X-100 and 0.5% Tween 20 and then incubated with either primary polyclonal Seladin-1/DHCR24 rabbit antibody (10471-1-AP; 1:400; Abcam), polyclonal ChAT goat antibody (AB144P; 1:400; Millipore, Darmstadt, Germany), monoclonal GFAP mouse antibody (ab10062; 1:1000; abcam) or monoclonal Olig2 mouse antibody (MABN50; 1:1000; Millipore) overnight at 4°C in a blocking solution (TBS buffer with 1% Triton X-100 and 0.5% Tween 20 supplemented with 4% of BSA). Then, sections were washed in TBS buffer with 1% Triton X-100 and 0.5% Tween 20 and incubated with, polyclonal Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse (715-005-150; 1:400; Jackson ImmunoResearch), polyclonal Cy3-conjugated donkey anti-rabbit (705-025-003; 1:400; Jackson ImmunoResearch) and polyclonal Cy5-conjugated

donkey anti-goat (705-175-147; 1:400; Jackson ImmunoResearchEurope, Newmarket, UK) antibodies for 1h at room temperature in the blocking solution. Finally, the sections were washed in TBS and mounted in VECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The staining specificity was checked on dedicated sections following the same experimental steps except the primary antibody incubation.

For cell imaging, 72h after transfection, cells were washed three times in PBS solution, and then fixed in a 4% formaldehyde solution diluted in PBS for 20 min. Cells were then permeabilized for 20 min in a permeabilization solution (PBS buffer with 0.5% Triton X-100) and blocked in PBS solution with 10% of FBS. Fixed cells were then incubated with either primary polyclonal Seladin-1/DHCR24 rabbit antibody (10471-1-AP; 1:400; Abcam), polyclonal rabbit anti-SMN clone 502 (1:400; obtained from Suzie Lefebvre, Paris, France) and monoclonal mouse anti-Flag M2 (F1804, 1:1000; Sigma) overnight at 4°C. The following day, cells were washed with PBS 0.5% Triton X-100 solution and incubated with and polyclonal Alexa488-conjugated donkey anti-rabbit (711-545-152; 1:400; Jackson ImmunoResearch) and polyclonal Cy3-conjugated donkey anti-mouse (715-025-150; 1:400; Jackson ImmunoResearch) antibodies for 2h at room temperature. The staining specificity was checked on dedicated wells following the same experimental steps except the primary antibody incubation.

All counts, fluorescence intensity analyses and tinted images were performed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Identical brightness, contrast, and color balance adjustments were applied to all groups.

Microscopy.

For all immunofluorescence, except the localization of Seladin/DHRC24 in motor neurons, images were collected with a CMOS camera (ORCA Flash 2.8, Hamamatsu Photonics France, Massy, France) mounted on a Zeiss AxioObserver microscope (Z1, Carl Zeiss SAS, Le Pecq, France) using the ZEN 2012 software (Carl Zeiss SAS) with 100 (X10 ZeissPlanNeoFluar NA 0.3), 200(X20 Zeiss EC-Plan-Apo NA 0.8) and 630 (X63 Zeiss Plan-Apo Oil NA 1.4) magnifications. For the Seladin/DHCR24 localization in motor neurons, the confocal images were collected with a LSM710 (Carl Zeiss SAS)

mounted on a Zeiss AxioImager Z2 microscope using the LSM ZEN Black software (Carl Zeiss SAS) with a 63 (X63 Zeiss Plan-Apochronat NA 1.4) magnification.

Cell culture and plasmid transfection.

Human immortalized culture of fibroblasts from type 1 SMA patients and control patients was kindly provided by Suzie Lefebvre (Renvoise et al., 2006). Fibroblasts cells were plated at 10.000 cells/cm² in 6 wells plates at +37°C in 5% CO_2 in DMEM Glutamax (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% FBS, 1% sodium pyruvate, 1% Penicillin-Streptomycin. At 70% confluence, fibroblasts were transfected with turbofect (4µl per well) transfection reagent (Thermo Fisher Scientific) in an antibiotic-free growth medium with 400ng per well of either empty pFlag-CMV2 vector as a negative control or pFlag-*DHCR24*-CMV2 for 72h following manufacturer's instructions. Transfection medium was then replaced by growth medium for 60h. For pharmacological inhibition of DHCR24/Seladin-1, fibroblasts were treated with MER/29 (kindly provided by Antonin Lamazière) at 10µM for 48h as described in (Singh et al., 2013). Cells were harvested in cold PBS (Thermo Fisher Scientific) and centrifuged at 300g for 5min. Finally, supernatant was removed and pellet frozen at -80°C.

Gas-Chromatography Mass Spectrometry

Total cholesterol, sterol precursor and oxysterol analysis were performed as previously described (Boussicault et al., 2016). This method was originally adapted from the 'gold standard' protocol (Dzeletovic et al., 1995) developed for oxysterol quantitation in order to minimize the formation of spontaneous autoxidation products. Briefly, 12 days old control and type 2 SMA-like mice lumbar spinal cords were weighed and homogenized with a TissueLyser II apparatus (Qiagen) in a 500µl PBS solution containing butylated hydroxytoluene (BHT, 50 mg/ml) and EDTA (0.5 M). Prior to extraction, a mix of internal deuterated standards for each sterol species was added. After alkaline hydrolysis, a trimethylsilyl derivatization was performed using 100µl of N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) (BSTFA) (Sigma). The trimethylsilylether derivatives of sterols and oxysterols were separated by gas chromatography (Hewlett-Packard 6890 series) in a medium polarity capillary column RTX-65 (65% diphenyl 35% dimethylpolysiloxane, length 30 m, diameter 0.32 mm, film thickness 0.25 mm; Restesk).

The mass spectrometer (Agilent 5975 inert XL) in series with the gas chromatography was set up for detection of positive ions. Ions were produced in the electron impact mode at 70 eV. They were identified by the scanning mode and quantified by selective monitoring of the specific ions after normalization and calibration with the appropriate internal and external standards [for more details see (Boussicault et al., 2016).

Statistical Analysis

All data are expressed as means and standard deviation (± SD) of *n* different mice or cultured cell samples for each group. For endpoint studies, a Kolmogorov–Smirnov normal distribution analysis was performed on all data followed by either Student's *t* test for normally distributed data or a non-parametric Mann–Whitney *U* test, to verify significant differences between groups.(Prism 6, GraphPad Software, Inc). Statistical significance was considered when statistical power exceeds 95% in two-tailed calculation(*P*_0.05;AnaStats.fr,France).

Experimental Design

All experiments based on mice were performed in a blind manner, with samples vials uniquely coded to replace pathological or control origins. The pathological background of the mice was further determined by both physiological criteria (body weight, size, and tail length) and a post-dissection genotyping. All cells experiment were performed on a randomized manner, on either control or SMA background.

RESULTS

Cholesterol homeostasis is altered in SMA

To evaluate the possible contribution of cholesterol metabolism in SMA pathogenesis, we performed a lipidomic analysis by GC-MS in spinal cord of type 2 SMA-like mice to measure cholesterol and specific sterol metabolites concentrations belonging to each branch of the cholesterol biosynthesis pathway (Fig. 1A). This included lanosterol, generated at the beginning of the cholesterol biosynthesis pathway, which constitutes the substrate of the two terminal branches of the pathway, 7-lathosterol, belonging to the Kandutsch-Russel pathway, and desmosterol, belonging to the Bloch pathway. Lipidomic analysis indicated an important decrease in cholesterol concentrations in SMA spinal cords compared to controls (Fig. 1B), along with a decrease of lanosterol and 7-lathosterol (Fig. 1C and D). Interestingly, the desmosterol, the last intermediate of cholesterol synthesis was accumulating in SMA spinal cord suggesting a defect in the last step of cholesterol synthesis (Fig. 1E).

Therefore, in order to evaluate the cholesterol metabolism in SMA patients, we compared the level of circulating 24-OHC in serum samples from healthy subjects and severe type SMA patients. Interestingly, the GC-MS results revealed a tendency to a decrease in this oxysterol level in SMA compared to healthy subjects (Fig. 1F), suggesting that a perturbation of the cholesterol turn-over occurred in SMA patients.

Altogether, these data suggest for the first time that the cholesterol biosynthesis pathway is altered in SMA.

The expression levels of the main cholesterol biosynthesis enzymes are reduced in SMA.

In order to understand the origin of the cholesterol depletion in SMA, we analyzed the expression of a set of genes involved in the cholesterol biosynthesis pathway in fibroblasts from

type 1 SMA patient and healthy controls. We focused on the main enzymes of the Bloch and Kandutsch-Russel pathways (Fig.1A), including HMGCR, mevalonate pyrophosphate decarboxylase (MVD), Squalene monooxygenase (SQLE), NAD(P) Dependent Steroid Dehydrogenase-Like (NSDHL), and DHCR24/Seladin-1. We found that most of these genes were significantly down-regulated in SMA compared to controls (Fig. 2A), with a huge decrease for HMGCR mRNA and for DHCR24/Seladin-1 mRNA and protein (Fig, 2A, B and C) which catalyzes one of the first and last steps of the cholesterol biosynthesis pathway, respectively.

We next analyzed by RT-qPCR the expression profile of the same set of cholesterol biosynthesis genes in the spinal cord of type 2 SMA-like mice, compared to age-matched wild-type controls. As indicated in Fig. 2D, all the tested genes displayed a significant decrease in their expression levels in SMA spinal cord compared to controls. Interestingly, we found similar results in the very severe type 1 SMA mice (Monani et al., 2000) (Supplementary Fig. 1A) and in the intermediate type 3 SMA-like mice (Tsai et al., 2006) (Supplementary Fig. 1B). Consistent with our previous results showing sterol intermediate decrease and desmosterol accumulation, both HMGCR and DHCR24/Seladin-1 expressions were strongly decreased in the spinal cord of type 2 SMA-like mice compared to age-matched wild-type controls at P12 at the transcriptional and protein levels (Fig. 2D, E, F, G and H).

Since HMGCR activity is controlled by the alternative splicing of *Hmgcr* exon 13 and that abnormal splicing is expected in SMA MNs (Custer et al., 2016), we analyzed by RT-qPCR the exon-13 splicing of *Hmgcr* mRNA. As shown in Fig. 2I, the ratio between *Hmgcr* mRNA without exon 13 and full-length *Hmgcr* mRNA is altered in the spinal cord of type 2 SMA-like mice compared to controls suggesting a decrease in HMGCR activity through a decrease of its full-length expression and an increase in the proportion of inactive enzyme coding transcripts.

Taken together, these data suggested that the deregulation of the cholesterol biosynthesis pathway could represent a hallmark of SMA pathogenesis.

The expression of SREBP2 is altered in SMA spinal cord.

Since HMGCR and DHCR24/Seladin-1 expressions remained low in SMA spinal cord, despite a significant decrease in cholesterol concentration, we questioned whether SREBP2 regulating pathway could be altered in SMA. We first looked at the levels of SREBP2 expression in SMA and control mouse spinal cords. We found that SMA induced a significant decrease in *Srebp2* mRNA expression levels (Fig. 3A). This decrease was correlated with a decrease in the full-length SREBP2 protein in SMA (Fig. 3B and C). However, the levels of cleaved SREBP-2 were equivalent to controls (Fig. 3B and D). These results suggest an increase in SREBP2 processing that is consistent with the low level of cholesterol in SMA. Nevertheless, this increase is not sufficient to increase HMGCR and DHCR24/Seladin-1 expression to the level of controls, as shown in Fig. 2D just above.

Taken together, all these data suggest that the misexpression of SREBP2 may contribute to the alteration of the cholesterol biosynthesis pathway in SMA spinal cord.

The sub-cellular distribution of DHCR24/Seladin-1 is altered in mouse SMA MNs.

Since DHCR24/Seladin-1 down-regulation has been already linked to neurodegeneration in the brain (Greeve et al., 2000) and because its subcellular localization *i.e.* cytoplasm or nucleus, is thought to reflect different functions (Wu et al., 2004), we investigated the cellular and sub-cellular DHCR24/Seladin-1 distributions in the different spinal cells (oligodendrocytes, MNs and astrocytes) by immunohistochemistry in control and type 2 SMA-like mice (Fig. 4A, B and C). At the cellular level, we indifferently observed a strong DHR24/Seladin-1 staining in oligodendrocytes (Fig. 4A), and in 90% of the MNs (Fig. 4B and

E), concurring to the situation reported in brain neurons (Valdez et al., 2010). At the sub-cellular level, in control spinal cords, DHR24/Seladin-1 appeared homogeneously distributed within the nucleus and cytoplasm in oligodendrocytes (Fig. 4A) and astrocytes (Fig. 3C). However, the localization of DHCR24/Seladin-1 in control MNs proved to be more complex, with an expression found to be either only nuclear (23% of MNs), only cytoplasmic (9% of MNs), or mixed nuclear/cytoplasmic (60% of the MNs) (Fig. 4D and E). Interestingly, in SMA spinal cord, while no difference could be recorded in oligodendrocytes and astrocytes when compared to controls (Fig. 4A and C), we found, in SMA MNs, an increase in the proportion of cytoplasmic and a decrease in the proportion of nuclear DHCR24/Seladin-1 expression (from 9 % to 15 % and from 23 to 14 %, respectively) when compared to control MNs (Fig. 4E).

All these data indicate a MN specific mislocalization of DHCR24/Seladin-1 in SMA, which suggests an alteration or an imbalance in DHCR24 functions in SMA MNs.

*DHCR24/Seladin-1 is involved in the control of SMN expression in physiological conditions***.**

Besides its well-defined role in cholesterol biosynthesis pathway, DHCR24/Seladin-1 participates in several other important regulating functions, including resistance to oxidative stress and apoptosis (Benvenuti et al., 2005; Greeve et al., 2000; Kuehnle et al., 2008). These functions are thought to be dependent on the nuclear translocation of DHCR24/Seladin-1 (Battista et al., 2009), raising still unanswered questions about a potential role of DHCR24/Seladin-1 in the regulation of gene expression. These observations prompted us to investigate whether DHCR24/Seladin-1 could be involved in the regulation of SMN expression.

We first investigated the effects of inhibiting DHCR24/Seladin-1 on SMN expression in healthy conditions. We found that the specific inhibition of DHCR/24Seladin-1 by Triparanol (MER/29) for 72h in wild-type cultured human fibroblasts, resulted in a significant reduction

of *SMN* mRNA (Fig. 5A) and protein expression (Fig. 5B and C). DHCR24/seladin-1 inhibition induced also a significant increase in the expression of *HMGCR* and *DHCR24*/*Seladin-1* mRNAs (Fig. 5D), suggesting a perturbation of the sterol content in the Triparanol-treated cells. Accordingly, an increase in the expression of *SREBP2* mRNA was also recorded in the treated cells (Fig. 5E).

These results provide the first lines of evidence indicating the involvement of DHCR24/Seladin-1 in the control of gene expression, as proved by SMN regulation in control cells. Additionally, this new function could occur by sterol dependent or independent mechanisms.

*DHCR24/Seladin-1 restoration promotes SMN expression in SMA Cells***.**

We then asked whether the restoration of DHCR24/Seladin-1 expression in SMA cells could improve SMN expression. To answer this question, we transiently transfected cDNAs encoding the coding sequence of human *DHCR24*/*Seladin-1*, fused to a Flag tag at the N-terminus, in cultured fibroblasts from type 1 SMA patient, and analyzed the expression of SMN at the transcript and protein levels. Very interestingly, the DHCR24/Seladin-1 overexpression in SMA cells led to a significant improvement of SMN expression, both at the steady state levels of SMN transcripts (Fig. 6A) and at the SMN protein levels (Fig. 6B and C). The DHCR24/Seladin-1-induced increase in SMN expression was associated with a significant increase of DHCR24/Seladin-1 presence in the nucleus of the transfected cells (Fig. 6E and F).

We finally questioned whether the DHCR24/Seladin-1-induced SMN expression was associated with an increased translocation of SMN in the nucleus, where SMN fulfills its major functions on RNA metabolism. To answer this question, we performed an immunocytochemistry aimed at detecting SMN in the Gemini of Coiled Bodies (*Gems*), which are small nuclear bodies in which SMN normally accumulates. Concurring with

DHCR24/Seladin-1-induced SMN expression, we expectedly recorded a significant increase in the number of *Gems* in the nucleus of SMA fibroblasts transfected with DHCR24/Seladin-1 compared to non-transfected cells (Fig. 6G and H), suggesting that DHCR24/Seladin-1 overexpression restored SMN functionality.

Taken together, all these data unexpectedly indicate that DHCR24/Seladin-1 enhances SMN expression in SMA cells. Restoring DHCR24/Seladin-1 was sufficient to promote SMN expression, suggesting that DHCR24/Seladin-1 could be a therapeutic target for SMA.

DISCUSSION

In this study, we revealed that cholesterol homeostasis is impaired in SMA with a significant reduction in cholesterol and an accumulation of its precursor desmosterol. This is associated with a decrease in cholesterol biosynthesis enzyme expression levels. Thus, a disruption of cholesterol homeostasis can be considered has a new hallmark of SMA pathophysiology. Most importantly, we provide here the first lines of evidence directly or indirectly implicating DHCR24/Seladin-1 in the control of SMN expression and is therefore an unexpected therapeutic target for fighting against SMA.

Before its role in cholesterol biosynthesis was discovered and stated, DHCR24/Seladin-1 was initially shown to confer efficient resistance against β-amyloid accumulation (Greeve et al., 2000) and to promote neuroprotection (Peri and Serio, 2008) in Alzheimer's disease. The potential role of DHCR24/Seladin-1 in neurodegeneration has been further substantiated by the evidence of its mis-expression in a brain sample of Huntington disease (Samara et al., 2014). The structure homologies with oxidoreductases (Greeve et al., 2000) and numerous studies in different cellular systems of oxidative stress have gradually substantiated a role of DHCR24/Seladin-1 in regulating oxidative stress, oxidative stress-induced apoptosis, even in neurons (Benvenuti et al., 2005; Greeve et al., 2000; Kuehnle et al., 2008). However, the molecular mechanisms underlying DHCR24/Seladin-1 neuroprotective role remained unclear. Here, we provide several lines of evidence for a new and unexpected role of DHCR24/Seladin-1 in the regulation of gene expression in SMA. Inhibiting DHCR24/Seladin-1 in wild-type cells resulted in *SMN* gene expression decrease and, conversely, restoring DHCR24/Seladin-1 expression in SMA cells resulted in its increase. Most importantly, the SMN-containing nuclear bodies called *Gems* are increased in the SMA cells in which DHCR24/Seladin-1 has been restored. One question that remains unclear is the potential link between DHCR24/Seladin-1 translocation in the nucleus and the accumulation of SMN in the *Gems*. The nuclear presence of DHCR24/Seladin-1 is significantly lower in SMA MNs, when compared to control MNs (Fig. 4E), and the DHCR24/Seladin-1-induced increase of SMN paralleled its translocation in the nucleus (Fig 6E and F). These data may

suggest that the role of DHCR24/Seladin-1 in gene regulation, at least for SMN in SMA tissues, is dependent of its nuclear translocation, as already shown with oxidative stress and apoptosis (Wu et al., 2004). Interestingly, since DHCR24/Seladin-1 has been identified as an mRNA binding protein (Castello et al., 2012), it could be speculated that DHCR24/Seladin-1 bind to SMN transcripts leading to an increase of its stability. Nevertheless, the localization of SMN in discrete nuclear structures, including *Gems* and Cajal bodies (CBs), is crucial for its role in ribonucleoprotein maturation and spliceosome formation and, besides, in the whole RNA metabolism (Liu and Dreyfuss, 1996; Meister et al., 2002; Pellizzoni et al., 2002; Rossoll et al., 2003; Sanchez et al., 2013). The present data, unraveling the impact of DHCR24/Seladin-1 misexpression on SMN expression and functioning, needs to be considered in a more general context in relation to neurodegeneration. Yet, the DHCR24/Seladin-1 misexpression found in several neurodegenerative contexts including Alzheimer's disease (Greeve et al., 2000) and Huntington Disease (HD) (Samara et al., 2014), would have far-reaching consequences for the regulation of gene expression than could have been thought previously. According to this hypothesis, recent studies pointed out alteration of the splicing machinery in HD (Fernandez-Nogales et al., 2016; Lewis and Smith, 2016).

The most established role for DHCR24/Seladin-1 in eukaryotic cells is its role as 3β-hydroxysteroid-Δ24 reductase in the cholesterol biosynthesis pathway. Cholesterol metabolism in the central nervous system (CNS) is independent from that in peripheral tissues due to blood-brain barrier, rending necessary for nervous cells including neurons, to harbor complete enzymatic equipment. Our lipidomic analysis in the spinal cord of SMA-like mice revealed a significant decrease in lanosterol and lathosterol, and increase in desmosterol levels. This intermediate sterol profile strongly concurs with a defect of DHCR24/Seladin-1 activity, which catalyzes the first and the last step of the Kandutsch-Russel and Bloch pathways, respectively. Importantly, the alteration of the cholesterol biosynthesis enzyme equipment was found in the spinal cord of all the SMA mouse strains tested, regardless of age (newborn or adult) and severity (severe or mild) of the disease. Thus, cholesterol disruption could be considered as a new hallmark of SMA physiopathology. In the other hand, improving cholesterol homeostasis, as expected following DHCR24/Seladin-1 restoration in SMA cells, is concomitant with an improvement

of SMN expression and functioning. Since the exact mechanism by which DHCR24/Seladin-1 controls SMN expression is still unknown and requires further investigations, a role of cholesterol itself cannot be excluded. Indeed, due to its crucial importance for cell functioning, the cholesterol status is continuously evaluated by molecular sensors, which, upon activation, trigger specific intracellular signaling pathways resulting in gene regulation. This is notably the case for the transcription factor SREBP2 when cholesterol is depleted and for oxysterol production, in excess cholesterol. Interestingly, we found that the expression pattern of SREBP2 is highly perturbed in SMA spinal cord, and that the main oxysterol produced by the CNS *i.e.* 24-OHC, is decreasing in SMA patient samples.

Besides, the present data raise questions about the neurotoxic impact of cholesterol depletion. Cholesterol is an essential component of the plasma membrane, which depletion in neurons impairs synaptic vesicle trafficking and neurotransmission, leading to dendritic spine and synapse degeneration (Linetti et al., 2010; Liu et al., 2010; Liu et al., 2007). Cholesterol is notably required for the correct formation and maintenance of the neuromuscular junction (NMJ) (Stetzkowski-Marden et al., 2006), which alteration and disruption is a hallmark of SMA (Biondi et al., 2008; Kariya et al., 2008; Kong et al., 2009). More generally, in the cell membrane, cholesterol is a key component of lipid rafts, which represent important platforms for cell signaling. Interestingly, recent data have reported a role of SMN in membrane dynamics, notably at the level of the subset of lipid rafts called caveolae (Gabanella et al., 2016). Thus, in the light of our present data, one can speculate that cholesterol homeostasis alteration would affect the lipid raft distribution ultimately contributing to a general perturbation of the intracellular signaling pathways, deprived of the necessary lipid rafts for signaling initiation (Wu et al., 1997). According to this hypothesis, in Alzheimer's disease as in SMA, two neurodegenerative diseases in which the cholesterol homeostasis is perturbed (Vance, 2012) (this study), the most important signaling pathway affected is the PI3K/AKT signaling (Biondi et al., 2010; Recabarren and Alarcon, 2017), known to be initiated at the level of the lipid rafts in neurons (Asaki et al., 2003). Accordingly, the intracellular reactivation of the PI3K/AKT pathway in SMA is sufficient to activate SMN expression (Branchu et al., 2013). Thus, taken together, all these data strongly suggest that the cholesterol homeostasis perturbation, resulting from excess cholesterol, as in Alzheimer's disease, or in cholesterol

depletion, as shown in SMA, contribute the neurodegeneration, at least partly by disorganizing the membrane signaling platforms and the signaling pathways that are initiated at their vicinity. Consequently, improving cholesterol homeostasis could represent a promising way for limiting neurodegeneration.

Most of the therapies developed to fight against SMA are designed to increase the expression levels of SMN protein in patients. Yet, therapeutic trials based on gene or antisense-oligonucleotide therapy are underway by intrathecal injections. These approaches are mainly designed for the severe type SMA patients, whose SMN expression is very low, and only targeting the correction of SMN expression in the spinal cord. These limitations lead to the absolute requirement of additional therapies, which could 1) be used in synergy with therapies focused on SMN restoration, 2) be beneficial for less severe patients, often diagnosed when the therapeutic window for SMN-promoting therapies has passed and 3) alleviate SMA symptoms in all organs targeted by SMA and not only spinal cells. That disruption of the cholesterol metabolism participating in SMA pathogenesis, regardless of the disease severity, was completely unanticipated as was the role of DHCR24/Seladin-1 in the regulation of SMN expression. Enhancing DHCR24/Seladin-1 expression in SMA cells holds the promise of providing both SMN-dependent and SMN-independent therapies, by improving SMN expression, on the one hand, and cholesterol homeostasis, on the other.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. Suzie Lefebvre for fruitful discussions and her help for the cultures of human fibroblasts. The authors want to thank C. Mader and central animal facility of the faculty of basic and biomedical sciences and J-M Petit and the Imaging plateform of the faculty). L.H. is the recipient of fellowship from the “Ministère de la Recherche et de la Technologie”.

FUNDING

These studies were supported by the Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM) and Université Paris Descartes.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1: *List of primers used for RT-qPCR*

Supplementary Figure 1: *The expression levels of the main cholesterol biosynthesis enzymes are reducted in severe and mild SMA-mice models.*

Supplementary Data 1: *Full-length blots*

REFERENCES

Asaki, C., Usuda, N., Nakazawa, A., Kametani, K., Suzuki, T., 2003. Localization of translational components at the ultramicroscopic level at postsynaptic sites of the rat brain. Brain Res. 972**,** 168-76.

Battista, M.C., Roberge, C., Martinez, A., Gallo-Payet, N., 2009. 24-dehydrocholesterol reductase/seladin-1: a key protein differentially involved in adrenocorticotropin effects observed in human and rat adrenal cortex. Endocrinology. 150**,** 4180-90.

Benvenuti, S., Luciani, P., Vannelli, G.B., Gelmini, S., Franceschi, E., Serio, M., Peri, A., 2005. Estrogen and selective estrogen receptor modulators exert neuroprotective effects and stimulate the expression of selective Alzheimer's disease indicator-1, a recently discovered antiapoptotic gene, in human neuroblast long-term cell cultures. J Clin Endocrinol Metab. 90**,** 1775-82.

Biondi, O., Grondard, C., Lecolle, S., Deforges, S., Pariset, C., Lopes, P., Cifuentes-Diaz, C., Li, H., della Gaspera, B., Chanoine, C., Charbonnier, F., 2008. Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. J Neurosci. 28**,** 953-62.

Biondi, O., Branchu, J., Sanchez, G., Lancelin, C., Deforges, S., Lopes, P., Pariset, C., Lecolle, S., Cote, J., Chanoine, C., Charbonnier, F., 2010. In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. J Neurosci. 30**,** 11288-99.

Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Amende, L.M., Kruth, H.S., Butler, J.D., Sokol, J., Comly, M.E., Vanier, M.T., August, J.T., Brady, R.O., et al., 1988. Type-C Niemann-Pick disease: low density lipoprotein uptake is associated with premature cholesterol accumulation in the Golgi complex and excessive cholesterol storage in lysosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 85**,** 8022-6.

Boussicault, L., Alves, S., Lamaziere, A., Planques, A., Heck, N., Moumne, L., Despres, G., Bolte, S., Hu, A., Pages, C., Galvan, L., Piguet, F., Aubourg, P., Cartier, N., Caboche, J., Betuing, S., 2016. CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. Brain. 139**,** 953-70.

Bowerman, M., Shafey, D., Kothary, R., 2007. Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. J Mol Neurosci. 32**,** 120-31.

Branchu, J., Biondi, O., Chali, F., Collin, T., Leroy, F., Mamchaoui, K., Makoukji, J., Pariset, C., Lopes, P., Massaad, C., Chanoine, C., Charbonnier, F., 2013. Shift from extracellular signal-regulated kinase to AKT/cAMP response element-binding protein pathway increases survival-motor-neuron expression in spinal-muscular-atrophy-like mice and patient cells. J Neurosci. 33**,** 4280-94.

Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell. 89**,** 331-40.

Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B.M., Strein, C., Davey, N.E., Humphreys, D.T., Preiss, T., Steinmetz, L.M., Krijgsveld, J., Hentze, M.W., 2012. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. Cell. 149**,** 1393-406.

Crawford, T.O., Pardo, C.A., 1996. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. Neurobiol Dis. 3**,** 97-110.

Custer, S.K., Gilson, T.D., Li, H., Todd, A.G., Astroski, J.W., Lin, H., Liu, Y., Androphy, E.J., 2016. Altered mRNA Splicing in SMN-Depleted Motor Neuron-Like Cells. PLoS One. 11**,** e0163954.

Dietschy, J.M., Turley, S.D., 2001. Cholesterol metabolism in the brain. Curr Opin Lipidol. 12**,** 105-12.

Dzeletovic, S., Breuer, O., Lund, E., Diczfalusy, U., 1995. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. Anal Biochem. 225**,** 73-80.

Edwards, P.A., Ericsson, J., 1999. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. Annu Rev Biochem. 68**,** 157-85.

Fernandez-Nogales, M., Santos-Galindo, M., Hernandez, I.H., Cabrera, J.R., Lucas, J.J., 2016. Faulty splicing and cytoskeleton abnormalities in Huntington's disease. Brain Pathol. 26**,** 772-778.

Funfschilling, U., Jockusch, W.J., Sivakumar, N., Mobius, W., Corthals, K., Li, S., Quintes, S., Kim, Y., Schaap, I.A., Rhee, J.S., Nave, K.A., Saher, G., 2012. Critical time window of neuronal cholesterol synthesis during neurite outgrowth. J Neurosci. 32**,** 7632-45.

Gabanella, F., Pisani, C., Borreca, A., Farioli-Vecchioli, S., Ciotti, M.T., Ingegnere, T., Onori, A., Ammassari-Teule, M., Corbi, N., Canu, N., Monaco, L., Passananti, C., Di Certo, M.G., 2016. SMN affects membrane remodelling and anchoring of the protein synthesis machinery. J Cell Sci. 129**,** 804-16.

Greeve, I., Hermans-Borgmeyer, I., Brellinger, C., Kasper, D., Gomez-Isla, T., Behl, C., Levkau, B., Nitsch, R.M., 2000. The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress. J Neurosci. 20**,** 7345-52.

Haas, D., Muenke, M., 2010. Abnormal sterol metabolism in holoprosencephaly. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 154C**,** 102-8.

Hsieh-Li, H.M., Chang, J.G., Jong, Y.J., Wu, M.H., Wang, N.M., Tsai, C.H., Li, H., 2000. A mouse model for spinal muscular atrophy. Nat Genet. 24**,** 66-70.

Iivonen, S., Hiltunen, M., Alafuzoff, I., Mannermaa, A., Kerokoski, P., Puolivali, J., Salminen, A., Helisalmi, S., Soininen, H., 2002. Seladin-1 transcription is linked to neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neuroscience. 113**,** 301-10.

Imlach, W.L., Beck, E.S., Choi, B.J., Lotti, F., Pellizzoni, L., McCabe, B.D., 2012. SMN is required for sensory-motor circuit function in Drosophila. Cell. 151**,** 427-39.

Ishida, E., Hashimoto, K., Okada, S., Satoh, T., Yamada, M., Mori, M., 2013. Thyroid hormone receptor and liver X receptor competitively up-regulate human selective Alzheimer's disease indicator-1 gene expression at the transcriptional levels. Biochem Biophys Res Commun. 432**,** 513-8.

Kariya, S., Park, G.H., Maeno-Hikichi, Y., Leykekhman, O., Lutz, C., Arkovitz, M.S., Landmesser, L.T., Monani, U.R., 2008. Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet.

Kong, L., Wang, X., Choe, D.W., Polley, M., Burnett, B.G., Bosch-Marce, M., Griffin, J.W., Rich, M.M., Sumner, C.J., 2009. Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. J Neurosci. 29**,** 842-51.

Koudinov, A.R., Koudinova, N.V., 2005. Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration. J Neurol Sci. 229-230**,** 233-40.

Kuehnle, K., Crameri, A., Kalin, R.E., Luciani, P., Benvenuti, S., Peri, A., Ratti, F., Rodolfo, M., Kulic, L., Heppner, F.L., Nitsch, R.M., Mohajeri, M.H., 2008. Prosurvival effect of DHCR24/Seladin-1 in acute and chronic responses to oxidative stress. Mol Cell Biol. 28**,** 539-50.

Lange, Y., Ye, J., Strebel, F., 1995. Movement of 25-hydroxycholesterol from the plasma membrane to the rough endoplasmic reticulum in cultured hepatoma cells. J Lipid Res. 36**,** 1092-7.

Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., et al., 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Cell. 80**,** 155-65.

Lewis, E.A., Smith, G.A., 2016. Using Drosophila models of Huntington's disease as a translatable tool. J Neurosci Methods. 265, 89-98.
Linetti, A., Fratangeli, A., Taverna, E., Valnegri, P., Francolini, M., Cappello, V., Matteoli, M., Passafaro, M., Rosa, P., 2010. Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. J Cell Sci. 123, 595-605.
Liu, Q., Dreyfuss, G., 1996. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. Embo J. 15, 3555-65.
Liu, Q., Trotter, J., Zhang, J., Peters, M.M., Cheng, H., Bao, J., Han, X., Weeber, E.J., Bu, G., 2010. Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. J Neurosci. 30, 17068-78.
Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyakkers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., Wang, Y.T., 2007. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. J Neurosci. 27, 2846-57.
Lorson, C.L., Strasswimmer, J., Yao, J.M., Baleja, J.D., Hahnen, E., Wirth, B., Le, T., Burghes, A.H., Androphy, E.J., 1998. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. Nat Genet. 19, 63-6.
Lorson, C.L., Androphy, E.J., 2000. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. Hum Mol Genet. 9, 259-65.
Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193, 265-75.
Meaney, S., Bodin, K., Diczfalusy, U., Bjorkhem, I., 2002. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: critical importance of the position of the oxygen function. J Lipid Res. 43, 2130-5.
Medina, M.W., Gao, F., Naidoo, D., Rudel, L.L., Temel, R.E., McDaniel, A.L., Marshall, S.M., Krauss, R.M., 2011. Coordinately regulated alternative splicing of genes involved in cholesterol biosynthesis and uptake. PLoS One. 6, e19420.
Meister, G., Eggert, C., Fischer, U., 2002. SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. Trends Cell Biol. 12, 472-8.
Mentis, G.Z., Blivis, D., Liu, W., Drobac, E., Crowder, M.E., Kong, L., Alvarez, F.J., Sumner, C.J., O'Donovan, M.J., 2011. Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy. Neuron. 69, 453-67.
Millino, C., Fanin, M., Vettori, A., Laveder, P., Mostacciuolo, M.L., Angelini, C., Lanfranchi, G., 2009. Different atrophy-hypertrophy transcription pathways in muscles affected by severe and mild spinal muscular atrophy. BMC Med. 7, 14.
Mitsche, M.A., McDonald, J.G., Hobbs, H.H., Cohen, J.C., 2015. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. Elife. 4, e07999.
Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H., McPherson, J.D., 1999. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. Hum Mol Genet. 8, 1177-83.

Monani, U.R., Sendtner, M., Coovert, D.D., Parsons, D.W., Andreassi, C., Le, T.T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossoll, W., Prior, T.W., Morris, G.E., Burghes, A.H., 2000. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet. 9**,** 333-9.

Nash, L.A., Burns, J.K., Chardon, J.W., Kothary, R., Parks, R.J., 2016. Spinal Muscular Atrophy: More than a Disease of Motor Neurons? Curr Mol Med. 16**,** 779-792.

Navarro, G., Borroto-Escuela, D.O., Fuxe, K., Franco, R., 2014. Potential of caveolae in the therapy of cardiovascular and neurological diseases. Front Physiol. 5**,** 370.

Pellizzoni, L., Baccon, J., Rappsilber, J., Mann, M., Dreyfuss, G., 2002. Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. J Biol Chem. 277**,** 7540-5.

Peri, A., Serio, M., 2008. Neuroprotective effects of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. J Mol Endocrinol. 41**,** 251-61.

Recabarren, D., Alarcon, M., 2017. Gene networks in neurodegenerative disorders. Life Sci. 183**,** 83-97.

Renvoise, B., Khoobarry, K., Gendron, M.C., Cibert, C., Viollet, L., Lefebvre, S., 2006. Distinct domains of the spinal muscular atrophy protein SMN are required for targeting to Cajal bodies in mammalian cells. J Cell Sci. 119**,** 680-92.

Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A.K., Karle, K., Monani, U.R., Sendtner, M., 2003. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. J Cell Biol. 163**,** 801-12.

Samara, A., Galbiati, M., Luciani, P., Deledda, C., Messi, E., Peri, A., Maggi, R., 2014. Altered expression of 3-betahydroxysterol delta-24-reductase/selective Alzheimer's disease indicator-1 gene in Huntington's disease models. J Endocrinol Invest. 37**,** 729-37.

Sanchez, G., Dury, A.Y., Murray, L.M., Biondi, O., Tadesse, H., El Fatimy, R., Kothary, R., Charbonnier, F., Khandjian, E.W., Cote, J., 2013. A novel function for the survival motoneuron protein as a translational regulator. Hum Mol Genet. 22**,** 668-84.

Singh, P., Saxena, R., Srinivas, G., Pande, G., Chattopadhyay, A., 2013. Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. PLoS One. 8**,** e58833.

Stetzkowski-Marden, F., Recouvreur, M., Camus, G., Cartaud, A., Marchand, S., Cartaud, J., 2006. Rafts are required for acetylcholine receptor clustering. J Mol Neurosci. 30**,** 37-8.

Tsai, L.K., Tsai, M.S., Lin, T.B., Hwu, W.L., Li, H., 2006. Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. Neurobiol Dis. 24**,** 286-95.

Valdez, C.M., Smith, M.A., Perry, G., Phelix, C.F., Santamaria, F., 2010. Cholesterol homeostasis markers are localized to mouse hippocampal pyramidal and granule layers. Hippocampus. 20**,** 902-5.

Valenza, M., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Fenu, S., Jamot, L., Strand, A., Tarditi, A., Woodman, B., Racchi, M., Mariotti, C., Di Donato, S.,

Corsini, A., Bates, G., Pruss, R., Olson, J.M., Sipione, S., Tartari, M., Cattaneo, E., 2005. Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease. J Neurosci. 25**,** 9932-9.

Valenza, M., Carroll, J.B., Leoni, V., Bertram, L.N., Bjorkhem, I., Singaraja, R.R., Di Donato, S., Lutjohann, D., Hayden, M.R., Cattaneo, E., 2007. Cholesterol biosynthesis pathway is disturbed in YAC128 mice and is modulated by huntingtin mutation. Hum Mol Genet. 16**,** 2187-98.

Vance, J.E., 2012. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. Dis Model Mech. 5**,** 746-55.

Wu, C., Butz, S., Ying, Y., Anderson, R.G., 1997. Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. J Biol Chem. 272**,** 3554-9.

Wu, C., Miloslavskaya, I., Demontis, S., Maestro, R., Galaktionov, K., 2004. Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. Nature. 432**,** 640-5.

Yang, J., Sato, R., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1994. Sterol-resistant transcription in CHO cells caused by gene rearrangement that truncates SREBP-2. Genes Dev. 8**,** 1910-9.

Zerenturk, E.J., Sharpe, L.J., Brown, A.J., 2012. Sterols regulate 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase (DHCR24) via dual sterol regulatory elements: cooperative induction of key enzymes in lipid synthesis by Sterol Regulatory Element Binding Proteins. Biochim Biophys Acta. 1821**,** 1350-60.

Legends to figures

Figure 1: *Cholesterol homeostasis is altered in SMA.*

(A) Representation of cholesterol biosynthesis pathway main steps showing metabolites (grey boxes) and key enzymes (white boxes) in the Bloch and Kandutsch-Russel pathways. (**B-E)** Quantification by GC-MS of Cholesterol (**B,**), Lanosterol (**C**), 7-lathosterol (**D**) and Desmoterol (**E**) metabolites in the ventral lumbar spinal cords of type 2 SMA-like mice compared to controls at P12 (n=3). (**F)** Quantification by GC-MS of 24S-hydroxycholesterol (**F,** p=0.31) in the serum of SMA patients (n=7) compared to controls (n=4; *: p<0,05)

Figure 2: *The expression levels of the main cholesterol biosynthesis enzymes are reduced in SMA.*

(**A**) Quantification by RT-qPCR of the transcripts encoding cholesterol biosynthesis key enzymes normalized by *RPL13A* in immortalized SMA human fibroblasts (n=3). (**B,C**) Western blot analysis and quantification of DHCR24/Seladin-1 protein expression in immortalized SMA human fibroblasts (n=5). (**D**) Quantification by RT-qPCR of the transcripts encoding cholesterol biosynthesis key enzymes normalized by 26S in the ventral lumbar spinal cord of type 2 SMA-like mice at P12 (n=6). (**E-H**) Western blot analysis and quantification of HMGCR (**E and F**) and DHCR24/Seladin-1 (**G and H**) protein expression in the ventral lumbar spinal cord of type 2 SMA-like mice at P12 (n=6). (**I**) Ratio of the *Hmgcr* transcript without exon 13 (-13) with the *Hmgcr* containing exon 13 (+13) after quantification by RT-qPCR in the ventral lumbar spinal cord of type 2 SMA-like mice at P12 (n=6; *: p<0.05; significance relative to controls)

Figure 3: *The expression of SREBP2, the main transcriptional regulator of cholesterol biosynthesis enzymes, is altered in the spinal cord of type2 SMA-like mice.*

(**A**) Quantification by RT-qPCR of *Srebf2* transcripts normalized by *26S* in the lumbar spinal cord of control and type II SMA-like mice at P12 (n=5). (**B-D**) Western blot analysis and quantification of the full-length SREBP2 protein expression (120kDa; **B** and **C**) and the C-terminal cleaved form (68kDa;

B and **D**) in the lumbar spinal cord of control and SMA-like mice at P12 (n=6). (*: p<0.05; significance relative to controls).

Figure 4: ***The sub-cellular distribution of DHCR24/Seladin-1 is altered in MNs cells from the spinal cord of type 2 SMA-like mice.***

(**A-C**) Immunodetection of DHCR24/Seladin-1 protein (green) in either Olig2-positive oligodendrocytes (**A**; red; scale bar 10 µm), CholineAcetylTransferase (ChAT) positive MNs (**B**; red; scale bar 25 µm) and GFAP-positive astrocytes (**C**; red, scale bar 10 µm) in the lumbar spinal cord of control and SMA-like mice at P12, with a counterstaining of nuclei (Hoestch 33258; blue). (**D**) Confocal images of immunodetected DHCR24/Seladin-1 protein (green) in the nucleus (blue) and the cytoplasm of ChAT-positive MNs (red) in the lumbar spinal cord of control and SMA-like mice at P12 (scale bar 25 µm). (**E**) Quantification of the proportion of lumbar MNs with either a nuclear only or a cytoplasmic only or both cytoplasmic and nuclear localization of DHCR24/Seladin-1 in control and SMA-like mice at P12 (n=3; *: p<0.05; significance relative to controls)

Figure 5: ***DHCR24/Seladin-1 is involved in the control of SMN expression in physiological conditions.***

(**A**) Quantification by RT-qPCR of the E4–E5 and E7-E8 segments of the *SMN* transcripts normalized by *RPL13A* in immortalized control human fibroblasts treated for 72h with the DHCR24/Seladin-1 pharmacologic inhibitor MER/29 (10µM) compared to vehicle treatment (n=4). (**B and C**) Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in immortalized control human fibroblasts treated for 48h with DHCR24/Seladin-1 pharmacologic inhibitor MER/29 (10µM) compared to vehicle treatment (n=4). (**D, E**) Quantification by RT-qPCR of *HMGCR*, *DHCR24* and *SREBF2* transcripts normalized by *RPL13A* in immortalized control human fibroblasts treated for 72h with the DHCR24/Seladin-1 pharmacologic inhibitor MER/29 (10µM) compared to vehicle treatment (n=4; *: p<0.05; significance relative to vehicle treated cells).

Figure 6: ***DHCR24/Seladin-1 restoration promotes SMN expression in SMA cells.***

(A) Quantification by RT-qPCR of the *E4–E5* and *E7-E8* segments of the *SMN* transcripts normalized by *RPL13A* in immortalized SMA human fibroblasts after transfection with a DHCR24/Seladin-1 plasmid for 72h (n=4). (**B-D)** Western blot analysis and quantification of SMN (**B, C**) and DHCR24/Seladin-1 (**B and D**) in immortalized SMA human fibroblasts after transfection with a DHCR24/Seladin-1 plasmid for 72h (n=4). (**E**) Immunodetection of DHCR24 (green), in the nucleus (blue) of Flag-positive cells (Red) after transfection with Flag-tagged DHCR24/Seladin-1 plasmid for 72h compared to cells transfected with the empty plasmid. (**F**) Quantification of the average fluorescence intensity of DHCR24/Seladin-1 staining in the nucleus of non-transfected and Flag-DHCR24 plasmid transfected cells. (**G**) Immunodetection of SMN (green), in the nucleus (blue) of flag-positive (Red) compared to flag-negative (unstained) cells after transfection with flag-tagged DHCR24/Seladin-1 plasmid for 72h. The white filled arrows indicate nucleus containing gems. Dotted lines indicate cells cropped (scale bar large image: 25µm; scale bar crop: 5µm) (**H**) Quantification of the number of gems in the nucleus after transfection with flag-tagged DHCR24/Seladin-1 plasmid for 72h compared to not transfected cells (*: $p<0.05$; significance relative to empty plasmid or not transfected cells).

Supplementary Figure 1: ***The expression levels of the main cholesterol biosynthesis enzymes are reducted in severe and mild SMA-mice models.***

(**A and B**) Quantification by RT-qPCR of the transcripts encoding cholesterol biosynthesis key enzymes normalized by 26S in the ventral lumbar spinal cords of either type 2 SMA-like (n=5) (**A**) or type 3 SMA-like (n=3) (**B**) mice compared to age matched controls. (*: $p<0.05$; significance relative to controls)

Fig. 1

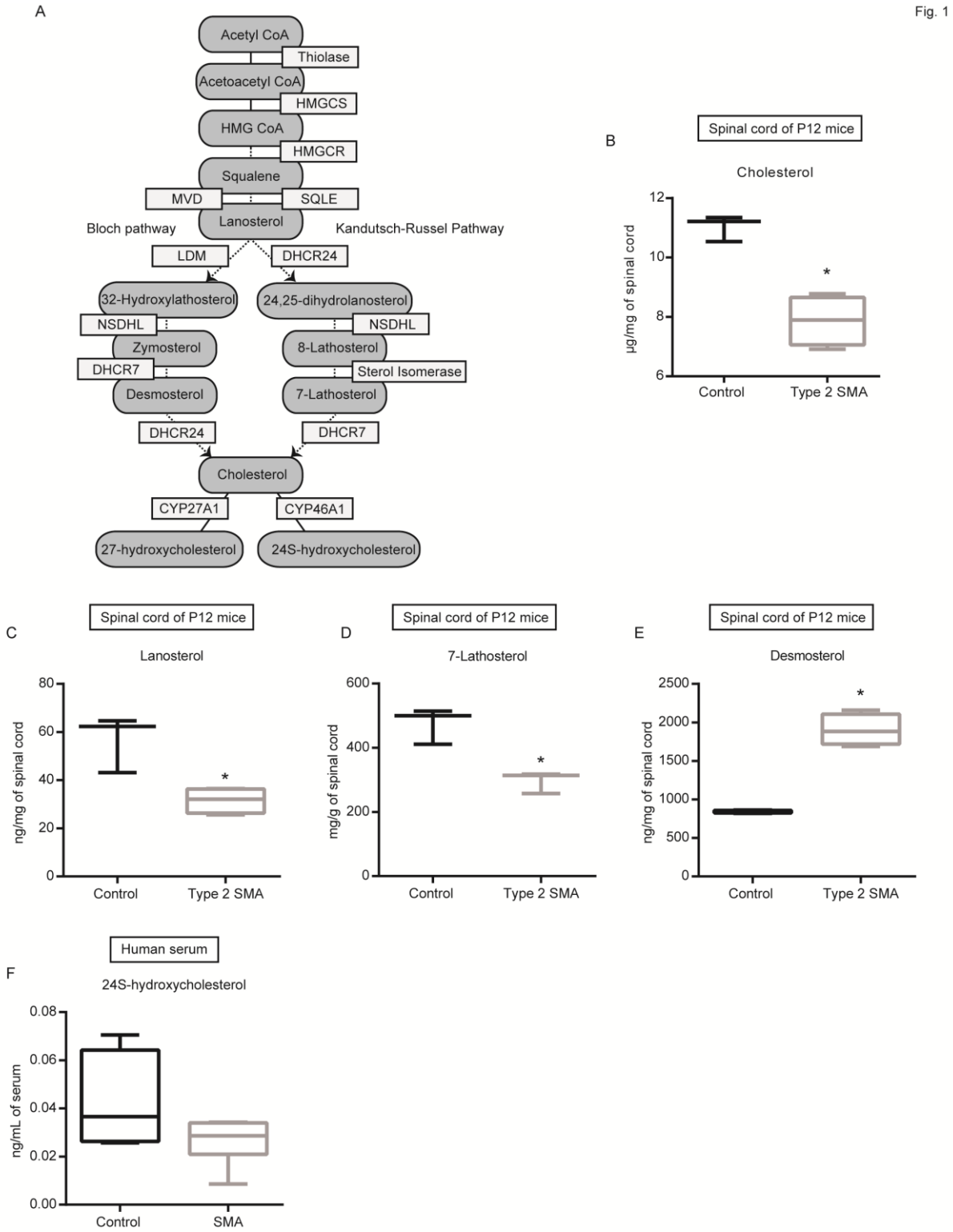

A
Acetyl CoA
Thiolase
Acetoacetyl CoA
HMGCS
HMG CoA
HMGCR
Squalene
MVD
SQLE
Lanosterol
Bloch pathway
Kandutsch-Russel Pathway
LDM
DHCR24
32-Hydroxylathosterol
24,25-dihydrolanosterol
NSDHL
NSDHL
Zymosterol
8-Lathosterol
DHCR7
Sterol Isomerase
Desmosterol
7-Lathosterol
DHCR24
DHCR7
Cholesterol
CYP27A1
CYP46A1
27-hydroxycholesterol
24S-hydroxycholesterol
B
Spinal cord of P12 mice
Cholesterol
µg/mg of spinal cord
12
10
8
6
*
Control
Type 2 SMA
C
Spinal cord of P12 mice
Lanosterol
ng/mg of spinal cord
80
60
40
20
0
*
Control
Type 2 SMA
D
Spinal cord of P12 mice
7-Lathosterol
mg/g of spinal cord
600
400
200
0
*
Control
Type 2 SMA
E
Spinal cord of P12 mice
Desmosterol
ng/mg of spinal cord
2500
2000
1500
1000
500
0
*
Control
Type 2 SMA
F
Human serum
24S-hydroxycholesterol
ng/mL of serum
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
Control
SMA

Fig. 2

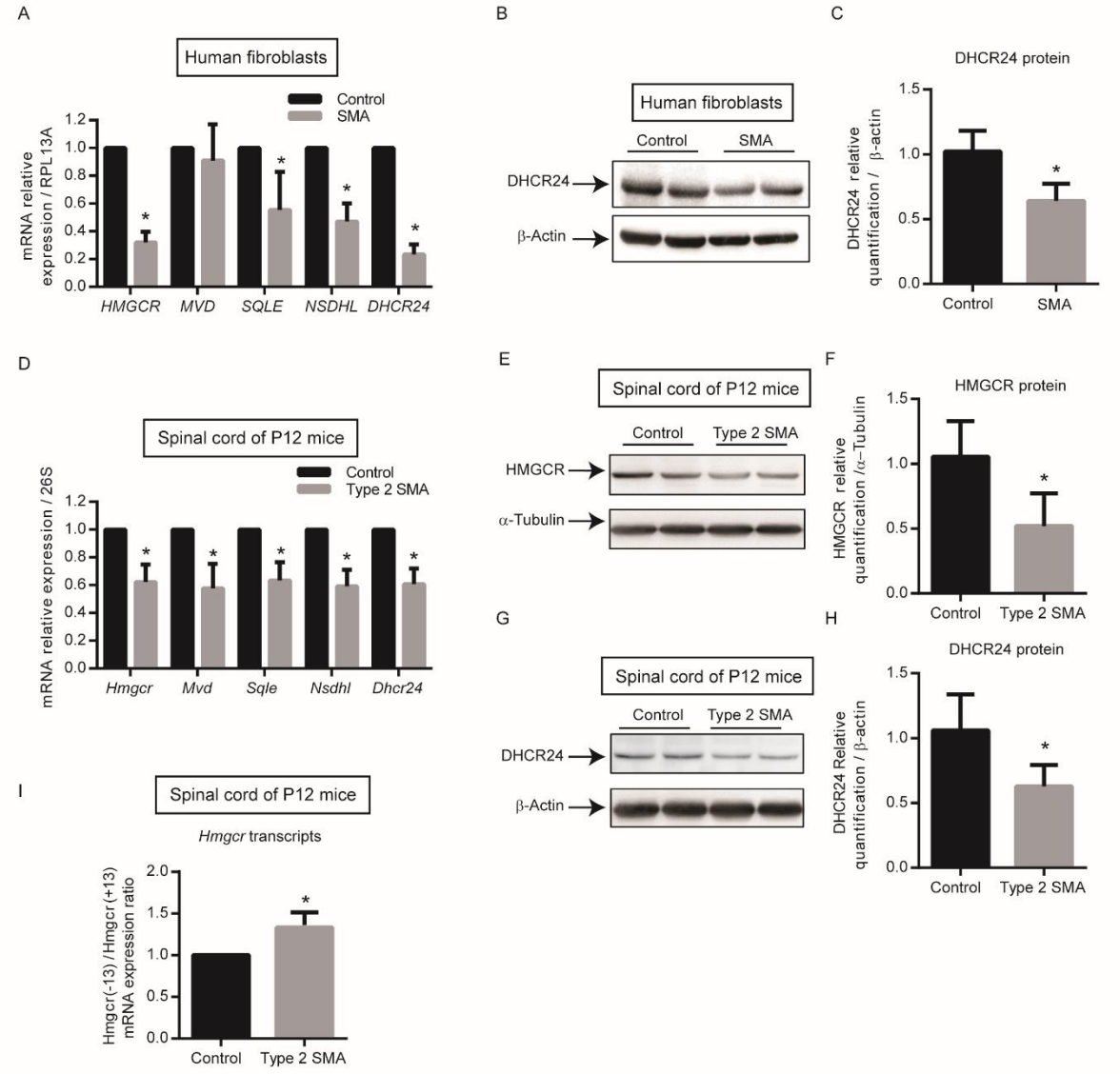

A
Human fibroblasts
Control
SMA
mRNA relative expression / RPL13A
HMGCR
MVD
SQLE
NSDHL
DHCR24
B
Human fibroblasts
Control
SMA
DHCR24
β-Actin
C
DHCR24 protein
DHCR24 relative quantification / β-actin
Control
SMA
D
Spinal cord of P12 mice
Control
Type 2 SMA
mRNA relative expression / 26S
Hmgcr
Mvd
Sqle
Nsdhl
Dhcr24
E
Spinal cord of P12 mice
Control
Type 2 SMA
HMGCR
α-Tubulin
F
HMGCR protein
HMGCR relative quantification /α–Tubulin
Control
Type 2 SMA
G
Spinal cord of P12 mice
Control
Type 2 SMA
DHCR24
β-Actin
H
DHCR24 protein
DHCR24 Relative quantification / β-actin
Control
Type 2 SMA
I
Spinal cord of P12 mice
Hmgcr transcripts
Hmgcr(-13) /Hmgcr(+13) mRNA expression ratio
Control
Type 2 SMA

Fig. 3

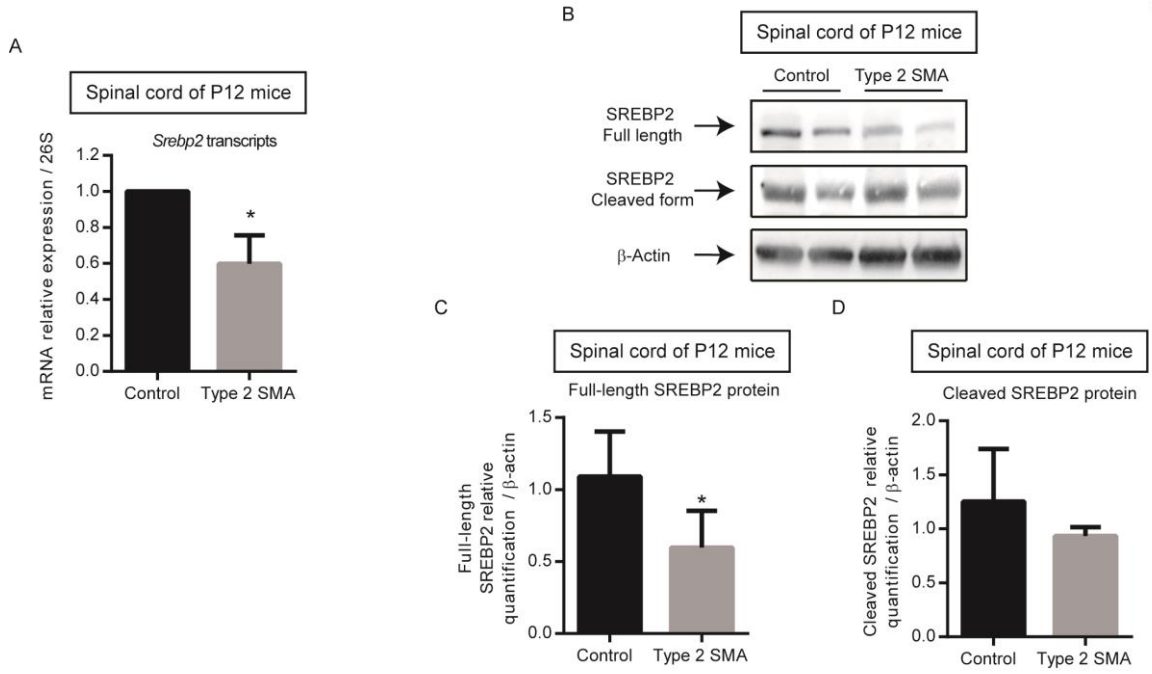

A
Spinal cord of P12 mice
Srebp2 transcripts
mRNA relative expression / 26S
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
Control
Type 2 SMA
B
Spinal cord of P12 mice
Control
Type 2 SMA
SREBP2
Full length
SREBP2
Cleaved form
β-Actin
C
Spinal cord of P12 mice
Full-length SREBP2 protein
Full-length
SREBP2 relative
quantification / β-actin
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Control
Type 2 SMA
D
Spinal cord of P12 mice
Cleaved SREBP2 protein
Cleaved SREBP2 relative
quantification / β-actin
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
Type 2 SMA

Fig. 4

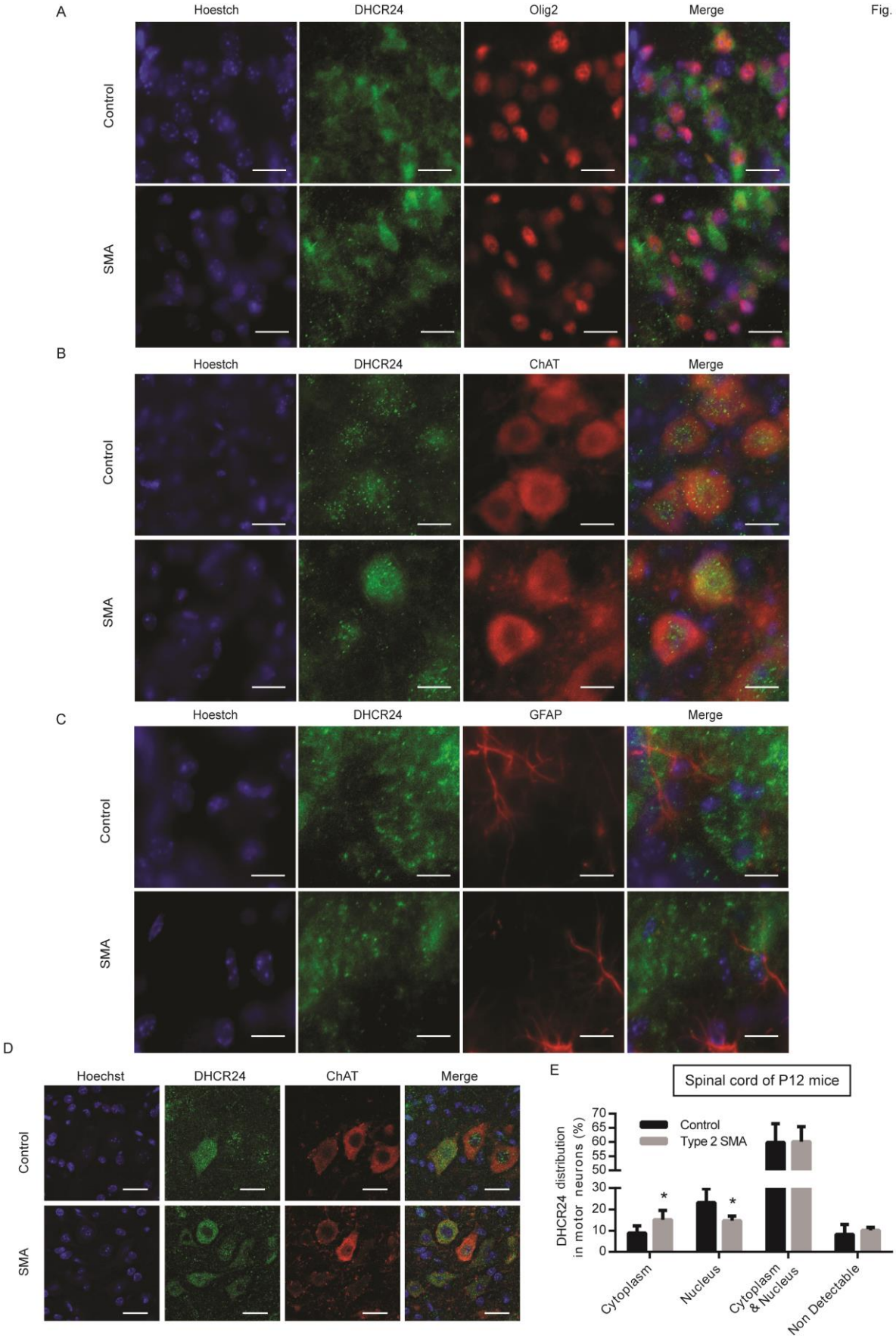

A
Hoestch
DHCR24
Olig2
Merge
Control
SMA
B
Hoestch
DHCR24
ChAT
Merge
Control
SMA
C
Hoestch
DHCR24
GFAP
Merge
Control
SMA
D
Hoechst
DHCR24
ChAT
Merge
Control
SMA
E
Spinal cord of P12 mice
Control
Type 2 SMA
DHCR24 distribution in motor neurons (%)
70
65
60
55
50
30
20
10
0
*
*
Cytoplasm
Nucleus
Cytoplasm & Nucleus
Non Detectable

Fig. 5

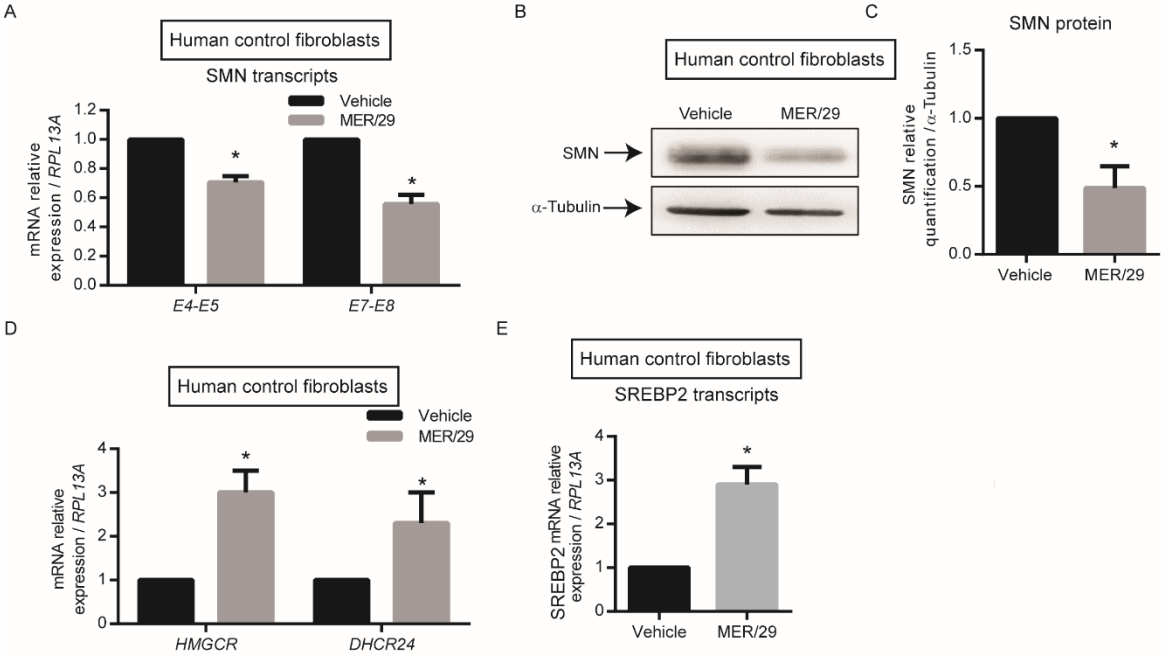
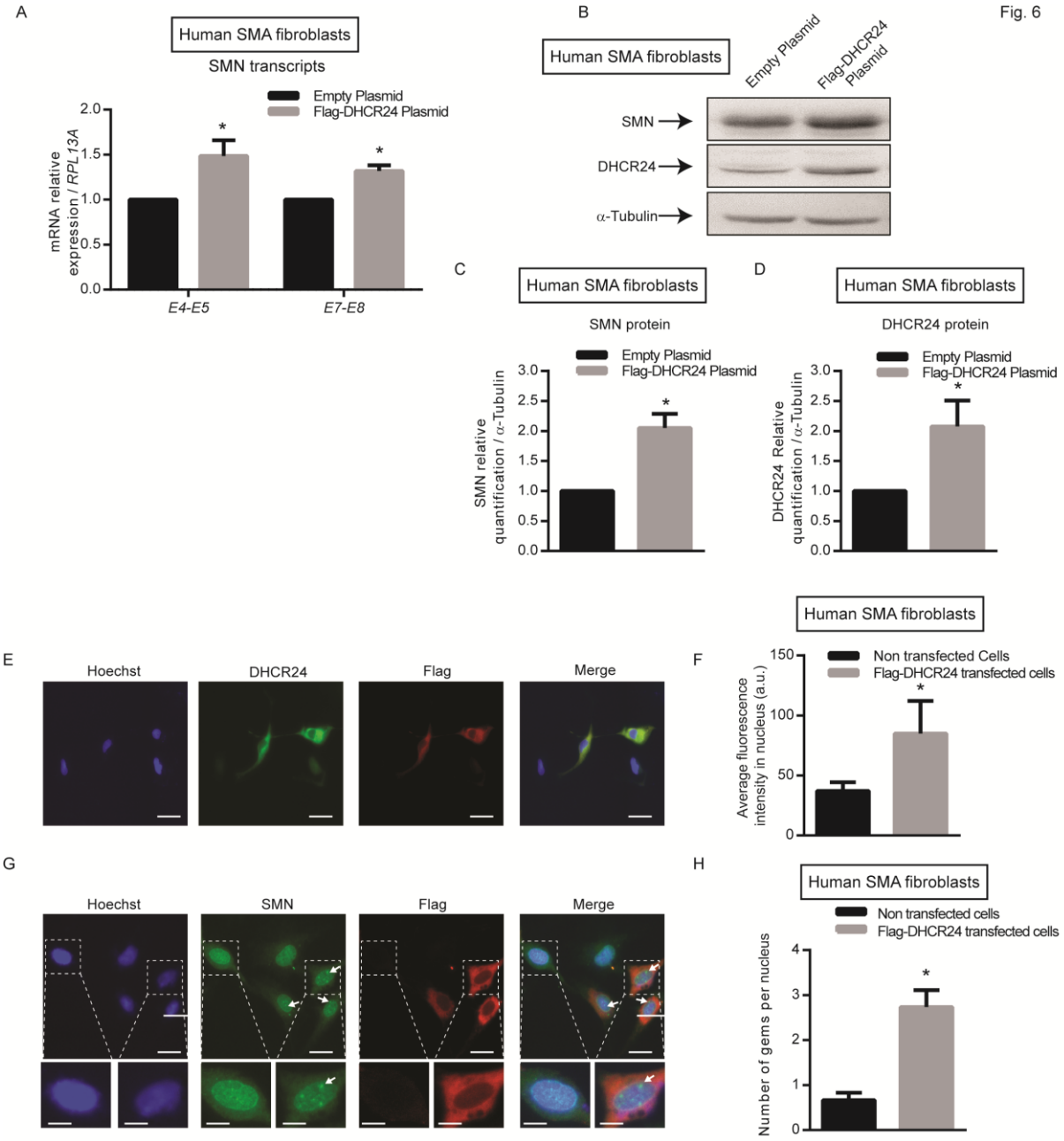
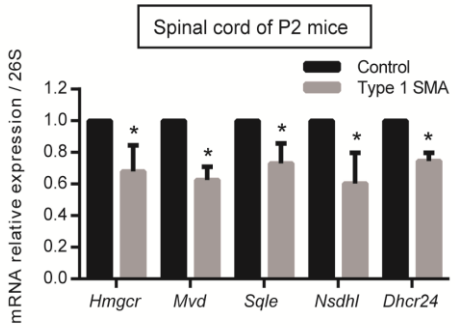

A
Human control fibroblasts
SMN transcripts
Vehicle
MER/29
mRNA relative expression / RPL13A
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
*
E4-E5
E7-E8
B
Human control fibroblasts
Vehicle
MER/29
SMN
α-Tubulin
C
SMN protein
SMN relative quantification / α-Tubulin
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Vehicle
MER/29
D
Human control fibroblasts
Vehicle
MER/29
mRNA relative expression / RPL13A
4
3
2
1
0
*
*
HMGCR
DHCR24
E
Human control fibroblasts
SREBP2 transcripts
SREBP2 mRNA relative expression / RPL13A
4
3
2
1
0
*
Vehicle
MER/29

Fig. 6


A
Human SMA fibroblasts
SMN transcripts
Empty Plasmid
Flag-DHCR24 Plasmid
mRNA relative expression / RPL13A
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
E4-E5
E7-E8
B
Human SMA fibroblasts
Empty Plasmid
Flag-DHCR24 Plasmid
SMN
DHCR24
α-Tubulin
C
Human SMA fibroblasts
SMN protein
Empty Plasmid
Flag-DHCR24 Plasmid
SMN relative quantification / α-Tubulin
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
D
Human SMA fibroblasts
DHCR24 protein
Empty Plasmid
Flag-DHCR24 Plasmid
DHCR24 Relative quantification / α-Tubulin
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
E
Hoechst
DHCR24
Flag
Merge
F
Human SMA fibroblasts
Non transfected Cells
Flag-DHCR24 transfected cells
Average fluorescence intensity in nucleus (a.u.)
150
100
50
0
*
G
Hoechst
SMN
Flag
Merge
H
Human SMA fibroblasts
Non transfected cells
Flag-DHCR24 transfected cells
Number of gems per nucleus
4
3
2
1
0
*

Supplementary Fig. 1

A



B

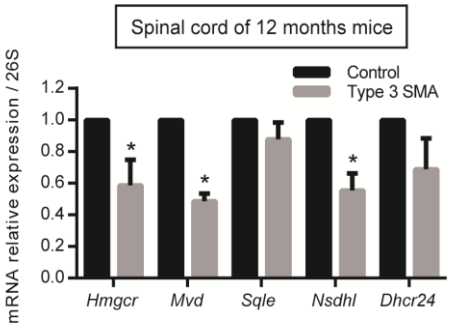


Table 1 : List of primers used for RT-qPCR on both human or mice samples.

	Mouse	
Gene		Primers
26S	Foward	5’-AGGAGAAACAACGGTCGTGCCAAA-3’
	Reverse	5’-GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG-3’
Hmgcr	Foward	5’ -GAATGCCTTGTGATTGGAGTTG- 3’
	Reverse	5’ -ACACAGGCCGGGAAGAATG- 3’
Mvd	Foward	5´ -CCTGCCTGAGAGAGATTCG-3´
	Reverse	5´ -CACAAAGCCCCCATAGAGAC-3´
Sqle	Foward	5’ -ATTGGCTCAGGCCTTGTATG- 3’
	Reverse	5’ -ATTGAAAGCAACCCAACAGG- 3’
Nsdhl	Foward	5´ -GCCAGTGTTGTCTTTGAGG-3´
	Reverse	5´ -CCAGGTTTTCCCCATTTC-3´
Dhcr24	Foward	5´ -GTTCGTGTGCCTCTTCTTG-3´
	Reverse	5´ -TCTTACTGCCCTGTTCCTTC-3´
Srebp2	Foward	5' -GGTGTGATTGTCTTGAGCGTCTT- 3'
	Reverse	5'- AGCTGCGAAATCACCTTTGG- 3'
Hmgcr Exon 13(+)	Foward	5' -ACGGAAGGCTGTCTTGTG- 3'
	Reverse	5' -CTGCTGGTGCTATCAAAGG- 3'
Hmgcr Exon 13(-)	Foward	5’-ACACCACGCTCATGAGTTTCCATC-3’
	Reverse	5’-ACCTCCACCAAGCAAGGAGT-3’
	Human	
HMGCR	Foward	5’ -TGTTCAAGGAGCATGCAAAGA- 3’
	Reverse	5’ -GCCATTACGGTCCCACACA- 3’
MVD	Foward	5´ -CCGCCCATCTCTTACCTC- 3´
	Reverse	5´ -ACAGCAGCCACAAACTCAG- 3´
SQLE	Foward	5´ -TGGAGAAAACTGCTAAAGGG- 3
	Reverse	5´ -CACGACAAAGGAATGAGATG- 3´
NSDHL	Foward	5’ -AGGCAGCCAGGAACGGCAAGAT- 3’
	Reverse	5’ -GAAATGCCTTCCCACCCAGTGTCGA- 3’
DHCR24	Foward	5’ -TCCAGGGTTGAATCTTGTCC- 3’
	Reverse	5’ -GGGATGAGTGGTTGGAGAAA- 3’

SMN2 E7E8	Foward	5’ -AAAAAGAAGGAAGGTGCTCAC- 3’
	Reverse	5’ -GCCTCACCACCGTGCTGG- 3’
SMN2 E4E5	Foward	5’ -TGTGTTGTGGTTTACACTGG- 3’
	Reverse	5’ -TATTTCCAGGAGACCTGGAG- 3’
RPL13A	Foward	5’ -AAGGTCGTGCGTCTGAAG- 3’
	Reverse	5’ -GAGTCCGTGGGTCTTGAG- 3’

2.2. Conclusion de l'article 2

Dans cet article nous avons mis en évidence, et pour la première fois dans l'ASI, une dérégulation de la voie de biosynthèse du cholestérol et son implication dans la modulation de l'expression de la protéine SMN.

Les niveaux de cholestérol de plusieurs intermédiaires participant à sa synthèse sont perturbés dans la moelle épinière de souris, ce qui est associé avec des niveaux d'expression diminués de la plupart des enzymes impliquées dans leurs synthèses. De plus, nous montrons également que le niveau d'expression du facteur de transcription SREBP2, principal régulateur de l'homéostasie du cholestérol est également diminué chez les souris ASI. Enfin, nos résultats démontrent que moduler les niveaux d'activité ou d'expression de l'enzyme DHCR24 permet de modifier l'expression de SMN ainsi que sa localisation nucléaire.

Nos premiers résultats ont confirmés ce qui est retrouvé dans d'autres neuropathologies, à savoir une diminution du niveau d'expression de l'enzyme DHCR24, associée à une accumulation du métabolite desmostérol (Boussicault et al., 2016; Greeve et al., 2000; Samara et al., 2014). D'autre part, nous montrons que la localisation subcellulaire de cette enzyme est altérée dans les motoneurones lombaires de souris ASI, avec une présence cytoplasmique plus importante que chez les souris contrôles.

De plus, la diminution d'activité ou l'expression de DHCR24 permet de faire varier les niveaux d'expression des transcrits et de la protéine SMN dans des fibroblastes de patients. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'enzyme fait diminuer le niveau d'expression de SMN. A l'inverse, la surexpression de DHCR24 dans des fibroblastes de patients ASI augmente le niveau d'expression de SMN et la quantité de gems dans le noyau des cellules transfectées. Outre sa fonction de réductase dans la biosynthèse du cholestérol, DHCR24 est connue pour participer à la réponse au stress oxydant et l'apoptose (Benvenuti et al., 2005; Greeve et al., 2000; Kuehnle et al., 2008). Cependant, c'est la première fois que son implication dans la régulation des gènes SMN est démontrée.

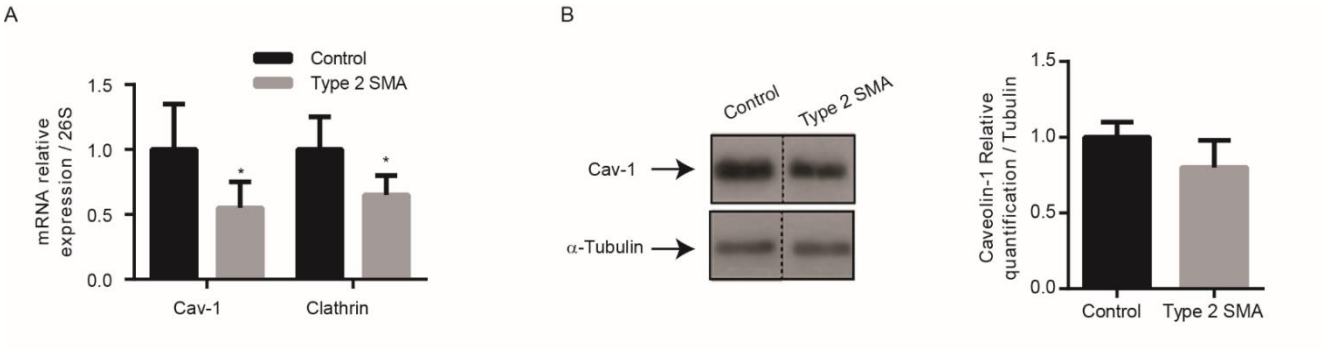
Ces données soulignent, une fois de plus, l'importance de l'homéostasie du cholestérol et son implication dans les processus neurodégénératifs. Le cholestérol est essentiel pour l'intégrité de la membrane plasmique et l'élaboration de plateformes de signalisation. Or les études précédentes du laboratoire ont mis en évidence une dérégulations des voies de signalisation notamment AKT/CREB et ERK/Elk-1 sous le contrôle de l'IGF-1R dans l'ASI (Biondi et al., 2010, 2015; Branchu et al., 2013). Il serait intéressant d'évaluer dans quelle mesure la perturbation du métabolisme du cholestérol intervient dans la modulation d'activation de ces voies.

2.3. Résultats complémentaires aux articles 1 et 2

Les recherches effectuées pendant ces dernières années au laboratoire ont mis en évidence une dérégulation de la balance d'activation des voies de signalisation ERK et AKT dans des modèles murins d'ASI. Plus particulièrement, dans la moelle épinière de souris ASI de type 2, la voie ERK/Elk-1 est suractivée alors que la voie AKT/CREB est inhibée. Dans l'article 1, nous montrons que cette dérégulation est associée à une surexpression du récepteur à l'IGF-1 qui est connu pour moduler l'activité de ces voies de signalisation. L'invalidation partielle de l'*Igf1r* entraine une activation de la voie AKT/CREB et une inhibition de la voie ERK/Elk-1. Nous avons donc cherché à évaluer le lien entre le niveau d'expression de l'IGF-1R et la modulation de la balance d'activation des voies de signalisation intracellulaires. Pour cela, nous avons étudié les mécanismes d'internalisation du récepteur, dépendants de la cavéolin-1 ou de la clathrine. Ces deux voies d'endocytose n'activant pas les voies intracellulaires ERK et AKT de manière identique (Martins et al., 2011).

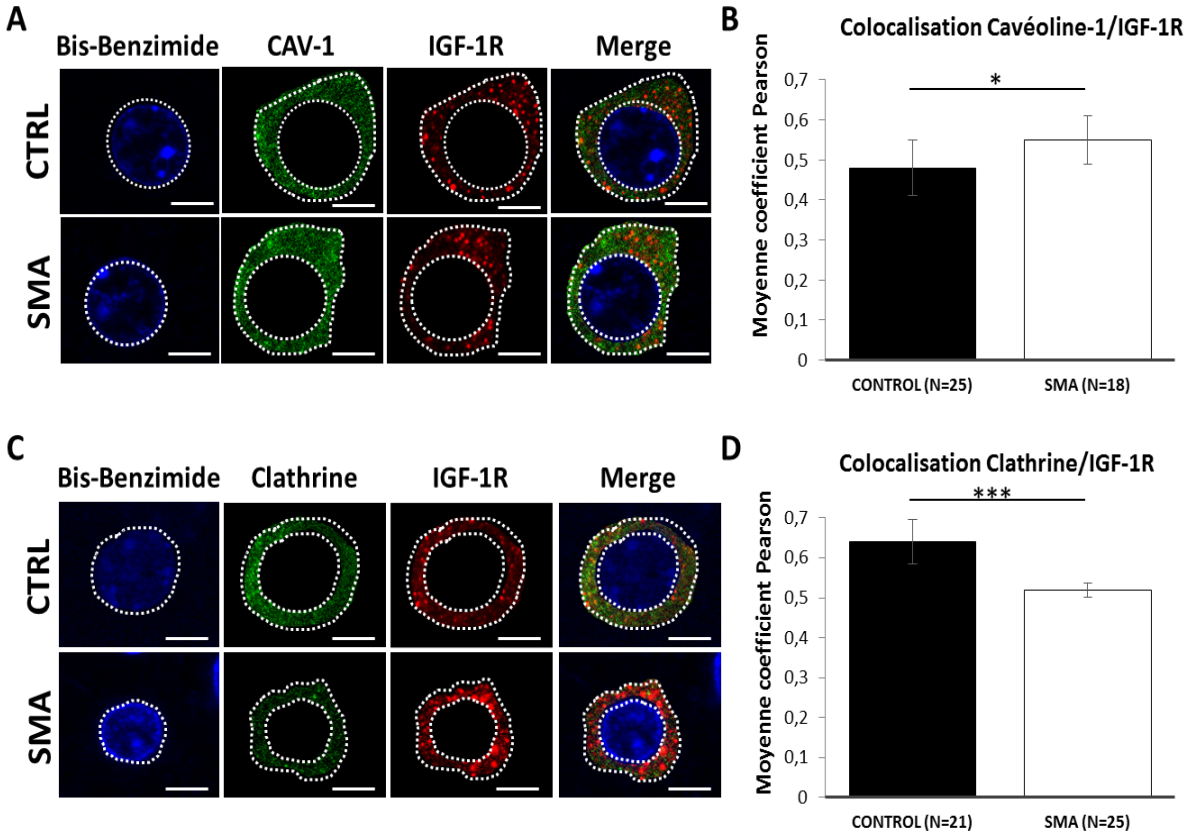
Nous rapportons dans l'Article 2, une diminution de l'expression des enzymes de la voie de biosynthèse du cholestérol associée à une chute de la concentration de cholestérol dans la moelle épinière de souris ASI de type 2. Premièrement, nous nous somme demandé dans quelle mesure le profil d'activation des voies de signalisation AKT/CREB et ERK/Elk-1 pourrait être lié à une modulation de l'homéostasie du cholestérol. Deuxièmement, la réduction d'expression de l'IGF-1R permet d'améliorer le phéntoype des souris modèles d'ASI ainsi l'expression de la protéine SMN. Nous avons voulu savoir si un changement de l'homéostasie du cholestérol pouvait intervenir dans la modulation du phénotype et l'expression de SMN. Pour y répondre, nous avons évalué l'homéostasie du cholestérol par une analyse lipidomique du cholestérol et de ses précurseurs. Puis, nous avons mesuré le niveau d'expression des enzymes de la voie de biosynthèse du cholestérol dans des souris ASI *Igf1r*+/- par rapport à des souris ASI *Igf1r*+/+.

Afin d'évaluer le rôle des mécanismes d'internalisation dans la signalisation des voies AKT/CREB et ERK/Elk-1 dans l'ASI, nous avons d'abord étudié le profil d'expression des protéines Cav-1 et Clathrine dans la moelle épinière de souris ASI de type 2 par rapport à des souris contrôles. Puis, nous avons réalisé des expériences de co-immunomarquage entre l'IGF-1R et les protéines Cav-1 et Clathrine dans les oligodendrocytes de la moelle épinière de souris ASI de type 2 par rapport à des souris contrôles. Le marquage pour l'IGF-1R dans les motoneurones étant trop faible pour réaliser les expériences de co-localisation.



Résultats complémentaires Articles 1&2 Figure 1 : A. Quantification par RT-PCR des transcrits codant pour la Cavéoline-1 et Clathrine, normalisés par les transcrits codant pour 26S dans la moelle épinière de souris ASI de type 2 par rapport à des souris contrôles. **B**. Analyse et quantification par western immunoblot de l'expression de la protéine Cav-1 dans la moelle épinière de souris ASI de type 2 par rapport à des souris contrôles. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± l'écart moyen (* $p<0.05$ par rapport aux souris contrôles, Mann-Whitney U).

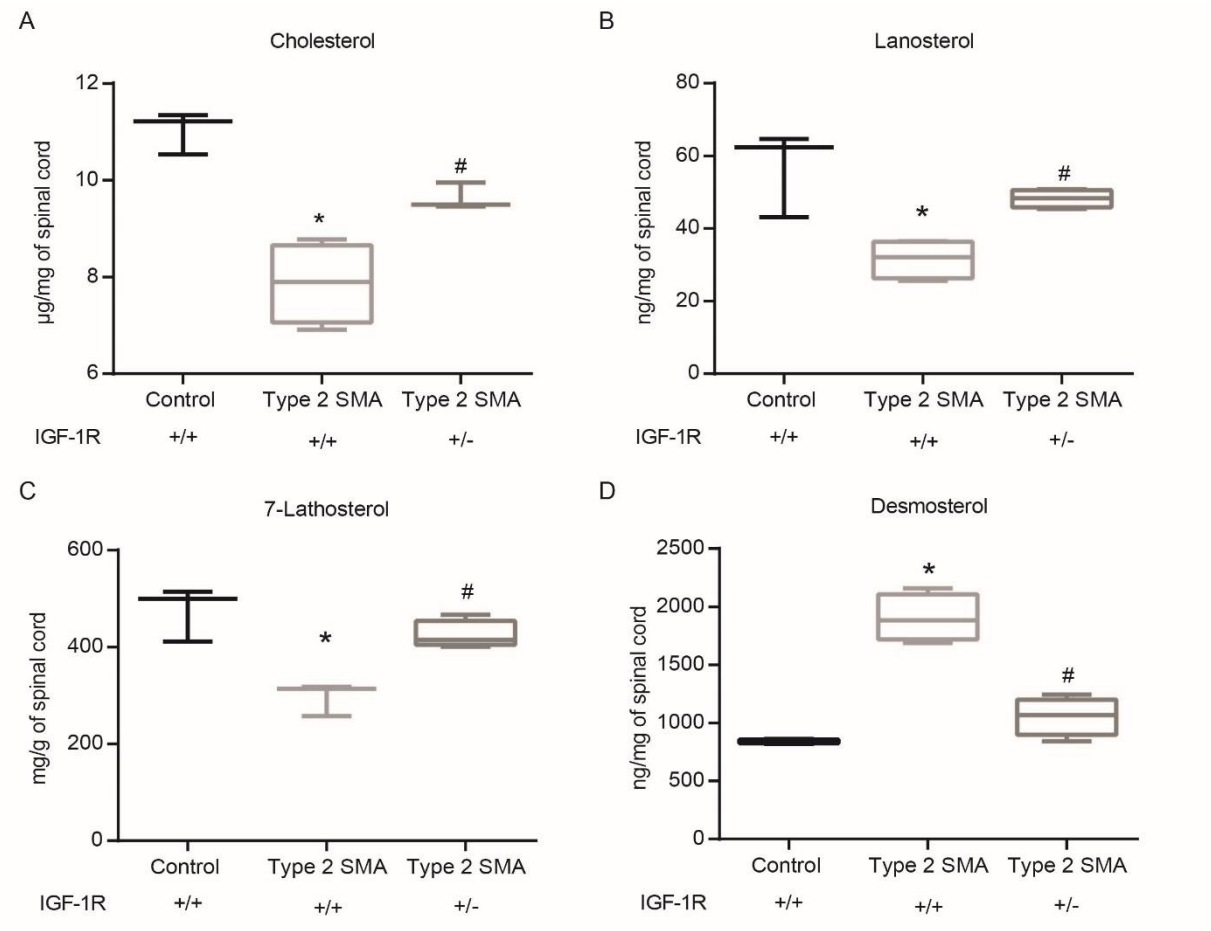
Ces résultats montrent une diminution du niveau d'expression des transcrits codant pour les protéines Cav-1 et Clathrin et une tendance à la diminution pour la protéine Cav-1 dans la moelle épinière de souris ASI de type 2. Ces résultats nécessitent d'être confirmés notamment pour l'expression protéique de Clathrin.



Résultats complémentaires Articles 1&2 Figure 2: A-D Analyse et quantification de la colocalisation CAV-1/IGF-1R et Clathrine/IGF-1R dans les oligodendrocytes de la moelle épinière des souris contrôles (CTRL) et SMA. (A, C) Immunofluorescence dirigée contre CAV-1 (A, vert), la Clathrine (C, vert) et IGF-1R (A et C, rouge) (B et D) Quantification de la colocalisation CAV-1/IGF-1R et Clathrine/IGF-1R grâce au coefficient de Pearson. Les pointillés représentent la façon dont les cellules ont été détourées pour l'analyse. N= nombre de cellules quantifiées. Echelle : 15 µm. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$)

L'expérience de co-localisation entre les protéines Cav-1, Clathrin et l'IGF-1R ont permis de révéler une augmentation d'environ 15% de la co-localisation entre Cav-1 et l'IGF-1R chez les souris ASI par rapport aux contrôles dans les oligodendrocytes. A l'inverse, la co-localisation entre la Clathrine le l'IGF-1R a diminué d'environ 18% dans les oligodendrocytes des souris ASI.

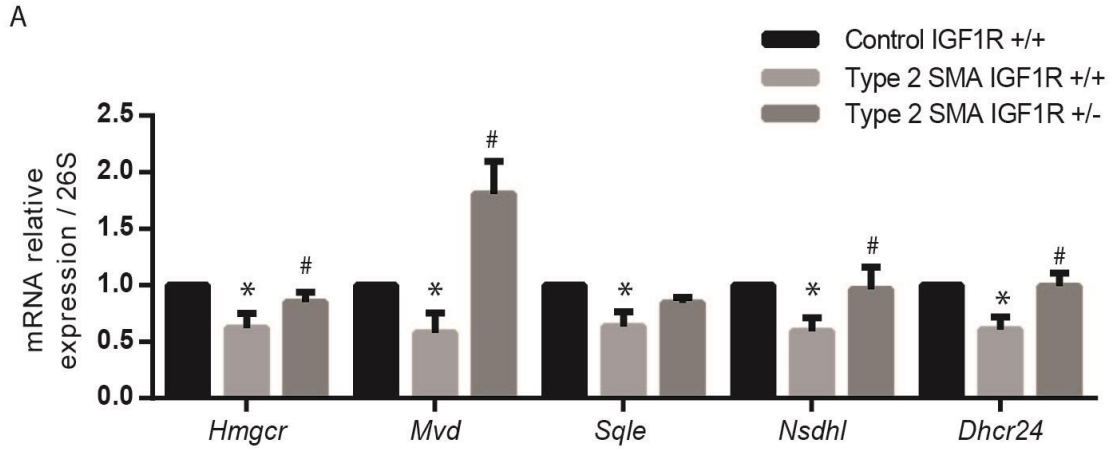
Afin d'évaluer si la réduction de l'IGF-1R est liée à une modulation de l'homéostasie du cholestérol, nous avons analysé par GC-MS les niveaux de cholestérol et des précurseurs lanostérol, 7-lathostérol et desmostérol dans la moelle épinière de souris ASI et ASI Igf1r +/- à P12.



Résultats complémentaires Articles 1&2 Figure 3 : **A-D**. Quantification par GC-MS du cholestérol (**A**), Lanostérol (**B**), 7-Lathostérol (**C**) et du Desmostérol (**D**) dans la moelle épinière de souris ASI de type 2 invalidées pour le récepteur à l'IGF-1 ou de souris ASI de type II par rapport à des souris contrôles. Les valeurs sont représentées sous forme de boites à moustaches. (* $p<0.05$ par rapport aux souris contrôles, # $p<0.05$ par rapport aux souris ASI IGF-1R +/+, Mann-Whitney U).

Les résultats de l'analyse lipidomique indiquent que dans la moelle épinière des souris ASI *Igf1r* +/-, la concentration de cholestérol est supérieure à celle des souris ASI. Les résultats sont similaires pour le lanostérol et le 7-lathostérol qui retrouvent des valeurs proches de celles des souris contrôles. Enfin, le desmostérol, présent en quantité supérieure chez la souris ASI atteint le niveau du contrôle dans la moelle des souris ASI *Igf1r* +/-. Ces résultats indiquent que le niveau d'expression du récepteur à l'IGF-1R a permis de rétablir la quantité de cholestérol et de ses précurseurs dans la moelle épinière de souris ASI.

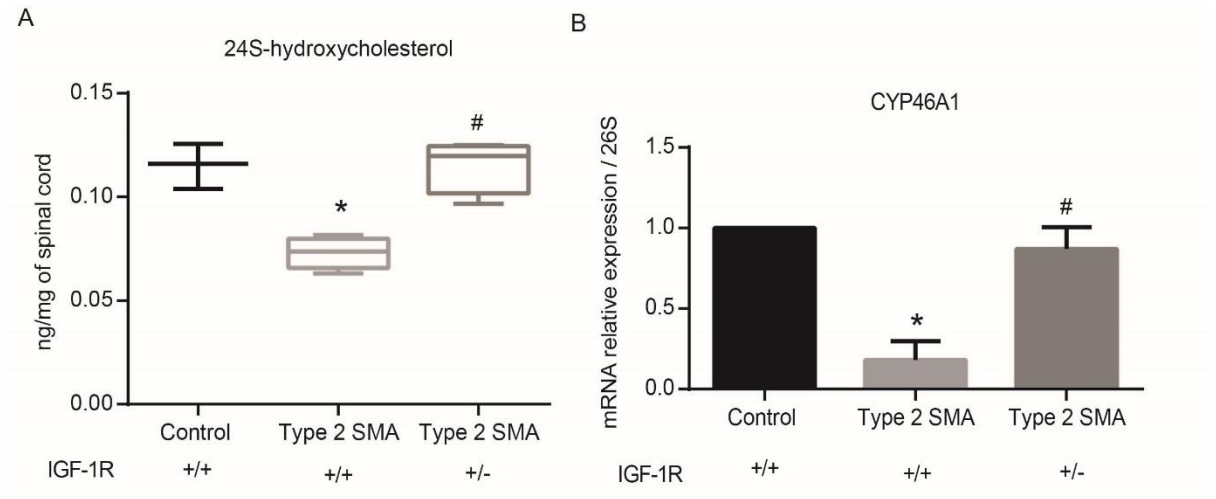
Afin d'identifier l'origine de la restauration du niveau de cholestérol et de ses précurseurs, nous avons analysé par RT-PCR, les niveaux d'expression des enzymes HMGCR, MVD, SQLE, NSDHL et DHCR24 impliquées dans la biosynthèse de plusieurs intermédiaires du cholestérol.



Résultats complémentaires Articles 1&2 Figure 4 : **A**. Quantification par RT-PCR des transcrits codant pour différentes enzymes de la voies de biosynthèse du cholestérol, normalisés par les transcrits codant pour 26S dans la moelle épinière de souris SMA de type II invalidées pour le récepteur à l'IGF-1 ou de souris SMA de type II par rapport à des souris contrôles. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± l'écart moyen (* $p<0.05$ par rapport aux souris contrôles, # $p<0.05$ par rapport aux souris SMA IGF-1R +/+, Mann-Whitney U).

Nos résultats indiquent que, pour la majorité des enzymes étudiées, leur niveau d'expression est augmentée dans la moelle épinière des souris ASI *Igf1r* +/- et retrouvent des valeurs proches des souris contrôles.

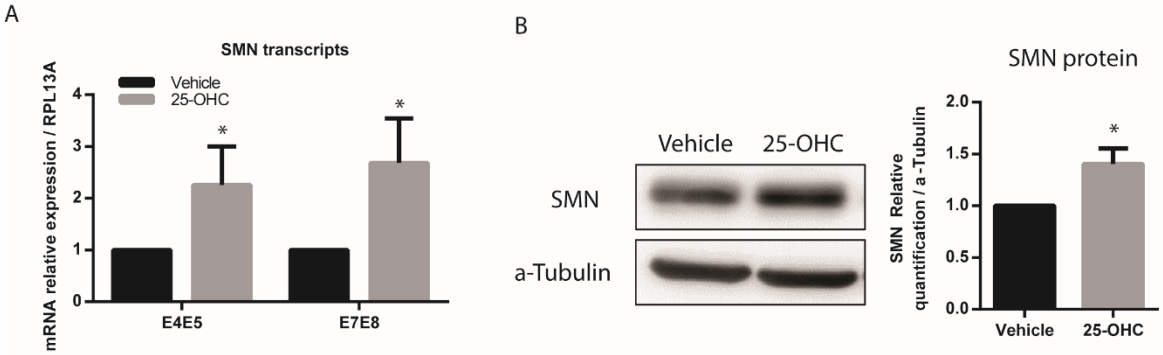
La régulation du métabolisme du cholestérol cérébral repose, en partie, sur sa sécrétion sous forme d'oxystérols, en particulier le 24-OHC. Puisque que le taux de cholestérol est diminué dans la moelle épinière des souris ASI, nous avons cherché à évaluer si la production de 24-OHC est affectée par la pathologie. Par ailleurs, la réduction de l'IGF-1R permet de restaurer le niveau de cholestérol et des intermédiaires participant à sa synthèse. Ainsi, nous nous sommes demandé si la production de 24-OHC est modifiée dans les souris ASI *Igf-1r* +/-. Pour cela, nous avons évalué le niveau de 24-OHC et le niveau d'expression de l'enzyme CYP46A1 qui catalyse sa transformation à partir de cholestérol dans la moelle épinière de souris ASI et ASI *Igf1r* +/-.



Résultats complémentaires Articles 1&2 Figure 5 : **A**. Quantification par GC-MS du 24S-hydroxycholestérol dans la moelle épinière de souris SMA de type II invalidées pour le récepteur à l'IGF-1 ou de souris SMA de type II par rapport à des souris contrôles. **B**. Quantification par RT-PCR des transcrits codant pour l'enzyme CYP46A1 normalisés par les transcrits codant pour le 26S dans la moelle épinière de souris SMA de type II invalidées pour le récepteur à l'IGF-1 ou de souris SMA de type II par rapport à des souris contrôles. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± l'écart moyen (* $p<0.05$ par rapport aux souris contrôles, # $p<0.05$ par rapport aux souris SMA IGF-1R +/+, Mann-Whitney U).

Nous avons observé une diminution de la quantité de 24S-hydroxycholestérol ainsi qu'une chute d'expression de l'enzyme CYP46A1 dans la moelle épinière des souris ASI par rapport aux contrôles. L'invalidation du récepteur à l'IGF-1 restaure le niveau de 24S-hydroxycholestérol qui retrouve une valeur similaire à celle du contrôle, de même que le niveau d'expression de l'enzyme CYP46A1.

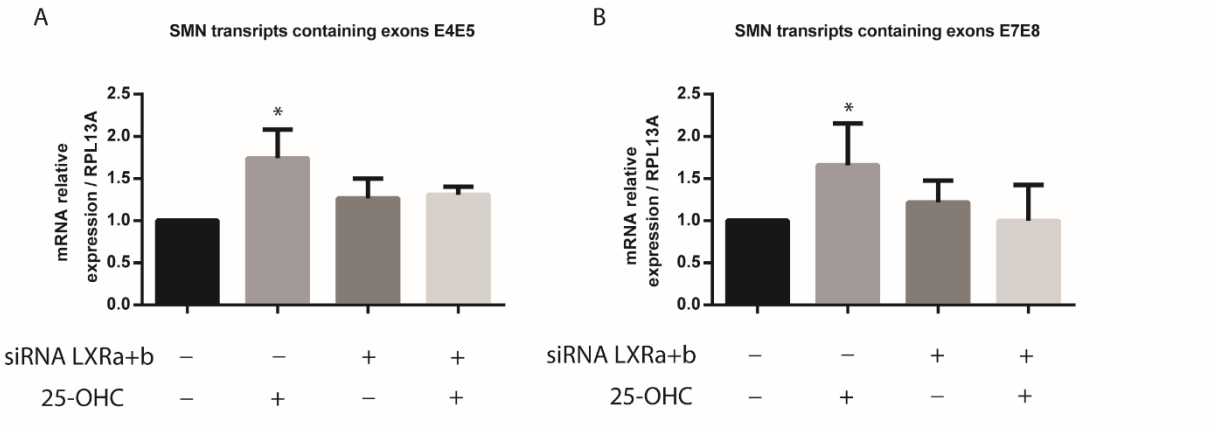
Compte tenu de la diminution du 24-OHC dans la moelle épinière, nous avons voulu évaluer l'effet d'un traitement avec un oxystérol sur l'expression de SMN dans le modèle in vitro de fibroblastes de patient ASI. L'oxystérol 25-OHC est connu pour moduler l'épissage de certains transcrits notamment HMGCR (Medina et al., 2011). Nous avons voulu savoir s'il était capable de modifier le taux d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN. Nous avons donc traité les fibroblastes de patients ASI avec du 25-OHC pendant 24h et nous avons évalué le niveau d'expression de SMN.



Résultats complémentaires Articles 1&2 Figure 6 : A Quantification par RT-PCR des segments E4-E5 et E7-E8 des transcrits SMN normalisés par les transcrits codant pour RPL13A dans des fibroblastes immortalisés de patients ASI traités pendant 24h avec du 25-OHC par rapport à une solution contrôle. **B.** Analyse et quantification par western immunoblot de l'expression de la protéine SMN dans des fibroblastes immortalisés de patients ASI traités pendant 24h avec du 25-OHC par rapport à une solution contrôle. (n=4, * :$p<0.05$, Mann-Whitney U)

Le traitement 25-OHC dans les fibroblastes de patients ASI a induit une augmentation du taux de transcrits SMN (Figure 4A) et de la quantité de protéine SMN (Figure 4B).

Nous avons voulu identifier le mécanisme à l'origine de l'augmentation de l'expression de SMN suite au traitement 25-OHC. Il est connu que les oxystérols, dont le 25-OHC, sont des ligands du LXR (Janowski et al., 1996; Tice et al., 2014). De plus, une étude non publiée menée au laboratoire a permis d'identifier un site potentiel de liaison pour le récepteur nucléaire RXR, avec lequel le LXR peut former un hétérodimère, sur le promoteur du gène SMN2. Nous avons évalué l'implication du LXR dans l'augmentation de l'expression de SMN suite au traitement 25-OHC. Pour cela, nous avons transfectés les fibroblastes de patient ASI avec deux siARN dirigés contres les isoformes alpha et beta du LXR puis traité ces cellules avec du 25-OHC.



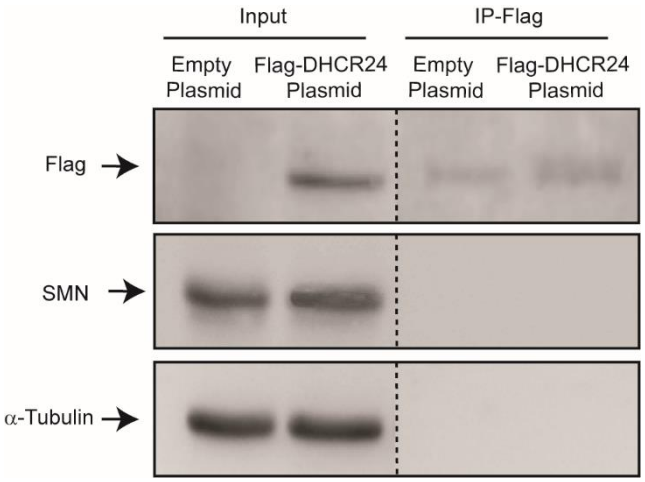
Résultats complémentaires Articles 1&2 Figure 7 : A et B Quantification par RT-PCR des segments E4-E5 (**A**) et E7-E8 (**B**) des transcrits SMN normalisés par les transcrits codant pour RPL13A dans des fibroblastes immortalisés de patients ASI transfecté pendant 48h avec un siARN contre le LXRa et LXRb puis traités pendant 24h avec du 25-OHC par rapport à une solution contrôle (n=3, * :p<0.05, Mann-Whitney U).

Lorsque les fibroblastes de patients ASI sont transfectés avec des siARN contre les deux isoformes du LXR, le traitement 25-OHC n'entraine pas d'augmentation du taux de transcrits SMN.

Les résultats du second papier démontrent une implication de DHCR24 dans le contrôle de l'expression de SMN, la protéine responsable de la maladie. Cependant, les mécanismes qui sont à l'origine de ce contrôle n'ont pas été étudiés dans le papier.

La protéine DHCR24 a récemment été identifiée comme potentielle RBP (Castello et al., 2012), mais aucune étude n'a fait de lien entre DHCR24 et son éventuellement fixation sur les ARN issus des gènes SMN. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de l'expression de SMN pouvait être directement liée à une stabilisation des ARNm suite à la fixation de DHCR24 sur l'ARN messager provenant du gène SMN2.

Afin de vérifier la première hypothèse, nous avons surexprimé à l'aide d'un plasmide l'enzyme DHCR24 fusionnée avec une étiquette Flag (DHCR24-Flag) dans des fibroblastes de patient ASI de type 1. Puis, nous avons réalisé une co-immunoprécipitation de l'enzyme à l'aide d'un anticorps anti-Flag et amplifié l'ARN messager du gène SMN2. Nous nous sommes également servi de cette expérience de co-immunoprécipitation pour vérifier si la protéine DHCR24 pouvait co-précipiter avec la la protéine SMN.



Résultats complémentaires Articles 1&2 Figure 8 : Analyse par western immunoblot de l'expression des protéines SMN et Flag-DHCR24 dans des fibroblastes immortalisés de patients ASI transfectés pendant 72h avec un plasmide contenant la protéine DHCR24 fusionnée à une étiquette Flag ou bien un plasmide vide et suite à l'immunoprécipitation de DHCR24-Flag.

Les résultats de cette expérience n'ont pas été concluants puisque nous ne sommes pas parvenus à amplifier la séquence de l'ARN messager provenant du gène SMN2 après immunoprécipitation de DHCR24-Flag. De même, nous n'avons pas pu détecter la protéine SMN suite à l'immunoprécipitation de DHCR24-Flag. Nos résultats indiquent donc que, dans nos conditions, l'enzyme DHCR24 n'interagit ni avec la séquence d'ARN SMN, ni avec la protéine SMN.

2.3.1. Matériel et Méthodes

Echantillons de patients

Le plasma des patients ASI de type 1 âgés de 3 à 15 mois ont été collectés dans des tubes et gracieusement fournis par Brigite Estournet en accord avec le programme TROPHOS. Le plasma des patients non-ASI âgés de 3 à 15 mois ont été récupérés dans des tubes recouverts d'EDTA selon un protocole standard de suivi lipidique (Clinal metabolic department PM, Hopital Saint Antoine, AP-HP)

Souris

Les souris transgéniques mimant l'amyotrophie spinale de type 2 (FVB/NRj-*Smn* $^{\Delta 7/\Delta 7}$, huSMN2 +/-) possédent deux copies du transgène humain SMN2 et sont invalidées pour le gène murin Smn. Ces souris proviennent de Jackson Laboratory et ont été génotypées comme précédemment (Grondard, 2005) et ont fait l'objet d'une standardisation de leur phénotype. Seules les souris SMA dont le poids était compris entre 3 et 4g à P8 ont été utilisées par les expériences, tandis seules les souris hétérozygotes (*Smn Δ7/+ SMN2*) ont servies de contrôles. Pour obtenir des souris mimant la SMA de type 2 et invalidées partiellement pour le récepteur à l'IGF-1, les souris FVB/NRj-*Smn+/Δ7 SMN2* ont été croisée avec des souris *Igf1r+/- (*B6.129-Igf1rtm1.2Mhz/Orl, souche EM00115 (Holzenberger et al., 2003) puis purifiées sur 10 générations dans le fond génétique FVB/NRj (Janvier Labs).

Clonage de plasmide

La séquence codante (NM_014792) du gène humain DHCR24/Seladin-1 a été amplifiée par une technique de PCR standard à l'aide de la DNA polymerase High Fidelity Phusion (Thermofischer) and clonée dans les sites de restrictions BamHI et HindIII du vecteur pFlag-CMV2 (Sigma).

Culture cellulaire

Les cultures de fibroblastes immortalisés humains de patient ASI de type I nous ont été fournies par Suzie Lefebvre (Renvoisé et al., 2006). Les fibroblastes ont été encemencés à 10.000 cellules/cm² dans des plaques 6 puits à +37°C avec 5% de CO2 dans du milieu de croissance contenant du DMEM Glutamax (Thermo Fischer Scientific) supplémenté avec 10% de FBS, 1% de sodium pyruvate, 1% de Penicillin-Streptomycin. A 70% de confluence, les fibroblastes ont été transfectés avec l'agent transfectant Turbofect (4µl par puit) (Termo Fischer Scientific) dans un milieu sans antibiotiques et 400ng par puit d'un vecteur pFlag-CMV2 vide comme contrôle négatif ou bien un vector pFlag-DHCR24-CMV2 pendant 72h selon les recommandations du fournisseur. Le milieu de transfection a ensuite été remplacé

par du milieu de croissance pour 60h. Pour le traitement avec l'oxystérol 25-OHC, les fibroblastes ASI ont été traités avec 2.5µM de 25-hydroxycholestérol (Sigma) pendant 24h. Les cellules ont ensuite été récupérées dans du PBS froid (Thermo Fischer Scientific) et centrifugées à 300g pendant 5min. Enfin, le supernageant a été retiré et le culot congelé à -80°C. Les transfections des fibroblastes de patient ASI avec les siARN ont été réalisées à 70% de confluence pendant 72h avec 25nM de siARN contre les isoformes alpha (L-003413-02-005, Dharmacon) et beta (L-003412-02-005, Dharmacon) du LXR en utilisant l'agent transfectant Dharmafect 3 (4µl par puit) (Dharmacon). Après 48h de transfection avec les siARN, les fibroblastes de patient ASI ont été traités pendant 24h avec 2.5µM de 25-OHC (Sigma).

RT-qPCR

Les parties ventrales de la moelle épinière lombaire ont été homogénéisés à l'aide d'un TissueLyser (Qiagen) et les ARN totaux ont été extraits dans 1mL de Trizol (Thermo Fischer Scientific). Chaque échantillon d'ARN a subi un traitement DNAse à l'aide de la RQ1 RNAse-DNase (Promega), puis 1µg d'ARN a été rétro-transcrit avec des oligo dT15 et le système de rétro transcription Improm II reverse transcription system (Promega).

Les qPCR ont été réalisées selon un protocole standard dans une solution de SYBERGreen ROX mix (Thermo Fischer Scientific) dans un ABI Prism 7000 pour un volume de réaction final de 7µl et les amorces suivantes :

Hmgcr Sens :	5' -GAATGCCTTGTGATTGGAGTTG- 3'
Hmgcr Anti-sens :	5' -ACACAGGCCGGGAAGAATG- 3'
Mvd Sens :	5´ -CCTGCCTGAGAGAGATTCG-3´
Mvd Antisens :	5´ -CACAAAGCCCCCATAGAGAC-3´
Sqle Sens :	5' -ATTGGCTCAGGCCTTGTATG- 3'
Sqle Antisens :	5' -ATTGAAAGCAACCCAACAGG- 3'
Nsdhl Sens :	5´ -GCCAGTGTTGTCTTTGAGG-3´
Nsdhl Antisens :	5´ -CCAGGTTTTCCCCATTTC-3´
Dhcr24 Sens :	5´ -GTTCGTGTGCCTCTTCTTG-3´
Dhcr24 Antisens :	5´ -TCTTACTGCCCTGTTCCTTC-3´
Cav-1 Sens :	5' -TACAAGCCCAACAACAAG- 3'
Cav-1 Antisens :	5' -TAAATGCCCCAGATGAGTG- 3'
Clathrin Sens :	5' -GAAAGGAATGGTGAAGGAAG- 3'
Clathrin Antisens :	5' -CATCTACACAGGCAAAGCAG- 3'
SMN E4E5 :	5' -TGTGTTGTGGTTTACACTGG- 3'
SMN E7E8 :	5' –TATTTCCAGGAGACCTGGAG- 3'

Cyp46a1 Sens :	5’ -AGAAGTATGGACCTGTGGTGCGG- 3’
Cyp46a1 AntisenS	5’ -TGGTTGACATCAGGAACTTCTTAACC- 3’
26S sens :	5’ -AGGAGAAACAACGGTCGTGCCAAA-3’
26S Antisens :	5’ -GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG-3’

Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses lipidomiques pour le cholestérol total et de ses précurseurs ont été réalisées comme décrit précédemment dans l’Article 2.

Immuno-précipitation des ARN

L’immuno-précipitation de la protéine DHCR24 fusionnée avec l’étiquette Flag a été réalisée à l’aide de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-Flag. Pour le couplage billes/anticorps, 50µl de Dynabeads (Invitrogen) proteine G ont été incubées avec 5µg d’anticorps monoclonaux de souris anti-Flag (F3165, Sigma) pendant 2h à température ambiante sous agitation. Les billes ont ensuite été lavées avec 1mL de PBS puis avec 1mL de triethanolamine (0.2M pH 8.2, Sigma). Afin d’assoicer par liaison covalente les billes et les anticorps, les billes ont été incubées dans 1mL de dimethyl pimelimidate (0.02M pH 8.2, Sigma) pendant 30min sous agitation. La réaction a été stoppée en ajoutant 1mL de Glycine 0.05M pendant 15min.

Après 72h de transfection avec le plasmide pFlag-DHCR24-CMV2 ou le plasmide contrôle, les fibroblastes immortalisés de patients ASI ont été fixées avec du formaldéhyde 0.5% puis lavées avec de la glycine 1M et finalement récupérées dans du PBS froid. Les cellules ont ensuite été broyées par sonication à faible intensité pendant 5min toutes les 30secondes dans 500µl de tampon de lyse froid (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 5 mM EDTA, pH 8.0). Le lysat cellulaire a ensuite été incubé avec des billes non couplées avec des anticorps pendant 30min à +4°C sous agitation puis un aliquot de chaque échantillon a été conservé pour servir de témoin (input). Le lysat cellulaire a ensuite été incubé avec les billes couplées aux anticorps anti-Flag pendant 4h à +4°C sous agitation puis lavé 3 fois avec le tampon de lyse. 1/3 des billes ont été utilisées pour une extraction protéique et 2/3 des billes ont été utilisées pour une extraction d’ARN.

Pour l’extraction protéique, les billes ont été incubées pendant 20min à 65°C avec 30µl de tampon Laemmli sans dithiothréitol (DTT), puis seul le surnageant a été conservé et utilisé pour le western Immunoblot en ajoutant du DTT. L’intégralité de l’extraction protéique a été utilisée pour le western immunoblot.

Pour l’extraction d’ARN, les billes ont été incubées avec 100µl de tampon de lyse (200mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 1% SDS, Riboblock 5µl/mL) et 70µg de protéinase K

(Sigma) pendant 1h à 65°C. Seul le surnageant a été conservé et les ARN ont été extraits avec une solution de phénol acide. Chaque échantillon d'ARN a subi un traitement DNAse à l'aide de la RQ1 RNAse-DNase (Promega), puis 9µl de la solution d'ARN pour la condition d'immunoprécipitation ou 1µg d'ARN pour les inputs ont été rétro-transcrit avec des random primers (Promega) et le système de rétro transcription superscript III (Thermo Fischer Scientific).

Les qPCR ont été réalisées selon un protocole standard dans une solution de SYBERGreen ROX mix (Thermo Fischer Scientific) dans un ABI Prism 7000 pour un volume de réaction final de 7µl et les amorces suivantes :

SMN premessager sens : 5' -ACTGCAAGAAAACCTTAACTGCAG- 3'

SMN premessager antisens : 5' –GGAATGTGAGCACTTTCCTTCTTTTTG- 3'

Western ImmunoBlot

Les culots congelés des cultures de fibroblastes immortalisés de patients ASI de type 1 ont été broyés dans 40 µl d'un tampon de lyse froid tandis que les moelles épinières lombaires de souris ont été broyés dans 20µl d'un tampon de lyse froid pour 1mg de tissu (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 5 mM EDTA, pH 8.0). La concentration en protéine de chaque échantillon a été déterminée par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951). Ensuite, pour Cav-1 et SMN 10 µg de protéines totales ont été soumis une électrophorèse en gel SDS-PAGE 12,5%. Les incubations avec les anti-corps primaires ont été réalisées sur des membranes PVDF pendant une nuit à +4°C dans une solution de TBS, Tween 20 0.05% et BSA 4% contenant les anticorps primaires monoclonaux de souris anti-SMN (610646, 1:5000, BDBiosciences), anti-Cav-1 (ab17052, 1:1000, Abcam), α-tubuline (T6074, 1 :10000, Sigma). Le jour suivant, les membranes ont été rinçées 3 fois avec une solution de TBS, 0.1% Tween 20 et incubées 1h à température ambiante avec un anticorps monoclonal de chèvre anti-souris (1706516, 1 :5000, Biorad). Les anticorps fixés ont été révélés par le système ECL (Ge Healthcare) et les membranes ont été observées par l'appareil ImageQuant 400. La densité optique de chaque bande spécifique quantifiée par le logistiel ImageJ a été soustraite du bruit de fond et rapportée à la densité optique du témoin interne (α-tubulin).

Immunohistofluorescence et analyse de co-localisation

Pour les résultats complémentaires, les expériences d'immunohistofluorescence ont été realisées comme décrit dans l'article 2 à la différence des anticorps utilisés. Les coupes flottantes de moelle épinière lombaire ont été incubées avec : l'anticorps polyclonal de chèvre anti-oligodendrocyte transcription factor (Olig2 MBN50, clone 211F1, 1 :1000, Millipore), l'anticorps polyclonal de lapin anti-IGF-1Rb (3027, 1 :1000, Cell Signaling), l'anticorps monoclonal de souris anti-Cavéolin-1 (ab17052, 1 :400, Abcam) ou l'anticorps monoclonal de

souris anti-clathrine (ab2731, 1 :1000, Abcam). Les coupes ont été lavées par une solution de TBS Tween20 0.5%, Triton 0.1% puis incubées avec les anticorps secondaires polyclonaux d'âne anti-lapin Alexa 555, âne anti-chèvre Cy5, âne antisouris Alexa 488 (1 :4000, Jackson ImmunoResearch). Les images de co-localisation ont été prises au microscope confocal Zeiss LSM 710 à 630 de grossissement (63X Zeiss UPlanS Apo 1.4 à huile). Le profil de co-localisation entre Cav-1/Clathrine et IGF-1R a été analysé sur reconstruction en Z d'images prises en microscopie confocale.

Analyses statistiques

Les valeurs de quantification par GC-MS sont représentées en boites à moustache ± l'écart-type tandis que les autres valeurs sont représentées en moyenne ± écart type. En premier lieu, un test de distribution normale Kolmogorov-Simirnov a été réalisé sur l'ensemble des valeurs puis, un test statistique test statistique de type test de T a été réalisé pour les données suivant une distribution normale afin de vérifier la significativité des différences intergroupes. Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été réalisé pour les données suivant une distribution non-normale.

Discussion

Le manque d'efficacité des traitements IGF-1 dans l'ASI proviendraient de la surexpression de l'IGF-1R.

L'IGF est un facteur neurotrophique connu pour protéger les cellules du SNC (Doré et al., 1997; Feldman et al., 1997). Dans le cerveau, il favorise la division, la maturation des cellules gliales et neuronales (Doré et al., 1997). Il stimule l'expression de neurofilaments et des protéines de la myéline et agit sur le métabolisme du glucose (Jiang et al., 2015; Miescher et al., 1993). Dans la moelle épinière, il module, entre autre, l'activité de l'acétylcholine transférase, réduit la mort par apoptose des motoneurones pendant leur développement et augmente la prolifération des cellules du tissu interstitiel (Lin et al., 2016; Narai et al., 2005; Seto et al., 2002).

Dans des contextes de pathologies du motoneurone, les traitements IGF-1 exercent des effets bénéfiques. L'administration d'un AAV9 contenant l'IGF-1 humain dans les muscles de souris modèles de la SLA a significativement réduit la mort des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière lombaire. L'augmentation de l'IGF dans ce modèle a également permis de prolonger la durée de vie des souris (Lin et al., 2016). La transposition de ces résultats chez les patients atteints de la SLA semble être bénéfique puisque l'administration d'IGF-1 dans la moelle épinière de 9 patients a permis de retarder le déclin d'une partie des fonctions motrices sans effets secondaires (Nagano et al., 2005). Dans l'ASI, l'impact des traitements avec l'IGF-1 sont moins importants. Des souris modèles d'une ASI sévère ont été modifiées génétiquement pour surexprimer une isoforme de l'IGF-1 ne s'exprimant que dans le muscle (mIGF-1). Ces souris ont une espérance de vie légèrement supérieure aux souris non modifiées génétiquement au 15ème jour. Elles présentent une augmentation de la taille des fibres musculaires, classiquement atrophiées dans l'ASI, mais sans modification des capacités motrices (Bosch-Marcé et al., 2011). Une méthode d'administration intraveineuse d'un AVV1 codant l'IGF-1 humaine dans un permet d'augmenter légèrement le nombre de motoneurones dans la moelle épinière, d'augmenter la coordination motrice mais avec de modestes effets sur la durée de vie (Tsai et al., 2012). Enfin, l'injection intrapéritonéale d'une forme recombinante d'IGF-1 complexée avec l'IGFBP3 dans un modèle sévère d'ASI diminue la mort des motoneurones, augmente les fonctions motrices mais sans effets sur la durée de vie (Murdocca et al., 2012).

La raison pour laquelle les traitements IGF-1 exercent de modestes effets dans les modèles ASI pourrait s'expliquer par la surexpression de son récepteur dans la moelle épinière (Biondi et al., 2015) ou le muscle (Bosch-Marcé et al., 2011). La surexpression de l'IGF-1R pourrait être responsable de l'activation de voies intracellulaires telles que ERK qui, nous l'avons démontré (Branchu et al., 2013), sont associées à une répression de l'expression de

SMN. Les traitements IGF-1 systémiques exerceraient donc des effets protecteurs pour les types cellulaires qui ne seraient pas concernés par la surexpression de l'IGF-1R et des effets plus restrictifs pour la moelle épinière et le muscle en raison de l'activation constitutive de voies intracellulaires comme ERK qui limiteraient l'action de l'IGF-1.

Il serait intéressant de regarder l'effet de l'administration d'IGF-1 dans le modèle ASI de type 2 *Igf1r* +/- sur les voies de signalisation AKT et ERK. Il est envisageable que ce traitement entraine un effet synergiste avec la réduction d'expression de l'IGF-1R.

Pour quelle raison la surexpression de l'IGF-1R est-elle associée à une activation de la voie ERK et une inhibition de niveau d'activation de la voie AKT ?

La quantité d'IGF-1R à la surface de la cellule et son activité sont régulées par des mécanismes spécifiques d'internalisation et de recyclage (Prager et al., 1994; Salani et al., 2010). La localisation du récepteur à l'IGF-1 à la membrane peut être dans des puits recouverts de clathrine (Yoneyama et al., 2013) ou bien dans les cavéoles (Salani et al., 2010). L'internalisation du récepteur favorise le recrutement des adapteurs des voies de signalisation comme IRS-1 et p66-SHC. La phosphorylation d'IRS-1 suite à l'activation de l'IGF-1R active la voie PI3K/AKT (Giorgetti et al., 1993; Martins et al., 2011) alors que la phosphorylation de la voie p66-SHC active la voie Ras/Raf/MEK/ERK (Giorgetti et al., 1994; Martins et al., 2011). Il a été montré que l'internalisation de l'IGF-1R dépendante des puits recouverts de clathrine favorise plutôt l'activation de la voie MEK/ERK tandis que la voie d'internalisation dépendante des cavéolines favorise plutôt la voie PI3K/AKT (Martins et al., 2011). Notre étude de la colocalisation du récepteur IGF-1R avec les protéines Cav-1 et Clathrine a montré que dans la moelle épinière des souris ASI, l'IGF-1R co-localise plus avec la cavéoline-1 que dans les souris contrôles. Nous observons l'inverse pour la co-localisation avec la clathrine. A partir de ces éléments, nous pouvons envisager que l'activation constitutive de la voie ERK mesurée dans la moelle épinière des souris ASI, est une conséquence de l'incapacité de l'IGF-1R à être internalisé par la voie des cavéolines. L'internalisation du récepteur utiliserait majoritairement les puits recouverts de clathrine et donc l'activation de la voie ERK plutôt que la voie AKT.
Nous avons mesuré une diminution de l'expression de la protéine cavéoline-1 dans la moelle épinière des souris ASI par rapport aux souris contrôles et nous rapportons dans l'Article 2, une altération de l'homéostasie du cholestérol associée à une chute de la concentration en cholestérol dans la moelle épinière de souris ASI de type 2. De plus, nous avons démontré que l'expression de l'IGF-1R était augmentée dans la moelle épinière de souris ASI mais nous n'avons pas évalué si son expression était plus importante à la membrane ou dans le cytoplasme. En considérant que le récepteur est accumulé à la membrane plasmique, nous pouvons nous demander si la diminution de la concentration en cholestérol peut affecter la localisation de l'IGF-1R à la membrane. Une diminution de la concentration en cholestérol

dans la membrane réduit la formation des rafts lipidiques et des cavéoles (Couet et al., 1997; Ludwig et al., 2013; Nystrom et al., 1999). Il serait nécessaire de vérifier cette hypothèse cependant, nous pouvons spéculer que dans l'ASI, la diminution de la biosynthèse de cholestérol se traduise par un appauvrissement des membranes en cholestérol. Par conséquent, la diminution de la fluidité membranaire liée à cet appauvrissement entrainerait une répartition abérrante du récepteur IGF-1R à la surface de la cellule qui s'accumule dans les cavéoles, ce qui expliquerait pourquoi nous observons une augmentation de la co-localisation de l'IGF-1R avec la cavéoline-1 dans la moelle épinière des souris ASI.

Il a été démontré qu'une diminution de la concentration en cholestérol membranaire entraine une chute de la phosphorylation d'AKT. Il en est de même avec une diminution de l'expression de Cav-1 (Lu et al., 2008b). Ces données confirmeraient nos résultats, cependant les auteurs de cette étude ont également évalué que la diminution en cholestérol membranaire entraine une diminution de la co-localisation de l'IGF-1R avec la cavéoline-1. Nous pouvons supposer qu'en fonction du niveau de diminution de cholestérol dans la membrane et du type cellulaire, la colocalisation de l'IGF-1R avec la cavéoline-1 en sera différemment affectée.

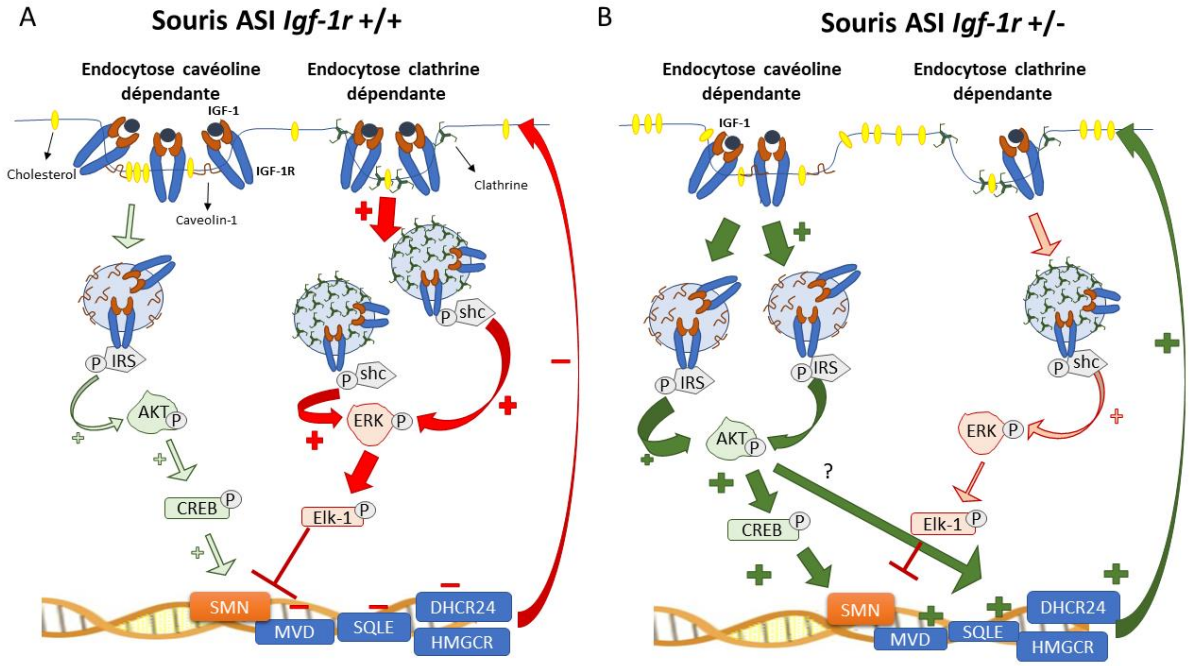


Figure 29: Schéma hypothétique du lien entre l'activation de la voie ERK, la surexpression de l'IGF-1R et l'altération du métabolisme du cholestérol. (A) La diminution du niveau d'expression des enzymes de la biosynthèse du cholestérol entrainerait un appauvrissement de la membrane plasmique en cholestérol. L'altération de l'architecture membranaire favoriserait l'internalisation dépendante des puits recouverts de clatherine qui stimule la voie ERK/Elk-1 et réprime la transcription de SMN. (B) La diminution de l'expression de l'IGF-1R permet de d'activer la voie AKT/CREB et de diminuer l'activité de la voie ERJK/Elk-1. L'activation de la voie AKT entraine une augmentation de l'expression de SMN ainsi que des enzymes de la biosynthèse du cholestérol participeraient ainsi à rétablir la fluidité membranaire et de potentialiser les effets de l'invalidation génétique de l'IGF-1R.

Pourquoi la diminution d'expression de l'IGF-1R est-elle associée à une augmentation du niveau d'activation de la voie AKT ?

L'induction d'un KO conditionnel pour l'IGF-1R dans des précurseurs adultes neuronaux induit soit une diminution du niveau d'activation de la voie ERK ou de la voie AKT selon le devenir des cellules. Dans les precurseurs neuronaux, la délétion de l'IGF-1R entraine une diminution du niveau de phosphorylation d'AKT alors que les neurones issus de ces cellules souches neuronales présentent une diminution de la phosphorylation de ERK (Chaker et al., 2015). Dans une autre étude, l'invalidation génétique totale de l'IGF-1R dans des fibroblastes a entrainé une diminution simultanée de l'activation des voies AKT et ERK (Holzenberger et al., 2003).

Il est connu que les voies de signalisation AKT et ERK peuvent subir une activation simultanée synergiste (Brami-Cherrier et al., 2002; Rommel et al., 1999) ou bien exercer des effets opposés. C'est notamment le cas dans des neurones granulaires pour lequels l'activation des voies de signalisation par le VEGF entraine une inhibition de la voie AKT et une activation de la voie ERK (Cui et al., 2011). De plus, des expériences d'inhibition spécifique de la voie ERK/Elk-1 avec le U0126 entraine une activation de la voie AKT/CREB dans la moelle épinière de souris ASI de type 1 (Branchu et al., 2013). L'ensemble de ces données semblent indiquer que les voies ERK et AKT sont interconnectées dans la moelle épinière des souris ASI et que pour augmenter le niveau d'activation de la voie AKT il serait nécessaire de diminuer le niveau d'activation de la voie ERK. Ainsi, dans la moelle épinière des souris *Igf1r* +/-, la diminution du niveau d'activation de la voie ERK par un mécanisme précédemment proposé, permettrait la levée d'inhibition de la voie AKT et son activation neuroprotectrice.

Le lien entre les altérations des voies de signalisations ERK et AKT et une perturbation de l'homéostasie du cholestérol n'a pas été clairement établi dans les pathologies neurodégénératives**. L'altération des voies de signalisation intracellulaires sont-elles à l'origine de la dérégulation de l'homéostasie du cholestérol ? Les voies intracellulaires ERK et AKT contrôlent-t-elles l'homéostasie du cholestérol dans l'ASI ?**

Il a été démontré que le facteur de transcription SREBP2 est un substart de la voie MAPK/ERK activée par l'insuline (Kotzka et al., 2004; Roth et al., 2000). La phosphorylation de SREBP2 par ERK n'influence pas sa liaison avec les éléments de réponses sur l'ADN mais stimule la transcactivation de ses gènes cibles. Ces résultats sont peu concordants avec ce que l'on observe dans les moelles de souris ASI car une la suractivation de la voie ERK/Elk-1 n'entraine visiblement pas d'activation des gènes cibles de SREBP2 à savoir HMGCR, SQLE ou DHCR24. Il est connu que Elk-1 peut recruter un complexe mSin3A-histone deacetylase corepressor complex qui, par son action de déacétylation de la chromatine va réprimer la

transcription (Yang et al., 2001). Nous pouvons envisager qu'il existe des mécanismes de répression de l'action de SREBP2 par la suractivation de ERK dans la moelle épinière des souris ASI de type 2. En revanche, une autre étude démontre que la voie PI3K/AKT est capable d'activer SREBP1 et SREBP2 (Shi et al., 2016). Dans la moelle épinière des souris ASI, la réduction d'expression de l'IGF-1R et l'activation de la voie AKT pourrait être à l'origine de l'activation de SREBP2. Cette activation entrainerait l'augmentation de la transcription des gènes HMGCR, SQLE et DHCR24 ce qui restaurerait le niveau de cholestérol.

Comment peut-on expliquer l'augmentation de l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN ?

Nous avons montré que dans la moelle épinière des souris ASI *Igf1r* +/-, l'augmentation d'activation du facteur de transcription CREB est associée à une augmentation de sa fixation sur le promoteur du gène SMN2. Nous observons l'effet inverse pour Elk-1 dont le niveau de phosphorylation et sa fixation sur le promoteur du gène SMN2 sont diminués suite à la réduction de l'expression de l'IGF-1R (Article 1 Fig.7).

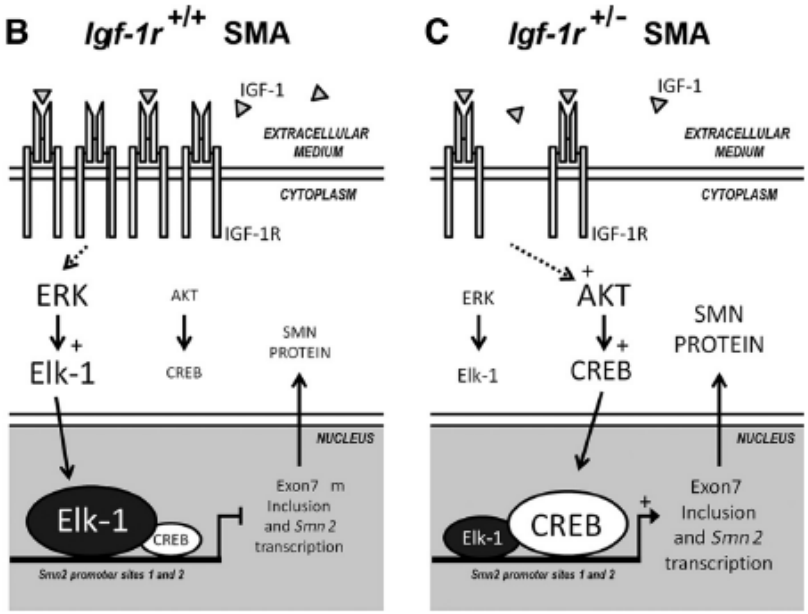


Figure 30: La modulation du niveau d'expression de l'IGF-1R est suffisante pour restaurer le profil d'activation des voies de signalization AKT/CREB et ERK/Elk-1, induisant une augmentation de l'expression de SMN chez la souris (Biondi et al., 2015).

Ces évènements moléculaires aboutissent à une augmentation du niveau d'expression de SMN dans la moelle épinière des souris ASI de type 2. L'augmentation de la quantité de protéine SMN mesurée dans la moelle épinière de souris ASI *Igf1r*+/- est corrélée à une augmentation du taux de transcrits SMN totaux (Article 1 Fig. 3J) et une augmentation de la quantité de transcrits contenant l'exon 7 (Article 2 Fig. 3I). Il semblerait que la réduction de

l'expression de l'IGF-1R induise à la fois une augmentation de la transcription du gène SMN2 ou de la stabiltié des ARNm SMN2 et une modulation des évènements post-transcriptionnels d'épissage du transcrit. Nos résultats d'expérience de ChIP montrant une augmentation de la fixation de CREB sur le promoteur du gène SMN2 semblent indiquer que l'augmentation de la quantité de transcrits SMN2 serait liée à une activation de la transcription du gène SMN2. Une étude par ailleurs démontré l'implication de CREB dans la transcription du gène SMN2 (Majumder et al., 2004). En revanche, l'implication de CREB en tant que modulateur de l'inclusion n'a pas encore été démontrée.

Les résultats publiés en 2010 par mon laboratoire d'acceuil ont démontré qu'un traitement intrathécal avec du NMDA chez les souris ASI de type 2 induit une augmentation de l'expression de la protéine SMN associée à une augmentation du taux d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN sans modification de la quantité de transcrits SMN totaux. De plus, dans les souris ASI traitées avec du NMDA, l'augmentation d'expression de SMN est associée à une activation de CREB (Biondi et al., 2010). Il semblerait donc qu'il existe un mécanisme commun de modulation de l'épissage des transcrits SMN, dans lequel CREB interviendrait.
La régulation de l'épissage des exons dépend d'un grand nombre de facteurs tels que la vitesse de transcription, le degré de compaction de la chromatine ou la liaison des RBPs (Fu and Ares, 2014; Kornblihtt et al., 2013; Naftelberg et al., 2015). L'augmentation de la méthylation et donc la compaction de l'ADN, peut favoriser le recrutement du répresseur de l'inclusion PTB via la protéine adaptatrice MRG15. Ce répresseur est responsable de l'excision d'un exon alternatif d'un transcrit (Luco et al., 2010). Il a été démontré que laboratoire que dans la moelle épinière des souris ASI de type 2, l'augmentation de la fixation de CREB sur le promoteur du gène SMN2 est associée à une diminution de la fixation de Elk-1 sur ce promoteur suite aux traitements NMDA ou à la réduction de l'IGF-1R (Biondi et al., 2015; Branchu et al., 2013). Comme abordé précemment l'activation de Elk-1 est suseptible de recruter des HDAC qui vont réprimer l'accessibilité des gènes aux machineries de transcription (Yang et al., 2001). Nous pouvons donc spéculer que la diminution de la fixation de Elk-1 sur le promoteur du gène SMN2, suite à l'activation de CREB, permet d'augmenter les évènements d'épissage et donc l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN.

L'épissage des ARN est un évènement couplé à la transcription (Maniatis and Reed, 2002; Montes et al., 2012). Cela implique, entre autre, que l'excision des introns et des exons alternatifs est déterminée par le rythme auquel les sites d'épissage et de régulation d'épissage émergent durant la transcription (Kornblihtt et al., 2013). Il est connu que réduire la vitesse d'élongation de l'ARN polymerase II peut être associée au recrutement de facteurs inhibant l'inclusion d'exon et qu'augmenter la vitesse de transcription empêche ce facteur de se fixer et donc d'augmenter l'inclusion (Dutertre et al., 2010; Solier et al., 2010). Par conséquent, nous pouvons envisager que la fixation de CREB sur le promoteur du gène SMN2 puisse

augmenter la vitesse d'élongation de l'ARN polymerase II et l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN.

La protéine DHCR24 permet-elle de moduler le stress oxydant dans l'ASI ?

L'implication du stress oxydant dans l'ASI est débattue. En effet, une étude a évalué que des astrocytes déficients pour la protéine SMN devienennt réactifs (processus selon lequel les cellules modifient leur métabolisme, cytosquelette et peuvent sécréter des facteurs pro-apoptotiques dans des conditions de stress) mais ne présentent pas de stress oxydant (Patitucci and Ebert, 2016). D'autres travaux démontrent que le potentiel membranaire mitochondrial est altéré dans les motoneurones de souris ASI et que cette dérégulation est associée avec une augmentation du stress oxydant (Miller et al., 2016).

Le niveau d'expression de DHCR24 est associé à une modulation du stress oxydant (Crameri et al., 2006; Kuehnle et al., 2008; Luciani et al., 2008; Wu et al., 2004). Nous résultats montrent que le niveau d'expression de DHCR24 est diminué dans 3 modèles de sévérité d'ASI chez la souris et dans les fibroblastes de patients ASI de type 1. Nous pouvons envisager que le faible niveau d'expression de l'enzyme est à l'origine de l'incapacité de certains types cellulaires à lutter contre le stres oyxant. Hypothétiquement, les motoneurones des souris ASI seraient particulièrement visés par ce phénomène. En effet, nous montrons que la proportion de motoneurones présentant un marquage pour DHCR24 dans le cytoplasme est plus importante dans les souris ASI que chez le contrôle. Inversement, un pourcentage plus faible de motoneurones sont marqués pour DHCR24 dans le noyau dans la moelle épinière de souris ASI. Or, pour lutter contre le stress oxydant, la présence de DHCR24 dans le noyau est requise (Battista et al., 2009). Ainsi, les motoneurones seraient plus vulnérables face à un stress oxydant en raison d'un défaut de localisation de la protéine DHCR24.

L'action antioxydante de l'enzyme permettrait de diminuer directement la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'origine du stress oxydant (Lu et al., 2008a). Selon leurs résultats, la partie N-terminale, contenant le domaine conférant à l'enzyme ses capacités oxydorecuctrices est responsable de l'élimination des ROS. Une autre étude a montré que l'infection de cellules neuronales de souris avec un AVV-DHCR24 a permis d'éliminer l'excès de ROS et de dimimuer l'apoptose (Lu et al., 2014). Nous pouvons spéculer que la diminution d'expression de DHCR24 dans les motoneurones puisse impacter leur capacité à éliminer les ROS et donc à augmenter le stress oxydant.

Comment l'enzyme DHCR24 intervient-elle dans la modulation de l'expression de SMN ?

Les travaux menés dans l'Article 2 ont permis de démontrer l'implication d'une enzyme de la biosynthèse du cholestérol dans le contrôle de l'expression de SMN. Une augmentation

de l'expression de DHCR24 dans les fibroblastes de patients ASI de type 1 induit une augmentation de l'expression de la protéine SMN (Article 2 Fig. 6). Les expériences de co-immuno précipitation de la protéine DHCR24 démontrent, que dans nos conditions, la protéine DHCR24 ne fixe pas les ARN issu du gène SMN2, ni la protéine SMN elle-même. C'est donc qu'il existe un autre mécanisme à l'origine de l'augmentation de l'expression de SMN. Le traitement avec le triparanol (MER/29) provoque une chute d'expression de SMN (Article 2 Fig. 5). Or cette molécule n'induit pas de modification du niveau d'expression de DHCR24 mais inhibe son activité enzymatique, ce qui a pour conséquence de diminuer la biosynthèse du cholestérol. Nous n'avons pas quantifié le cholestérol dans les fibroblastes contrôles avant et après traitement mais nous pouvons avancer que le niveau de cholestérol est plus bas dans les cellules traitées. En effet, le niveau d'expression de DHCR24 et HMGCR est augmenté suite au traitement (Article 2 Fig. 5D et E), deux enzymes cibles du facteur de transcription SREBP2 en cas de diminution du taux de cholestérol. Nous pouvons spéculer que le contrôle de l'expression de SMN est dépendant d'une augmentation ou d'une diminution du cholestérol dans les fibroblastes. Chez le contrôle, la chute de cholestérol suite au traitement entrainerait une diminution de l'expression de SMN et la surexpression de DHCR24 dans les fibroblastes ASI permettrait de restaurer le niveau de cholestérol et induit une augmentation de l'expression de SMN. Le cholestérol modulerait, par exemple, l'activation de voies de signalisation connues pour contrôler l'expression de SMN, telles que les voies AKT/CREB et ERK/Elk-1.

La perte de fonction de SMN est-elle responsable d'un épissage alternatif abbérant des transcrits codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse du cholestérol ?

La protéine SMN intervient, entre autre, dans l'assamblage des composants du splicéosome, impliqué dans la machinerie d'épissage des ARN (Gubitz et al., 2004). En effet, des altérations de l'épissage des ARNm ont été observées dans des cellules « motorneuron-like » déficientes en protéine SMN (Custer et al., 2016). Nos expériences ont révélé que le taux d'inclusion de l'exon 13 dans les transcrits HMGCR est diminué dans la moelle épinière des souris ASI de type 2 par rapport aux souris contrôles (Article 2 Fig. 2I), suggérant une diminution d'activité de l'enzyme HMGCR. Ces données sont surprenantes compte tenu de la littérature décrivant une augmentation de l'épissage de plusieurs transcrits codant pour des protéines impliquées dans l'homéostasie du cholestérol en cas d'appauvrissement en cholestérol membranaire. Les transcrits issus des gènes codant pour HMGCR et le récepteur aux LDL subissent un épissage alternatif en cas de déplétion en cholestérol et qui est aboli en cas d'excès de cholestérol. Pour l'enzyme HMGCR, l'excision de l'exon 13 diminue son activité enzymatique (Medina et al., 2011; Yu et al., 2014) tandis que pour le LDLR, l'épissage des exons 4 et 12 diminue sa localisation membranaire et son internalisation (Holla et al., 2009; Zhu et al., 2007). Nous pouvons suggérer qu'un système d'épissage abbérant, lié au manque

de protéine SMN, soit à l'origine de l'excision de l'exon 13 de HMGCR, alors que le contenu en cholestérol en bas.

L'altération du métabolisme du cholestérol concerne-t-elle tous les types cellulaires de la moelle épinière des souris ASI ?

Nous avons réalisé, pour la première fois, une étude de l'expression de l'enzyme DHCR24 dans la moelle épinière de souris. Les résultats obtenus dans la moelle épinière des souris contrôles à 12 jours montrent qu'un marquage pour la protéine DHCR24 est retrouvé dans les trois types cellulaires étudiés à savoir, les astrocytes, les oligodendrocytes ainsi que les motoneurones. Nous n'avons pas évalué le niveau d'expression de l'enzyme pour chaque type cellulaire cependant, les immunomarquages de l'enzyme indiquent un marquage intense de DHCR24 dans les motoneurones et les oligodendrocytes, alors que le marquage astrocytaire semble être nettement plus faible.

Afin d'expliquer pourquoi les astrocytes exprimeraient moins l'enzyme DHCR24 nous pouvons proposer deux hypothèses. La première serait que les motoneurones et les oligodendrocytes de la moelle épinière reposent sur un mode de production différent des astrocytes. Il a été montré que l'équipement enzymatique pour la biosynthèse de cholestérol des astrocytes et des neurones n'est pas identique. Par exemple, les enzymes SLQE et NSDHL sont plus fortement exprimées dans les neurones que les astrocytes (Nieweg et al., 2009). Deuxièmement, les souris ont été prélevées 12 jours après la naissance, elles sont donc encore en période de développement. Nous pouvons envisager qu'à cette période du développement de la souris, les motoneurones reposent sur leur propre synthèse du cholestérol et qu'ils n'ont pas besoin d'un approvisionnement des astrocytes qui limiteraient donc leur synthèse de cholestérol contrairement à l'âge adulte.

La chute d'expression de plusieurs enzymes de la biosynthèse du cholestérol et l'altération de la concentration du cholestérol et ses intermédiaires que nous rapportons dans l'article 2 concernent l'ensemble de la moelle épinière lombaire. Nous ne savons pas si tous les types cellulaires sont affectés, et s'ils le sont, dans quelle mesure cela est délétère pour les souris ASI. Tous les types cellulaires nécessitent que l'homéostasie du cholestérol soit contrôlée afin de fonctionner correctement, cependant les neurones sont particulièrement affectés par une altération du métabolisme du cholestérol comme le démontre le lien entre neurodégénérescence et modification du métabolisme du cholestérol. Les motoneurones représentent une faible proportion du nombre de cellules de la moelle épinière, par conséquent une différence d'expression des enzymes de la biosyntèse du cholestérol uniquement dans ce type cellulaire serait difficilement mesurable avec les méthodes que nous avons utilisées (RT-PCR et Western immuno-blot). Il est plus probable que les altérations de l'homéostasie du cholestérol que nous rapportons affectent l'ensemble des cellules mais que les motoneurones

soient plus vulnérables à ces perturbations. Afin de vérifier l'éventuelle spécificité cellulaire d'une diminution d'expression des enzymes de la biosynthèse du cholestérol il serait intéressant de réaliser une expérience de tri-cellulaire par FACS fin d'isoler chaque type de population cellulaire et d'évaluer dans chacun d'entre eux le niveau d'expression des enzymes de la biosynthèse du cholestérol.

Le LXR joue-t--il un rôle neuroprotecteur dans l'ASI ? Son activation est-elle responsable de l'augmentation de l'expression de SMN ?

Nous avons prouvé qu'un traitement avec un dérivé oxydé du cholestérol, le 25-OHC, induisait une augmentation de l'expresison de SMN dans des fibroblastes de patient ASI (Résultats complémentaires des Articles 1 et 2). L'augmentation de l'expresison de SMN suite à ce traitement est associée à une augmentation de la quantité de transcrits SMN totaux mais également avec une augmentation du taux d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN. Nous avons également mis en évidence que les effets du 25-OHC sont dépendant du LXR puisque diminuer l'expression des deux isoformes alpha et beta du LXR supprime l'augmentation de l'expression de SMN suite au traitement. Le LXR régule-t-il directement l'expression de SMN. Il est envisageable que l'activation du LXR par le 25-OHC entraine l'hétérodimérisation du LXR avec le RXR sur le site putatif pour le RXR que nous avons identifié. Il faudrait vérifier par des expériences de précipitation de la chromatine que (1) le LXR puisse se fixer sur le promoteur de SMN2 et (2) que sa fixation soit responsable de l'augmentation d'expression de SMN. L'enzyme DHCR24 est une cible transcriptionnelle du LXR. Il existe dans le deuxième intron du gène DHCR24 une séquence de fixation pour le LXR (Wang et al., 2008). L'activation du LXR serait donc bénéfique pour plusieurs raisons. La première serait à travers un contrôle de l'expression de SMN directement, la seconde par l'activation de l'expression de DHCR24 qui, nous l'avons démontré, peut augmenter le niveau d'expression de SMN.

Nous pouvons également formuler l'hypothèse selon laquelle, la surexpression de l'enzyme DHCR24 dans les fibroblastes de patients ASI permettrait de rétablir un flux de synthèse du cholestérol, qui augmenterait la production de 25-OHC. Le 25-OHC, en se fixant sur le LXR permettrait d'activer la transcription du gène SMN2 et par conséquent la quantité de protéine SMN produite (Figure 31). Nous ne sommes pas parvenus à détecter l'expression de l'enzyme CYP46A1 dans les fibroblastes de patients ASI. Ce résultat était attendu puisque la CYP46A1 est exprimée quasi-exclusivement par les neurones. Ainsi des résultast similaires seraient attendus avec l'oxystérol 24-OHC dans des cellules neuronales.

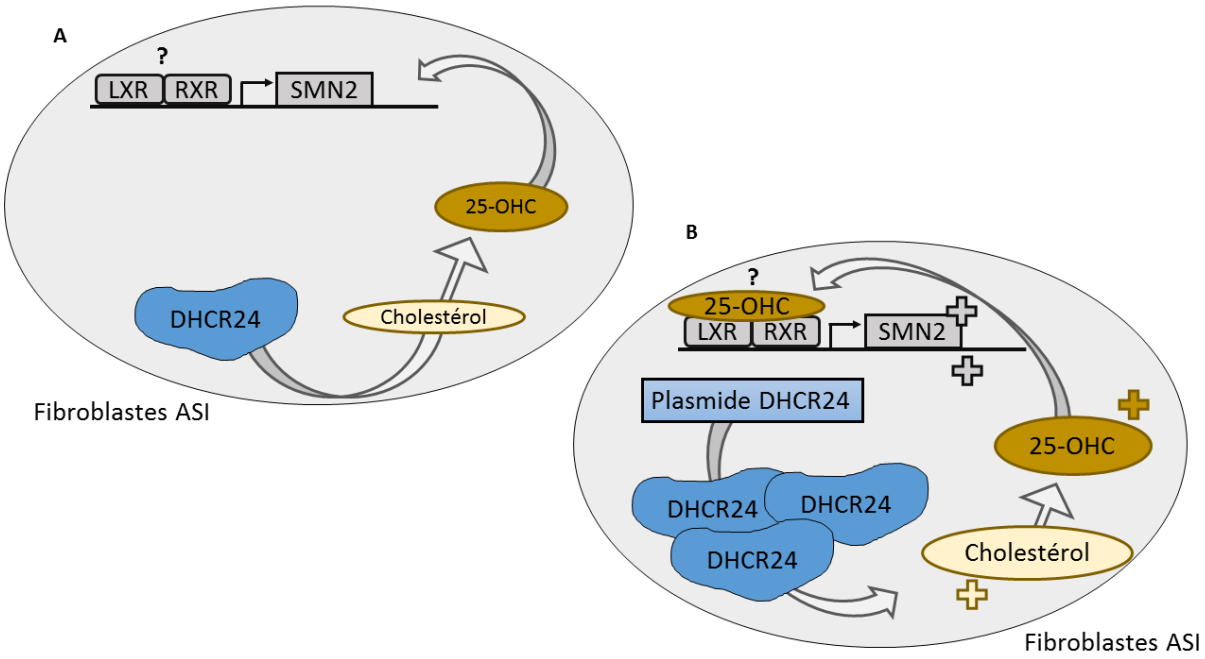


Figure 31: Schéma récapitulant le mécanisme possible par lequel la surexpression de DHCR24 induirait une augmentation de l'expression de SMN dans les fibroblastes de patient ASI. (A) Dans des fibroblastes le faible niveau d'expression de DHCR24 induirait une faible production de 25-OHC qui n'est pas suffisante pour activer l'expression de SMN. (B) La surexpression de DHCR24 dans les fibroblastes ASI permet de rétablir le flux métabolique du cholestérol et la production de 25-OHC. Le 25-OHC se fixerait alors sur le site putatif de liaison du RXR pour activer la transcription du gène SMN2.

Les effets neuroprotecteurs du LXR ont d'ailleurs été démontrés dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. Un traitement avec un agoniste du LXR permet de réduire drastiquement les plaques de peptide Ab et d'augmenter les capacités mémorielles en activant l'expression du transporteur ABCA1 et de l'apoE (Jiang et al., 2008). Dans un autre modèle de la maladie, l'activation du LXR a induit l'expression de la protéine Syn1, impliquée dans la synaptogénèse et qui est normalement altérée par l'aggrégation de l'Ab (Sandoval-Hernández et al., 2015). D'autre part, une étude a démontré que la forme sauvage de la protéine huntingtin pouvait agir comme co-facteur du LXR et augmenter l'expression de ses gènes cibles. En revanche, la forme mutée de l'huntingtin n'interagit que faiblement avec le récepteur nucléaire (Futter et al., 2009). L'expression de la forme mutée de l'huntingtin dans la maladie d'Huntington serait donc en partie responsable de l'incapacité du LXR à réguler l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol. En effet, un grand nombre des cibles transcriptionnelles du LXR qui participent à la régulation de l'homéostasie du cholestérol (SREBP, ABCA1, HMGCR, ApoE) sont altérées dans les maladies d'Alzheimer, d'Hungtinton et comme nous l'avons démontré, dans l'ASI également. Le LXR constituerait donc une cible thérapeutique intéressante pour les maladies neurodégénératives en induisant l'expression des gènes permettant de restaurer le métabolisme du cholestérol.

Le desmostérol est-il neurotoxique ou neuroprotecteur ?

Des variations du taux de desmostérol sont observées lorsque l'enzyme DHCR24 n'est pas exprimée correctement. C'est le cas de patients atteints de desmosterolose, maladie caractérisée par une mutation du gène DHCR24, qui présentent des taux élevés de desmostérol circulant (Andersson et al., 2002; Waterham et al., 2001). De même, une diminution de l'expression de DHCR24 est associée à une augmentation de desmostérol dans le putamen post-mortem de patients atteints de la maladie d'Huntington (Kreilaus et al., 2015). A l'inverse, un taux anormalement bas de desmostérol est retrouvé dans le cerveau (Wisniewski et al., 2013) ou le plasma de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Sato et al., 2012).

Plusieurs arguments alimentent l'hypothèse selon laquelle le desmostérol serait neuroprotecteur. Premièrement, une accumulation de desmostérol semble être un phénomène physiologique puisque son augmentation dans le cerveau en développement a été rapportée dans plusieurs espèces dont la souris (Quan et al., 2003) et l'homme (Dennick et al., 1973). Des chercheurs ont rapporté que la concentration en desmostérol augmente avant les périodes de myélination, mais les mécanismes impliqués et l'intérêt physiologique n'ont pas été élucidés (Fumagalli and Paoletti, 1963). Deuxièmement, la structure moléculaire proche du desmostérol lui permet de remplacer le cholestérol dans la membrane et induit la prolifération cellulaire de cellules KO pour l'enzyme DHCR24 (Rodríguez-Acebes et al., 2009). Enfin, le desmostérol est un activateur puissant du LXR (Spann et al., 2012; Yang et al., 2006b). L'activation du LXR par le desmostérol permettrait de réduire les processus inflammatoires et d'induire une neuroprotection (Morales et al., 2008; Spann et al., 2012). Tous ces éléments portent à croire que le desmostérol serait plutôt neuroprotecteur.

Nous démontrons dans l'Article 2 que dans la moelle épinière des souris ASI de type 2, le niveau de desmostérol est plus haut que chez les souris contrôles. La réduction de l'IGF-1R a permis de diminuer ce taux de desmostérol. Nous pouvons donc nous demander si l'augmentation de desmostérol, dans des contextes pathologiques, ne résulte pas d'un mécanisme compensatoire visant à restaurer l'homéostasie du cholestérol.

Perspectives

Dans l'article 1, nous démontrons que la réduction de l'expression de l'IGF-1R dans la moelle épinière de souris ASI de type 2 entraine à la fois une augmentation de l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN et le taux de transcrits SMN totaux. L'augmentation de la quantité totale de transcrits est surement attribuable à la fixation de CREB sur le promoteur de SMN mais son implication dans la modulation de l'épissage n'a été démontrée. Afin d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans cette modulation, il serait intéressant d'étudier des protéines connues pour être impliquées dans l'épissage alternatif de SMN.

La protéine hnRNP G favorise l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN en entrant en interaction avec la protéine SR-like Htra2-beta1 (Hofmann and Wirth, 2002; Hofmann et al., 2000). Nous pourrions ainsi réaliser dans un premier temps une analyse du profil d'activation des protéines hnRNP G et Htra2-beta1 entre de souris ASI *Igf1r* +/+ en comparaison des souris ASI *Igf1r*+/-. L'activation de l'une ou l'autre de ces protéines suite à la réduction de l'IGF-1R ne serait pas forcément impliquée dans une modification d'épissage des transcrits SMN2. C'est pour cela que dans un second temps, il serait judicieux d'effectuer une expérience d'immuno-précipitation de ces deux protéines et de vérifier si dans les souris ASI *Igf1r* +/- nous mesurons une quantité de transcrits SMN2 associée à ces deux protéines plus importante que chez les souris ASI *Igf1r* +/+.

Nous discutions précédemment de l'implication du cholestérol dans l'amélioration du phénotype des souris suite à la réduction de l'IGF-1R. Afin d'élucider plus en détail les mécanismes impliqués nous pourrions réaliser plusieurs analyses.

Nous pourrions évaluer l'effet de l'invalidation génétique partielle de l'IGF-1R sur les voies de signalisation AKT/CREB et ERK/Elk-1 dans une condition où la biosynthèse du cholestérol est inhibée pharmacologiquement. Pour cela, nous pouvons proposer un traitement avec une molécule capable de diminuer la synthèse de cholestérol in vivo. C'est le cas de la simvastatine, une statine inhibant l'activité de l'enzyme HMGCR et capable de traverser la barrière hémato-encéphalique pour agir au niveau du SNC (Fang et al., 2017). Nous pouvons proposer de traiter des souris ASI *Igf1r*+/- dès la naissance avec la simvastatine et évaluer le niveau d'activation des voies intracellulaires ERK et AKT ainsi que le niveau d'expression de SMN à 12 jours.

Les résultats que nous avons obtenus concernant les dérégulations du métabolisme du cholestérol dans un contexte d'ASI permettent de mieux appréhender le contexte métabolique de la pathologie. La compréhension du contexte physiologique d'une pathologie

est essentielle à la découverte de nouvelles approches thérapeutiques. Dans un premier temps, il serait nécessaire d'étendre les analyses de l'homéostasie du cholestérol du modèle murin aux patients atteints d'ASI. La découverte d'une tendance à la diminution du 24-OHC dans le sérum de patient ASI pourrait indiquer que le SNC est affecté par une altération du métabolisme du cholestérol. La synthèse du cholestérol du SNC étant indépendante de la périphérie, il est envisageable qu'une dérégulation du métabolisme du cholestérol ne concerne que la moelle épinière.

La portée thérapeutique directe de nos résultats est limitée. En effet, sur la base de nos découvertes, il faudrait parvenir à stimuler la voie de biosynthèse du cholestérol spécifiquement dans le SNC. D'une part, la majorité des traitements concernant la modulation du cholestérol consistent à inhiber sa voie de biosynthèse. D'autre part, il faudrait parvenir à ne cibler que le SNC car une accumulation de cholestérol dans la circulation périphérique aurait des effets négatifs comme l'augmentation des risques d'accidents cardiovasculaires. La surexpression de l'enzyme DHCR24 dans les cellules de patients ASI a induit une augmentation de l'expression de SMN et du nombre de gems. Afin de consolider nos résultats, il serait intéressant de réaliser une injection d'AAV contenant la séquence de l'enzyme DHCR24 directement dans la moelle épinière des souris ASI. Ce type d'expérience a d'ailleurs déjà été réalisé dans la maladie d'Huntington. L'injection d'AAV contenant la séquence de l'enzyme CYP46A1 dans des modèles murins de la maladie d'Huntington permet de restaurer la biosynthèse du cholestérol et d'induire une neuroprotection (Boussicault et al., 2016).

La plupart des thérapies actuelles pour les patients atteints d'ASI consistent à augmenter l'expression d'une protéine SMN fonctionnelle dans la moelle épinière. Les approches visant à utiliser les oligonucléotides modificateurs d'épissages sont certes efficaces mais sont limitées aux patients pour lesquels l'augmentation de l'expression de SMN est encore efficace. Il est donc nécessaire de trouver des approches thérapeutiques permettant de traiter l'ensemble des patients atteints de la maladie. C'est notamment, une meilleure compréhension de la physiologie de l'ASI qui permettrait d'agir sur la pathologie de manière indépendante de l'expression de SMN, par exemple en protégeant les motoneurones de la mort cellulaire.

Si la modulation du métabolisme du cholestérol s'avère bénéfique pour les patients, elle permettrait donc d'intervenir en complément des traitements déjà existants.

Bibliographie

Abdel-Khalik, J., Yutuc, E., Crick, P.J., Gustafsson, J.-Å., Warner, M., Roman, G., Talbot, K., Gray, E., Griffiths, W.J., Turner, M.R., et al. (2017). Defective cholesterol metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. J. Lipid Res. *58*, 267–278.

Andersson, H.C., Kratz, L., and Kelley, R. (2002). Desmosterolosis presenting with multiple congenital anomalies and profound developmental delay. Am. J. Med. Genet. *113*, 315–319.

Andreassi, C., Angelozzi, C., Tiziano, F.D., Vitali, T., De Vincenzi, E., Boninsegna, A., Villanova, M., Bertini, E., Pini, A., Neri, G., et al. (2004). Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. Eur. J. Hum. Genet. EJHG *12*, 59–65.

Arkblad, E., Tulinius, M., Kroksmark, A.-K., Henricsson, M., and Darin, N. (2009). A population-based study of genotypic and phenotypic variability in children with spinal muscular atrophy. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 *98*, 865–872.

Babin, P.J., Goizet, C., and Raldúa, D. (2014). Zebrafish models of human motor neuron diseases: Advantages and limitations. Prog. Neurobiol. *118*, 36–58.

Bae, S.-H., and Paik, Y.-K. (1997). Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol Δ24-reductase. Biochem. J. *326*, 609–616.

Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. Cell *75*, 73–82.

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

Battaglia, G., Princivalle, A., Forti, F., Lizier, C., and Zeviani, M. (1997). Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. Hum. Mol. Genet. *6*, 1961–1971.

Battista, M.-C., Roberge, C., Martinez, A., and Gallo-Payet, N. (2009). 24-dehydrocholesterol reductase/seladin-1: a key protein differentially involved in adrenocorticotropin effects observed in human and rat adrenal cortex. Endocrinology *150*, 4180–4190.

Benvenuti, S., Luciani, P., Vannelli, G.B., Gelmini, S., Franceschi, E., Serio, M., and Peri, A. (2005). Estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators Exert Neuroprotective Effects and Stimulate the Expression of Selective Alzheimer's Disease Indicator-1, a Recently Discovered Antiapoptotic Gene, in Human Neuroblast Long-Term Cell Cultures. J. Clin. Endocrinol. Metab. *90*, 1775–1782.

Biondi, O., Grondard, C., Lecolle, S., Deforges, S., Pariset, C., Lopes, P., Cifuentes-Diaz, C., Li, H., della Gaspera, B., Chanoine, C., et al. (2008). Exercise-Induced Activation of NMDA Receptor Promotes Motor Unit Development and Survival in a Type 2 Spinal Muscular Atrophy Model Mouse. J. Neurosci. *28*, 953–962.

Biondi, O., Branchu, J., Sanchez, G., Lancelin, C., Deforges, S., Lopes, P., Pariset, C., Lecolle, S., Cote, J., Chanoine, C., et al. (2010). In Vivo NMDA Receptor Activation Accelerates Motor Unit Maturation, Protects Spinal Motor Neurons, and Enhances SMN2 Gene Expression in Severe Spinal Muscular Atrophy Mice. J. Neurosci. *30*, 11288–11299.

Biondi, O., Lopes, P., Desseille, C., Branchu, J., Chali, F., Ben Salah, A., Pariset, C., Chanoine, C., and Charbonnier, F. (2012). Physical exercise reduces cardiac defects in type 2 spinal muscular atrophy-like mice. J. Physiol. *590*, 5907–5925.

Biondi, O., Branchu, J., Ben Salah, A., Houdebine, L., Bertin, L., Chali, F., Desseille, C., Weill, L., Sanchez, G., Lancelin, C., et al. (2015). IGF-1R Reduction Triggers Neuroprotective Signaling Pathways in Spinal Muscular Atrophy Mice. J. Neurosci. *35*, 12063–12079.

Björkhem, I. (2009). Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo? J. Lipid Res. *50*, S213–S218.

Björkhem, I. (2013). Five decades with oxysterols. Biochimie *95*, 448–454.

Björkhem, I., and Meaney, S. (2004). Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *24*, 806–815.

Björkhem, I., Lütjohann, D., Diczfalusy, U., Ståhle, L., Ahlborg, G., and Wahren, J. (1998). Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. J. Lipid Res. *39*, 1594–1600.

Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. Cell *126*, 789–799.

Boon, K.-L., Xiao, S., McWhorter, M.L., Donn, T., Wolf-Saxon, E., Bohnsack, M.T., Moens, C.B., and Beattie, C.E. (2009). Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects. Hum. Mol. Genet. *18*, 3615–3625.

Bordet, T., Buisson, B., Michaud, M., Drouot, C., Galéa, P., Delaage, P., Akentieva, N.P., Evers, A.S., Covey, D.F., Ostuni, M.A., et al. (2007). Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. J. Pharmacol. Exp. Ther. *322*, 709–720.

Bosch-Marcé, M., Wee, C.D., Martinez, T.L., Lipkes, C.E., Choe, D.W., Kong, L., Van Meerbeke, J.P., Musarò, A., and Sumner, C.J. (2011). Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice. Hum. Mol. Genet. *20*, 1844–1853.

Bosco, D.A., Fowler, D.M., Zhang, Q., Nieva, J., Powers, E.T., Wentworth, P., Lerner, R.A., and Kelly, J.W. (2006). Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. Nat. Chem. Biol. *2*, 249–253.

Boussicault, L., Alves, S., Lamazière, A., Planques, A., Heck, N., Moumné, L., Despres, G., Bolte, S., Hu, A., Pagès, C., et al. (2016). CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. Brain J. Neurol. *139*, 953–970.

Bowerman, M., Shafey, D., and Kothary, R. (2007). Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. J. Mol. Neurosci. MN *32*, 120–131.

Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Garcia, M., Pagès, C., Hipskind, R.A., and Caboche, J. (2002). Dopamine Induces a PI3-Kinase-Independent Activation of Akt in Striatal Neurons: A New Route to cAMP Response Element-Binding Protein Phosphorylation. J. Neurosci. *22*, 8911–8921.

Branchu, J., Biondi, O., Chali, F., Collin, T., Leroy, F., Mamchaoui, K., Makoukji, J., Pariset, C., Lopes, P., Massaad, C., et al. (2013). Shift from Extracellular Signal-Regulated Kinase to AKT/cAMP Response Element-Binding Protein Pathway Increases Survival-Motor-Neuron Expression in Spinal-Muscular-Atrophy-Like Mice and Patient Cells. J. Neurosci. *33*, 4280–4294.

Brass, B.J., Nonner, D., and Barrett, J.N. (1992). Differential effects of insulin on choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in neuron-rich striatal cultures. J. Neurochem. *59*, 415–424.

Bretillon, L., Sidén, A., Wahlund, L.O., Lütjohann, D., Minthon, L., Crisby, M., Hillert, J., Groth, C.G., Diczfalusy, U., and Björkhem, I.

(2000). Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. Neurosci. Lett. *293*, 87–90.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. Cell *89*, 331–340.

Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002). Cholesterol Addition to ER Membranes Alters Conformation of SCAP, the SREBP Escort Protein that Regulates Cholesterol Metabolism. Mol. Cell *10*, 237–245.

Brzeska, M., Szymczyk, K., and Szterk, A. (2016). Current Knowledge about Oxysterols: A Review: Current knowledge about oxysterols…. J. Food Sci. *81*, R2299–R2308.

Brzustowicz, L.M., Lehner, T., Castilla, L.H., Penchaszadeh, G.K., Wilhelmsen, K.C., Daniels, R., Davies, K.E., Leppert, M., Ziter, F., and Wood, D. (1990). Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. Nature *344*, 540–541.

Burghes, H.M. (2008). Other forms of survival motor neuron protein and spinal muscular atrophy: an opinion. Neuromuscul. Disord. NMD *18*, 82–83.

Bürglen, L., Seroz, T., Miniou, P., Lefebvre, S., Burlet, P., Munnich, A., Pequignot, E.V., Egly, J.M., and Melki, J. (1997). The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIH, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. Am. J. Hum. Genet. *60*, 72–79.

Burlot, M.-A., Braudeau, J., Michaelsen-Preusse, K., Potier, B., Ayciriex, S., Varin, J., Gautier, B., Djelti, F., Audrain, M., Dauphinot, L., et al. (2015). Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology. Hum. Mol. Genet. *24*, 5965–5976.

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

Butchbach, M.E.R. (2016). Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. Front. Mol. Biosci. *3*.

Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., and Torres-Aleman, I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 2926–2933.

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

Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., and Torres-Aleman, I. (2002). Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. Nat. Med. *8*, 1390–1397.

Carro, E., Trejo, J.L., Núñez, A., and Torres-Aleman, I. (2003). Brain repair and neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. Mol. Neurobiol. *27*, 153–162.

Cartegni, L., and Krainer, A.R. (2002). Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. Nat. Genet. *30*, 377–384.

Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B.M., Strein, C., Davey, N.E., Humphreys, D.T., Preiss, T., Steinmetz, L.M., et al. (2012). Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. Cell *149*, 1393–1406.

Chaker, Z., Aïd, S., Berry, H., and Holzenberger, M. (2015). Suppression of IGF-I signals in neural stem cells enhances neurogenesis and olfactory function during aging. Aging Cell *14*, 847–856.

Chali, F., Desseille, C., Houdebine, L., Benoit, E., Rouquet, T., Bariohay, B., Lopes, P., Branchu, J., Della Gaspera, B., Pariset, C., et al. (2016). Long-term exercise-specific neuroprotection in spinal muscular atrophy-like mice: Exercise-specific adaptation of motor unit in spinal muscular atrophy. J. Physiol. *594*, 1931–1952.

Chang, T.-Y., Li, B.-L., Chang, C.C.Y., and Urano, Y. (2009). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. *297*, E1–E9.

Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R.A., Yong, J., Shevchenko, A., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2000). Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. J. Cell Biol. *148*, 1177–1186.

Chen, J., Zhang, X., Kusumo, H., Costa, L.G., and Guizzetti, M. (2013). Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: Implications for brain cholesterol homeostasis. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids *1831*, 263–275.

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

Chung, B., Wong, V., and Ip, P. (2003). Prevalence of neuromuscular diseases in Chinese children: a study in southern China. J. Child Neurol. *18*, 217–219.

Cohen, E., Paulsson, J.F., Blinder, P., Burstyn-Cohen, T., Du, D., Estepa, G., Adame, A., Pham, H.M., Holzenberger, M., Kelly, J.W., et al. (2009). Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. Cell *139*, 1157–1169.

Commare, M.C., Kurstjens, S.P., and Barois, A. (1994). Diaphragmatic paralysis in children: a review of 11 cases. Pediatr. Pulmonol. *18*, 187–193.

Coovert, D.D., Le, T.T., McAndrew, P.E., Strasswimmer, J., Crawford, T.O., Mendell, J.R., Coulson, S.E., Androphy, E.J., Prior, T.W., and Burghes, A.H. (1997). The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. Hum. Mol. Genet. *6*, 1205–1214.

Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Salani, S., Ronchi, D., Saladino, F., Bordoni, A., Fortunato, F., Del Bo, R., et al. (2008). Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. J. Clin. Invest. *118*, 3316–3330.

Couet, J., Sargiacomo, M., and Lisanti, M.P. (1997). Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. J. Biol. Chem. *272*, 30429–30438.

Crameri, A., Biondi, E., Kuehnle, K., Lütjohann, D., Thelen, K.M., Perga, S., Dotti, C.G., Nitsch, R.M., Ledesma, M.D., and Mohajeri, M.H. (2006). The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and Abeta generation in vivo. EMBO J. *25*, 432–443.

Cui, W., Li, W., Han, R., Mak, S., Zhang, H., Hu, S., Rong, J., and Han, Y. (2011). PI3-K/Akt and ERK pathways activated by VEGF play opposite roles in MPP+-induced neuronal apoptosis. Neurochem. Int. *59*, 945–953.

Custer, S.K., Gilson, T.D., Li, H., Todd, A.G., Astroski, J.W., Lin, H., Liu, Y., and Androphy, E.J. (2016). Altered mRNA Splicing in SMN-Depleted Motor Neuron-Like Cells. PloS One *11*, e0163954.

Cutler, R.G., Pedersen, W.A., Camandola, S., Rothstein, J.D., and Mattson, M.P. (2002). Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *52*, 448–457.

Darin, N., and Tulinius, M. (2000). Neuromuscular disorders in childhood: a

descriptive epidemiological study from western Sweden. Neuromuscul. Disord. NMD *10*, 1–9.

Das, A., Brown, M.S., Anderson, D.D., Goldstein, J.L., and Radhakrishnan, A. (2014). Three pools of plasma membrane cholesterol and their relation to cholesterol homeostasis. eLife *3*.

Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B., Holtzman, D.M., and Zlokovic, B.V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. J. Clin. Invest. *118*, 4002–4013.

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

Dennick, R.G., Dean, P.D., and Abramovich, D.A. (1973). Desmosterol levels in human foetal brain--a reassessment. J. Neurochem. *20*, 1293–1294.

Diekstra, F.P., Saris, C.G.J., van Rheenen, W., Franke, L., Jansen, R.C., van Es, M.A., van Vught, P.W.J., Blauw, H.M., Groen, E.J.N., Horvath, S., et al. (2012). Mapping of gene expression reveals CYP27A1 as a susceptibility gene for sporadic ALS. PloS One *7*, e35333.

Dierick, I., Baets, J., Irobi, J., Jacobs, A., De Vriendt, E., Deconinck, T., Merlini, L., Van den Bergh, P., Rasic, V.M., Robberecht, W., et al. (2008). Relative contribution of mutations in genes for autosomal dominant distal hereditary motor neuropathies: a genotype-phenotype correlation study. Brain J. Neurol. *131*, 1217–1227.

Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2004). *Thematic review series: Brain Lipids.* Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. J. Lipid Res. *45*, 1375–1397.

Dimitriadi, M., Sleigh, J.N., Walker, A., Chang, H.C., Sen, A., Kalloo, G., Harris, J., Barsby, T., Walsh, M.B., Satterlee, J.S., et al. (2010). Conserved Genes Act as Modifiers of Invertebrate SMN Loss of Function Defects. PLOS Genet. *6*, e1001172.

Dimitriadi, M., Kye, M.J., Kalloo, G., Yersak, J.M., Sahin, M., and Hart, A.C. (2013). The Neuroprotective Drug Riluzole Acts via Small Conductance Ca2+-Activated K+ Channels to Ameliorate Defects in Spinal Muscular Atrophy Models. J. Neurosci. *33*, 6557–6562.

D'Mello, S.R., Borodezt, K., and Soltoff, S.P. (1997). Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *17*, 1548–1560.

Doré, S., Kar, S., and Quirion, R. (1997). Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. Trends Neurosci. *20*, 326–331.

Doria, M., Maugest, L., Moreau, T., Lizard, G., and Vejux, A. (2016). Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. Free Radic. Biol. Med. *101*, 393–400.

Drzewinska, J., Walczak-Drzewiecka, A., and Ratajewski, M. (2011). Identification and analysis of the promoter region of the human DHCR24 gene: involvement of DNA methylation and histone acetylation. Mol. Biol. Rep. *38*, 1091–1101.

Duan, C., Ren, H., and Gao, S. (2010). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. Gen. Comp. Endocrinol. *167*, 344–351.

Dubowitz, V. (1999). Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc. *3*, 49–51.

Dutertre, M., Sanchez, G., De Cian, M.-C., Barbier, J., Dardenne, E., Gratadou, L., Dujardin, G., Le Jossic-Corcos, C., Corcos, L., and Auboeuf, D. (2010). Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response. Nat. Struct. Mol. Biol. *17*, 1358–1366.

Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. Nature *457*, 277–280.

Fang, S.-C., Xie, H., Chen, F., Hu, M., Long, Y., Sun, H.-B., Kong, L.-Y., Hong, H., and Tang, S.-S. (2017). Simvastatin ameliorates memory impairment and neurotoxicity in streptozotocin-induced diabetic mice. Neuroscience *355*, 200–211.

Feldman, E.L., Sullivan, K.A., Kim, B., and Russell, J.W. (1997). Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. Neurobiol. Dis. *4*, 201–214.

Forss-Petter, S., Danielson, P.E., Catsicas, S., Battenberg, E., Price, J., Nerenberg, M., and Sutcliffe, J.G. (1990). Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. Neuron *5*, 187–197.

Frattini, E., Ruggieri, M., Salani, S., Faravelli, I., Zanetta, C., Nizzardo, M., Simone, C., Magri, F., and Corti, S. (2015). Pluripotent stem cell-based models of spinal muscular atrophy. Mol. Cell. Neurosci. *64*, 44–50.

Frugier, T., Tiziano, F.D., Cifuentes-Diaz, C., Miniou, P., Roblot, N., Dierich, A., Le Meur, M., and Melki, J. (2000). Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. Hum. Mol. Genet. *9*, 849–858.

Fu, X.-D., and Ares, M. (2014). Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. Nat. Rev. Genet. *15*, 689–701.

Fumagalli, R., and Paoletti, R. (1963). The identification and significance of desmosterol in the developing human and animal brain. Life Sci. 1962 *5*, 291–295.

Funfschilling, U., Jockusch, W.J., Sivakumar, N., Mobius, W., Corthals, K., Li, S., Quintes, S., Kim, Y., Schaap, I.A.T., Rhee, J.-S., et al. (2012). Critical Time Window of Neuronal Cholesterol Synthesis during Neurite Outgrowth. J. Neurosci. *32*, 7632–7645.

Futter, M., Diekmann, H., Schoenmakers, E., Sadiq, O., Chatterjee, K., and Rubinsztein, D.C. (2009). Wild-type but not mutant huntingtin modulates the transcriptional activity of liver X receptors. J. Med. Genet. *46*, 438–446.

Gabanella, F., Carissimi, C., Usiello, A., and Pellizzoni, L. (2005). The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. Hum. Mol. Genet. *14*, 3629–3642.

Gabanella, F., Pisani, C., Borreca, A., Farioli-Vecchioli, S., Ciotti, M.T., Ingegnere, T., Onori, A., Ammassari-Teule, M., Corbi, N., Canu, N., et al. (2016). SMN affects membrane remodelling and anchoring of the protein synthesis machinery. J Cell Sci *129*, 804–816.

Garbes, L., Riessland, M., Hölker, I., Heller, R., Hauke, J., Tränkle, C., Coras, R., Blümcke, I., Hahnen, E., and Wirth, B. (2009). LBH589 induces up to 10-fold SMN protein levels by several independent mechanisms and is effective even in cells from SMA patients non-responsive to valproate. Hum. Mol. Genet. *18*, 3645–3658.

Gilliam, T.C., Brzustowicz, L.M., Castilla, L.H., Lehner, T., Penchaszadeh, G.K., Daniels, R.J., Byth, B.C., Knowles, J., Hislop, J.E., and Shapira, Y. (1990). Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. Nature *345*, 823–825.

Giorgetti, S., Ballotti, R., Kowalski-Chauvel, A., Tartare, S., and Van Obberghen, E. (1993). The insulin and insulin-like growth factor-I receptor substrate IRS-1 associates with and

activates phosphatidylinositol 3-kinase in vitro. J. Biol. Chem. *268*, 7358–7364.

Giorgetti, S., Pelicci, P.G., Pelicci, G., and Van Obberghen, E. (1994). Involvement of Src-homology/collagen (SHC) proteins in signaling through the insulin receptor and the insulin-like-growth-factor-I-receptor. Eur. J. Biochem. *223*, 195–202.

Giudetti, A.M., Romano, A., Lavecchia, A.M., and Gaetani, S. (2016). The Role of Brain Cholesterol and its Oxidized Products in Alzheimer's Disease. Curr. Alzheimer Res. *13*, 198–205.

Gontier, G., George, C., Chaker, Z., Holzenberger, M., and Aïd, S. (2015). Blocking IGF Signaling in Adult Neurons Alleviates Alzheimer's Disease Pathology through Amyloid-β Clearance. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *35*, 11500–11513.

Gosselet, F., Saint-Pol, J., and Fenart, L. (2014). Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: implications for Alzheimer's disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. *446*, 687–691.

Greeve, I., Hermans-Borgmeyer, I., Brellinger, C., Kasper, D., Gomez-Isla, T., Behl, C., Levkau, B., and Nitsch, R.M. (2000). The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 7345–7352.

Grondard, C. (2005). Regular Exercise Prolongs Survival in a Type 2 Spinal Muscular Atrophy Model Mouse. J. Neurosci. *25*, 7615–7622.

Gu, H., Wang, F., and Zhang, D. (2014). Caveolin-1 interacts with ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) and regulates ABCG1-mediated cholesterol efflux. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids *1841*, 847–858.

Gubitz, A.K., Feng, W., and Dreyfuss, G. (2004). The SMN complex. Exp. Cell Res. *296*, 51–56.

Han, V.K.M., and Carter, A.M. (2000). Spatial and Temporal Patterns of Expression of Messenger RNA for Insulin-Like Growth Factors and their Binding Proteins in the Placenta of Man and Laboratory Animals. Placenta *21*, 289–305.

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

Harjes, P., and Wanker, E.E. (2003). The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. Trends Biochem. Sci. *28*, 425–433.

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

Hoffmann, J. (1893). Ueber chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter, auf familiärer Basis. J. Neurol. *3*, 427–470.

Hofmann, Y., and Wirth, B. (2002). hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. Hum. Mol. Genet. *11*, 2037–2049.

Hofmann, Y., Lorson, C.L., Stamm, S., Androphy, E.J., and Wirth, B. (2000). Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 9618–9623.

Holla, Ø.L., Nakken, S., Mattingsdal, M., Ranheim, T., Berge, K.E., Defesche, J.C., and Leren, T.P. (2009). Effects of intronic mutations in the LDLR gene on pre-mRNA splicing: Comparison of wet-lab and bioinformatics analyses. Mol. Genet. Metab. *96*, 245–252.

Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Géloën, A., Even, P.C., Cervera, P.,

and Le Bouc, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nature *421*, 182–187.

Hong, C., and Tontonoz, P. (2014). Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. *13*, 433–444.

Horton, J.D., Shah, N.A., Warrington, J.A., Anderson, N.N., Park, S.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. Proc. Natl. Acad. Sci. *100*, 12027–12032.

Hsieh-Li, H.M., Chang, J.G., Jong, Y.J., Wu, M.H., Wang, N.M., Tsai, C.H., and Li, H. (2000). A mouse model for spinal muscular atrophy. Nat. Genet. *24*, 66–70.

Huang, P., Nedelcu, D., Watanabe, M., Jao, C., Kim, Y., Liu, J., and Salic, A. (2016). Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothened in Hedgehog Signaling. Cell *166*, 1176–1187.e14.

Huynh, T.-P.V., Davis, A.A., Ulrich, J.D., and Holtzman, D.M. (2017). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the influence of apolipoprotein E on amyloid-β and other amyloidogenic proteins. J. Lipid Res. *58*, 824–836.

Iannaccone, S.T. (2007). Modern Management of Spinal Muscular Atrophy. J. Child Neurol. *22*, 974–978.

Iwahashi, H., Eguchi, Y., Yasuhara, N., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., and Tsujimoto, Y. (1997). Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. Nature *390*, 413–417.

Iyer, C.C., McGovern, V.L., Murray, J.D., Gombash, S.E., Zaworski, P.G., Foust, K.D., Janssen, P.M.L., and Burghes, A.H.M. (2015). Low levels of Survival Motor Neuron protein are sufficient for normal muscle function in the SMNΔ7 mouse model of SMA. Hum. Mol. Genet. *24*, 6160–6173.

Jakobsson, T., Treuter, E., Gustafsson, J.-Å., and Steffensen, K.R. (2012). Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. Trends Pharmacol. Sci. *33*, 394–404.

Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. Nature *383*, 728–731.

Janowski, B.A., Grogan, M.J., Jones, S.A., Wisely, G.B., Kliewer, S.A., Corey, E.J., and Mangelsdorf, D.J. (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 266–271.

Jiang, L., Yuan, X., Yang, N., Ren, L., Zhao, F., Luo, B., Bian, Y., Xu, J., Lu, D., Zheng, Y., et al. (2015). Daucosterol protects neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-mediated injury by activating IGF1 signaling pathway. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *152*, 45–52.

Jiang, Q., Lee, C.Y.D., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T.M., Collins, J.L., et al. (2008). ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. Neuron *58*, 681–693.

Jiménez Garduño, A.M., Juárez-Hernández, L.J., Polanco, M.J., Tosatto, L., Michelatti, D., Arosio, D., Basso, M., Pennuto, M., and Musio, C. (2017). Altered ionic currents and amelioration by IGF-1 and PACAP in motoneuron-derived cells modelling SBMA. Biophys. Chem.

Karasinska, J.M., and Hayden, M.R. (2011). Cholesterol metabolism in Huntington disease. Nat. Rev. Neurol. *7*, 561–572.

Kariya, S., Obis, T., Garone, C., Akay, T., Sera, F., Iwata, S., Homma, S., and Monani, U.R. (2014). Requirement of enhanced Survival Motoneuron protein imposed during neuromuscular junction maturation. J. Clin. Invest. *124*, 785–800.

Kernochan, L.E., Russo, M.L., Woodling, N.S., Huynh, T.N., Avila, A.M., Fischbeck, K.H., and Sumner, C.J. (2005). The role of histone acetylation in SMN gene expression. Hum. Mol. Genet. *14*, 1171–1182.

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

Kolb, S.J., Battle, D.J., and Dreyfuss, G. (2007). Molecular Functions of the SMN Complex. J. Child Neurol. *22*, 990–994.

Kölsch, H., Heun, R., Kerksiek, A., Bergmann, K.V., Maier, W., and Lütjohann, D. (2004). Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients. Neurosci. Lett. *368*, 303–308.

Kong, L., Wang, X., Choe, D.W., Polley, M., Burnett, B.G., Bosch-Marcé, M., Griffin, J.W., Rich, M.M., and Sumner, C.J. (2009). Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 842–851.

Kornblihtt, A.R., Schor, I.E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., and Muñoz, M.J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 153–165.

Kotzka, J., Lehr, S., Roth, G., Avci, H., Knebel, B., and Muller-Wieland, D. (2004). Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. J. Biol. Chem. *279*, 22404–22411.

Kreilaus, F., Spiro, A.S., Hannan, A.J., Garner, B., and Jenner, A.M. (2015). Brain Cholesterol Synthesis and Metabolism is Progressively Disturbed in the R6/1 Mouse Model of Huntington's Disease: A Targeted GC-MS/MS Sterol Analysis. J. Huntingt. Dis. *4*, 305–318.

Krieger, F., Elflein, N., Saenger, S., Wirthgen, E., Rak, K., Frantz, S., Hoeflich, A., Toyka, K.V., Metzger, F., and Jablonka, S. (2014). Polyethylene glycol-coupled IGF1 delays motor function defects in a mouse model of spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. Brain J. Neurol. *137*, 1374–1393.

Kuehnle, K., Crameri, A., Kalin, R.E., Luciani, P., Benvenuti, S., Peri, A., Ratti, F., Rodolfo, M., Kulic, L., Heppner, F.L., et al. (2008). Prosurvival Effect of DHCR24/Seladin-1 in Acute and Chronic Responses to Oxidative Stress. Mol. Cell. Biol. *28*, 539–550.

Kugelberg, E., and Welander, L. (1956). Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. AMA Arch. Neurol. Psychiatry *75*, 500–509.

La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E., and Fischbeck, K.H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. Nature *352*, 77–79.

La Spada, A.R., Roling, D.B., Harding, A.E., Warner, C.L., Spiegel, R., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Yee, W.C., and Fischbeck, K.H. (1992). Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. Nat. Genet. *2*, 301–304.

Labrum, R., Rodda, J., and Krause, A. (2007). The molecular basis of spinal muscular atrophy (SMA) in South African black patients. Neuromuscul. Disord. NMD *17*, 684–692.

LaDu, M.J., Falduto, M.T., Manelli, A.M., Reardon, C.A., Getz, G.S., and Frail, D.E. (1994). Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. J. Biol. Chem. *269*, 23403–23406.

Lafont, E., Milhas, D., Carpentier, S., Garcia, V., Jin, Z.-X., Umehara, H., Okazaki, T., Schulze-Osthoff, K., Levade, T., Benoist, H., et al. (2010). Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FasL-triggered cell death. Cell Death Differ. *17*, 642–654.

Lane-Donovan, C., Philips, G.T., and Herz, J. (2014). More than Cholesterol Transporters: Lipoprotein Receptors in CNS Function and Neurodegeneration. Neuron *83*, 771–787.

Lange, Y., Ory, D.S., Ye, J., Lanier, M.H., Hsu, F.-F., and Steck, T.L. (2008). Effectors of Rapid Homeostatic Responses of Endoplasmic Reticulum Cholesterol and 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase. J. Biol. Chem. *283*, 1445–1455.

Le, T.T., Pham, L.T., Butchbach, M.E.R., Zhang, H.L., Monani, U.R., Coovert, D.D., Gavrilina, T.O., Xing, L., Bassell, G.J., and Burghes, A.H.M. (2005). SMNΔ7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. Hum. Mol. Genet. *14*, 845–857.

Lee, S.D., and Tontonoz, P. (2015). Liver X receptors at the intersection of lipid metabolism and atherogenesis. Atherosclerosis *242*, 29–36.

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

Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrandy, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G., and Melki, J. (1997). Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. Nat. Genet. *16*, 265–269.

Leoni, V., Mariotti, C., Tabrizi, S.J., Valenza, M., Wild, E.J., Henley, S.M.D., Hobbs, N.Z., Mandelli, M.L., Grisoli, M., Björkhem, I., et al. (2008). Plasma 24S-hydroxycholesterol and caudate MRI in pre-manifest and early Huntington's disease. Brain J. Neurol. *131*, 2851–2859.

Leoni, V., Mariotti, C., Nanetti, L., Salvatore, E., Squitieri, F., Bentivoglio, A.R., Bandettini di Poggio, M., Bandettini Del Poggio, M., Piacentini, S., Monza, D., et al. (2011). Whole body cholesterol metabolism is impaired in Huntington's disease. Neurosci. Lett. *494*, 245–249.

Li, D.K., Tisdale, S., Lotti, F., and Pellizzoni, L. (2014). SMN control of RNP assembly: From post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease. Semin. Cell Dev. Biol. *32*, 22–29.

Li, Y.C., Park, M.J., Ye, S.-K., Kim, C.-W., and Kim, Y.-N. (2006). Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. Am. J. Pathol. *168*, 1107-1118; quiz 1404-1405.

Lin, H., Hu, H., Duan, W., Liu, Y., Tan, G., Li, Z., Liu, Y., Deng, B., Song, X., Wang, W., et al. (2016). Intramuscular Delivery of scAAV9-hIGF1 Prolongs Survival in the hSOD1(G93A) ALS Mouse Model via Upregulation of D-Amino Acid Oxidase. Mol. Neurobiol.

Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1996). A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. EMBO J. *15*, 3555–3565.

Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). Cell *75*, 59–72.

Liu, Q., Fischer, U., Wang, F., and Dreyfuss, G. (1997). The Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, SMN, and Its Associated Protein SIP1 Are in a Complex with Spliceosomal snRNP Proteins. Cell *90*, 1013–1021.

Lloyd, D.B., and Thompson, J.F. (1995). Transcriptional modulators affect in vivo protein binding to the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoters. J. Biol. Chem. *270*, 25812–25818.

Locatelli, D., Terao, M., Kurosaki, M., Zanellati, M.C., Pletto, D.R., Finardi, A., Colciaghi, F., Garattini, E., and Battaglia, G.S. (2015).

Different Stability and Proteasome-Mediated Degradation Rate of SMN Protein Isoforms. PLOS ONE *10*, e0134163.

Lorson, C.L., and Androphy, E.J. (1998). The Domain Encoded by Exon 2 of the Survival Motor Neuron Protein Mediates Nucleic Acid Binding. Hum. Mol. Genet. *7*, 1269–1275.

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

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

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. *193*, 265–275.

Lu, X., Kambe, F., Cao, X., Kozaki, Y., Kaji, T., Ishii, T., and Seo, H. (2008a). 3β-Hydroxysteroid-Δ24 Reductase Is a Hydrogen Peroxide Scavenger, Protecting Cells from Oxidative Stress-Induced Apoptosis. Endocrinology *149*, 3267–3273.

Lu, X., Kambe, F., Cao, X., Yamauchi, M., and Seo, H. (2008b). Insulin-like growth factor-I activation of Akt survival cascade in neuronal cells requires the presence of its cognate receptor in caveolae. Exp. Cell Res. *314*, 342–351.

Lu, X., Jia, D., Zhao, C., Wang, W., Liu, T., Chen, S., Quan, X., Sun, D., and Gao, B. (2014). Recombinant adenovirus-mediated overexpression of 3β-hydroxysteroid-Δ24 reductase. Neural Regen. Res. *9*, 504–512.

Luchetti, G., Sircar, R., Kong, J.H., Nachtergaele, S., Sagner, A., Byrne, E.F., Covey, D.F., Siebold, C., and Rohatgi, R. (2016). Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothened to promote Hedgehog signaling. eLife *5*.

Luciani, P., Deledda, C., Rosati, F., Benvenuti, S., Cellai, I., Dichiara, F., Morello, M., Vannelli, G.B., Danza, G., Serio, M., et al. (2008). Seladin-1 Is a Fundamental Mediator of the Neuroprotective Effects of Estrogen in Human Neuroblast Long-Term Cell Cultures. Endocrinology *149*, 4256–4266.

Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., and Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. Science *327*, 996–1000.

Ludwig, A., Howard, G., Mendoza-Topaz, C., Deerinck, T., Mackey, M., Sandin, S., Ellisman, M.H., and Nichols, B.J. (2013). Molecular Composition and Ultrastructure of the Caveolar Coat Complex. PLOS Biol. *11*, e1001640.

Lund, E.G., Xie, C., Kotti, T., Turley, S.D., Dietschy, J.M., and Russell, D.W. (2003). Knockout of the Cholesterol 24-Hydroxylase Gene in Mice Reveals a Brain-specific Mechanism of Cholesterol Turnover. J. Biol. Chem. *278*, 22980–22988.

Lunn, J.S., Sakowski, S.A., McGinley, L.M., Pacut, C., Hazel, T.G., Johe, K., and Feldman, E.L. (2015). Autocrine production of IGF-I increases stem cell-mediated neuroprotection. Stem Cells Dayt. Ohio *33*, 1480–1489.

MacLeod, M.J., Taylor, J.E., Lunt, P.W., Mathew, C.G., and Robb, S.A. (1999). Prenatal onset spinal muscular atrophy. Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc. *3*, 65–72.

Mahley, R.W., and Rall, S.C. (2000). Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. *1*, 507–537.

Mahmoudi, S., Henriksson, S., Weibrecht, I., Smith, S., Söderberg, O., Strömblad, S., Wiman, K.G., and Farnebo, M. (2010). WRAP53 is essential for Cajal body formation and for targeting the survival of motor neuron

complex to Cajal bodies. PLoS Biol. *8*, e1000521.

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

Majumder, S., Varadharaj, S., Ghoshal, K., Monani, U., Burghes, A.H.M., and Jacob, S.T. (2004). Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. J. Biol. Chem. *279*, 14803–14811.

Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. Nature *416*, 499–506.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature *469*, 343–349.

Martins, A.S., Ordóñez, J.L., Amaral, A.T., Prins, F., Floris, G., Debiec-Rychter, M., Hogendoorn, P.C.W., and Alava, E. de (2011). IGF1R Signaling in Ewing Sarcoma Is Shaped by Clathrin-/Caveolin-Dependent Endocytosis. PLOS ONE *6*, e19846.

Mathews, L.S., Hammer, R.E., Behringer, R.R., D'Ercole, A.J., Bell, G.I., Brinster, R.L., and Palmiter, R.D. (1988). Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. Endocrinology *123*, 2827–2833.

Mattis, V.B., Ebert, A.D., Fosso, M.Y., Chang, C.-W., and Lorson, C.L. (2009). Delivery of a read-through inducing compound, TC007, lessens the severity of a spinal muscular atrophy animal model. Hum. Mol. Genet. *18*, 3906–3913.

Maury, Y., Côme, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., and Nedelec, S. (2014). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. Nat. Biotechnol. *33*, nbt.3049.

McGovern, V.L., Iyer, C.C., Arnold, W.D., Gombash, S.E., Zaworski, P.G., Blatnik, A.J., Foust, K.D., and Burghes, A.H.M. (2015). SMN expression is required in motor neurons to rescue electrophysiological deficits in the SMNΔ7 mouse model of SMA. Hum. Mol. Genet. *24*, 5524–5541.

McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 517–533.

McWhorter, M.L., Monani, U.R., Burghes, A.H.M., and Beattie, C.E. (2003). Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. J. Cell Biol. *162*, 919–931.

Medina, M.W., Gao, F., Naidoo, D., Rudel, L.L., Temel, R.E., McDaniel, A.L., Marshall, S.M., and Krauss, R.M. (2011). Coordinately Regulated Alternative Splicing of Genes Involved in Cholesterol Biosynthesis and Uptake. PLoS ONE *6*, e19420.

Meffre, D., Shackleford, G., Hichor, M., Gorgievski, V., Tzavara, E.T., Trousson, A., Ghoumari, A.M., Deboux, C., Nait Oumesmar, B., Liere, P., et al. (2015). Liver X receptors alpha and beta promote myelination and remyelination in the cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 7587–7592.

Melki, J., Sheth, P., Abdelhak, S., Burlet, P., Bachelot, M.F., Lathrop, M.G., Frezal, J., and Munnich, A. (1990). Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. Lancet Lond. Engl. *336*, 271–273.

Melki, J., Lefebvre, S., Burglen, L., Burlet, P., Clermont, O., Millasseau, P., Reboullet, S., Bénichou, B., Zeviani, M., and Le Paslier, D. (1994). De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. Science *264*, 1474–1477.

Mercer, E.A., Korhonen, L., Skoglösa, Y., Olsson, P.A., Kukkonen, J.P., and Lindholm, D. (2000). NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways. EMBO J. *19*, 3597–3607.

Merlini, L., Stagni, S.B., Marri, E., and Granata, C. (1992). Epidemiology of neuromuscular disorders in the under-20 population in Bologna Province, Italy. Neuromuscul. Disord. NMD *2*, 197–200.

Meyer, K., Ferraiuolo, L., Schmelzer, L., Braun, L., McGovern, V., Likhite, S., Michels, O., Govoni, A., Fitzgerald, J., Morales, P., et al. (2015). Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: a dose-response study in mice and nonhuman primates. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *23*, 477–487.

Miescher, G.C., Taylor, V., Kappos, L., Matthieu, J.M., and Honegger, P. (1993). Protein kinases expressed in aggregating brain cell cultures during myelination. Schweiz. Arch. Neurol. Psychiatr. Zurich Switz. 1985 *144*, 217–221.

Miguel-Aliaga, I., Culetto, E., Walker, D.S., Baylis, H.A., Sattelle, D.B., and Davies, K.E. (1999). The Caenorhabditis Elegans Orthologue of the Human Gene Responsible for Spinal Muscular Atrophy Is a Maternal Product Critical for Germline Maturation and Embryonic Viability. Hum. Mol. Genet. *8*, 2133–2143.

Miguel-Aliaga, I., Chan, Y.B., Davies, K.E., and van den Heuvel, M. (2000). Disruption of SMN function by ectopic expression of the human SMN gene in Drosophila. FEBS Lett. *486*, 99–102.

Miller, N., Shi, H., Zelikovich, A.S., and Ma, Y.-C. (2016). Motor neuron mitochondrial dysfunction in spinal muscular atrophy. Hum. Mol. Genet. *25*, 3395–3406.

Millino, C., Fanin, M., Vettori, A., Laveder, P., Mostacciuolo, M.L., Angelini, C., and Lanfranchi, G. (2009). Different atrophy-hypertrophy transcription pathways in muscles affected by severe and mild spinal muscular atrophy. BMC Med. *7*, 14.

Mirza, R., Hayasaka, S., Takagishi, Y., Kambe, F., Ohmori, S., Maki, K., Yamamoto, M., Murakami, K., Kaji, T., Zadworny, D., et al. (2006). DHCR24 gene knockout mice demonstrate lethal dermopathy with differentiation and maturation defects in the epidermis. J. Invest. Dermatol. *126*, 638–647.

Mirza, R., Hayasaka, S., Kambe, F., Maki, K., Kaji, T., Murata, Y., and Seo, H. (2008). Increased expression of aquaporin-3 in the epidermis of DHCR24 knockout mice. Br. J. Dermatol. *158*, 679–684.

Monani, U.R., McPherson, J.D., and Burghes, A.H. (1999). Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). Biochim. Biophys. Acta *1445*, 330–336.

Monani, U.R., Sendtner, M., Coovert, D.D., Parsons, D.W., Andreassi, C., Le, T.T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossoll, W., Rossol, W., et al. (2000). The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. Hum. Mol. Genet. *9*, 333–339.

Montes, M., Becerra, S., Sánchez-Álvarez, M., and Suñé, C. (2012). Functional coupling of transcription and splicing. Gene *501*, 104–117.

Morales, J.R., Ballesteros, I., Deniz, J.M., Hurtado, O., Vivancos, J., Nombela, F., Lizasoain, I., Castrillo, A., and Moro, M.A. (2008). Activation of liver X receptors promotes neuroprotection and reduces brain inflammation in experimental stroke. Circulation *118*, 1450–1459.

Murdocca, M., Malgieri, A., Luchetti, A., Saieva, L., Dobrowolny, G., de Leonibus, E., Filareto, A., Quitadamo, M.C., Novelli, G., Musarò, A., et al. (2012). IPLEX administration improves motor neuron survival and ameliorates motor functions in a severe

mouse model of spinal muscular atrophy. Mol. Med. Camb. Mass *18*, 1076–1085.

Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Rosenthal, N. (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. Nat. Genet. *27*, 195–200.

Naftelberg, S., Schor, I.E., Ast, G., and Kornblihtt, A.R. (2015). Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. Annu. Rev. Biochem. *84*, 165–198.

Nagano, I., Shiote, M., Murakami, T., Kamada, H., Hamakawa, Y., Matsubara, E., Yokoyama, M., Morita, K., Shoji, M., and Abe, K. (2005). Beneficial effects of intrathecal IGF-1 administration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurol. Res. *27*, 768–772.

Najem, D., Bamji-Mirza, M., Yang, Z., and Zhang, W. (2016). Aβ-Induced Insulin Resistance and the Effects of Insulin on the Cholesterol Synthesis Pathway and Aβ Secretion in Neural Cells. Neurosci. Bull. *32*, 227–238.

Narai, H., Nagano, I., Ilieva, H., Shiote, M., Nagata, T., Hayashi, T., Shoji, M., and Abe, K. (2005). Prevention of spinal motor neuron death by insulin-like growth factor-1 associating with the signal transduction systems in SODG93A transgenic mice. J. Neurosci. Res. *82*, 452–457.

Narayanan, U., Achsel, T., Lührmann, R., and Matera, A.G. (2004). Coupled In Vitro Import of U snRNPs and SMN, the Spinal Muscular Atrophy Protein. Mol. Cell *16*, 223–234.

Naryshkin, N.A., Weetall, M., Dakka, A., Narasimhan, J., Zhao, X., Feng, Z., Ling, K.K.Y., Karp, G.M., Qi, H., Woll, M.G., et al. (2014). Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. Science *345*, 688–693.

Navarro, G., Borroto-Escuela, D.O., Fuxe, K., and Franco, R. (2014). Potential of caveolae in the therapy of cardiovascular and neurological diseases. Front. Physiol. *5*, 370.

Neff, N.T., Prevette, D., Houenou, L.J., Lewis, M.E., Glicksman, M.A., Yin, Q.W., and Oppenheim, R.W. (1993). Insulin-like growth factors: putative muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival. J. Neurobiol. *24*, 1578–1588.

Nguyen, K.T., Wang, W.J., Chan, J.L., and Wang, L.H. (2000). Differential requirements of the MAP kinase and PI3 kinase signaling pathways in Src- versus insulin and IGF-1 receptors-induced growth and transformation of rat intestinal epithelial cells. Oncogene *19*, 5385–5397.

Nieweg, K., Schaller, H., and Pfrieger, F.W. (2009). Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. J. Neurochem. *109*, 125–134.

Norwood, F.L.M., Harling, C., Chinnery, P.F., Eagle, M., Bushby, K., and Straub, V. (2009). Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. Brain J. Neurol. *132*, 3175–3186.

Nystrom, F.H., Chen, H., Cong, L.N., Li, Y., and Quon, M.J. (1999). Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *13*, 2013–2024.

Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F., and Patsch, W. (2003). Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. Biochem. J. *371*, 89–96.

Olsson, A., Höglund, K., Sjögren, M., Andreasen, N., Minthon, L., Lannfelt, L., Buerger, K., Möller, H.J., Hampel, H., Davidsson, P., et al. (2003). Measurement of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid

precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. Exp. Neurol. *183*, 74–80.

Ortegren, U., Karlsson, M., Blazic, N., Blomqvist, M., Nystrom, F.H., Gustavsson, J., Fredman, P., and Strålfors, P. (2004). Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes. Eur. J. Biochem. *271*, 2028–2036.

Ozdinler, P.H., and Macklis, J.D. (2006). IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. Nat. Neurosci. *9*, 1371–1381.

Pagliarini, V., Pelosi, L., Bustamante, M.B., Nobili, A., Berardinelli, M.G., D'Amelio, M., Musarò, A., and Sette, C. (2015). SAM68 is a physiological regulator of *SMN2* splicing in spinal muscular atrophy. J. Cell Biol. *211*, 77–90.

Palacino, J., Swalley, S.E., Song, C., Cheung, A.K., Shu, L., Zhang, X., Van Hoosear, M., Shin, Y., Chin, D.N., Keller, C.G., et al. (2015). SMN2 splice modulators enhance U1-pre-mRNA association and rescue SMA mice. Nat. Chem. Biol. *11*, 511–517.

Párrizas, M., Saltiel, A.R., and LeRoith, D. (1997). Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. J. Biol. Chem. *272*, 154–161.

Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 185–194.

Passini, M.A., Bu, J., Richards, A.M., Treleaven, C.M., Sullivan, J.A., O'Riordan, C.R., Scaria, A., Kells, A.P., Samaranch, L., San Sebastian, W., et al. (2014). Translational fidelity of intrathecal delivery of self-complementary AAV9-survival motor neuron 1 for spinal muscular atrophy. Hum. Gene Ther. *25*, 619–630.

Patitucci, T.N., and Ebert, A.D. (2016). SMN deficiency does not induce oxidative stress in SMA iPSC-derived astrocytes or motor neurons. Hum. Mol. Genet. *25*, 514–523.

Pedrotti, S., Bielli, P., Paronetto, M.P., Ciccosanti, F., Fimia, G.M., Stamm, S., Manley, J.L., and Sette, C. (2010). The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. EMBO J. *29*, 1235–1247.

Pellizzoni, L., Baccon, J., Charroux, B., and Dreyfuss, G. (2001). The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. Curr. Biol. *11*, 1079–1088.

Pfeifer, T., Buchebner, M., Chandak, P.G., Patankar, J., Kratzer, A., Obrowsky, S., Rechberger, G.N., Kadam, R.S., Kompella, U.B., Kostner, G.M., et al. (2011). Synthetic LXR agonist suppresses endogenous cholesterol biosynthesis and efficiently lowers plasma cholesterol. Curr. Pharm. Biotechnol. *12*, 285–292.

Pfrieger, F.W. (2003). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *60*, 1158–1171.

Pires, V.B., Simões, R., Mamchaoui, K., Carvalho, C., and Carmo-Fonseca, M. (2017). Short (16-mer) locked nucleic acid splice-switching oligonucleotides restore dystrophin production in Duchenne Muscular Dystrophy myotubes. PloS One *12*, e0181065.

Prager, D., Li, H.L., Asa, S., and Melmed, S. (1994). Dominant negative inhibition of tumorigenesis in vivo by human insulin-like growth factor I receptor mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 2181–2185.

Prior, T.W., Krainer, A.R., Hua, Y., Swoboda, K.J., Snyder, P.C., Bridgeman, S.J., Burghes, A.H.M., and Kissel, J.T. (2009). A Positive Modifier of Spinal Muscular Atrophy in the SMN2 Gene. Am. J. Hum. Genet. *85*, 408–413.

Quan, G., Xie, C., Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2003). Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. Brain Res. Dev. Brain Res. *146*, 87–98.

Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. Proc. Natl. Acad. Sci. *104*, 6511–6518.

Radhakrishnan, A., Goldstein, J.L., McDonald, J.G., and Brown, M.S. (2008). Switch-like Control of SREBP-2 Transport Triggered by Small Changes in ER Cholesterol: A Delicate Balance. Cell Metab. *8*, 512–521.

Rantham Prabhakara, J.P., Feist, G., Thomasson, S., Thompson, A., Schommer, E., and Ghribi, O. (2008). Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on tyrosine hydroxylase and alpha-synuclein in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. J. Neurochem. *107*, 1722–1729.

Renvoisé, B., Khoobarry, K., Gendron, M.-C., Cibert, C., Viollet, L., and Lefebvre, S. (2006). Distinct domains of the spinal muscular atrophy protein SMN are required for targeting to Cajal bodies in mammalian cells. J. Cell Sci. *119*, 680–692.

Renvoisé, B., Quérol, G., Verrier, E.R., Burlet, P., and Lefebvre, S. (2012). A role for protein phosphatase PP1γ in SMN complex formation and subnuclear localization to Cajal bodies. J. Cell Sci. *125*, 2862–2874.

Rodríguez-Acebes, S., de la Cueva, P., Fernández-Hernando, C., Ferruelo, A.J., Lasunción, M.A., Rawson, R.B., Martínez-Botas, J., and Gómez-Coronado, D. (2009). Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta24-reductase-deficient cell line. Biochem. J. *420*, 305–315.

Rommel, C., Clarke, B.A., Zimmermann, S., Nuñez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (1999). Differentiation Stage-Specific Inhibition of the Raf-MEK-ERK Pathway by Akt. Science *286*, 1738–1741.

Rosenbaum, A.I., and Maxfield, F.R. (2011). Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and potential therapeutic approaches. J. Neurochem. *116*, 789–795.

Rossoll, W., Kröning, A.-K., Ohndorf, U.-M., Steegborn, C., Jablonka, S., and Sendtner, M. (2002). Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? Hum. Mol. Genet. *11*, 93–105.

Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kröning, A.-K., Karle, K., Monani, U.R., and Sendtner, M. (2003). Smn, the spinal muscular atrophy–determining gene product, modulates axon growth and localization of β-actin mRNA in growth cones of motoneurons. J. Cell Biol. *163*, 801–812.

Roth, G., Kotzka, J., Kremer, L., Lehr, S., Lohaus, C., Meyer, H.E., Krone, W., and Müller-Wieland, D. (2000). MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro. J. Biol. Chem. *275*, 33302–33307.

Sabra, M., Texier, P., Maalouf, J.E., and Lomonte, P. (2013). The Tudor protein survival motor neuron (SMN) is a chromatin-binding protein that interacts with methylated lysine 79 of histone H3. J Cell Sci *126*, 3664–3677.

Saito, M., Benson, E.P., Saito, M., and Rosenberg, A. (1987). Metabolism of cholesterol and triacylglycerol in cultured chick neuronal cells, glial cells, and fibroblasts: accumulation of esterified cholesterol in serum-free culture. J. Neurosci. Res. *18*, 319–325.

Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y.K., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. J. Biol. Chem. *272*, 20213–20221.

Salani, B., Passalacqua, M., Maffioli, S., Briatore, L., Hamoudane, M., Contini, P., Cordera, R., and Maggi, D. (2010). IGF-IR

internalizes with Caveolin-1 and PTRF/Cavin in HaCat cells. PloS One *5*, e14157.

Samara, A., Galbiati, M., Luciani, P., Deledda, C., Messi, E., Peri, A., and Maggi, R. (2014). Altered expression of 3-betahydroxysterol delta-24-reductase/selective Alzheimer's disease indicator-1 gene in Huntington's disease models. J. Endocrinol. Invest. *37*, 729–737.

Sandoval-Hernández, A.G., Buitrago, L., Moreno, H., Cardona-Gómez, G.P., and Arboleda, G. (2015). Role of Liver X Receptor in AD Pathophysiology. PloS One *10*, e0145467.

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.

Sasaoka, T., Ishiki, M., Sawa, T., Ishihara, H., Takata, Y., Imamura, T., Usui, I., Olefsky, J.M., and Kobayashi, M. (1996). Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways. Endocrinology *137*, 4427–4434.

Sato, Y., Suzuki, I., Nakamura, T., Bernier, F., Aoshima, K., and Oda, Y. (2012). Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology. J. Lipid Res. *53*, 567–576.

Scheinowitz, M., Kessler-Icekson, G., Freimann, S., Zimmermann, R., Schaper, W., Golomb, E., Savion, N., and Eldar, M. (2003). Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression. Growth Horm. IGF Res. Off. J. Growth Horm. Res. Soc. Int. IGF Res. Soc. *13*, 19–25.

Schrank, B., Götz, R., Gunnersen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K.V., Smith, A.G., and Sendtner, M. (1997). Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 9920–9925.

Schulman, I.G. (2017). Liver X receptors link lipid metabolism and inflammation. FEBS Lett. *591*, 2978–2991.

Schweinzer, C., Kober, A., Lang, I., Etschmaier, K., Scholler, M., Kresse, A., Sattler, W., and Panzenboeck, U. (2011). Processing of endogenous AβPP in blood-brain barrier endothelial cells is modulated by liver-X receptor agonists and altered cellular cholesterol homeostasis. J. Alzheimers Dis. JAD *27*, 341–360.

Sen, A., Dimlich, D.N., Guruharsha, K.G., Kankel, M.W., Hori, K., Yokokura, T., Brachat, S., Richardson, D., Loureiro, J., Sivasankaran, R., et al. (2013). Genetic circuitry of Survival motor neuron, the gene underlying spinal muscular atrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. *110*, E2371–E2380.

Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S., and Suetsugu, S. (2011). Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. J Cell Sci *124*, 2032–2040.

Seo, J., Singh, N.N., Ottesen, E.W., Lee, B.M., and Singh, R.N. (2016). A novel human-specific splice isoform alters the critical C-terminus of Survival Motor Neuron protein. Sci. Rep. *6*, srep30778.

Seto, D., Zheng, W.-H., McNicoll, A., Collier, B., Quirion, R., and Kar, S. (2002). Insulin-like growth factor-I inhibits endogenous acetylcholine release from the rat hippocampal formation: possible involvement of GABA in mediating the effects. Neuroscience *115*, 603–612.

Setola, V., Terao, M., Locatelli, D., Bassanini, S., Garattini, E., and Battaglia, G. (2007). Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 1959–1964.

Shabanpoor, F., McClorey, G., Saleh, A.F., Järver, P., Wood, M.J.A., and Gait, M.J. (2015). Bi-specific splice-switching PMO oligonucleotides conjugated via a single peptide active in a mouse model of Duchenne

muscular dystrophy. Nucleic Acids Res. *43*, 29–39.

Shafey, D., Boyer, J.G., Bhanot, K., and Kothary, R. (2010). Identification of Novel Interacting Protein Partners of SMN Using Tandem Affinity Purification. J. Proteome Res. *9*, 1659–1669.

Shi, Q., Hoffman, B., and Liu, Q. (2016). PI3K-Akt signaling pathway upregulates hepatitis C virus RNA translation through the activation of SREBPs. Virology *490*, 99–108.

Shimano, H., Horton, J.D., Hammer, R.E., Shimomura, I., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1996). Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. J. Clin. Invest. *98*, 1575–1584.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *1*, 31–39.

Singh, R.N., Howell, M.D., Ottesen, E.W., and Singh, N.N. (2017). Diverse role of survival motor neuron protein. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech. *1860*, 299–315.

Solier, S., Barb, J., Zeeberg, B.R., Varma, S., Ryan, M.C., Kohn, K.W., Weinstein, J.N., Munson, P.J., and Pommier, Y. (2010). Genome-wide analysis of novel splice variants induced by topoisomerase I poisoning shows preferential occurrence in genes encoding splicing factors. Cancer Res. *70*, 8055–8065.

Spann, N.J., Garmire, L.X., McDonald, J.G., Myers, D.S., Milne, S.B., Shibata, N., Reichart, D., Fox, J.N., Shaked, I., Heudobler, D., et al. (2012). Regulated Accumulation of Desmosterol Integrates Macrophage Lipid Metabolism and Inflammatory Responses. Cell *151*, 138–152.

Strippoli, R., Loureiro, J., Moreno, V., Benedicto, I., Lozano, M.L.P., Barreiro, O., Pellinen, T., Minguet, S., Foronda, M., Osteso, M.T., et al. (2015). Caveolin-1 deficiency induces a MEK-ERK1/2-Snail-1-dependent epithelial-mesenchymal transition and fibrosis during peritoneal dialysis. EMBO Mol. Med. *7*, 357.

Sumner, C.J. (2007). Molecular Mechanisms of Spinal Muscular Atrophy. J. Child Neurol. *22*, 979–989.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell *126*, 663–676.

Tangsrud, S.E., and Halvorsen, S. (1988). Child neuromuscular disease in southern Norway. Prevalence, age and distribution of diagnosis with special reference to “non-Duchenne muscular dystrophy.” Clin. Genet. *34*, 145–152.

Tice, C.M., Noto, P.B., Fan, K.Y., Zhuang, L., Lala, D.S., and Singh, S.B. (2014). The Medicinal Chemistry of Liver X Receptor (LXR) Modulators. J. Med. Chem. *57*, 7182–7205.

Ting, J.P.-Y., Lovering, R.C., Alnemri, E.S.P.D., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., et al. (2008). The NLR gene family: An official nomenclature. Immunity *28*, 285–287.

Tizzano, E.F., Cabot, C., and Baiget, M. (1998). Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of spinal muscular atrophy. Am. J. Pathol. *153*, 355–361.

Tokuda, T., Calero, M., Matsubara, E., Vidal, R., Kumar, A., Permanne, B., Zlokovic, B., Smith, J.D., Ladu, M.J., Rostagno, A., et al. (2000). Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer’s amyloid beta peptides. Biochem. J. *348 Pt 2*, 359–365.

del Toro, D., Xifró, X., Pol, A., Humbert, S., Saudou, F., Canals, J.M., and Alberch, J. (2010). Altered cholesterol homeostasis contributes to enhanced excitotoxicity in Huntington’s disease. J. Neurochem. *115*, 153–167.

Tsai, L.-K., Chen, Y.-C., Cheng, W.-C., Ting, C.-H., Dodge, J.C., Hwu, W.-L., Cheng, S.H., and Passini, M.A. (2012). IGF-1 delivery to CNS attenuates motor neuron cell death but does not improve motor function in type III SMA mice. Neurobiol. Dis. *45*, 272–279.

Tsai, L.-K., Chen, C.-L., Ting, C.-H., Lin-Chao, S., Hwu, W.-L., Dodge, J.C., Passini, M.A., and Cheng, S.H. (2014). Systemic administration of a recombinant AAV1 vector encoding IGF-1 improves disease manifestations in SMA mice. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *22*, 1450–1459.

Valenza, M., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Fenu, S., Jamot, L., Strand, A., Tarditi, A., Woodman, B., Racchi, M., et al. (2005). Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 9932–9939.

Valenza, M., Carroll, J.B., Leoni, V., Bertram, L.N., Björkhem, I., Singaraja, R.R., Di Donato, S., Lutjohann, D., Hayden, M.R., and Cattaneo, E. (2007). Cholesterol biosynthesis pathway is disturbed in YAC128 mice and is modulated by huntingtin mutation. Hum. Mol. Genet. *16*, 2187–2198.

Valenza, M., Marullo, M., Di Paolo, E., Cesana, E., Zuccato, C., Biella, G., and Cattaneo, E. (2015). Disruption of astrocyte-neuron cholesterol cross talk affects neuronal function in Huntington's disease. Cell Death Differ. *22*, 690–702.

Verhaart, I.E.C., Robertson, A., Wilson, I.J., Aartsma-Rus, A., Cameron, S., Jones, C.C., Cook, S.F., and Lochmüller, H. (2017). Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q–linked spinal muscular atrophy – a literature review. Orphanet J. Rare Dis. *12*.

Wan, L., and Dreyfuss, G. (2017). Splicing-Correcting Therapy for SMA. Cell *170*, 5.

Wang, F., Gu, H., and Zhang, D. (2014). Caveolin-1 and ATP binding cassette transporter A1 and G1-mediated cholesterol efflux. Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets. *14*, 142–148.

Wang, Y., Rogers, P.M., Stayrook, K.R., Su, C., Varga, G., Shen, Q., Nagpal, S., and Burris, T.P. (2008). The Selective Alzheimer's Disease Indicator-1 Gene (Seladin-1/DHCR24) Is a Liver X Receptor Target Gene. Mol. Pharmacol. *74*, 1716–1721.

Waterham, H.R., Koster, J., Romeijn, G.J., Hennekam, R.C.M., Vreken, P., Andersson, H.C., FitzPatrick, D.R., Kelley, R.I., and Wanders, R.J.A. (2001). Mutations in the 3β-Hydroxysterol Δ24-Reductase Gene Cause Desmosterolosis, an Autosomal Recessive Disorder of Cholesterol Biosynthesis. Am. J. Hum. Genet. *69*, 685–694.

Wee, C.D., Kong, L., and Sumner, C.J. (2010). The genetics of spinal muscular atrophies. Curr. Opin. Neurol. *23*, 450–458.

Werdnig, G. (1971). Two early infantile hereditary cases of progressive muscular atrophy simulating dystrophy, but on a neural basis. 1891. Arch. Neurol. *25*, 276–278.

Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J.A., and Jessell, T.M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. Cell *110*, 385–397.

Wisniewski, T., Newman, K., and Javitt, N.B. (2013). Alzheimer's disease: brain desmosterol levels. J. Alzheimers Dis. JAD *33*, 881–888.

Wu, C., Butz, S., Ying, Y., and Anderson, R.G. (1997). Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. J. Biol. Chem. *272*, 3554–3559.

Wu, C., Miloslavaskaya, I., Demontis, S., Maestro, R., and Galaktionov, K. (2004). Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. Nature *432*, 640.

Xu, C., Chen, X., Grzeschik, S.M., Ganta, M., and Wang, C.H. (2011). Hydroxyurea enhances SMN2 gene expression through nitric oxide release. Neurogenetics *12*, 19–24.

Yadav, A., Kalita, A., Dhillon, S., and Banerjee, K. (2005). JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3. J. Biol. Chem. *280*, 31830–31840.

Yang, B., Oo, T.N., and Rizzo, V. (2006a). Lipid rafts mediate H2O2 prosurvival effects in cultured endothelial cells. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *20*, 1501–1503.

Yang, C., McDonald, J.G., Patel, A., Zhang, Y., Umetani, M., Xu, F., Westover, E.J., Covey, D.F., Mangelsdorf, D.J., Cohen, J.C., et al. (2006b). Sterol Intermediates from Cholesterol Biosynthetic Pathway as Liver X Receptor Ligands. J. Biol. Chem. *281*, 27816–27826.

Yang, S.H., Vickers, E., Brehm, A., Kouzarides, T., and Sharrocks, A.D. (2001). Temporal recruitment of the mSin3A-histone deacetylase corepressor complex to the ETS domain transcription factor Elk-1. Mol. Cell. Biol. *21*, 2802–2814.

Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. Cell *110*, 489–500.

d'Ydewalle, C., Ramos, D.M., Pyles, N.J., Ng, S.-Y., Gorz, M., Pilato, C.M., Ling, K., Kong, L., Ward, A.J., Rubin, L.L., et al. (2017). The Antisense Transcript SMN-AS1 Regulates SMN Expression and Is a Novel Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy. Neuron *93*, 66–79.

Yoneyama, Y., Matsuo, M., Take, K., Kabuta, T., Chida, K., Hakuno, F., and Takahashi, S.-I. (2013). The AP-1 complex regulates intracellular localization of insulin receptor substrate 1, which is required for insulin-like growth factor I-dependent cell proliferation. Mol. Cell. Biol. *33*, 1991–2003.

Young, P.J., Man, N. thi, Lorson, C.L., Le, T.T., Androphy, E.J., Burghes, A.H.M., and Morris, G.E. (2000a). The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding. Hum. Mol. Genet. *9*, 2869–2877.

Young, P.J., Le, T.T., thi Man, N., Burghes, A.H., and Morris, G.E. (2000b). The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. Exp. Cell Res. *256*, 365–374.

Young, P.J., Le, T.T., Dunckley, M., thi Man, N., Burghes, A.H.M., and Morris, G.E. (2001). Nuclear Gems and Cajal (Coiled) Bodies in Fetal Tissues: Nucleolar Distribution of the Spinal Muscular Atrophy Protein, SMN. Exp. Cell Res. *265*, 252–261.

Young, P.J., Day, P.M., Zhou, J., Androphy, E.J., Morris, G.E., and Lorson, C.L. (2002). A Direct Interaction between the Survival Motor Neuron Protein and p53 and Its Relationship to Spinal Muscular Atrophy. J. Biol. Chem. *277*, 2852–2859.

Yu, C.-Y., Theusch, E., Lo, K., Mangravite, L.M., Naidoo, D., Kutilova, M., and Medina, M.W. (2014). HNRNPA1 regulates HMGCR alternative splicing and modulates cellular cholesterol metabolism. Hum. Mol. Genet. *23*, 319–332.

Zerenturk, E.J., Sharpe, L.J., and Brown, A.J. (2012a). Sterols regulate 3β-hydroxysterol Δ24-reductase (DHCR24) via dual sterol regulatory elements: Cooperative induction of key enzymes in lipid synthesis by Sterol Regulatory Element Binding Proteins. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids *1821*, 1350–1360.

Zerenturk, E.J., Kristiana, I., Gill, S., and Brown, A.J. (2012b). The endogenous regulator 24(S),25-epoxycholesterol inhibits cholesterol synthesis at DHCR24 (Seladin-1). Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids *1821*, 1269–1277.

Zhang, H., Xing, L., Singer, R.H., and Bassell, G.J. (2007). QNQKE targeting motif for the SMN-Gemin multiprotein complexin neurons. J. Neurosci. Res. *85*, 2657–2667.

Zhang, Z., Pinto, A.M., Wan, L., Wang, W., Berg, M.G., Oliva, I., Singh, L.N., Dengler, C., Wei, Z., and Dreyfuss, G. (2013). Dysregulation of synaptogenesis genes antecedes motor neuron pathology in spinal muscular atrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. *110*, 19348–19353.

Zhu, H., Tucker, H.M., Grear, K.E., Simpson, J.F., Manning, A.K., Cupples, L.A., and Estus, S. (2007). A common polymorphism decreases low-density lipoprotein receptor exon 12 splicing efficiency and associates with increased cholesterol. Hum. Mol. Genet. *16*, 1765–1772.

Annexes

1. Liste des abbreviations utilisées dans le manuscrit

24-OHC: 24S-hydroxycholesterol

25-OHC: 25-hydrocholesterol

27-OHC: 27-hydroxycholesterol

AAV: adeno-associated virus

ABCA1: ATP binding cassette A1

ACAT-1: acetyl-coa acetyltransferase

ADN : acide desoxyribonucleique

ApoE: apolipoprotein E

APP: amyloid precusor protein

AR: androgen receptor

ARN : acide ribonucleique

ASI: amyotrophie spinale infantile

ASO: antisens oligonucleotide

Aβ: peptide amyloïde

Bcl-2: b-cell lymphoma 2

BHE: barrière hématoencéphalique

BMP: bone morphogenic proteins

Cav: caveolin

CB: cajal bodies

ChAT: choline acetyltransferase

CREB: cAMP response element binding protein

DHCR24: 3β-hydroxysterol Δ24-reductase

ELK: ETS domain containing protein

ERAD: endoplasmic reticulum associated protein degradation

ERK: extracellular signal regulated kinases

ESE: exonic splicing enhancer

ESS: exonic splicing silencer

FAD: flavine adenine dunucleotide dependant

FDA: food and drug administration

HDAC: histone deacetylase

HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase

HPRT: hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase

IGF: insulin-like growth factor

IGFBP: insulin-like growth factor binding protein

iPSCs : induced pluripotent stem cells

IRS1: insulin receptor substrate 1

LCR: liquide céphalorachidien

LDL: low density lipoprotein

LRP : low density lipoprotein receptor

LXR: Liver X Receptor

MVD: mevalonate dehydrogenase

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NAIP: NLR family apoptosis inhibitory protein

NMDA: N-methyl-D-aspartate

NSDHL: NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PRC2: Polycom repressive complex-2

RBP: RNA binding protein

RE: reticulum endoplasmique

RXR: Retinoic X Receptor

SELADIN-1: selective alzheimer disease indicator 1

SHC: src homology 2 domain containing

SLA : sclérose latérale amyotrophique

SMA: spinal muscular atrophy

SMN: survival of motor neuron

SNC: système nerveux central

snRNP: small nuclear ribonucleoprotein

SQLE: squalene synthase

SRE: sterol regulatory element

SREBP: sterol regulatory element-binding protein

SSD: sterol sensing domain

SSO: splice switching oligonucleotide

TGF: transforming growth factor

2. Liste des publications

1. *IGF-1R Reduction Triggers Neuroprotective Signaling Pathways in Spinal Muscular Atrophy Mice.*

Biondi O, Branchu J, Ben Salah A, **Houdebine L**, Bertin L, Chali F, Desseille C, Weill L, Sanchez G, Lancelin C, Aïd S, Lopes P, Pariset C, Lécolle S, Côté J, Holzenberger M, Chanoine C, Massaad C, Charbonnier F : J. Neurosci, 2015

2. *Long-term exercise-specific neuroprotection in Spinal Muscular Atrophy-like mice.*

Chali F, Desseille C, **Houdebine L**, Benoit E, Rouquet T, Bariohay B, Lopes P, Branchu J, Gaspera BD, Pariset C, Chanoine C, Charbonnier F, Biondi O : J. Physiol, 2016

3. *Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis.*

Houdebine L, Gallelli CA, Rastelli M, Sampathkumar NK, Grenier J : Chem Phys Lipids, 2017

4. *Specific physical exercise improves energetic metabolism in the skeletal muscle of Amyotrophic-Lateral-Sclerosis mice.*

Desseille C, Deforges S, Biondi O, **Houdebine L**, d'Amico D, Lamaziere A, Caradeux C, Bertho G, Bruneteau G, Weill L, Bastin J, Djouadi F, Salachas F, Lopes P, Chanoine C, Massaad C, Charbonnier F : Frontiers, 2017

5. *24-dehydrocholesterol reductase DHCR24/Seladin-1 is a therapeutic target for spinal muscular atrophy*

Houdebine L, Biondi O, Weill L, Lamazière A, D'Amico D, Della Gaspera B, Quijano-Roy S, Lopes P, Massaad C, Charbonnier F : Soumis, 2017

3. Article 3

Long-term exercise-specific neuroprotection in spinal muscular atrophy-like mice

Farah Chali[1], Céline Desseille[1], **Léo Houdebine**[1], Evelyne Benoit[3], Thaïs Rouquet[4], Bruno Bariohay[4], Philippe Lopes[1,2], Julien Branchu[1], Bruno Della Gaspera[1], Claude Pariset[1], Christophe Chanoine[1], Frédéric Charbonnier[1] et Olivier Biondi[1]

1 Université Paris Descartes and INSERM UMRS 1124, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France
2 Université d'Evry-val-d'Essonne, Bd F. Mitterrand, 91000 Evry, France
3 Institut des Neurosciences Paris-Saclay UMR 9197, CNRS, Bˆat 32-33, and Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (DSV/iBiTec-S/SIMOPRO),
CEA de Saclay, Bât. 152, 91190 Gif-sur-Yvette, France
4 BIOMEOSTASIS, Nutritional behavior and metabolic disorders, FST St Jérôme, Service B52, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397Marseille, France

Publié le 27 Février 2017 dans The Journal of Physiology 594.7 (2016) pp 1931–1952

J Physiol 594.7 (2016) pp 1931–1952

JPn Neuroscience
The Journal of Physiology

Long-term exercise-specific neuroprotection in spinal muscular atrophy-like mice

Farah Chali[1], Céline Desseille[1], Léo Houdebine[1], Evelyne Benoit[3], Thaïs Rouquet[4], Bruno Bariohay[4], Philippe Lopes[1,2], Julien Branchu[1], Bruno Della Gaspera[1], Claude Pariset[1], Christophe Chanoine[1], Frédéric Charbonnier[1] and Olivier Biondi[1]

[1]*Université Paris Descartes and INSERM UMRS 1124, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France*
[2]*Université d'Evry-val-d'Essonne, Bd F. Mitterrand, 91000 Evry, France*
[3]*Institut des Neurosciences Paris-Saclay UMR 9197, CNRS, Bât 32-33, and Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (DSV/iBiTec-S/SIMOPRO), CEA de Saclay, Bât. 152, 91190 Gif-sur-Yvette, France*
[4]*BIOMEOSTASIS, Nutritional behavior and metabolic disorders, FST St Jérôme, Service B52, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille, France*

Key points

- The real impact of physical exercise parameters, i.e. intensity, type of contraction and solicited energetic metabolism, on neuroprotection in the specific context of neurodegeneration remains poorly explored.
- In this study behavioural, biochemical and cellular analyses were conducted to compare the effects of two different long-term exercise protocols, high intensity swimming and low intensity running, on motor units of a type 3 spinal muscular atrophy (SMA)-like mouse model.
- Our data revealed a preferential SMA-induced death of intermediate and fast motor neurons which was limited by the swimming protocol only, suggesting a close relationship between neuron-specific protection and their activation levels by specific exercise.
- The exercise-induced neuroprotection was independent of SMN protein expression and associated with specific metabolic and behavioural adaptations with notably a swimming-induced reduction of muscle fatigability.
- Our results provide new insight into the motor units' adaptations to different physical exercise parameters and will contribute to the design of new active physiotherapy protocols for patient care.

Abstract Spinal muscular atrophy (SMA) is a group of autosomal recessive neurodegenerative diseases differing in their clinical outcome, characterized by the specific loss of spinal motor neurons, caused by insufficient level of expression of the protein survival of motor neuron (SMN). No cure is at present available for SMA. While physical exercise might represent a promising approach for alleviating SMA symptoms, the lack of data dealing with the effects of different exercise types on diseased motor units still precludes the use of active physiotherapy in SMA patients. In the present study, we have evaluated the efficiency of two long-term physical exercise paradigms, based on either high intensity swimming or low intensity running, in alleviating SMA symptoms in a mild type 3 SMA-like mouse model. We found that 10 months' physical training induced significant benefits in terms of resistance to muscle damage, energetic metabolism, muscle fatigue and motor behaviour. Both exercise types significantly enhanced motor neuron survival, independently of SMN expression, leading to the maintenance of neuromuscular junctions and skeletal muscle phenotypes, particularly in the soleus, plantaris and tibialis of trained mice. Most importantly, both exercises significantly improved neuromuscular excitability properties. Further, all these training-induced benefits were quantitatively and qualitatively related to the specific characteristics of each exercise, suggesting that the related neuroprotection is strongly

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

DOI: 10.1113/JP271361

dependent on the specific activation of some motor neuron subpopulations. Taken together, the present data show significant long-term exercise benefits in type 3 SMA-like mice providing important clues for designing rehabilitation programmes in patients.

(Received 24 July 2015; accepted after revision 22 December 2015)
Corresponding author O. Biondi: Université Paris Descartes and INSERM UMR_S 1124, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France. Email: olivier.biondi@parisdescartes.fr

Abbreviations ChAT, choline acetyltransferase; Chodl, chondrolectin; CK, creatine kinase; CMAP, compound muscle action potential; ERRβ, oestrogen-related receptor β; MyHC, myosin heavy chain; NMJ, neuromuscular junction; SMA, spinal muscular atrophy; SMN, survival of motor neuron; TBS, Tris-buffered solution.

Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA), the leading genetic cause of death in childhood, is a neurodegenerative disorder characterized by spinal motor neuron degeneration, leading to progressive muscle weakness and atrophy (Russman *et al.* 1983). No cure for SMA is at present available. Patient care is usually provided through supportive ventilation, feeding assistance and passive limb and thoracic physiotherapy (Bladen *et al.* 2014). Deletion or mutation of the telomeric copy of the *Survival-of-Motor Neuron* gene *SMN1* is responsible for SMA (Lefebvre *et al.* 1995). The inverted centromeric copy of the *SMN1* gene, *SMN2*, produces a majority of transcripts lacking exon 7, resulting in the expression of an unstable survival of motor neuron (SMN) protein. *SMN2* is thus unable to fully compensate for the *SMN1* mutation (Lorson *et al.* 1998; Lorson & Androphy, 2000). Consequently, the number of *SMN2* copies in the genome modulates the clinical heterogeneity of the disease. Three main types of SMA are commonly distinguished according to the age of onset and the severity of motor capacity impairments (Harding & Thomas, 1980), the severe type 1 SMA (Werdnig–Hoffman disease), the intermediate type 2 SMA, and the mild type 3 SMA (Kugelberg–Wellander disease).

Several studies have suggested that motor unit maturation was severely impaired in the severe type of SMA-like mice, providing a tentative explanation for the motor neuron-specific sensitivity to a loss of the ubiquitously expressed SMN protein (Biondi *et al.* 2008; Kariya *et al.* 2008; Kong *et al.* 2009). We have reported that a 5-day training programme was sufficient to promote SMN expression in the spinal cord of severe type SMA-like mice, resulting in the improvement of the motor unit post-natal maturation and motor neuron survival (Grondard *et al.* 2005; Biondi *et al.* 2008). Taken together, these data support the hypothesis of a link between neuronal activity, motor unit maturation, SMN expression and neuroprotection. However, no data are available in the case of less severe SMA, which is characterized by a late disease onset (Tsai *et al.* 2006), therefore raising questions about the potential role of motor unit maturation in the SMA-induced neurodegeneration in adulthood on the one hand, and the potential exercise-induced benefits in such a pathological context on the other.

Moreover, the potential benefits induced by long-term physical training in the case of SMA-induced late-onset and progressive neurodegeneration have never been investigated. Several investigations describing the effects of exercise in mouse models corresponding to different adulthood neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease (Tuon *et al.* 2012; Goes *et al.* 2014), Alzheimer's disease (Liu *et al.* 2013; Xu *et al.* 2013), and amyotrophic lateral sclerosis (Kirkinezos *et al.* 2003; Veldink *et al.* 2003; Liebetanz *et al.* 2004; Deforges *et al.* 2009) have globally indicated beneficial effects of physical exercise, but these are related to either the intrinsic parameters of the exercise or the nature of neuronal alterations. Indeed, physical exercise consists in different practices involving various motor, metabolic and physiological solicitations, including concentric *vs.* eccentric contractions, anaerobic *vs.* oxidative pathways, voluntary *vs.* forced and long-term *vs.* acute exercises. However the impact of these different exercise parameters has never been thoroughly investigated on diseased motor units, which limits the application of active physiotherapy for neurodegenerative disorders.

In the present study, we investigated the effects of two different exercises in adult type 3 SMA-like mice (Tsai *et al.* 2006) over 10 consecutive months, i.e. a high intensity and amplitude swimming-based training and a low intensity and amplitude running-based training (Grondard *et al.* 2008). We report compelling evidence of specific exercise-induced benefits for diseased adult motor units, at both the structural and the functional level.

Methods

Ethical approval

Animal handling and experimentation were performed in line with approved Institutional Animal Care and Use Committee protocols at the University of Paris Descartes and followed the national authority (Ministère de la Recherche et de la Technologie, France) guidelines for

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

the detention, use and the ethical treatment of laboratory animals based on European Union Directive 2010/63/EU.

Type 3 SMA-like mouse model

The knockout-transgenic type 3 SMA-like mice (FVB/NRj-*Smn*$^{\Delta 7/\Delta 7}$, *huSMN2*$^{+/+}$) derived from mice obtained from the Institute of Molecular Biology (Hsieh-Li *et al.* 2000) (Academia Sinica, Taipei, Taiwan) have been purified on the FVB/NRj genetic background (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) by backcross for more than 10 generations and were designated as 'SMA' ($n = 68$). The control mice (control; $n = 68$) were heterozygous knock-out for murin *Smn*, expressed homozygous human *SMN2* transgene (FVB/NRj-*Smn*$^{\Delta/\Delta 7}$, *huSMN2*$^{+/+}$). Only males were selected for experimentation to standardize the analyses, and all the experiments were performed in a blind systematic manner to minimize bias. From two to four animals were housed in each cage, with food and water *ad libitum*.

Physical training protocols and behavioural evaluation

Two-month-old mice were submitted either to running-based training on a speed-regulated treadmill at 13 m min^{-1}, or to swimming-based training in an adjustable-flow swimming pool at 5 l min^{-1} (Charbonnier and Soude, 2006, Patent FR 06 53772). Both exercises were performed for 20 min per day and 5 days a week for 10 consecutive months. Mice were initially subjected to a preliminary 2-week training period during which the speed of treadmill and the intensity of water flow were increased every day by 5% increment from 50% to the final speed. Sedentary control and SMA ($n = 28$) mice were placed in the pool without flow (14 SMA and 14 control mice) and floated at the water surface or on the treadmill without speed (14 SMA and 14 control mice). We formed four groups of trained mice, one running group of controls and one of SMA (Run control and Run SMA; $n = 12$ for each) and one swimming group of controls and one of SMA (Swim control and Swim SMA; $n = 12$ for each).

All groups of control and SMA mice were tested at 2, 3, 6, 9 and 12 months of age for motor capabilities through four different tests, i.e. a grip test for muscle resistance; grip strength for maximum muscle force; open-field for exploratory abilities; and a fatigue test for the measure of time before exhaustion in the swimming condition. Both a 48 h actimeter for spontaneous activity and a fatigue test for the measure of time before exhaustion in the running condition were applied to all groups of mice at 12 months of age only.

For the grip test, the time during which the animals were able to sustain their weight holding onto a metal rail suspended at 50 cm from a table was recorded with a maximum time at 720 s. Only the maximum value of five successive trials was recorded with at least a 10 min resting period between each try.

For the grip strength test, the strength was measured using a grip tensiometer (Bioseb, Vitrolles, France) according to the TREAT-NMD guidelines. Forelimb and four-limb traction strength tests were separately performed using a single thin metal rod and a thin metal grid, respectively, interfaced with a tensiometer. Mice gripped the metal rod with forelimbs or the metal grid with four limbs and the manipulator pulled it progressively by the tail along the instrument axis (following the manufacturer's protocol). Only the maximum value of five successive tries was retained as maximum force for each mouse, and the measurement was given in grams. The hindlimb grip strength was calculated by subtracting forelimb from four-limb grip measurements.

For the open-field test, the mice were tested individually in a wooden box measuring 50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 20 cm and divided into 25 equal squares of 10 cm. Squares adjacent to walls were referred to as the periphery and the nine remaining squares were referred to as the centre. The open field was washed after each session. A mouse was placed in a central square on the open field and allowed to move freely for 5 min. The number of peripheral and central square crossings was scored manually by the experimenter.

For the actimeter, both total locomotor activity and rearing behaviour were recorded for each mouse during two successive days using the commercially available Physiocage system (Panlab/Harvard apparatus, Cornella, Spain) and the software suite METABOLISM (V2.2.01, Panlab). Mice were singly housed in home cages placed over a sensor platform equipped with an extensiometric weight transducer and two infra-red (IR) sensor bars including 16 IR beams spaced by 15.6 mm to allow the detection of rearing behaviour. Values of locomotor activity (arbitrary units) and rearing events were acquired by the system every second. For each animal, the total locomotor activity and the number of rearing events were calculated as the sum of the recorded values obtained for 7.5 min-, 12 h- or 24 h-interval periods.

For the fatigue tests, based either in our adjustable-flow swimming pool or in a speed-regulated treadmill, mice were subjected to the maximum sustainable water flow or treadmill speed and the time during which animals were able to maintain this maximum intensity was recorded as well as the value of speed. In the swimming fatigue test, the maximum water flow was 6 l min^{-1} and in the running fatigue test, the maximum treadmill speed was 21 m min^{-1}.

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

Histological and immunohistochemical analysis

Mice were anaesthetized with 1% pentobarbital solution (6 μl g^{-1}) and were intracardially perfused first with 20 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and then with 30 ml of 4% paraformaldehyde (PFA).

For motor neuron analysis, the spinal cord was dissected, post-fixed in 4% PFA for 12 h and rinsed 2 times in PBS azide 0.01% buffer. The L1 to L5 lumbar region was isolated from spinal cord, embedded in 4% agarose type 1 and cut with a vibrating blade microtome (VT-1000S, Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) at 50 μm-thick cross sections. One out of every five sections (an average of 10 sections examined corresponding to about 200 motor neurons per animal, and about 1600 motor neurons per experimental point) was processed for immunohistochemical analysis. After 30 min at room temperature in a blocking solution (with 0.5% Tween-20, 0.5% Triton X-100 and 4% donkey serum in Tris buffer solution (TBS)), tissues sections were incubated in primary goat choline acetyltransferase (ChAT) (polyclonal goat anti-ChAT; 1:400; Chemicon, Inc., Temecula, CA, USA) and mouse oestrogen-related receptor β (ERRβ; human ERRβ/NR3A2 MAb, 1:500, R&D systems Europe, France) antibody for 3 days at 4°C and diluted in the blocking solution. Sections were then washed between each subsequent step with 0.5% Tween-20 and 0.5% Triton X-100 in TBS. Sections were subsequently incubated with secondary Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse (1:400; Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, UK) and Alexa Fluor® 568 donkey anti-goat (1:400; Jackson ImmunoResearch) for 1 h at room temperature. The sections were mounted in VectashielD® mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The staining specificity was checked by performing the incubation in the absence of the primary antibody.

For motor end-plate labelling, the soleus, plantaris and tibialis muscles were dissected and post-fixed 12 h in PFA 4%. Muscle fibres were dilacerated and stained for pre-synaptic motor nerve terminals using a mix of rabbit antibody directed against the 61 kDa isoform of neurofilament protein (NF-L; 1:1,000; AB9568, Millipore) and rabbit anti-synaptophysin (1:5; 80130, Life Technologies) and using Alexa Fluor 568-conjugated-α-bungarotoxin (4 mg ml^{-1} in PBS with 4% bovine serum albumin) for post-synaptic motor nerve terminals. The dilacerated myofibres were subsequently incubated with an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:400; Jackson ImmunoResearch) to reveal the pre-synaptic staining.

For histology and typology analysis, soleus, plantaris and tibialis muscles were dissected from anaesthetized animals with 1% pentobarbital solution (6 μl g^{-1}). All muscles were frozen in cold isopentane, maintained at −80°C on dry ice and cut in a cryostat (Leica) to give 10 μm-thick cross sections. Slices with muscle sections were either stained by histological haematoxylin–eosine (H&E), dehydrated via an alcohol gradient and then mounted with Eukitt (VWR International, Strasbourg, France) or fixed with acetone and incubated with mouse antibodies raised against mouse myosin heavy chains (MyHC): slow type I (NCL-MyHCs), all fast type II (NCL-MyHCf) (Leica Microsystems, France) and intermediate type IIa (A4.74) diluted at 1:20 in 0.5% Tween 20 PBS. The secondary antibodies used were goat anti-mouse-specific antibodies conjugated with Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch). Sections were visualized as described above. For each mouse, three sections of each muscle were studied. The percentages of fast IIx and IIb fibres were determined as the difference between the total number of type II and type IIa fibres.

All counts were performed using ImageJ software v1.47 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Colour images were tinted using ImageJ software v1.47, and identical brightness, contrast and colour balance adjustments were applied to all groups.

In situ hybridization

Floating lumbar spinal cord sections were dehydrated in a graded series of methanol washes before storage in 100% methanol at −20°C. Sections were rehydrated by successive washes in methanol and 0.1% Tween-20 PBS (PBT) ending up in 100% PBT. Sections were treated with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). After additional washes in PBT, sections were digested with 20 μg ml^{-1} proteinase K (Invitrogen). The reaction was stopped by washing in a large volume of PBT. The sections were then postfixed in 4% formaldehyde before preincubation in hybridization buffer (50% formamide, 5× SSC, pH 4.5, 1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 50 μg ml^{-1} tRNA (Sigma-Aldrich), 50 μg ml^{-1} heparin (Sigma-Aldrich) in PBT). Then, *chondrolectin* (*Chodl*) probe, as previously described (Enjin *et al.* 2010) (1914-2530, NM_0139134.3), at 300 ng ml^{-1} was heat-denatured in hybridization buffer. Hybridization was performed overnight (14–16 h) at 65°C. Unbound probe was removed by sequential washes of buffer 1 (50% formamide, 5× SSC, pH 4.5 and 0.02% SDS in PBT) followed by buffer 2 (50% formamide, 2× SSC, pH 4.5, and PBT) at 65°C. The sections were further washed in 0.1% Tween-20 TBS (TBST) before incubation in 1% blocking reagent (Roche Diagnostics Scandinavia, Stockholm, Sweden) together with 1:5000 diluted anti-digoxigenin alkaline phosphatase-conjugated antibody (Roche Diagnostics Scandinavia) overnight at 4°C. Unbound antibody was removed by sequential washes with 2 mM levamisole (GTF Fisher, Stockholm, Sweden) in TBST followed by washes with 2 mM levamisole in NTMT (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl2 and 0.1% Tween-20). Sections were

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

developed in BM purple AP substrate (Roche Diagnostics Scandinavia).

Microscopy

All immunofluorescence images were collected with a CMOS camera (ORCA Flash 2.8, Hamamatsu Photonics France, Massy, France) mounted on a Zeiss AxioObserver microscope (Z1, Carl Zeiss SAS, Le Pecq, France) using the ZEN 2012 software (Carl Zeiss SAS) with 100 (×10 Zeiss Plan NeoFluar NA 0.3), 200 (×20 Zeiss EC-Plan-Apo NA 0.8) and 630 (×63 Zeiss Plan-Apo Oil NA 1.4) magnifications.

Serum lactate and creatine kinase measurements

Mice were anaesthetized with 1% pentobarbital solution (6 μl g^{-1}) diluted in 0.9% saline buffer by intraperitoneal injection. An 800 μl blood sample was taken from the right ventricle with a 1 ml syringe mounted with a 22-gauge needle, both coated with heparin (5000 UI ml^{-1}, Pan Pharma Luitré, France). The blood sample was centrifuged at 1500 *g* for 10 min at 4°C. Obtained serum was then frozen, stored at −80°C, and used within 1 month. Serum creatine kinase (CK) activity was quantified in duplicate using the EnzyChrom CK Assay Kit (ECPK-100; BioAssay Systems, Hayward, CA, USA). For each point, a 10 μl sample of serum was incubated at 22°C in 100 μl of reactive buffer following the manufacturer's protocol in a 96-well plate. The plate was read on a microplate spectrometer (SpectraMax 340PC384; Molecular Devices, St Grégoire, France) at 340 nm wavelength after 20 and 40 min of incubation. CK activity was evaluated following the manufacturer's protocol and given in units per litre (U l^{-1}). Lactate levels were quantified in duplicate using a lactate assay kit (K607-100; BioVision, Milpitas, CA, USA). For each point, 2 μl samples of serum were incubated at 22°C in 50 μl of buffer and 50 μl of reaction mix following the manufacturer's protocol in a 96-well plate. The plate was read on the same microplate spectrometer at 570 nm wavelength after 30 min of incubation. Lactate level was given in nanomoles per microlitre (nmol μl^{-1}).

Protein and Western blot analysis

The ventral parts of frozen spinal cords were maintained at −20°C and were selectively dissected by razor blade. A furrow still appeared in the middle of the ventral part and dorsal root ganglia were visible on the dorsal part of the spinal cord. Ventral lumbar spinal cord samples (4–10 mg) were homogenized in 100 μl per 5 mg tissues in the presence of ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 10 mM NaF, 1× protease inhibitor (Roche, Basel, Switzerland), 1% phosphatase inhibitor (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)). Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 min, 17,000 *g*) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Protein samples (40 μg) were submitted to 12.5% SDS-PAGE electrophoresis (1.5 M Tris pH 8.3, 12.5% acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% ammonium persulfate, 0.06% tetramethylethylenediamine). The separated proteins were transferred on PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories) according to the Towbin protocol (Towbin *et al.* 1984). Equal loading of samples was checked by Ponceau dye staining of the transferred gels. Western blot analysis was performed on membranes overnight at 4°C in 4% BSA, 0.05% Tween 20, TBS pH 7.4. The primary antibody monoclonal mouse anti-SMN (1: 5.000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) was incubated overnight at 4°C in the above blocking medium. Membranes were rinsed in 0.1% Tween 20 in TBS for 3 × 10 min at room temperature and then incubated in horseradish peroxydase-conjugated goat secondary antibody directed against mouse immunoglobulins (1:5000; Bio-Rad Laboratories) in 0.1 % Tween 20 in TBS for 1 h at room temperature. Bound antibody complexes were developed using the enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham Biotech, Saclay, France) and exposed to hyperfilm ECL-plus X ray film (GE Healthcare, France). Films were quantified with ImageJ v1.47.

Electrophysiological recordings from the mouse neuromuscular system *in vivo*

Multimodal evaluation of excitability properties of the neuromuscular system of control and SMA mice was performed *in vivo* by means of a minimally invasive electrophysiological method, using the Qtrac© software written by Prof. Hugh Bostock (Institute of Neurology, London, UK), as detailed previously (Boerio *et al.* 2009). Experiments were performed on mice anaesthetized by inhalation of 1.5% of isoflurane (AErrane®, Baxter SA, Lessines, Belgium) in air, and the experimental protocol has been approved by the French Departmental Direction of Animal Protection (no. A91-453 to E.B.).

Briefly, an anaesthetized mouse was placed on a heating pad to maintain body temperature between 35.4 and 35.6°C throughout the experiment (measured using a rectal probe) to avoid non-specific modifications of the measured excitability parameters. Electrical stimulation was delivered to the tibial branch of sciatic motor nerve, by means of surface electrodes, and the compound muscle action potential (CMAP) was recorded using needle electrodes inserted into the plantar muscle. The mouse was submitted to one session of excitability measurements (TRONDE protocol) which consisted of five different tests (stimulus–response relationship (C1), strength–duration relationship (C2), recovery cycle

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

(C3), current–threshold relationship (C4) and threshold electrotonus (C5)) from which more than 30 parameters were determined (numbered 1–38) and analysed (Kiernan & Bostock, 2000; Nodera & Kaji, 2006; Vianello *et al.* 2014).

C1: the stimulus–response relationship gives information on the neuromuscular excitability state. It consisted of measuring the CMAP amplitude as a function of the intensity of a stimulation (of 1 ms duration) to evaluate notably both the CMAP maximal amplitude and the stimulation intensity that had to be applied to evoke a CMAP of 50% maximal amplitude.

C2: the strength–duration relationship reflects the axonal resting potential at the nodal membrane, giving information about the density and the functioning of persistent sodium channels. It was derived from the intensity–duration curve which determines the intensity in relation to the duration (0.2–1.0 ms) of a stimulus necessary to evoke a given amplitude of CMAP, in order to provide (1) the rheobase (i.e. the minimal intensity of infinitely long duration stimulation necessary to evoke a CMAP) and (2) the strength–duration time constant or chronaxie (i.e. the intensity duration of twice rheobase stimulation necessary to evoke a CMAP) given by the x-intercept and the slope, respectively.

C3: the 'recovery cycle' corresponds to the excitability changes that occur following a CMAP. It consisted of the refractory periods (during which membrane excitability is either nil or markedly decreased and whose duration is specified by the first x-intercept) followed by the supernormal and late subnormal periods (during which membrane excitability is increased and decreased, respectively). These excitability changes were assessed by a first supramaximal stimulation followed, at time intervals varying from 1 to 200 ms, by a test stimulation required to obtain a CMAP with 40% maximal amplitude. Then, these changes were expressed as the percentage of threshold change of the required test stimulation and plotted as a function of interstimulus intervals.

C4: the current–threshold relationship shows the axonal accommodation capacities to depolarization and hyperpolarization. It measured the threshold changes at the end of prolonged (200 ms) subthreshold conditioning ranging from 50 to 100% thresholds. The extent to which the slope of this relationship tended to increase in response to prolonged depolarizing and hyperpolarizing currents reflected outward and inward rectifications, respectively.

C5: the threshold electrotonus reflects the electrotonic changes in membrane potential. It refers to the threshold changes that occur during and after prolonged (100 ms) subthreshold conditioning depolarizing and hyperpolarizing currents applied at specified threshold percentages (20, 40 and 70%).

Statistical analysis

All data are expressed as means and standard deviation (± SD) of n different mice for each group. For the longitudinal behavioural studies, a two-way ANOVA for repeated measures with Tukey's *post hoc* analysis was performed to compare all groups of mice and all ages (Systat v 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For other endpoint studies, a Kolmogorov–Smirnov normal distribution analysis was performed on all data followed by either Student's t test for normally distributed data or a non-parametric Mann–Whitney U test, to verify significant differences between groups (Systat v 8.0). Statistical significance was considered when statistical power exceeds 95% ($P \leq 0.05$; AnaStats.fr, France).

Results

Long-term physical training improves resistance to muscle damages and aerobic performance in type 3 SMA-like mice

We submitted a population of controls and type 3 SMA-like mice to either a running or a swimming protocol for 10 months, as previously described (Grondard *et al.* 2008). To better characterize each exercise and to define their effects in an SMA context, we investigated the creatine kinase (CK) activity and lactate levels (indicators of potential exercise-induced muscle lesions and energetic pathway used, respectively) in the serum of trained controls and type 3 SMA-like mice in comparison to sedentary counterparts, at 2 and 12 months of age.

In control mice, we found that, in contrast to swimming, a single bout of running induced a significant increase in CK activity at 2 and 12 months of age (Fig. 1*A–C*). Conversely and in contrast to running, a single bout of swimming exercise induced a 2-fold increase in serum lactate levels at 2 and 12 months of age (Fig. 1*B*). These data suggested that only the running-based exercise induced muscle damage and that the swimming-based exercise solicited more the anaerobic pathway than the running-based training, as previously reported (Grondard *et al.* 2008).

In SMA mice, no alteration of the CK activity was detected at 2 and 12 months of age when compared to control mice, while the circulating lactate concentration levels were significantly 2-fold higher at both ages in

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

sedentary SMA mice ($P < 0.05$; Fig. 1*A* and *B*). After a bout of exercise, independently of its type, we observed an elevation of both CK activity and lactate concentration compared to sedentary SMA mice at 2 (Fig. 1*A* and *B*) and 12 months of age (data not shown). Interestingly, in type 3 SMA-like mice and after 10 months of training, serum CK activity and lactate level response to a single exercise bout returned to control levels (Fig. 1*C* and *D*). These data suggested that a 10-month training programme in type 3 SMA-like mice leads to (1) an improved muscle resistance to activity-induced damage and (2) an increase in aerobic performance.

Long-term physical training significantly improves type 3 SMA-like mouse motor behaviour in a type-specific manner

We next compared the impact of both physical exercises on the motor function, including motor behaviour and strength in the fore- and hindlimbs, of type 3 SMA-like mice and age-matched controls, from 2 to 12 months of age.

The grip strength test results indicated a significant decrease in maximal force from 6 months of age in the forelimbs and from 9 months of age in hindlimbs of sedentary type 3 SMA-like mice (Fig. 2*A*). Both exercise types enhanced muscular strength in type 3 SMA-like mice reaching values comparable to sedentary controls throughout the tested age range (Fig. 2*A*).

We then measured the muscular fatigability to low intensity effort (20% of maximum force) during a grip test. The resistance to fatigue for both control and type 3 SMA-like mice increased significantly between 2 and 3 months of age, from 20 to 160 s. However, SMA-like mice showed progressive decrease in their resistance to fatigue until 140 s, while control mice showed a significant increase reaching a plateau around 250 s at 9 months old (Fig. 2*B*). After the running programme, muscle fatigability was significantly reduced in response to the low intensity effort in type 3 SMA-like mice from 9 months of age. Interestingly, the swimming exercise improved muscle resistance to the low intensity test in both control and type 3 SMA-like mice, with scores exceeding sedentary control levels (720 s at 6 months of age; Fig. 2*B*).

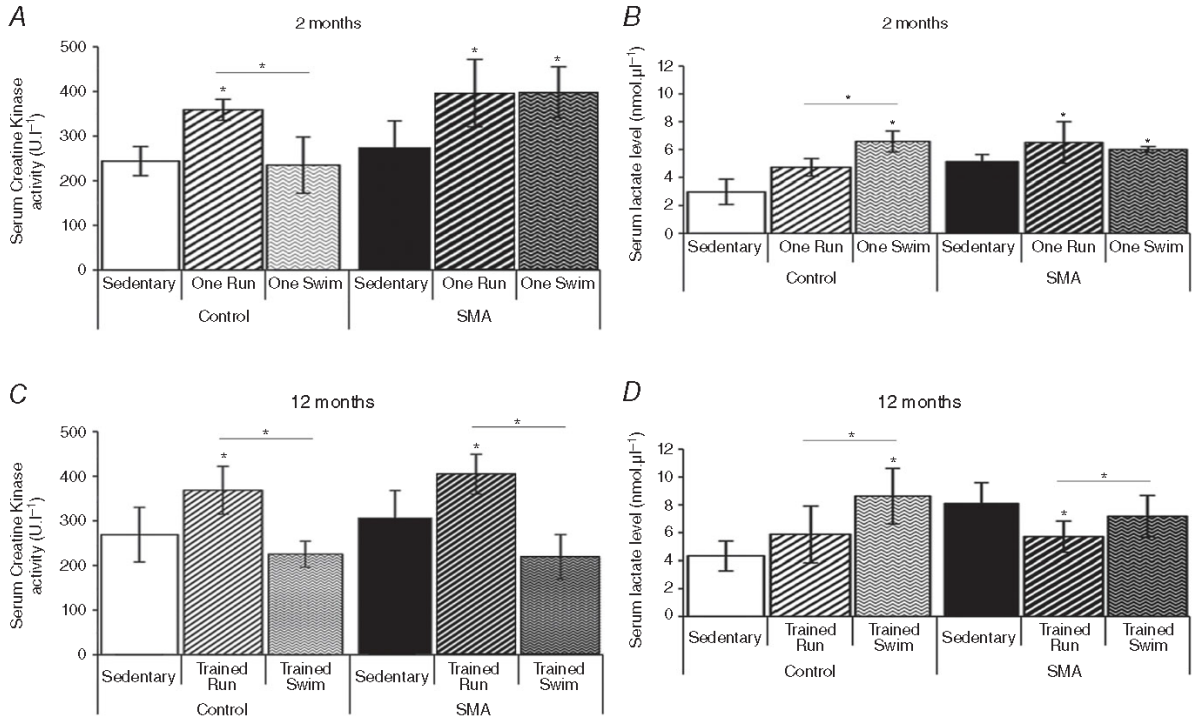


Figure 1. Running- and swimming-based 10-month training programmes improve muscle resistance to exercise and aerobic capacity in type 3 SMA-like mice
A–D, quantification of creatine kinase activity (*A* and *C*) and lactate level (*B* and *D*) in the serum of sedentary control and type 3 SMA-like mice (Control; SMA) at 2 months of age (*A* and *B*) after one bout of either running (One Run) or swimming (One Swim) exercise and in the serum of sedentary and 10-month-trained control and type 3 SMA-like mice to running (Trained Run) or swimming (Trained Swim) at 12 months of age (*C* and *D*; $n = 12$ in each group). Data are represented as means ± SD (*$P < 0.05$).

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

When we submitted mice to the high intensity swimming fatigue test, we found a significantly higher fatigability in type 3 SMA-like mice when compared to controls, with a decrease in the time to exhaustion from 3 months of age and in the sustained maximum water flow from 6 months of age, reaching 83 s and 3 l min^{-1} against 200 s and 6 l min^{-1}, respectively (Fig. 2C). The running exercise significantly reduced fatigability in response to

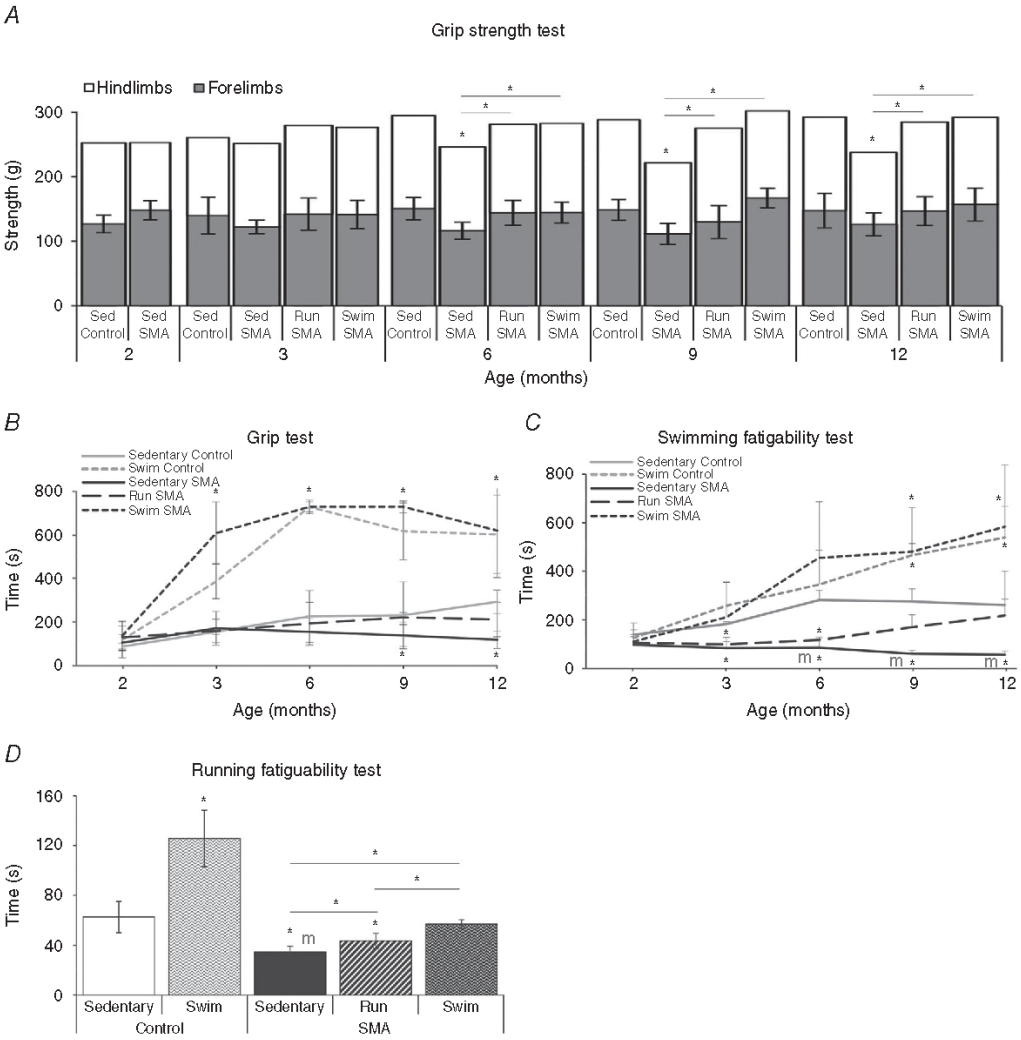


Figure 2. Running- and swimming-based 10-month training programmes differentially improve muscle strength and limit muscle fatigability in type 3 SMA-like mice
A and *B*, longitudinal measurements of the fore- and hindlimb muscle strength (Grip strength test; *A*) and the forelimb muscle fatigability to low intensity efforts (Grip test; *B*) of sedentary control mice (Sed Control) compared to sedentary (Sed SMA), running-trained (Run SMA) and swimming-trained (Swim SMA) type 3 SMA-like mice from 2 to 12 months of age. *C*, longitudinal measurements of the muscle resistance to maximal intensity efforts in swimming pool of sedentary control (Sed Control) and type 3 SMA-like (Sed SMA) mice compared to swimming-based trained control (Swim Control) and type 3 SMA-like (Swim SMA) mice or to running-based trained type 3 SMA-like (Run SMA) mice from 2 to 12 months of age (Swimming fatigability test). The minimal sustained water flow was 3 l min^{-1} and is indicated in the panel by 'm'. *D*, measurement of the muscle resistance to maximal intensity efforts in treadmill of sedentary control (Sed Control) and type 3 SMA-like (Sed SMA) mice compared to swimming-based trained control (Swim Control) and type 3 SMA-like (Swim SMA) mice or to running-based trained type 3 SMA-like (Run SMA) mice (Running fatigability test). The minimal sustained speed was fixed at 16 m min^{-1} and is indicated in the panel by 'm' ($n = 12$ in each group). Data are represented as means ± SD (*$P < 0.05$).

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

the high intensity effort in type 3 SMA-like mice, while the swimming programme enhanced muscle resistance in both control and type 3 SMA-like mice, with values exceeding control levels (500 s at 12 months of age; Fig. 2*C*). These results were also confirmed in the high intensity running fatigue test at 12 months of age though the type 3 SMA-like mice trained to swim did not exceed sedentary controls (Fig. 2*D*).

Finally, no significant differences were observed in the open field test between all groups of mice from 2 to 12 months of age (Fig. 3*A*). This result was confirmed at 12 months of age with the actimeter test of 48 h (Fig. 3*B*). However, the number of vertical rearing events decreased significantly in type 3 SMA-like compared to control mice at 12 months of age (Fig. 3*C*). This parameter was improved by both exercise protocols in type 3 SMA-like mice (Fig. 3*C*). Taken together, these behavioural data suggested that both types of long-term physical training were beneficial in terms of resistance to fatigue and motor behaviour in type 3 SMA-like mice, with swimming being more effective than running.

Specific exercise differentially protects motor neuron subpopulations in type 3 SMA-like mice

In order to investigate the cellular mechanisms underlying the beneficial effects of physical training on the motor behaviour in type 3 SMA-like mice, we analysed the motor neuron populations by counting the residual number of ChAT-positive neurons in the ventral horn of the L1–L5 lumbar spinal cord in sedentary and trained control and type 3 SMA-like mice at 12 months of age. The total number of motor neurons showed a marked decrease in the lumbar spinal cord of type 3 SMA-like mice, with a 45% loss of ChAT-positive neurons when compared to control mice (Fig. 4*A* and *B*). Both exercise protocols significantly decreased motor neuron loss when compared to controls with the strongest efficiency observed with the swimming programme, reducing by half the motor neuron loss in SMA-like mice (Fig. 4*A* and *B*).

To better characterize the neuroprotective effects of each exercise programme, we then analysed the different spinal motor neuron subpopulations, based on (1) their localization in the spinal cord (medial *vs.* lateral), (2) their

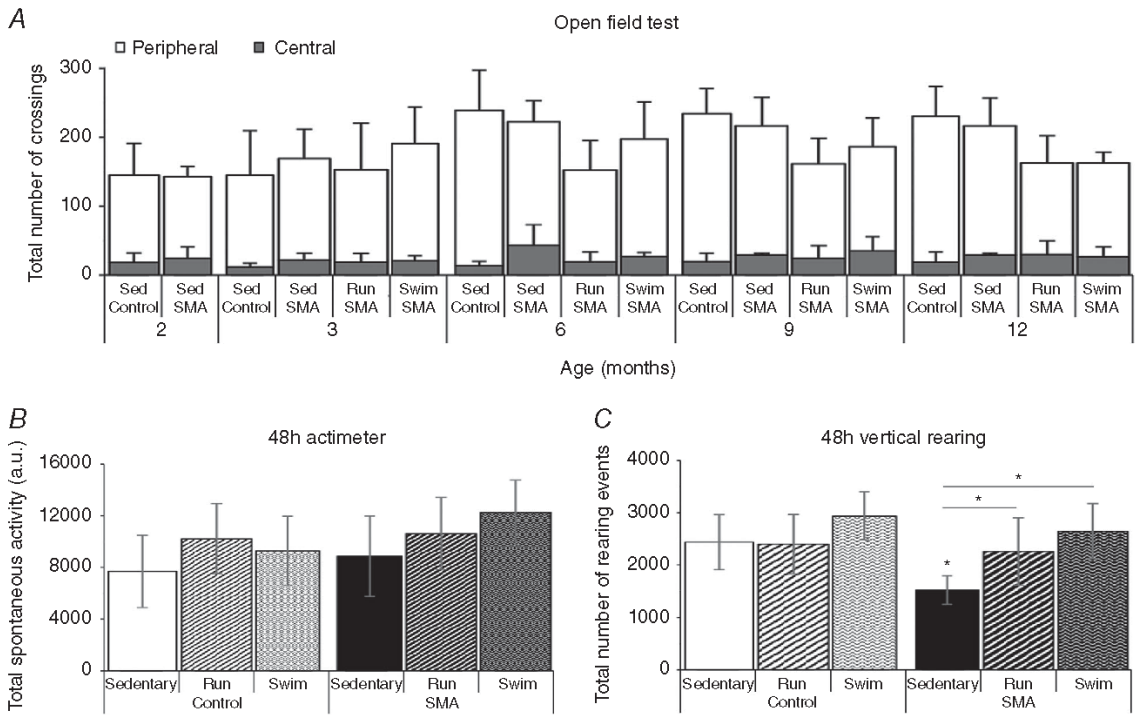


Figure 3. Running- and swimming-based 10-month training programmes improve motor capacity despite specific adaptations in type 3 SMA-like mice
A, longitudinal measurements of the exploratory behaviour (Open field test) of sedentary control mice (Sed Control) compared to sedentary (Sed SMA), running-trained (Run SMA) and swimming-trained (Swim SMA) type 3 SMA-like mice from 2 to 12 months of age. *B* and *C*, endpoint quantification of the spontaneous activity (*B*) and vertical rearing events (*C*) during 48 h (48 h actimeter and 48 h vertical rearing) in sedentary and running-trained (Run) or swimming-trained (swim) control and type 3 SMA-like mice at 12 months of age ($n = 12$ in each group). Data are represented as means ± SD (*$P < 0.05$).

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

soma size distribution (large *vs.* small area), and (3) their types (fast *vs.* slow).

Two different pools of motor neurons were distinguished on the basis of their cell body localization within the ventral spinal cord. Those with a cell body in the medial region of the ventral spinal cord are thought to specifically innervate proximal and axial muscles while those with a more laterally localized soma are thought to specifically innervate distal muscles (Bacskai *et al.* 2014). In the spinal cord of the sedentary type 3 SMA-like mice, we observed a significant decrease in the number of medial motor neurons, from six to one motor neuron per slice when compared to sedentary controls, whereas the loss was limited to only 37% for lateral motor neurons (Fig. 4*B*). Both exercise protocols efficiently limited medial motor neuron loss although swimming clearly provided more pronounced effects than running (Fig. 4*B*).

We next analysed the different subpopulations of motor neurons according to the distribution of their soma size, in lumbar spinal cord (mean of 10 slices from L1 to L5). In sedentary type 3 SMA-like mice, we observed a significant decrease in the absolute number of large (area greater than 600 μm^2) and intermediate-area motor neurons (area ranged between 300 and 600 μm^2) in comparison

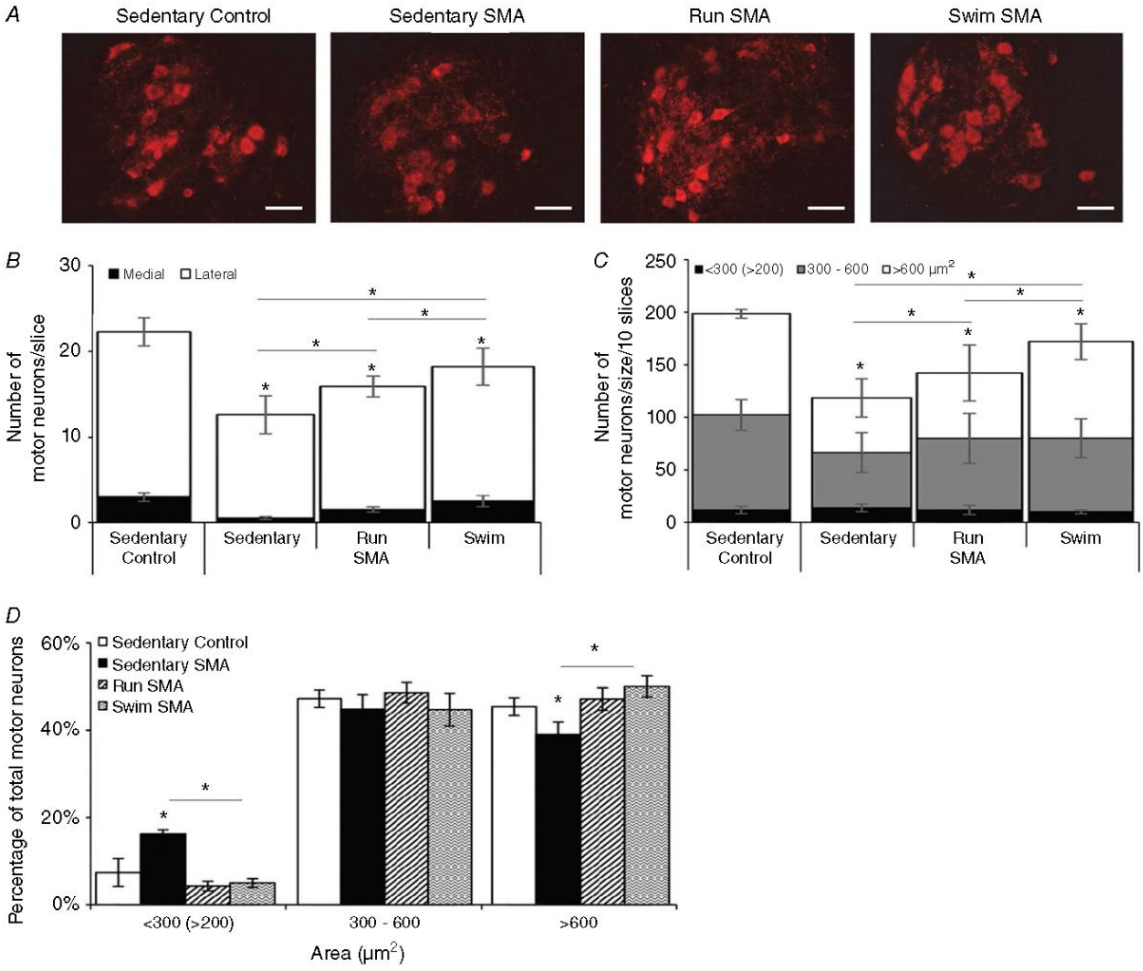


Figure 4. Running- and swimming-based 10-month training programmes induced neuroprotection of motor neuron subpopulations in type 3 SMA-like mice

A, immunodetection of ChAT-positive motor neurons in the lumbar spinal cord (L1–L5) of sedentary control mice (left) compared to sedentary (middle left), running-trained (middle right) and swimming-trained (right) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (scale bar: 50 μm). *B–D*, quantitative analysis of the number of total, medial and lateral motor neurons per ventral horn (*B*) and of the absolute number (*C*) or proportion (*D*) of motor neurons in small (> 300 μm^2), intermediate (300–600 μm^2) and large (< 600 μm^2) range of cell body area in the spinal cord of sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) and swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age ($n = 8$ for each group). Data are represented as means ± SD (*$P < 0.05$).

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

to sedentary controls (48 in type 3 SMA-like mice *vs.* 96 in control mice and 52 in type 3 SMA-like mice *vs.* 101 in control mice). In contrast, the absolute number of small-area motor neurons (less than 300 μm^2) remained stable at around 14 (Fig. 4*C*). Consequently, we noted a switch in the proportion of residual motor neurons from large to small in type 3 SMA-like mice when compared to controls, unexpectedly suggesting a motor neuron type-dependent degeneration in type 3 SMA-like mice (Fig. 4*D*). Both exercise protocols significantly reduced the loss of intermediate- and large-area motor neurons, with a maximal protection noted for large motor neurons after the swimming programme (Fig. 4*C* and *D*).

We finally compared the impact of each training programme on the survival of fast or slow motor neurons. Since fast motor neurons are shown to express chondrolectin (Chodl) and slow motor neurons oestrogen-related receptor β (ERRβ) (Enjin *et al.* 2010), we performed either *in situ* hybridization for *Chodl* mRNA or immunolocalization of ERRβ in ChAT-positive cells in ventral horn of the lumbar L1–L5 spinal cord (Fig. 5*A–D*). As expected, we found that all *Chodl*-positive cells exhibited large soma surfaces, up to 600 μm^2, while all of ERRβ-ChAT-positive neurons exhibited soma surfaces smaller than 600 μm^2 (data not shown). In sedentary type 3 SMA-like mice, the numbers of *Chodl*-positive neurons (Fig. 5*A*) and ERRβ-positive motor neurons (Fig. 5*C*) were 2-fold lower compared to sedentary controls (Fig. 5*B* and *D*). Very interestingly, the swimming-based training significantly reduced the loss of *Chodl*-positive motor neurons reaching levels comparable to controls, but failed to protect ERRβ motor neurons (Fig. 5*A–D*). Conversely, we found a significant running-induced neuroprotection of the ERRβ-positives motor neurons but no significant effects on *Chodl*-positive neurons in type 3 SMA-like mice (Fig. 5*A–D*).

Finally, to determine whether such exercise-induced neuroprotection could be linked to a modification in SMN protein expression, we performed Western blots on full-length SMN protein in the ventral lumbar L1–L5 spinal cord of sedentary and trained controls and type 3 SMA-like mice at 12 months of age. We found a 2-fold decrease in SMN protein expression in type 3 SMA-like mice when compared to controls (Fig. 5*E* and *F*). Both physical training programmes were unable to induce SMN expression in the spinal cord, suggesting an SMN-independent exercise-induced benefit (Fig. 5*E* and *F*).

Long-term physical training protects neuromuscular junction structure in type 3 SMA-like mice

We next analysed the shape of the neuromuscular junction (NMJ) for innervated NMJ using α-bungarotoxin staining and neurofilament+synaptophysin immunostaining, as previously described (Biondi *et al.* 2008). Three different muscles of the calf, the extensor slow-twitch soleus, the extensor fast-twitch plantaris and the flexor fast-twitch tibialis, were compared in control and type 3 SMA-like mice. In adulthood, the pretzel shape organization could be pathologically affected according two main parameters: gutter fragmentation (Fig. 6*A*) and total area alterations (Falk *et al.* 2014).

At 12 months of age, a significant increase in fragmented NMJs was only recorded in the two extensor soleus (Fig. 6*B* and *C*) and plantaris muscles of sedentary type 3 SMA-like mice compared to control mice (Fig. 6*F*). Interestingly, both exercise protocols were able to significantly reduce SMA-induced NMJ fragmentation, with a complete or a partial decrease in the plantaris and the soleus (Fig. 6*D* and *E*) muscles, respectively, when compared to controls (Fig. 6*F*).

Concerning the total gutter area at 12 months of age, only the plantaris NMJs appeared significantly affected by the disease, with a significant increase in the proportion of small and intermediate plantaris NMJ area, associated with a decrease in the proportion of large plantaris NMJ area in type 3 SMA-like mice compared to controls (Fig. 6*G*). Both exercise protocols slightly reduced the SMA-induced decrease in NMJ area. In addition, only the running exercise induced an enlargement of the NMJ area in the soleus muscle (Fig. 6*G*).

Specific exercise differentially limited muscle atrophy and fast-to-slow myofibre transitions in type 3 SMA-like mice

Based on previous studies of SMA-induced muscle alterations in diverse mice models (Biondi *et al.* 2008; Grondard *et al.* 2008; Boyer *et al.* 2013; Cobb *et al.* 2013), we analysed muscles alterations, in soleus, plantaris and tibialis of controls and type 3 SMA-like mice at 12 months of age. Haematoxylin–eosin staining showed an atrophy in all the studied SMA muscles, with a significant decrease in the proportion of the largest myofibres (cross-sectional area > 1500 μm^2 for both extensors and > 2500 μm^2 for the tibialis) in favour of the smallest myofibres (cross-sectional area < 1500 μm^2 for soleus and tibialis and < 1000 μm^2 for plantaris; Fig. 7*A–D*). Interestingly, both exercise types significantly reduced muscle atrophy and, in addition, induced an exercise-specific hypertrophy when compared to sedentary control mice (Fig. 7*A–D*). Accordingly, the running-based exercise preferentially induced a hypertrophy of intermediate-area myofibres for the two extensor muscles and of large-area myofibres for the flexor tibialis, whereas the swimming-based exercise preferentially induced a hypertrophy of the largest myofibres in the three muscles (Fig. 7*B–D*).

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

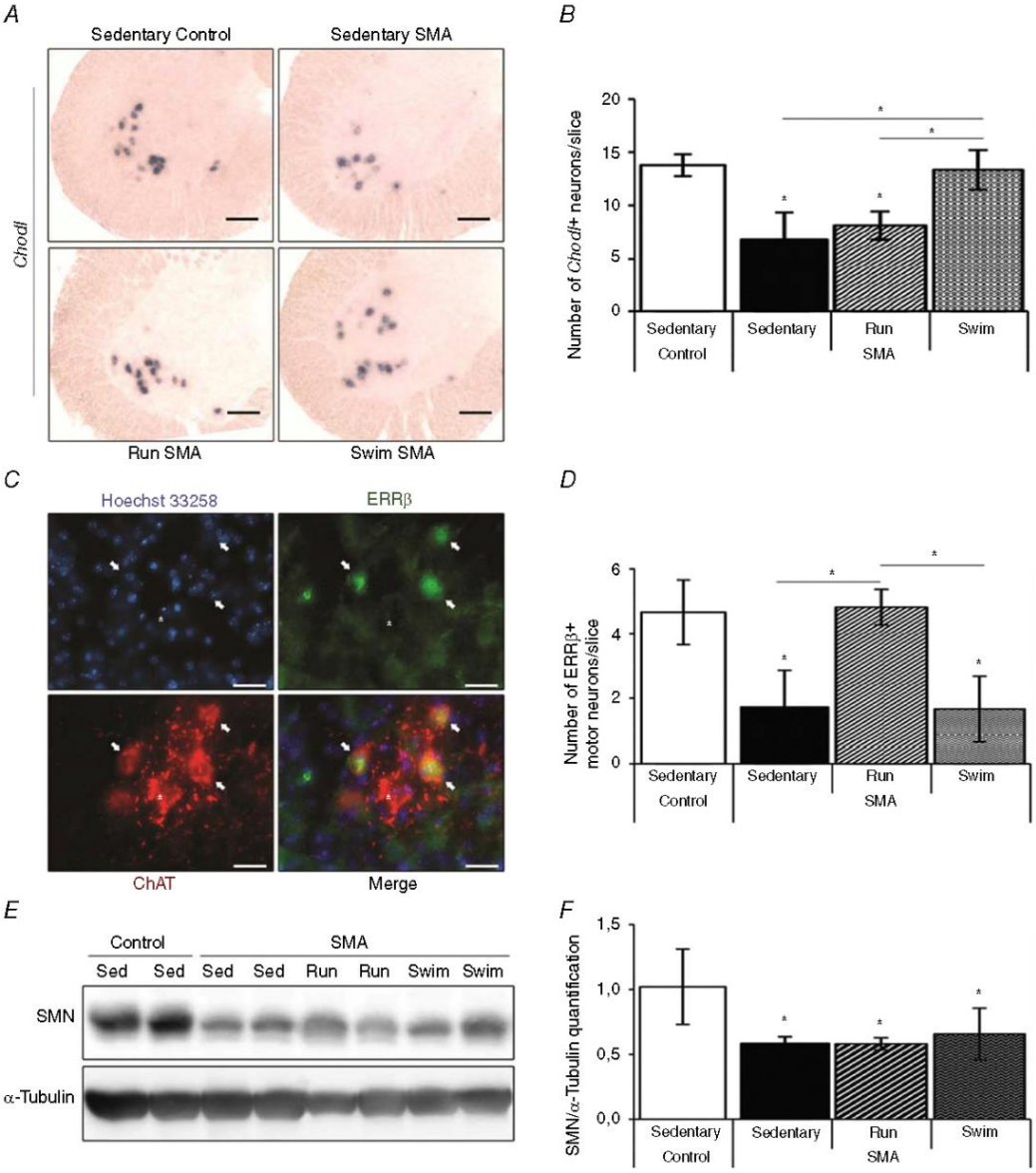


Figure 5. Exercise-induced specific neuroprotection of fast *vs.* slow motor neuron subpopulations in type 3 SMA-like mice is SMN independent

A, *in situ* hybridization on *Chondrolectin* mRNA (*Chodl*) in lumbar spinal cords of sedentary control (top left) and type 3 SMA-like mice (top right) compared to running-trained (bottom left) and swimming-trained (bottom right) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (scale bar: 100 μm). *B*, quantitative analysis of the number of *Chodl*-positive neurons in the ventral horn of lumbar spinal cords of sedentary control compared to sedentary, running-trained (Run) and swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age ($n = 4$ in each group). *C*, immunodetection of the slow-type motor neuron marker oestrogen-related receptor β (ERRβ, green) in the nucleus (Hoechst 33258, blue) of ChAT-positive motor neurons (ChAT, red) in the lumbar spinal cords of sedentary type 3 SMA-like mice at 12 months of age (scale bar: 25 μm). *D*, quantitative analysis of the number of ERRβ-positive motor neurons in the ventral horn of lumbar spinal cords of sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) or swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age ($n = 4$ in each group). *E* and *F*, Western blot analysis (*E*) and quantification (*F*) of SMN protein expression in the ventral lumbar spinal cord of sedentary control and type 3 SMA-like mice (Sed) compared to running-trained (Run) or swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age ($n = 4$ in each group). Data are represented as means ± SD (*$P < 0.05$).

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

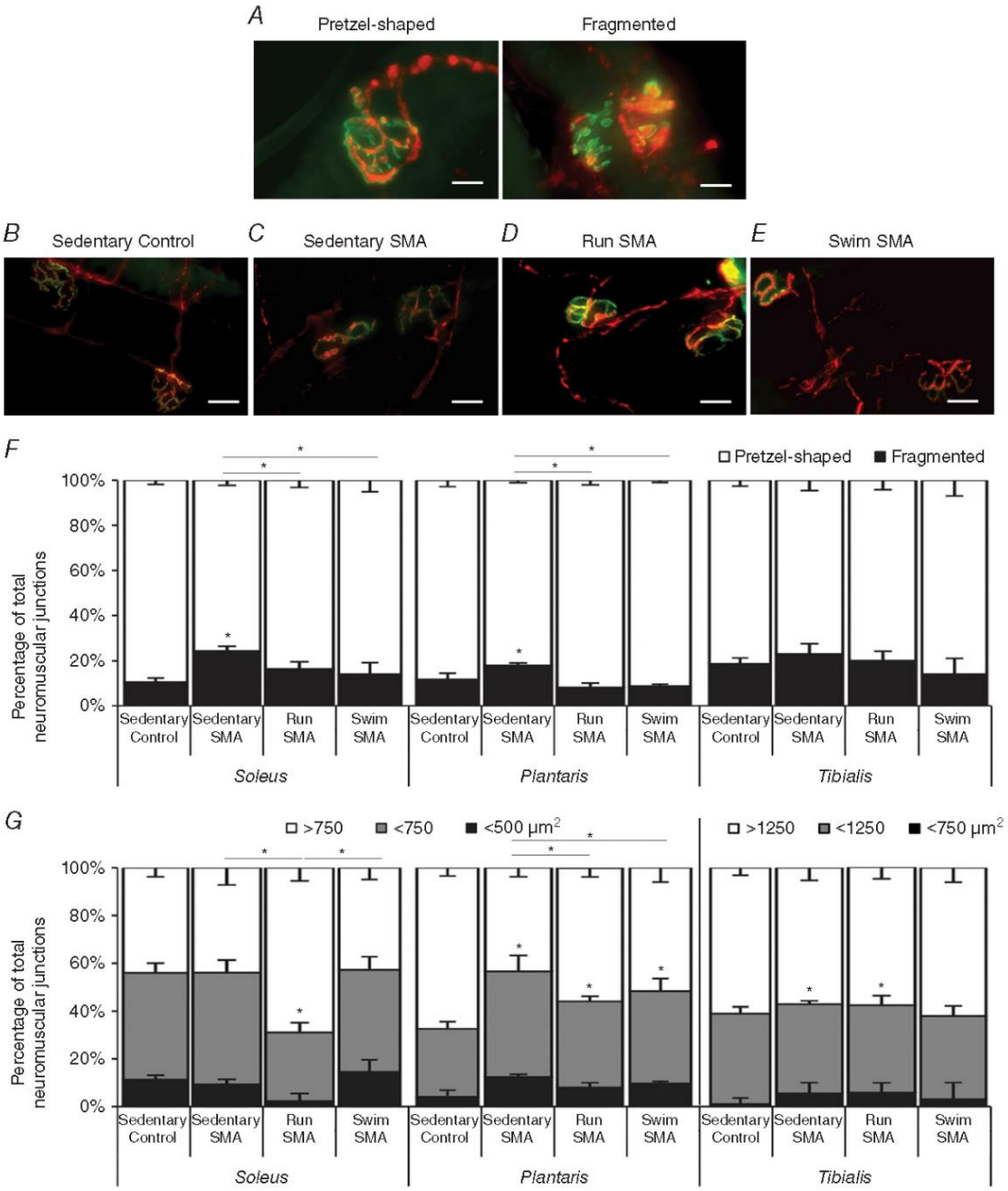


Figure 6. Running- and swimming-based 10-month training programmes reduce efficiently the neuromuscular junction defects in type 3 SMA-like mice

A–E, motor end-plate labelling with α-bungarotoxin (green) and anti-neurofilament plus anti-synaptophysin antibodies (NF+Synaptophysin, red), representing a typical pretzel-shaped (*A*, left) and a fragmented NMJ (*A*, right), in the soleus of sedentary control mice (*B*), sedentary type 3 SMA-like mice (*C*) and running-trained (*D*) or swimming-trained type 3 SMA-like mice (*E*) at 12 months of age (scale bars: 5 μm for *A* and 10 μm for *B–E*). *F* and *G*, quantification of the neuromuscular junction fragmentation (*F*) and area (*G*) in the soleus, plantaris and tibialis muscles from sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) or swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age ($n = 4$ in each group). Data are represented as means ± SD (*$P < 0.05$).

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

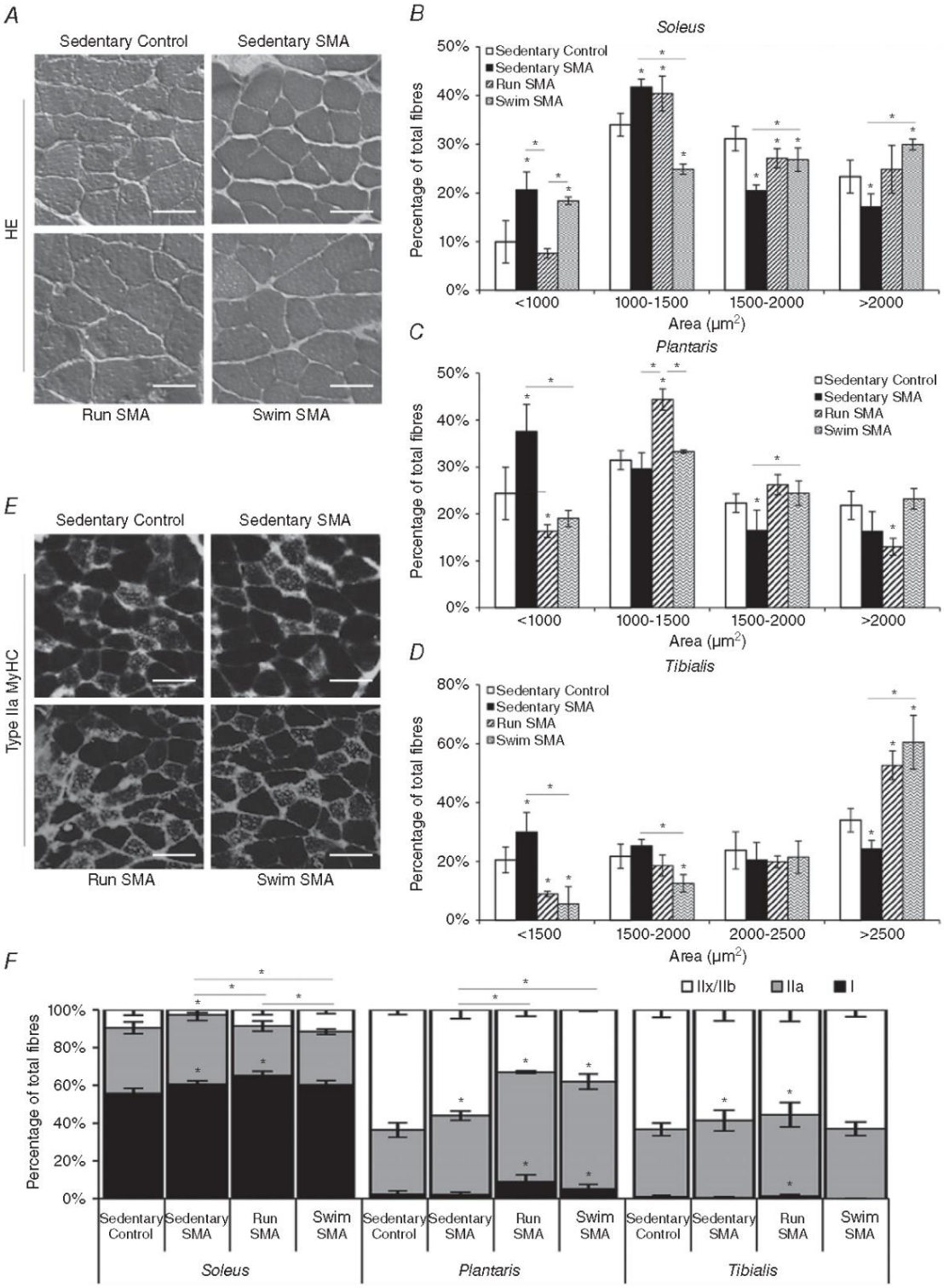


Figure 7. Exercise-specific adaptations of skeletal muscles in type 3 SMA-like mice

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

Concerning the muscle typology, we next determined the percentage of myofibres expressing slow (type I), intermediate (type IIa) or fast (IIx+IIb) myosin heavy chain isoforms, a signature of the myofibre metabolic profile (Schiaffino & Reggiani, 2011), as previously described (Biondi *et al.* 2008, 2010). At 12 months of age, we noted a transition to a slower, more oxidative, phenotype in the three SMA muscles compared to controls, as revealed by a gain in type I fibres for the soleus muscle and in type IIa fibres for the two fast-twitch muscles. Thus, the two extensor muscles were more affected than the flexor muscles in type 3 SMA-like mice (Fig. 7*E* and *F*). The swimming exercise reduced SMA-induced myofibre transitions in type 3 SMA-like mice (Fig. 7*F*), restoring the type I proportion and favouring the more glycolytic intermediate and fast-twitch myofibres (Fig. 7*F*). In contrast, the running-based training led to a gain in type I myofibres compared to sedentary SMA-like mice (Fig. 7*F*).

Long-term physical training significantly improved alterations of neuromuscular excitability in type 3 SMA-like mice

Finally, to ascertain that the exercise-induced protection of the motor unit structure resulted in retained functional properties, we evaluated, *in vivo*, the neuromuscular excitability properties of hindlimb plantar muscle in all groups of mice. Profound significant alterations of neuromuscular excitability waveforms (Fig. 8*A*) and associated analysed parameters (Table 1) were detected in 12-month-old sedentary type 3 SMA-like mice when compared to age-matched controls. In particular, for the stimulus–response relationship analysis (label C1, Table 1), a significant 11% enhanced latency (parameter 19 in Table 1) between the nerve stimulation onset and the CMAP peak amplitude was recorded in sedentary SMA-like mice compared to sedentary controls. In addition, as revealed by the strength–duration relationship analysis (label C2, Fig. 8*A* and Table 1), the chronaxie (parameter 03 in Table 1) was 31% lower in sedentary SMA-like mice compared to control mice. Furthermore, as derived from the recovery cycle analysis (label C3, Fig. 8*A* and Table 1), the sedentary SMA-like mice displayed a 42% higher and 15% longer refractory period than controls, as determined by (1) the percentage of threshold change at 2 ms interstimulus interval (parameter 32 in Table 1) and (2) the relative refractory period (parameter 10, i.e. the first *x*-intercept in Table 1), respectively. The SMA-like mice also displayed a 60–76% lower supernormal period, as determined by the percentage of threshold change between 5 and 7 ms interstimulus intervals (parameters 13, 34 and 33 in Table 1). The current–threshold relationship analysis (label C4, Fig. 8*A* and Table 1) showed that the most prominent abnormality in sedentary SMA mice was a 23% reduction of the hyperpolarizing slope (parameter 28 in Table 1). Finally, abnormalities in threshold electrotonus analysis (label C5, Fig. 8A and Table 1) were a 14–18% lower threshold increase in response to the hyperpolarizing current (parameters 22, 30, 11 and 31 in Table 1) in sedentary SMA-like mice compared to controls. Taken together, these results suggest a hyperexcitability of the neuromuscular system in sedentary SMA-like mice due to axonal membrane depolarization.

Importantly, all these alterations were counteracted by both exercise protocols in type 3 SMA-like mice, as revealed by the analysis of the neuromuscular excitability waveforms (Fig. 8*B* and *C*). In addition, excitability parameters of 12-month-old running and swimming type 3 SMA-like mice reached levels comparable to age-matched controls (Table 1).

Discussion

Admittedly, submitting SMA patients to an exercise programme may be considered hazardous due to motor weakness, muscular fatigue of patients and lack of studies investigating physical training effects in SMA (Preisler *et al.* 2009; Lewelt *et al.* 2015). The present study provides the first lines of evidence indicating that two different long-term exercises could be beneficial for mild SMA. While the running and swimming protocols used here were based on different velocity, amplitude of movement, energetic metabolic involvement and motor unit recruitment (Grondard *et al.* 2008), they both resulted in significant improvements in motor performance (grip strength), reduction in muscle fatigability (grip test and fatigability test), motor neuron neuroprotection, and prevention of NMJ shape and muscle phenotype alterations in a type 3 SMA-like mouse model (Table 2). However, each exercise protocol exhibited specificities,

A, haematoxylin–eosin staining of plantaris of sedentary control mice (top left) compared to sedentary (top right), running-trained (bottom left) and swimming-trained (bottom right) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (scale bar: 25 μm). *B–D*, quantification of the cross-sectional area of myofibres from soleus (*B*), plantaris (*C*) and tibialis (*D*) muscles of sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) and swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age ($n = 4$ in each group). *E*, immunodetection of type IIa myosin heavy chain (MyHC) in the plantaris of sedentary control mice (top left) compared to sedentary (top right), running-trained (bottom left) and swimming-trained (bottom right) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (scale bar: 50 μm). *F*, analysis of adult (i.e. I, II, IIa and IIx/IIb) MyHC isoforms typology of the soleus, plantaris and tibialis of sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) and swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age ($n = 4$ in each group). Data are represented as means ± SD (*$P < 0.05$).

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

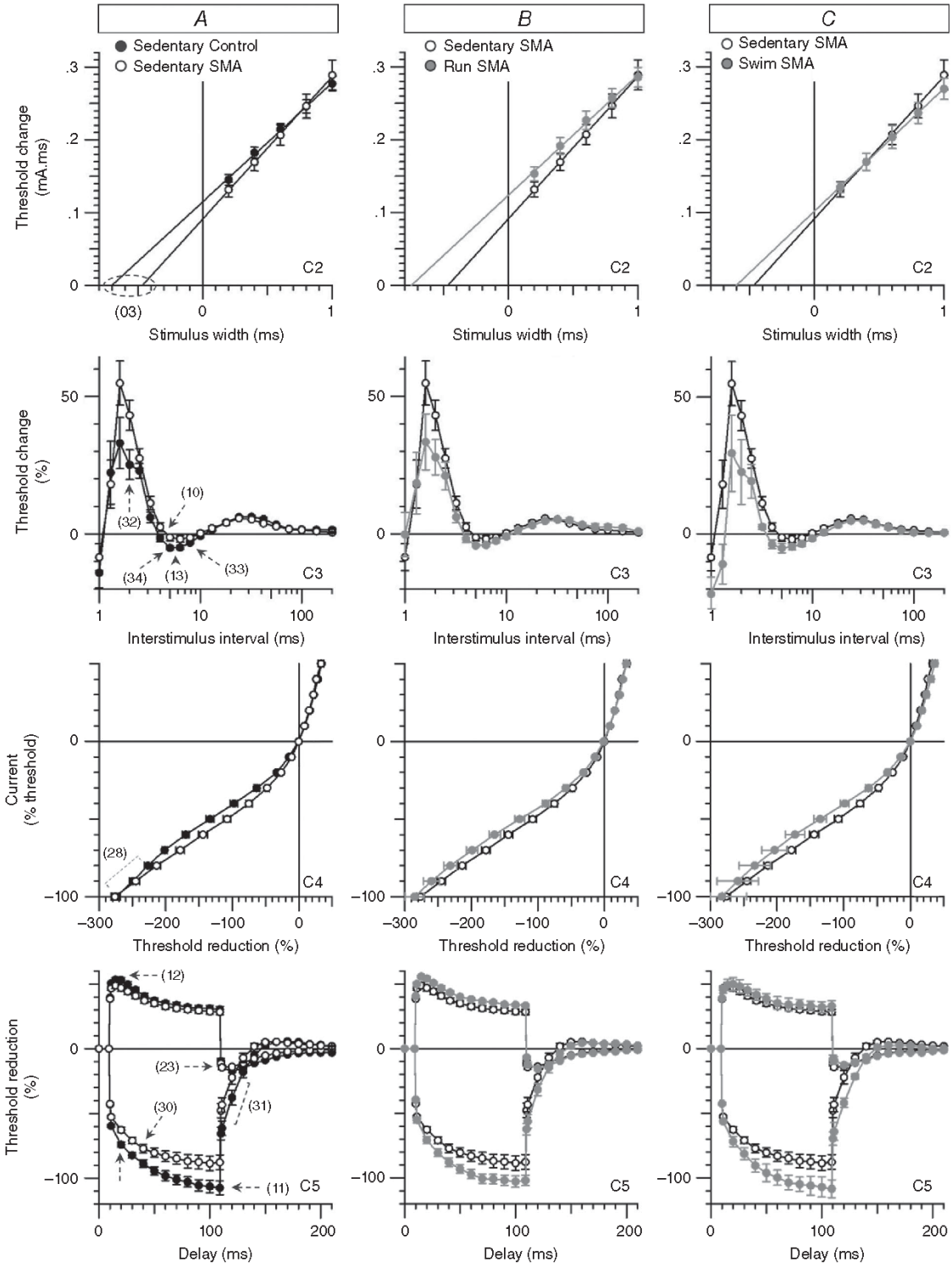


Figure 8. Running- and swimming-based 10-month training programmes counteract the neuromuscular excitability defect in a type 3 SMA-like mice

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

Table 1. Comparison of neuromuscular excitability parameters

Curve[a]	Derived excitability parameter[b]	Sedentary control	Sedentary SMA	Run SMA	Swim SMA
C1	06: Peak response (mV)	5.2 ± 1.2	4.4 ± 1.21	5 ± 1.2	4.6 ± 1.2
C1	19: Latency (ms)	2.9 ± 0.08	3.3 ± 0.1*	3 ± 0.1	2.9 ± 0.2
C1	01: Stimulus (mA) for 50% max response	0.2 ± 1.08	0.2 ± 1.1	0.2 ± 1	0.27 ± 1.2
C1	05: Stimulus–response slope	4.4 ± 1.17	3.7 ± 1.1	4.9 ± 1.2	4.3 ± 1.2
C2	03: Strength–duration time constant (ms)	0.7 ± 0.05	0.5 ± 0.04*	0.7 ± 0.04	0.6 ± 0.02
C2	04: Rheobase (mA)	0.16 ± 0,01	0.2 ± 0.01	0.17 ± 1.03	0.16 ± 1.05
C3	10: Relative refractory period (ms)	3.6 ± 0.1	4.3 ± 0.2*	3.6 ± 1.0	3.84 ± 1.1
C3	32: Refractoriness at 2 ms (%)	25.1 ± 5.3	43.1 ± 5.5*	27.8 ± 6.4	22.6 ± 11.7
C3	13: Superexcitability (%)	−7.9 ± 2.1	−2.4 ± 0.8*	−5.6 ± 1.7	−6.5 ± 1.9
C3	34: Superexcitability at 5 ms (%)	−5 ± 0.7	−1.2 ± 1.3*	−4.2 ± 0.4	−5.1 ± 1.6
C3	33: Superexcitability at 7 ms (%)	−4 ± 0.5	−1.6 ± 1*	−3.2 ± 0.6	−4 ± 0.9
C3	14: Subexcitability (%)	6 ± 0.4	5.2 ± 0.3*	4.7 ± 0.8	4.6 ± 0.4
C4	07: Resting *I–V* slope	0.8 ± 0.05	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.04	0.8 ± 0.07
C4	08: Minimum *I–V* slope	0.2 ± 0,01	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.02
C4	28: Hyperpolarization *I–V* slope	0.4 ± 0.01	0.32 ± 0.01*	0.41 ± 0.05	0.5 ± 0.1
C5	12: TEd (10–20 ms)	50.2 ± 1.9	44.6 ± 2.2	51.4 ± 1.3	48.3 ± 5
C5	20: TEd (40–60 ms)	35.3 ± 1.9	32.9 ± 2.1	38.3 ± 1.2	35.8 ± 4.6
C5	21: TEd (90–100 ms)	30.6 ± 2.2	28.5 ± 2.1	33.5 ± 1	32.5 ± 4.1
C5	22: TEh (10–20 ms)	−78.2 ± 1.9	−66.8 ± 2.2*	−75.7 ± 2.7	−76.5 ± 4.2
C5	30: TEh (20–40 ms)	−88.5 ± 2.7	−76.3 ± 3.1*	−87.3 ± 3.1	−89.5 ± 5.3
C5	11: TEh (90–100 ms)	−106.9 ± 5	−88.1 ± 5.6*	−102.4 ± 4.2	−107.7 ± 7.3
C5	31: TEh (slope 101–140 ms)	1.62 ± 0.1	1.2 ± 0.1*	1.4 ± 0.09	1.7 ± 0.1

[a]C1: stimulus–response relationship; C2: strength–duration relationship; C3: recovery cycle; C4: current–threshold relationship; and C5: threshold electrotonus. [b]TEd: threshold electrotonus from depolarizing currents (40%); TEh: threshold electrotonus from hyperpolarizing currents (40%). Derived excitability parameters (means ± SD) from plantar muscle recordings from sedentary controls ($n = 8$), sedentary SMA ($n = 8$), running-trained SMA (Run SMA; $n = 7$) and swimming-trained SMA (Swim SMA; $n = 4$) mice. Each group of SMA mice were compared to sedentary control animals and differences were considered significant when $P \leq 0.05$ (* and highlighted in grey).

notably regarding the effects on different motor neuron populations and on specific muscle fibres. The swimming protocol efficiently protected fast motor neurons, while the running protocol only protected slow motor neurons. Furthermore, the swimming protocol significantly increased muscle resistance to fatigability to reach higher values compared to sedentary control mice, while running slightly prevented the appearance of muscle fatigability. Finally, swimming exercise preferentially enhanced the cross-sectional area of large myofibres while running enhanced the cross-sectional area of intermediate myofibres (Table 2). In addition, the present study strongly suggests that the forced and repetitive use of motor units sufficiently protects them from SMA-induced alterations, independently of SMN gene expression.

Importantly, both exercise protocols efficiently protected the subpopulation of motor neurons that are particularly sensitive to SMA (Mentis *et al.* 2011). In type 3 SMA-like mice, the main part of the medial motor neuron population, innervating the proximal and axial muscles, had disappeared as already observed in a severe SMA mouse model (Mentis *et al.* 2011), while the lateral motor neurons, innervating distal muscles, remained present at 62%. Whatever the cause of the preferential loss of medial motor neurons, a significant protection was shown with both exercise paradigms, with the highest efficiency obtained with swimming exercise. This swimming efficiency could be explained by the higher solicitation of proximal muscles to maintain the body afloat compared to running. This hypothesis, linking the

A–C, superimposed excitability waveforms obtained *in vivo* by stimulating the tibial branch of the sciatic nerve and recording the CMAP from plantar muscle in sedentary control mice compared to sedentary type 3 SMA-like mice (*A*) and in sedentary type 3 SMA-like mice compared to either running-trained (*B*) or swimming-trained (*C*) type 3 SMA-like mice. The significant differences in excitability parameters between sedentary control and SMA mice are indicated by numbers and dashed lines or arrows. C2, strength–duration relationship. C3, recovery cycle. C4, current–threshold relationship. C5, threshold electrotonus (subthreshold conditioning depolarizing and hyperpolarizing current set to 40%). Data are represented as means ± SD of 4–8 animals per group (*$P < 0.05$).

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

Table 2. Comparison of running and swimming benefits in type 3 SMA-like mice

Physical exercise improvements	Run SMA	Swim SMA
Grip strength preservation	+++	+++
Muscle resistance to low intensity test	+	+++
Muscle resistance to high intensity test	+	+++
Motor neuron protection	++	+++
Medial motor neurons	++	+++
Large motor neurons	+	+++
Chodl$^+$ neurons	–	+++
ERRβ^+ motor neurons	+++	–
Preservation of NMJ shape	+++	+++
Muscle hypertrophy (increased CSA)	+++	+++
Intermediate myofibres	+++	++
Large myofibres	+	+++
Neuromuscular excitability	+++	+++

Comparison of the 10-month running and swimming exercises efficiency of the analysed parameters (motor capacity and motor unit) which have been improved by physical exercise in the type 3 SMA-like mice. The level of efficiency to improve each parameter is represented by '–' for no efficiency, $^+$ for low efficiency (under sedentary control levels), $^{++}$ for moderate efficiency and $^{+++}$ for high efficiency (equal or superior to sedentary control levels). The grey highlighting indicate which exercise induced the better effect on a considered parameter.

activation levels of a specific motor unit to the efficacy of its motor neuron protection, is further supported by the preferential neuroprotection of motor neurons subpopulations by specific exercise. Yet, the low intensity and amplitude running exercise was shown to preferentially recruit the slow and intermediate motor units (Grondard *et al.* 2008) and we observed that this type of exercise protected essentially small cell body ERRβ^+ motor neurons, referred to as slow motor neurons (Enjin *et al.* 2010). In contrast, the high intensity and amplitude swimming exercise was shown to recruit intermediate and fast motor units (Grondard *et al.* 2008) and we observed that this type of exercise protected preferentially large cell body *Chodl*$^+$ motor neurons, referred to as fast motor neurons (Enjin *et al.* 2010).

The fact that the exercise-induced neuroprotection in type 3 SMA-like mice occurred independently of SMN protein expression is puzzling and unexpected when compared with the effects of a 5-day training programme performed in type 2 SMA-like mice (Grondard *et al.* 2005). In contrast to the former study (Grondard *et al.* 2005), performed in immature 8-day-old mice (Biondi *et al.* 2008), the present study used an adult type 3 SMA mouse model characterized by low expression levels of SMN compared to more precocious ages. Undoubtedly, the molecular mechanisms underlying the beneficial effects of exercise in each case would be specifically linked to the structure of the responding system. Furthermore, several compounds such as Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitors (Bowerman *et al.* 2010) or the Histone deacetylases (HDAC) inhibitor trichostatin A (Liu *et al.* 2014) were also shown to significantly improve the motor behaviour and motor unit state of an intermediate SMA-like mouse model independently of SMN expression.

Interestingly, several previous studies have highlighted the importance of sensory–motor circuits in the physiopathology of SMA (Mentis *et al.* 2011; Imlach *et al.* 2012). Yet, alterations of proprioceptive neurons and cholinergic interneurons have been postulated to represent the primary cause of motor neuron and muscle dysfunctions in SMA, based on cellular and electrophysiological studies in the spinal cord of severe type SMA mice and in *Drosophila* (Mentis *et al.* 2011; Imlach *et al.* 2012). Since physical exercise is known to systematically involve myotatic reflexes to control the muscle contraction and the antagonist muscle coordination, it is tempting to speculate that both exercises exerted their beneficial effects on SMA motor neurons through an improvement of sensory–motor circuits, and *de facto* increasing the number of synaptic inputs on motor neurons, including proprioceptive inputs.

In addition to protecting motor neurons in SMA mice, both exercise protocols improved neuromuscular excitability properties. Several specific perturbations of the neuromuscular functions have already been reported in SMA, including (1) a CMAP decrease (Kissel *et al.* 2011), (2) motor neuron hyperexcitability (Mentis *et al.* 2011) and (3) an increase in latency (Yonekawa *et al.* 2013). However, if we confirmed some of these electrophysiology 'markers' of SMA such as increased latency (parameter 19, C1), we described here for the first time higher and longer refractory periods (parameters 32 and 10, C3), lower supernormal period (parameters 13, 34 and 33, C3) and smaller threshold changes in sedentary type 3 SMA-like mice, suggesting axonal motor neuron membrane depolarization through increased excitability of the SMA neuromuscular system (Kiernan & Bostock, 2000; Kiernan *et al.* 2002). These alterations could be linked to a dysfunction either in Na^+ and K^+ channels along the motor neuron axons or in the oxygen-dependent Na^+/K^+-ATPase (Kiernan & Bostock, 2000). Importantly, both physical exercises were able to counteract these neuromuscular defects, returning to control electrophysiological values. Therefore, our results concur with an exercise-induced compensatory hyperactivity of the Na^+/K^+-ATPase or a recovery of ion channel functionality, leading to membrane hyperpolarization.

Taken together, our results support the concept of a double adaptive effect in type 3 SMA-like mice, involving both an intrinsic muscle adaptation and an exercise-induced specific neuroprotection. Indeed, the running exercise induced a transition from type II to type

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

I myofibres in the context of preferential neuroprotection of slow motor neurons, which could be attributable to exercise-induced neuroprotection, but also a hypertrophy of intermediate fibres or large fibres, which may depend on intrinsic muscle adaptations. The swimming exercise induced a transition from type IIx/IIb to type IIa myofibres in both fast-twitch muscles with a hypertrophy of large fibres, which may result from intrinsic muscle adaptations, in a context of maintenance of IIx/IIb myofibres, likely to be attributable to the neuroprotection of fast motor neurons.

From a mechanistic point of view, the chemo-communications between motor neurons and muscles are likely to be involved in the specific effects of each exercise protocol on SMA motor unit adaptations. These communications occur through growth/neurotrophic factor release in an autocrine/paracrine mode and through axonal transport (de la Cruz *et al.* 1996; Wright *et al.* 1997; Chowdary *et al.* 2012; Glat *et al.* 2016). Interestingly, the axonal transport at the levels of the sciatic nerve has been shown to be differentially modulated by the type of physical solicitation, i.e. swim or run (Jasmin *et al.* 1987), thus potentially representing a likely mechanism to explain, at least partly, the specific effects of each exercise on SMA motor units.

Furthermore, based on structural (NMJ and myofibre phenotypes) and on behavioural data (vertical rearing events), we confirmed the preferential alteration of extensor muscles in the type 3 SMA-like mouse model (Biondi *et al.* 2008). In both exercise types, the extensors muscles are solicited, notably during the pushing phase of the movement (Gruner *et al.* 1980). The fact that these muscles were significantly improved by both exercises further substantiated the hypothesis of a direct link between activity and neuroprotection leading to beneficial motor unit adaptations.

Interestingly, several exercise-induced adaptations observed in SMA, such as increased muscle resistance to high and low intensity efforts, myofibre hypertrophy and muscle typology adaptations, were also found in controls. These observations suggest that SMA-like mice respond adequately to different physical exercise workloads. Thus, because each exercise type enhances specific motor unit adaptations, the exercise prescription should take into account the disease context and the expected motor unit adaptations.

Finally and most importantly, the present study provides several clues for designing rehabilitation protocols for mild SMA patients. The swimming-based training clearly provided the most profound benefits in terms of neuroprotection, muscle phenotype maintenance and motor behaviour, including a significant increase in muscle resistance to fatigue. Nevertheless, the running exercise also had specific beneficial effects on SMA motor units, i.e. protection of slow motor neurons and hypertrophy of intermediate myofibres, suggesting that the design of active physiotherapy protocols based on a mixture of running and swimming exercises could synergize the specific benefits induced by each exercise. The only limitation of such application could be the muscle weakness of type 2 and some type 3 SMA patients, especially on hindlimbs, due to high gravity strains. Therefore, short periods of high intensity swimming exercise essentially targeting the recruitment of extensor muscles should be clinically relevant for moderately severe SMA patients.

References

Bacskai T, Rusznak Z, Paxinos G & Watson C (2014). Musculotopic organization of the motor neurons supplying the mouse hindlimb muscles: a quantitative study using Fluoro-
Gold retrograde tracing. *Brain Struct Funct* **219**, 303–321.

Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, Pariset C, Lecolle S, Cote J, Chanoine C & Charbonnier F (2010). In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* **30**, 11288–11299.

Biondi O, Grondard C, Lecolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C & Charbonnier F (2008). Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* **28**, 953–962.

Bladen CL, Thompson R, Jackson JM, Garland C, Wegel C, Ambrosini A, Pisano P, Walter MC, Schreiber O, Lusakowska A, Jedrzejowska M, Kostera-Pruszczyk A, van der Pol L, Wadman RI, Gredal O, Karaduman A, Topaloglu H, Yilmaz O, Matyushenko V, Rasic VM, Kosac A, Karcagi V, Garami M, Herczegfalvi A, Monges S, Moresco A, Chertkoff L, Chamova T, Guergueltcheva V, Butoianu N, Craiu D, Korngut L, Campbell C, Haberlova J, Strenkova J, Alejandro M, Jimenez A, Ortiz GG, Enriquez GV, Rodrigues M, Roxburgh R, Dawkins H, Youngs L, Lahdetie J, Angelkova N, Saugier-Veber P, Cuisset JM, Bloetzer C, Jeannet PY, Klein A, Nascimento A, Tizzano E, Salgado D, Mercuri E, Sejersen T, Kirschner J, Rafferty K, Straub V, Bushby K, Verschuuren J, Beroud C & Lochmuller H (2014). Mapping the differences in care for 5,000 spinal muscular atrophy patients, a survey of 24 national registries in North America, Australasia and Europe. *J Neurol* **261**, 152–163.

Boerio D, Greensmith L & Bostock H (2009). Excitability properties of motor axons in the maturing mouse. *J Peripher Nerv Syst* **14**, 45–53.

Bowerman M, Beauvais A, Anderson CL & Kothary R (2010). Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model. *Hum Mol Genet* **19**, 1468–1478.

Boyer JG, Murray LM, Scott K, De Repentigny Y, Renaud JM & Kothary R (2013). Early onset muscle weakness and disruption of muscle proteins in mouse models of spinal muscular atrophy. *Skelet Muscle* **3**, 24.

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

Chowdary PD, Che DL & Cui B (2012). Neurotrophin signaling via long-distance axonal transport. *Annu Rev Phys Chem* **63**, 571–594.

Cobb MS, Rose FF, Rindt H, Glascock JJ, Shababi M, Miller MR, Osman EY, Yen PF, Garcia ML, Martin BR, Wetz MJ, Mazzasette C, Feng Z, Ko CP & Lorson CL (2013). Development and characterization of an SMN2-based intermediate mouse model of Spinal Muscular Atrophy. *Hum Mol Genet* **22**, 1843–1855.

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

de la Cruz RR, Pastor AM & Delgado-Garcia JM (1996). Influence of the postsynaptic target on the functional properties of neurons in the adult mammalian central nervous system. *Rev Neurosci* **7**, 115–149.

Enjin A, Rabe N, Nakanishi ST, Vallstedt A, Gezelius H, Memic F, Lind M, Hjalt T, Tourtellotte WG, Bruder C, Eichele G, Whelan PJ & Kullander K (2010). Identification of novel spinal cholinergic genetic subtypes disclose Chodl and Pitx2 as markers for fast motor neurons and partition cells. *J Comp Neurol* **518**, 2284–2304.

Falk DJ, Todd AG, Lee S, Soustek MS, ElMallah MK, Fuller DD, Notterpek L & Byrne BJ (2014). Peripheral nerve and neuromuscular junction pathology in Pompe disease. *Hum Mol Genet* **24**, 625–636.

Glat MJ, Benninger F, Barhum Y, Ben-Zur T, Kogan E, Steiner I, Yaffe D & Offen D (2016). Ectopic muscle expression of neurotrophic factors improves recovery after nerve injury. *J Mol Neurosci* **58**, 39–45.

Goes AT, Souza LC, Filho CB, Del Fabbro L, De Gomes MG, Boeira SP & Jesse CR (2014). Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* **256**, 61–71.

Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lecolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C & Charbonnier F (2005). Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* **25**, 7615–7622.

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

Gruner JA, Altman J & Spivack N (1980). Effects of arrested cerebellar development on locomotion in the rat. Cinematographic and electromyographic analysis. *Exp Brain Res* **40**, 361–373.

Harding AE & Thomas PK (1980). The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* **103**, 259–280.

Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH & Li H (2000). A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* **24**, 66–70.

Imlach WL, Beck ES, Choi BJ, Lotti F, Pellizzoni L & McCabe BD (2012). SMN is required for sensory-motor circuit function in Drosophila. *Cell* **151**, 427–439.

Jasmin BJ, Lavoie PA & Gardiner PF (1987). Fast axonal transport of acetylcholinesterase in rat sciatic motoneurons is enhanced following prolonged daily running, but not following swimming. *Neurosci Lett* **78**, 156–160.

Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT & Monani UR (2008). Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **17**, 2552–2569.

Kiernan MC & Bostock H (2000). Effects of membrane polarization and ischaemia on the excitability properties of human motor axons. *Brain* **123**, 2542–2551.

Kiernan MC, Walters RJ, Andersen KV, Taube D, Murray NM & Bostock H (2002). Nerve excitability changes in chronic renal failure indicate membrane depolarization due to hyperkalaemia. *Brain* **125**, 1366–1378.

Kirkinezos IG, Hernandez D, Bradley WG & Moraes CT (2003). Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **53**, 804–807.

Kissel JT, Scott CB, Reyna SP, Crawford TO, Simard LR, Krosschell KJ, Acsadi G, Elsheik B, Schroth MK, D'Anjou G, LaSalle B, Prior TW, Sorenson S, Maczulski JA, Bromberg MB, Chan GM & Swoboda KJ (2011). SMA CARNIVAL TRIAL PART II: a prospective, single-armed trial of L-carnitine and valproic acid in ambulatory children with spinal muscular atrophy. *PLoS One* **6**, e21296.

Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marce M, Griffin JW, Rich MM & Sumner CJ (2009). Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* **29**, 842–851.

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

Lewelt A, Krosschell KJ, Stoddard GJ, Weng C, Xue M, Marcus RL, Gappmaier E, Viollet L, Johnson BA, White AT, Viazzo-Trussell D, Lopes P, Lane RH, Carey JC & Swoboda KJ (2015). Resistance strength training exercise in children with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* **52**, 559–567.

Liebetanz D, Hagemann K, von Lewinski F, Kahler E & Paulus W (2004). Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* **20**, 3115–3120.

Liu H, Yazdani A, Murray LM, Beauvais A & Kothary R (2014). The Smn-independent beneficial effects of trichostatin A on an intermediate mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS One* **9**, e101225.

Liu HL, Zhao G, Zhang H & Shi LD (2013). Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *Behav Brain Res* **256**, 261–272.

Lorson CL & Androphy EJ (2000). An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* **9**, 259–265.

Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH & Androphy EJ (1998). SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* **19**, 63–66.

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

Mentis GZ, Blivis D, Liu W, Drobac E, Crowder ME, Kong L, Alvarez FJ, Sumner CJ & O'Donovan MJ (2011). Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neuron* **69**, 453–467.

Nodera H & Kaji R (2006). Nerve excitability testing and its clinical application to neuromuscular diseases. *Clin Neurophysiol* **117**, 1902–1916.

Preisler N, Andersen G, Thogersen F, Crone C, Jeppesen TD, Wibrand F & Vissing J (2009). Effect of aerobic training in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy disease). *Neurology* **72**, 317–323.

Russman BS, Melchreit R & Drennan JC (1983). Spinal muscular atrophy: the natural course of disease. *Muscle Nerve* **6**, 179–181.

Schiaffino S & Reggiani C (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* **91**, 1447–1531.

Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG & Rosenfelder G (1984). Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J Immunol Methods* **72**, 471–479.

Tsai LK, Tsai MS, Lin TB, Hwu WL & Li H (2006). Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* **24**, 286–295.

Tuon T, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Luciano T, Trom CB, Silva LA, Quevedo J, Souza CT, Lira FS & Pinho RA (2012). Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. *Neuroscience* **227**, 305–312.

Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH & van den Berg LH (2003). Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord* **13**, 737–743.

Vianello S, Bouyon S, Benoit E, Sebrie C, Boerio D, Herbin M, Roulot M, Fromes Y & de la Porte S (2014). Arginine butyrate per os protects mdx mice against cardiomyopathy, kyphosis and changes in axonal excitability. *Neurobiol Dis* **71**, 325–333.

Wright DE, Zhou L, Kucera J & Snider WD (1997). Introduction of a neurotrophin-3 transgene into muscle selectively rescues proprioceptive neurons in mice lacking endogenous neurotrophin-3. *Neuron* **19**, 503–517.

Xu ZQ, Zhang LQ, Wang Q, Marshall C, Xiao N, Gao JY, Wu T, Ding J, Hu G & Xiao M (2013). Aerobic exercise combined with antioxidative treatment does not counteract moderate- or mid-stage Alzheimer-like pathophysiology of APP/PS1 mice. *CNS Neurosci Ther* **19**, 795–803.

Yonekawa T, Komaki H, Saito Y, Sugai K & Sasaki M (2013). Peripheral nerve abnormalities in pediatric patients with spinal muscular atrophy. *Brain Dev* **35**, 165–171.

Additional information

Competing interests

The authors declare no competing financial interest. A patent on active physiotherapy for SMA patients is pending.

Author contributions

F.C. conducted and analysed the majority of experiments. C.D. and L.H. conducted the Western blot experiments and participated in the behavioural testing experiments. E.B. conducted and analysed the electrophysiological experiments on neuromuscular excitability. T.R. and B.B. conducted and analysed the spontaneous activity and vertical rearing experiments. B.D.G. conducted the *in situ* hybridization experiments. J.B. conducted NMJ experiments and developmental analysis of NMJ and muscle. P.L. conducted the behaviour analysis and helped in writing the manuscript. C.P. assisted in the majority of experiments and helped in writing the manuscript. C.C. helped in the analysis of muscle data. F.C. helped in supervising the project and experiments and helped in writing the manuscript. O.B. supervised the project and wrote the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

F.C. is the recipient of a PhD fellowship from the AXA Research fund and Fondation Garches. This work is supported by AFM (Association Française contre les Myopathies).

Acknowledgements

All the authors wish to thank C. Mader and J. Coppet for animal care and Klas Kullander and its laboratory for delivery of *in situ* hybridization probes.

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

Translational perspective

Growing evidence from the last decade indicates the positive impact of physical exercise on neuromuscular disorders, including Parkinson's disease and spinal muscular atrophy (SMA). However, in some cases like amyotrophic lateral sclerosis and Duchenne muscular dystrophy, the potential role of exercise remains under debate. 'Physical exercise' is a term that covers a wide range of conditions, including voluntary *vs.* forced and long-term *vs.* acute exercise, concentric *vs.* eccentric contractions and anaerobic *vs.* oxidative energetic pathways. The present study evaluated whether two different forced long-term exercises (10 consecutive months), based either on a low intensity running exercise, favouring the use of oxidative energetic pathways, or on a high intensity swimming exercise, favouring the use of anaerobic energetic pathways, could be beneficial for mild type SMA-like mice. We reported that while both types of exercise were beneficial, the motor unit structure and function did not equally respond: swimming-based exercise revealed further beneficial effects compared to running, especially on the protection of specific motor neuron subpopulations. Only the slow motor neurons have been protected after running, while both intermediate and fast motor neurons have been protected after swimming, leading to specific adaptations of other components of the motor unit, notably muscle fibres. Therefore, the present study reinforces the idea that a better understanding of the effects of 'well controlled' physical exercise on motor units could provide several clues when designing rehabilitation programmes for SMA patients. This work has been used to design an innovative clinical trial for SMA patients, which is currently ongoing in France.

© 2016 The Authors. The Journal of Physiology © 2016 The Physiological Society

4. Article 4

Effects of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of mutliple sclerosis

Léo Houdebine, Cristina Anna Gallelli, Marialetizia Rastelli, Nirmal Kumar Sampathkumar, Julien Grenier

Publié le 9 Juin 2017 dans le journal Chemistry and Physics of Lipids

G Model
CPL 4566 No. of Pages 8

ARTICLE IN PRESS

Chemistry and Physics of Lipids xxx (2017) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Chemistry and Physics of Lipids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemphyslip

Review

Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis

Léo Houdebine, Cristina Anna Gallelli, Marialetizia Rastelli, Nirmal Kumar Sampathkumar, Julien Grenier*

Paris Descartes University, INSERM UMRS 1124, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 April 2017
Received in revised form 6 June 2017
Accepted 7 June 2017
Available online xxx

Keywords:
Physical activity
Physical exercise
Multiple sclerosis
Oxysterols
Cholesterol
Myelin
Oxidative stress

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a central nervous demyelinating disease characterized by cyclic loss and repair of myelin sheaths associated with chronic inflammation and neuronal loss. This degenerative pathology is accompanied by modified levels of oxysterols (oxidative derivatives of cholesterol, implicated in cholesterol metabolism), highlighted in the brain, blood and cerebrospinal fluid of MS patients. The pathological accumulation of such derivatives is thought to participate in the onset and progression of the disease through their implication in inflammation, oxidative stress, demyelination and neurodegeneration. In this context, physical exercise is envisaged as a complementary resource to ameliorate therapeutic strategies. Indeed, physical activity exerts beneficial effects on neuronal plasticity, decreases inflammation and oxidative stress and improves blood-brain integrity in extents that could be beneficial for brain health. The present review attempts to summarize the available data on the positive effect of physical exercise to highlight possible links between physical activity and modulation of cholesterol/oxysterol homeostasis in MS.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 00
   1.1. Physical exercise and MS clinical outcomes . . . 00
   1.2. Physical exercise and oligodendroglial cell population . . . 00
   1.3. Physical exercise and demyelination . . . 00
   1.4. Physical exercise and neuronal population . . . 00
   1.5. Cholesterol homeostasis alteration and MS . . . 00
   1.6. Physical exercise and BBB integrity – brain cholesterol homeostasis . . . 00
   1.7. Physical exercise and oxidative stress – oxysterol generation and inflammation . . . 00
2. Conclusion . . . 00
   Conflicting interests . . . 00
   Acknowledgements . . . 00
   References . . . 00

1. Introduction

Myelin is derived from cytoplasmic extensions emanating from oligodendrocytes that insulate portion of axons to increase the speed of axon potentials. Numerous CNS structures are highly myelinated and named white matter, among which the corpus callosum in the brain, the cerebellum and the spinal cord. Due to its

* Corresponding author.
E-mail address: julien.grenier@parisdescartes.fr (J. Grenier).

http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.002
0009-3084/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article in press as: L. Houdebine, et al., Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis, Chem. Phys. Lipids (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.002

high cholesterol content, myelin accounts for 70% of the total cholesterol present in the brain. So, cholesterol metabolism appears essential for the development and maintenance of white matter (Dietschy, 2009; Muse et al., 2001; Saher et al., 2011).

Cholesterol homeostasis is compartmentalized between the CNS and the rest of the body. As the blood brain barrier (BBB) impermeates systemic cholesterol, the cholesterol present in the brain originates from *in-situ* synthesis (Bjorkhem and Meaney, 2004). To excrete cholesterol excess from the brain to the periphery, cholesterol must be oxidized in oxysterols (such as 24-S hydroxycholesterol) that can pass through the BBB to reach the blood flow. Altered cholesterol and oxysterol levels is a hallmark of chronic diseases, among which MS, where accumulation of cholesterol in myelin rich regions of the brain has been shown as early as the 50's (Cumings, 1955).

Physical exercise is known to exert numerous beneficial effects on the nervous system, from neuroprotection to enhanced learning and neuronal plasticity (Cassilhas et al., 2016; Cotman et al., 2007). Physical activity modulates growth factor signaling, oxidative stress and energy metabolism (through mitochondrial functioning, (Cotman and Berchtold, 2002)). It is thought to ameliorate MS pathology course and is envisaged as a complement to classical therapeutic treatment (Sa, 2014). Moreover, exercise has been shown to promote BBB maintenance (Souza et al., 2016), which disruption could participate in the alteration of cholesterol contents in the brain of MS patients (Zhornitsky et al., 2016). Physical exercise also modulates cholesterol metabolism (Baker et al., 2010; Lavoie, 2016; Mueller et al., 2015) that could contribute to the amelioration of MS outcomes.

Given the plethoric effects of different exercise paradigms on several CNS structures impacted by MS lesions, we can speculate that part of the benefits elicited by physical activity could be related to the modulation of cholesterol/oxysterol homeostasis. In order to explore these associations, we will review the effect of physical exercise on the onset and progression of MS, adding some unpublished data from our lab, and highlight some possible mechanistic links between benefits of exercise and modulation of cholesterol metabolism in MS.

1.1. Physical exercise and MS clinical outcomes

Several exercise paradigms have been tested in the context of MS mouse models, from voluntary- to forced-exercise, either running or swimming. It is of importance to distinguish between these protocols as they rely on distinct metabolic and neuroendocrine adaptations (for review, see (Hamilton and Rhodes, 2015)). Indeed, depending on the parameters of the effort (*i.e.* involving concentric or eccentric contractions, long-term or acute effort), the metabolic pathways involved are different. For instance, a high intensity and amplitude swimming-based training will solicit an anaerobic energetic pathway since it requires rapid and available energetic substrates, while a low intensity and amplitude running-based training will rely on aerobic energetic pathway (Grondard et al., 2008).

To study a variety of aspects of human MS, the disease can be modeled in rodents using various protocols, among which experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and cuprizone intoxication (Denic et al., 2011). In rodent models of MS, disease onset and progression can be assessed using clinical scoring determination based on the progressive appearance of hind limbs and forelimbs paralysis, at the origin of locomotor deficits and gradual disability observed in the pathology.

Overall, enhancing physical activity, either through voluntary or forced exercise, attenuates MS pathology. The first study published investigated the influence of exercise as a stressor during the onset of disease on an EAE model of MS. Authors showed that forced endurance treadmill running delayed the onset and the severity of the disease (Le Page et al., 1994). It is noteworthy that when the same team tested two days of either severe or moderate running exercise, only the severe exercise protocol was shown to significantly attenuate MS onset and severity (Le Page et al., 1996). Increased time of forced running exercise has later on been tested for 10 consecutive days (Patel and White, 2013). Despite an effect on brain NGF concentration, authors did not highlight any positive effect of exercise on MS severity. On the other hand, six weeks of forced swimming starting 5 weeks before MS induction attenuated disease severity even 5 weeks after exercise protocol was stopped (Bernardes et al., 2016, 2013). Moreover, it has been shown that voluntary running exercise performed during the entire course of the pathology delays the onset and attenuates the clinical defects of MS (Benson et al., 2015; Pryor et al., 2015; Rossi et al., 2009). Altogether, it appears that beneficial effect of physical exercise on MS severity depends more on exercise duration (acute versus chronic), rather than voluntary versus forced protocol. Indeed, periods of exercise superior to 3 weeks are necessary to promote adaptation to stress responses and neuroprotection (Adlard et al., 2005; Sigwalt et al., 2011; Zhang et al., 2011).

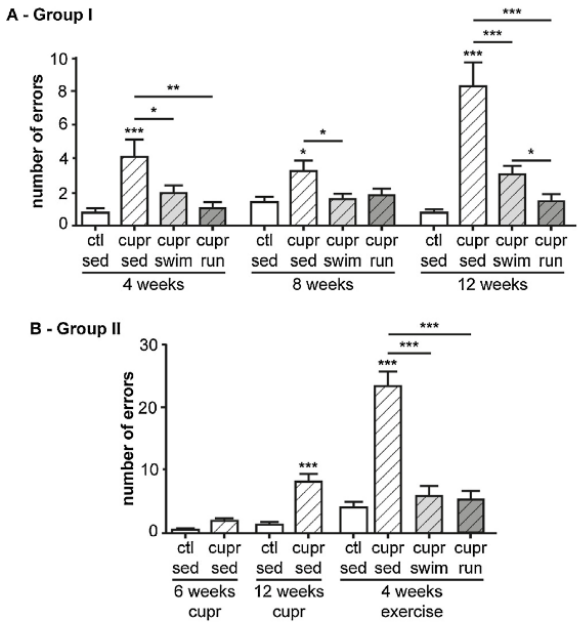


Fig. 1. Influence of exercise performed during (A – group I) or after (B – group II) 12 weeks of demyelination protocol on locomotion quality. Trained mice were committed to 20 min of daily exercise consisting of either running sessions on a treadmill at a speed of 4–6.5 m/min or swimming against an adjusted water flow of 2L/min. Locomotion was assessed using rod test following either (A) 4, 8 and 12 weeks of cuprizone intoxication for mice trained during cuprizone intoxication (group I) or (B) after 6 and 12 weeks of cuprizone and following 4 weeks of physical training after cuprizone withdrawal for the mice trained after cuprizone intoxication (Group II). Mice were trained to walk along a bar (70 cm long, 3 cm diameter) elevated 30 cm above the bench, from a start platform until a goal box. A high definition digital camera was used to record the experiment and we determined the number of times the mice hind paws slipped on the rod without falling (number of errors, calculated as the mean number of errors performed over three trials per animals). ctl sed: sedentary animals fed with normal chow, cupr sed: sedentary animals fed with 0.2% cuprizone added to the chow, cupr swim: animals fed with with 0.2% cuprizone added to the chow undergoing swimming exercise, cupr run: animals fed with with 0.2% cuprizone added to the chow undergoing running exercise.
N = 6 animals/group. * $P < 0{,}05$; ** $P < 0{,}01$; *** $P < 0{,}001$ by Tukey's post hoc test after one-way ANOVA when compared to either ctl sed or cupr sed group.

Please cite this article in press as: L. Houdebine, et al., Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis, Chem. Phys. Lipids (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.002

In line with this, in our mouse model of MS (where mice were intoxicated with cuprizone to induce cyclic death of oligodendrocytes and subsequent demyelination (Denic et al., 2011), we showed that two distinct forced exercise protocols were able to delay the onset and to decrease the severity of locomotor defects during pathology progression (Fig. 1). Interestingly, we also demonstrated that both forced exercise protocols, performed after MS onset, were also able to decrease the severity of the pathology.

Four weeks after beginning the demyelination protocol, locomotion defects were quantifiable in sedentary animals, as highlighted by an increase of the number of faults performed by the mice during the rod test. Both running and swimming protocols were able to counteract the appearance of locomotor defects, as exercised mice performed fewer errors. As the demyelination protocol lasts until 12 weeks, locomotor defects were more pronounced in sedentary animals whereas exercised animals appeared less affected by the disease. Moreover, both exercise protocols were also able to decrease the severity of the pathology even when they were performed for 4 weeks following the end of the demyelination protocol, when the pathology was well established. Indeed, 4 weeks after either swimming or running protocols, exercised mice that underwent demyelination protocol performed the same number of errors than the control mice, contrary to their sedentary counterparts.

1.2. Physical exercise and oligodendroglial cell population

Locomotor defects arise following demyelination of the central nervous system, as a result of oligodendrocytes death. Available studies on the influence of physical exercise on oligodendroglial cell lineage showed that exercise training protects against loss of spinal Oligodendrocyte Precursor Cells (OPC) and mature oligodendrocytes induced by high fat consumption (Yoon et al., 2016). Recently, in a mouse model of cerebellar ataxia, voluntary running ameliorated the pathology by inducing oligodendrogenesis (Alvarez-Saavedra et al., 2016). In an attempt to ameliorate the efficacy of Neural Stem cells (NSC) grafts after spinal cord injury, a treadmill locomotor training increased the differentiation of NSC to oligodendroglial and neuronal lineage (Hwang et al., 2014). In a MS context, our results suggest that both running and swimming protocols would stimulate OPC proliferation to dampen oligodendrocyte loss in the corpus callosum (Fig. 2).

Cuprizone intoxication led to 25% decrease of PDGFRα$^+$ cells in the corpus callosum together with a doubling of simple branched PDGFRα$^+$ cells (Fig. 2A). It is noteworthy, that the cell differentiation program is concomitant to morphological changes with emergence of multiple branched processes. So these results suggest that cuprizone depletes mature oligodendrocyte population together with the stimulation of precursor cell proliferation. Interestingly, physical exercise performed during demyelination reduced total oligodendrocyte population loss (with a more potent effect of running at the level of the lateral part of the corpus callosum). Moreover, the quantification of simple branched PDGFRα$^+$ cells suggests that this protective effect of physical exercise would be due to the stimulation of precursor cells proliferation. Running exercise exhibits a more potent effect, increasing by 8-fold the number of precursor cells in the corpus callosum of mice trained during the demyelination protocol.

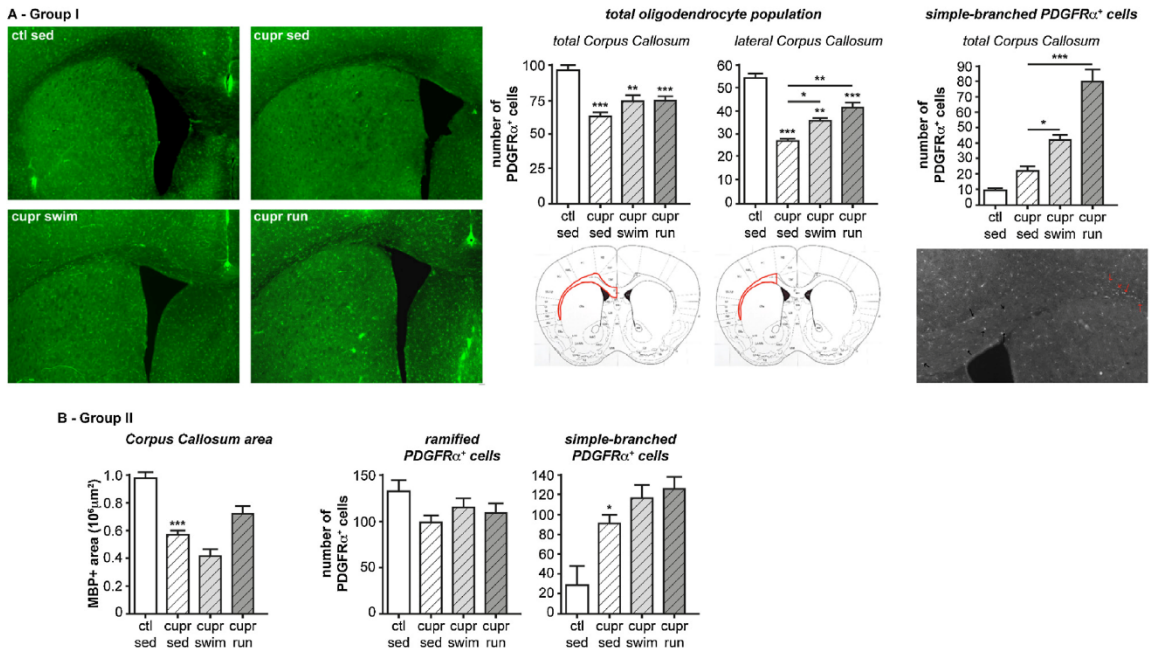


Fig. 2. Influence of exercise performed during (A – group I) or after (B – group II) 12 weeks of demyelination protocol on oligodendrocytes and myelinated area of the corpus callosum. (A) Oligodendrocyte precursor cells (OPCs) loss in the corpus callosum after 12 weeks of cuprizone intoxication was determined by immunohistochemistry using an antibody recognizing the OPC-specific marker PDGFRα. Either total (black and red arrows) or simple branched PDGFRa$^+$ cells (red arrows) were counted following confocal acquisition of brain slices labeled with an anti-PDGFRα antibody. Data are presented as mean ± SEM of cell counting in the corpus callosum (n = 3). * $P < 0{,}05$; ** $P < 0{,}01$; *** $P < 0{,}001$ by Tukey's post hoc test after one-way ANOVA when compared with ctl sed condition. (B) myelinated area of the corpus callosum was determined after delineation of the MBP$^+$ area following immunohistochemistry staining. Oligodendrocyte precursor cells (OPCs) loss in the corpus callosum after 12 weeks of cuprizone intoxication was determined by immunohistochemistry using an antibody recognizing PDGFRα. Either ramified or simple-branched PDGFRa$^+$ cells were counted in the corpus callosum. Data are presented as mean ± SEM of cell counting in the corpus callosum (n = 3). * $P < 0{,}05$; ** $P < 0{,}01$; *** $P < 0{,}001$ by Tukey's post hoc test after one-way ANOVA when compared with ctl sed condition. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article in press as: L. Houdebine, et al., Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis, Chem. Phys. Lipids (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.002

Moreover, when physical exercise was performed after induction of demyelination, running protocol seems to slightly protect corpus callosum from demyelination while the swimming exercise appeared inefficient (Fig. 2B). However, both exercise protocols would be able to increase simple branched PDGFRα$^+$ cell population, suggesting their influence on OPC recruitment to enhance remyelination process.

1.3. Physical exercise and demyelination

Oligodendrocyte loss and subsequent demyelination process is hypothesized to be primed and accompanied by immune cell infiltration; responsible of chronic inflammation through cytokine release that impedes endogenous remyelination (De Santi et al., 2011). In this context, analysis of physical exercise interventions gave conflicting results in MS patients, as serum proinflammatory cytokine levels were shown either unaltered (Bansi et al., 2013; Heesen et al., 2003; Schulz et al., 2004), increased (Castellano and White, 2008) or decreased (Golzari et al., 2010). Bernardes et al. showed that 6 weeks of forced swimming exercise was able to decrease pro-inflammatory cytokines concentration both in the brain and in the spinal cord of EAE mice (Bernardes et al., 2013). In line with this, voluntary wheel running was able to decrease immune cell infiltration in the spinal cord of MS mice (Benson et al., 2015; Pryor et al., 2015). Conversely, Rossi et al. did not highlight any immune cell infiltrates neither in the spinal cord nor in the brain of their MS mice-model (Rossi et al., 2009). In other chronic diseases, exercise was able to modulate nervous system inflammation. In a mouse model of Alzheimer disease (AD), 3 weeks of voluntary running was sufficient to alter immune profile and decrease Aβ accumulation in the brain of exercised mice (Nichol et al., 2008). Pre-conditioning running exercise for 3 weeks decreased TNFα accumulation following a brain stroke in rats (Ding et al., 2005). In humans, regular exercise has been shown able to decrease inflammatory mediators CRP, IL-6, or TNF-α, while anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 were increased (Teixeira-Lemos et al., 2011).

Demyelination accounts for the emergence of locomotor deficits and repetitive episodes of such process leads to the aggravation of the disease severity. Pryor et al. showed that chronic exercise was able to counteract myelin loss in the spinal cord (Pryor et al., 2015). In line with this, Bernardes et al. showed a decreased demyelinated area in the spinal cord of exercised animals (Bernardes et al., 2016, 2013). It is noteworthy that the only region analyzed to assess the influence of physical exercise on demyelination is spinal cord, while MS is known to attack white matter structures of the cerebrum and cerebellum (Wood, 2016). Indeed, in our mouse model of MS, we were able to highlight a 50% decrease of PLP and MBP structural myelin protein amounts in both the brain and the cerebellum (Fig. 3).

Interestingly, we showed that physical exercise performed during the demyelination protocol was able to counteract myelin loss in a region-specific manner. While running protocol was found more efficient to decrease myelin protein loss in the brain, swimming exercise exerted a more potent effect at the cerebellum level.

1.4. Physical exercise and neuronal population

In adult brain, physical exercise is known to modulate neuronal survival and this should be taken in account for explaining part of its beneficial effect toward MS. Indeed, physical activity directly modulates neurotransmission and neuronal activity, which in turn influence myelination process (for review see (Gibson et al., 2014; Meeusen and De Meirleir, 1995)). In the hippocampus, implicated in learning and memory processes, voluntary running exercise has been shown to enhance both adult neurogenesis and dendrite development (Eadie et al., 2005; Nokia et al., 2016; van Praag et al.,

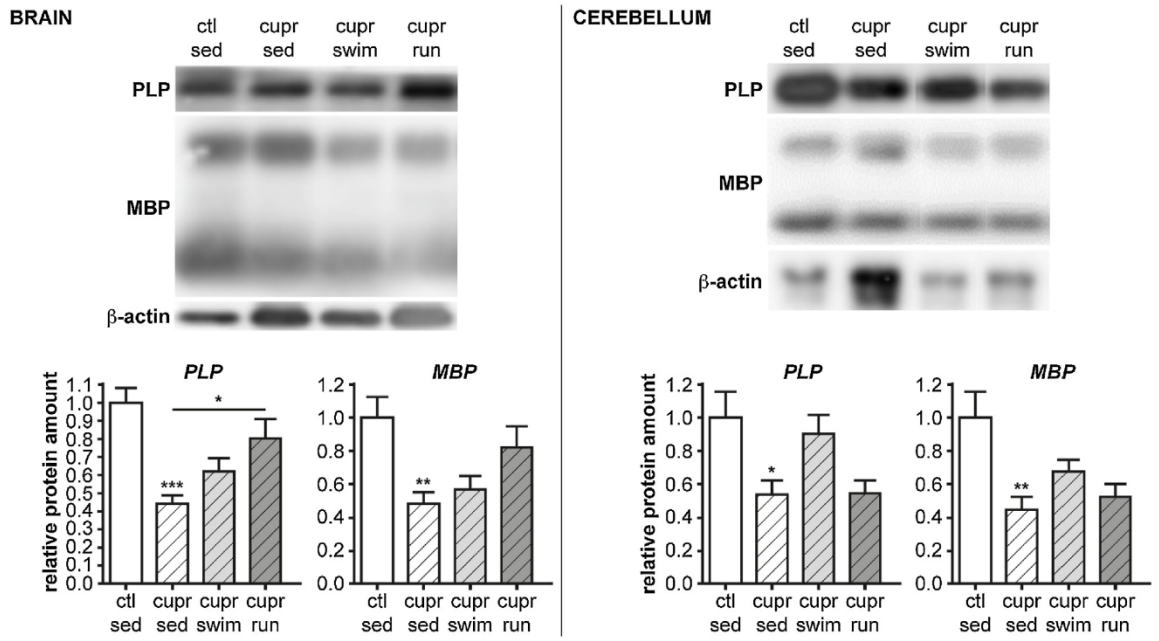


Fig. 3. Amount of myelin proteins in brain and cerebellum of mice subjected to 12 weeks of demyelination protocol concomitantly to exercise. Myelin protein amount was determined both in the brain and the cerebellum of mice demyelinated by cuprizone intoxication for 12 consecutive weeks, concomitantly with exercise. PLP and MBP protein expression level were quantified for at least 6 animals per group. * $P < 0{,}05$; ** $P < 0{,}01$; *** $P < 0{,}001$ by Tukey's post hoc test after one-way ANOVA when compared with either ctl sed or cupr sed condition.

Please cite this article in press as: L. Houdebine, et al., Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis, Chem. Phys. Lipids (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.002

1999). In aged mice, high intensity physical exercise was able to support neurogenesis (E et al., 2014).

In numerous rodent models of chronic diseases, physical exercise promoted neuronal survival (for review, see (Hamilton and Rhodes, 2015)). In the cerebellum of ataxic mice, voluntary running exercise was shown able to increase Purkinje cells dendritic arborization (Alvarez-Saavedra et al., 2016). In EAE rodent models, both swimming and voluntary running protocols harbored neuroprotective properties toward spinal cord (Bernardes et al., 2016; Pryor et al., 2015; Rossi et al., 2009). Moreover, neuronal growth was induced following voluntary running protocol in MS rats, through the inhibition of expression of the structural myelin protein MAG (Ghiani et al., 2007). Benson et al. showed that physical exercise was also able to dampen the abnormal neuronal activity in the SC of MS mice (Benson et al., 2015). At the hippocampal level, Kim et al. showed that regular exercise of MS mice enhanced neuroplasticity to promote memory functions (Kim and Sung, 2017).

Given the multiple effects of physical exercise toward nervous system physiology and functioning, we can speculate that part of its effects occur through cholesterol homeostasis modulation. The following section attempts to summarize the available data on cholesterol/oxysterol alteration in MS and highlight some possible link between physical exercise and control of cholesterol homeostasis in the CNS.

1.5. Cholesterol homeostasis alteration and MS

Abnormal concentrations of 24-S-hydroxycholesterol (24-S) have been found in the serum of MS patients, implying an imbalance in cholesterol homeostasis in the MS brain (Teunissen et al., 2007). Cholesterol homeostasis dysregulation observed in MS is thought to be primed and to participate in myelin sheath loss and subsequent neuronal death, BBB disruption, oxidative stress and chronic inflammation, among others. Moreover, in human, hypercholesterolemia has been linked to aggravation of MS, as Marrie et al. highlighted an increased risk of disability progression in MS patients suffering from hypercholesterolemia (Marrie and Horwitz, 2010). Increased blood cholesterol levels are hypothesized to induce increased inflammation within the CNS through disruption of the BBB and subsequent entry of 27-OH leading to enhance immune recruitment as well as oxidative damages (Zhornitsky et al., 2016). Moreover, elevated concentrations of 7-Keto-cholesterol (7-KC), known to induce neuronal damage via the activation and migration of microglial cells, have been highlighted in the cerebrospinal fluid of MS patients (Vejux and Lizard, 2009). Altered oxysterol levels in the cerebrospinal fluid and circulation of MS patients appears concomitant with demyelinating episodes (van de Kraats et al., 2014; Vuletic et al., 2014). In line with this, 24-S and 27-hydroxycholesterol (27-OH) are known to drive the expression of inflammatory cytokines (for review, see (Poli et al., 2013)) or potentiate oxidative stress to induce neuronal apoptosis in AD disease (Gamba et al., 2011). In MS mouse model, deletion of 25-hydroxylase, responsible of 25-hydroxycholesterol (25-OH) synthesis, significantly attenuated disease outcomes by limiting the entry of T lymphocytes into the central nervous system (Chalmin et al., 2015). *In vitro*, Nury et al. showed that 7β-hydroxycholesterol and 24-S, similarly to 7-KC, could trigger oligodendroglial cell death (Nury et al., 2015).

In this context, targeting cholesterol homeostasis is tempting to modulate the course of the pathology, using statins to inhibit cholesterol synthesis. Several studies have been undertaken to investigate the benefits of lowering circulating cholesterol level to dampen excessive oxysterol loads in the brain of MS patients (Chataway et al., 2014; Pihl-Jensen et al., 2015). In these studies, statin therapy showed significant reduction of clinical disability in MS patients. However, CNS penetrating statins could exert deleterious effects on remyelination, as cholesterol synthesis is necessary for this regenerative process. Indeed, prolonged statin treatment of MS mice-models induced demyelination and inhibited remyelination process through reduction of oligodendroglial cell differentiation (Miron et al., 2009). On the other hand, the cholesterol derivative olesoxime has been shown able to attenuate demyelination and enhance remyelination processes through induction of oligodendroglial cell maturation (Magalon et al., 2012). In line with this, our team showed that activation of LXRs (nuclear receptors known to bind oxysterols) using either natural or synthetic ligands (*e.g* 25-OH or TO901217, respectively) could stimulate CNS remyelination process (Meffre et al., 2015).

Physical exercise exerts numerous effects on multiple signaling pathways and cell processes, modulates metabolism and neuro-endocrine responses. Its influence on systemic cholesterol homeostasis (Baker et al., 2010; Lavoie, 2016; Mueller et al., 2015) could participate in its benefits toward MS pathogenicity. The following session aims to summarize the molecular and cellular processes modulated by physical exercise and their possible interaction with cholesterol homeostasis.

1.6. Physical exercise and BBB integrity – brain cholesterol homeostasis

The major molecular effectors identified to date in the beneficial effect of physical exercise are BDNF, VEGF and IGF-1. Indeed, physical exercise has been shown to promote BDNF expression in the brain of trained animals and humans (Castellano and White, 2008; Ma, 2008). Under IGF-1 activation, BDNF signaling participates in synaptic plasticity, together with VEGF signaling, they induce neuronal proliferation and differentiation (Fabel et al., 2003; Trejo et al., 2001); for review, see (Cotman et al., 2007) that could account for the reduction of neuronal loss described in brain MS. Moreover, IGF1 overexpression is able to stimulate oligodendroglial cell differentiation and myelination (De Paula et al., 2014). More recently, VGF signaling modulation has been implicated in the beneficial effect of voluntary running protocol in promoting oligodendrogenesis in ataxic mice (Alvarez-Saavedra et al., 2016). This protocol triggered cerebellar myelination and dendritic arborization that could participate in the beneficial effect of physical exercise highlighted in MS mouse models.

Disruption of the BBB, implicated in disease outcome and progression in MS, participates in the dysregulation of brain cholesterol homeostasis (Zhornitsky et al., 2016). Since cholesterol is a major component of lipid rafts, a deregulation of its content has devastating effects on signaling pathway activities (Park et al., 2009). Moreover, Oxysterols are known to regulate cholesterol content but also membrane fluidity. Recent evidences demonstrate that 25-OH is a promoter and 7-β hydroxycholesterol, an inhibitor of lipid rafts formation (Filomenko et al., 2015). Besides, physical training has been shown beneficial for blood-brain barrier maintenance in a model of chronic cerebral hypoperfusion (Lee et al., 2017). For the treatment of diabetic patients, exercise has been shown to improve endothelial function and reinforces antioxidative capacity, helping to prevent dementia and AD outcomes (Bertram et al., 2016). In the context of MS, physical exercise is able to attenuate BBB disruption through the stimulation of tight junction expression (Souza et al., 2016). So, by maintaining BBB integrity, physical exercise could ameliorate brain cholesterol homeostasis and subsequently lipid raft stability, allowing efficient signaling activities involved in neural cell survival and differentiation.

Please cite this article in press as: L. Houdebine, et al., Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis, Chem. Phys. Lipids (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.002

1.7. Physical exercise and oxidative stress – oxysterol generation and inflammation

Physical exercise has also been implicated in the modulation of redox status of the brain. Indeed, exercise performed in aged mice showed significant effects on brain mitochondrial function through effect on the electron transport chain (Gusdon et al., 2017). In line with this, 5 weeks of treadmill training has been shown to increase antioxidant response in exercised animals, through the stimulation of GSH and GS synthesis (de Senna et al., 2017). Effects of physical exercise on mitochondrial functioning have been hypothesized to influence myelin homeostasis, together with high fat diet (Yoon et al., 2016). Through the modulation of IGF-1 signaling, physical exercise would increase mitochondrial biogenesis, modulating oxidative balance to promote myelin homeostasis.

Elevated ROS production can lead to increased oxysterol production (Brown and Jessup, 2009), reinforcing the deleterious effects of redox status deregulation found in MS. Indeed, cytotoxic effects of oxysterols are well documented, from alteration of metabolic pathways to mitochondrial membrane modification and increased ROS production, leading to cell death (Coppola and Ghibelli, 2000; Salvayre et al., 2002). In this regard, the ability of physical exercise to dampen ROS production and modulate redox status allows normalizing oxysterol production, limiting their deleterious effects observed in MS.

In line with this, we highlighted in our mouse model of MS overexpression of ABCA1, a LXR target gene, suggesting an alteration of oxysterol signaling (Fig. 4). Interestingly, when mice were subjected to physical exercise during the demyelination protocol, ABCA1 mRNA levels were normalized both in the brain and the cerebellum. This could reflect a normalization of oxysterol levels in the central nervous system of trained animals, participating in the beneficial of physical exercise we highlighted toward myelin status within the brain and cerebellum of our MS mice-model.

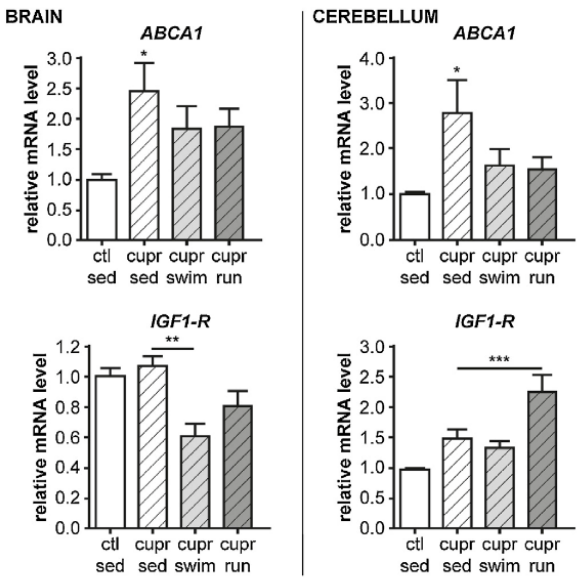


Fig. 4. Oxysterol pathway activity and IGF1 signaling pathway modulation evaluated in the brain and cerebellum of mice subjected to 12 weeks of demyelination protocol concomitantly to exercise. LXR signaling pathway activity was evaluated by quantifying mRNA amount of ABCA1, a LXR target gene. IGF1-R mRNA expression level was determined to highlight IGF1 pathway modulation. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; by Tukey's post hoc test after one-way ANOVA when compared to either ctl sed or cupr sed conditions.

In parallel, the dosage of IGF1-R mRNA expression level suggests that distinct exercise paradigms would differentially modulate IGF1 pathway in the CNS of MS mice. Indeed, while IGF1-R expression level is decreased in the brain of MS mice subjected to forced-swimming protocol, IGF1-R mRNA level appears higher in the cerebellum of MS mice of the running group. These discrepancies could underlie a differential effect of each exercise paradigm on myelin gene stimulation that we observed in either the brain or the cerebellum of our MS mice.

The potential crosstalk between oxysterol homeostasis modulation and IGF1 pathway elicited by physical activity in the brain of MS mice could also participate in the reduction of CNS myelin insults. Indeed, alteration of oxysterol homeostasis participates in the reduction of IGF1 activity, as observed in hypercholesterolemic animals where increased 27-OH concentration in the brain has been linked to attenuated IGF1 pathway and Aβ peptide production (Sharma et al., 2008). In line with this, by normalizing oxysterol concentration, physical exercise could modulate IGF1 activity, known to intervene in oligodendroglial cell lineage progression (Shi et al., 2014).

Abnormal accumulation of oxysterol found in MS brain has also been linked to chronic inflammation and T-cell entry in the CNS (Chalmin et al., 2015; Poli et al., 2013), at the origin of demyelination in MS pathology. Indeed, 24S and 27OH, among others, are known to trigger inflammatory cytokines release (Dugas et al., 2010; Marengo et al., 2016; Testa et al., 2014), while oxysterols have been shown able to modulate immune cell differentiation (Son et al., 2013; Soroosh et al., 2014); for review (Spann and Glass, 2013). To the opposite, the beneficial effect of physical exercise on demyelination outcomes can be linked to its anti-inflammatory capacities, through the reduction of pro-inflammatory cytokines production and decreased immune cell recruitment (Souza et al., 2016). Overall, physical activity appears beneficial for BBB integrity, normalizes systemic cholesterol homeostais and oxidative stress status. So, we can speculate that part of the anti-inflammatory properties of physical exercise could rely on its influence on brain oxysterol generation.

2. Conclusion

Physical exercise exerts multiple effects on brain functioning and resilience. Through the modulation of trophic factors signaling pathways, it enhances endogenous repairing mechanisms together with its influence on inflammation processes. Its implication in brain cholesterol homeostasis through modulation of mitochondrial activity and blood-brain barrier integrity is a possible way to potentiate these endogenous repairing mechanisms. Further studies need to be held in order to delineate the implication of physical exercise in modulating brain cholesterol homeostasis, together with a refinement of physical training protocols for a better characterization of the influence of such types of intervention on MS onset and progression in human.

Conflicting interests

The authors report no conflict of interest.

Acknowledgements

This work has been supported by the ARSEP foundation (ARSEP AO_2014 and ARSEP AO_2015) Paris Descartes University and INSERM.

Please cite this article in press as: L. Houdebine, et al., Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis, Chem. Phys. Lipids (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.002

References

Adlard, P.A., Perreau, V.M., Pop, V., Cotman, C.W., 2005. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. J. Neurosci. 25, 4217–4221.
Alvarez-Saavedra, M., De Repentigny, Y., Yang, D., O'Meara, R.W., Yan, K., Hashem, L. E., Racacho, L., Ioshikhes, I., Bulman, D.E., Parks, R.J., Kothary, R., Picketts, D.J., 2016. Voluntary running triggers VGF-mediated oligodendrogenesis to prolong the lifespan of Snf2h-Null Ataxic Mice. Cell Rep. 17, 862–875.
Baker, L.D., Frank, L.L., Foster-Schubert, K., Green, P.S., Wilkinson, C.W., McTiernan, A., Plymate, S.R., Fishel, M.A., Watson, G.S., Cholerton, B.A., Duncan, G.E., Mehta, P.D., Craft, S., 2010. Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial. Arch. Neurol. 67, 71–79.
Bansi, J., Bloch, W., Gamper, U., Kesselring, J., 2013. Training in MS: influence of two different endurance training protocols (aquatic versus overland) on cytokine and neurotrophin concentrations during three week randomized controlled trial. Mult. Scler. 19, 613–621.
Benson, C., Paylor, J.W., Tenorio, G., Winship, I., Baker, G., Kerr, B.J., 2015. Voluntary wheel running delays disease onset and reduces pain hypersensitivity in early experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Exp. Neurol. 271, 279–290.
Bernardes, D., Oliveira-Lima, O.C., Silva, T.V., Faraco, C.C., Leite, H.R., Juliano, M.A., Santos, D.M., Bethea, J.R., Brambilla, R., Orian, J.M., Arantes, R.M., Carvalho-Tavares, J., 2013. Differential brain and spinal cord cytokine and BDNF levels in experimental autoimmune encephalomyelitis are modulated by prior and regular exercise. J. Neuroimmunol. 264, 24–34.
Bernardes, D., Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Karmally, S., Dellarole, A., Carvalho-Tavares, J., Bethea, J.R., 2016. Prior regular exercise improves clinical outcome and reduces demyelination and axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neurochem. 136 (Suppl. 1), 63–73.
Bertram, S., Brixius, K., Brinkmann, C., 2016. Exercise for the diabetic brain: how physical training may help prevent dementia and Alzheimer's disease in T2DM patients. Endocrine 53, 350–363.
Bjorkhem, I., Meaney, S., 2004. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 806–815.
Brown, A.J., Jessup, W., 2009. Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. Mol. Aspects Med. 30, 111–122.
Cassilhas, R.C., Tufik, S., de Mello, M.T., 2016. Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. Cell Mol. Life Sci. 73, 975–983.
Castellano, V., White, L.J., 2008. Serum brain-derived neurotrophic factor response to aerobic exercise in multiple sclerosis. J. Neurol. Sci. 269, 85–91.
Chalmin, F., Rochemont, V., Lippens, C., Clottu, A., Sailer, A.W., Merkler, D., Hugues, S., Pot, C., 2015. Oxysterols regulate encephalitogenic CD4(+) T cell trafficking during central nervous system autoimmunity. J. Autoimmun. 56, 45–55.
Chataway, J., Schuerer, N., Alsanousi, A., Chan, D., MacManus, D., Hunter, K., Anderson, V., Bangham, C.R., Clegg, S., Nielsen, C., Fox, N.C., Wilkie, D., Nicholas, J.M., Calder, V.L., Greenwood, J., Frost, C., Nicholas, R., 2014. Effect of high-dose simvastatin on brain atrophy and disability in secondary progressive multiple sclerosis (MS-STAT): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. Lancet 383, 2213–2221.
Coppola, S., Ghibelli, L., 2000. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. Biochem. Soc. Trans. 28, 56–61.
Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Trends Neurosci. 25, 295–301.
Cotman, C.W., Berchtold, N.C., Christie, L.A., 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. Trends Neurosci. 30, 464–472.
Cumings, J.N., 1955. Lipid chemistry of the brain in demyelinating diseases. Brain 78, 554–563.
De Paula, M.L., Cui, Q.L., Hossain, S., Antel, J., Almazan, G., 2014. The PTEN inhibitor bisperoxovanadium enhances myelination by amplifying IGF-1 signaling in rat and human oligodendrocyte progenitors. Glia 62, 64–77.
De Santi, L., Polimeni, G., Cuzzocrea, S., Esposito, E., Sessa, E., Annunziata, P., Bramanti, P., 2011. Neuroinflammation and neuroprotection: an update on (future) neurotrophin-related strategies in multiple sclerosis treatment. Curr. Med. Chem. 18, 1775–1784.
de Senna, P.N., Bagatini, P.B., Galland, F., Bobermin, L., do Nascimento, P.S., Nardin, P., Tramontina, A.C., Goncalves, C.A., Achaval, M., Xavier, L.L., 2017. Physical exercise reverses spatial memory deficit and induces hippocampal astrocyte plasticity in diabetic rats. Brain Res. 1655, 242–251.
Denic, A., Johnson, A.J., Bieber, A.J., Warrington, A.E., Rodriguez, M., Pirko, I., 2011. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. Pathophysiology 18, 21–29.
Dietschy, J.M., 2009. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. Biol. Chem. 390, 287–293.
Ding, Y.H., Young, C.N., Luan, X., Li, J., Rafols, J.A., Clark, J.C., McAllister, J.P., 2nd Ding, Y., 2005. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. Acta Neuropathol. 109, 237–246.
Dugas, B., Charbonnier, S., Baarine, M., Ragot, K., Delmas, D., Menetrier, F., Lherminier, J., Malvitte, L., Khalfaoui, T., Bron, A., Creuzot-Garcher, C., Latruffe, N., Lizard, G., 2010. Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. Eur. J. Nutr. 49, 435–446.
Eadie, B.D., Redila, V.A., Christie, B.R., 2005. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. J. Comp. Neurol. 486, 39–47.
Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C.J., Palmer, T.D., 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. Eur. J. Neurosci. 18, 2803–2812.
Filomenko, R., Fourgeux, C., Bretillon, L., Gambert-Nicot, S., 2015. Oxysterols: influence on plasma membrane rafts microdomains and development of ocular diseases. Steroids 99, 259–265.
Gamba, P., Leonarduzzi, G., Tamagno, E., Guglielmotto, M., Testa, G., Sottero, B., Gargiulo, S., Biasi, F., Mauro, A., Vina, J., Poli, G., 2011. Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid-beta in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. Aging Cell 10, 403–417.
Ghiani, C.A., Ying, Z., de Vellis, J., Gomez-Pinilla, F., 2007. Exercise decreases myelin-associated glycoprotein expression in the spinal cord and positively modulates neuronal growth. Glia 55, 966–975.
Gibson, E.M., Purger, D., Mount, C.W., Goldstein, A.K., Lin, G.L., Wood, L.S., Inema, I., Miller, S.E., Bieri, G., Zuchero, J.B., Barres, B.A., Woo, P.J., Vogel, H., Monje, M., 2014. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. Science 344, 1252304.
Golzari, Z., Shabkhiz, F., Soudi, S., Kordi, M.R., Hashemi, S.M., 2010. Combined exercise training reduces IFN-gamma and IL-17 levels in the plasma and the supernatant of peripheral blood mononuclear cells in women with multiple sclerosis. Int. Immunopharmacol. 10, 1415–1419.
Grondard, C., Biondi, O., Pariset, C., Lopes, P., Deforges, S., Lecolle, S., Gaspera, B.D., Gallien, C.L., Chanoine, C., Charbonnier, F., 2008. Exercise-induced modulation of calcineurin activity parallels the time course of myofibre transitions. J. Cell Physiol. 214, 126–135.
Gusdon, A.M., Callio, J., Distefano, G., O'Doherty, R.M., Goodpaster, B.H., Coen, P.M., Chu, C.T., 2017. Exercise increases mitochondrial complex I activity and DRP1 expression in the brains of aged mice. Exp. Gerontol. 90, 1–13.
Hamilton, G.F., Rhodes, J.S., 2015. Exercise regulation of cognitive function and neuroplasticity in the healthy and diseased brain. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 135, 381–406.
Heesen, C., Kolbeck, J., Gold, S.M., Schulz, H., Schulz, K.H., 2003. Delivering the diagnosis of MS–results of a survey among patients and neurologists. Acta Neurol. Scand. 107, 363–368.
Hwang, D.H., Shin, H.Y., Kwon, M.J., Choi, J.Y., Ryu, B.Y., Kim, B.G., 2014. Survival of neural stem cell grafts in the lesioned spinal cord is enhanced by a combination of treadmill locomotor training via insulin-like growth factor-1 signaling. J. Neurosci. 34, 12788–12800.
Kim, T.W., Sung, Y.H., 2017. Regular exercise promotes memory function and enhances hippocampal neuroplasticity in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Neuroscience 346, 173–181.
Lavoie, J.M., 2016. Dynamics of hepatic and intestinal cholesterol and bile acid pathways: the impact of the animal model of estrogen deficiency and exercise training. World J. Hepatol. 8, 961–975.
Le Page, C., Ferry, A., Rieu, M., 1994. Effect of muscular exercise on chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. Journal of Applied Physiology 77 (5), 2341–2347.
Le Page, C., Bourdoulous, S., Beraud, E., Couraud, P.O., Rieu, M., Ferry, A., 1996. Effect of physical exercise on adoptive experimental auto-immune encephalomyelitis in rats. Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol. 73, 130–135.
Lee, J.M., Park, J.M., Song, M.K., Oh, Y.J., Kim, C.J., Kim, Y.J., 2017. The ameliorative effects of exercise on cognitive impairment and white matter injury from blood-brain barrier disruption induced by chronic cerebral hypoperfusion in adolescent rats. Neurosci. Lett. 638, 83–89.
Lezi, E., Burns, J.M., Swerdlow, R.H., 2014. Effect of high-intensity exercise on aged mouse brain mitochondria, neurogenesis, and inflammation. Neurobiol. Aging 35, 2574–2583.
Ma, Q., 2008. Beneficial effects of moderate voluntary physical exercise and its biological mechanisms on brain health. Neurosci. Bull. 24, 265–270.
Magalon, K., Zimmer, C., Cayre, M., Khaldi, J., Bourbon, C., Robles, I., Tardif, G., Viola, A., Pruss, R.M., Bordet, T., Durbec, P., 2012. Olesoxime accelerates myelination and promotes repair in models of demyelination. Ann. Neurol. 71, 213–226.
Marengo, B., Bellora, F., Ricciarelli, R., De Ciucis, C., Furfaro, A., Leardi, R., Colla, R., Pacini, D., Traverso, N., Moretta, A., Pronzato, M.A., Bottino, C., Domenicotti, C., 2016. Oxysterol mixture and, in particular, 27-hydroxycholesterol drive M2 polarization of human macrophages. Biofactors 42, 80–92.
Marrie, R.A., Horwitz, R.I., 2010. Emerging effects of comorbidities on multiple sclerosis. Lancet Neurol. 9, 820–828.
Meeusen, R., De Meirleir, K., 1995. Exercise and brain neurotransmission. Sports Med. 20, 160–188.
Meffre, D., Shackleford, G., Hichor, M., Gorgievski, V., Tzavara, E.T., Trousson, A., Ghoumari, A.M., Deboux, C., Nait Oumesmar, B., Liere, P., Schumacher, M., Baulieu, E.E., Charbonnier, F., Grenier, J., Massaad, C., 2015. Liver X receptors alpha and beta promote myelination and remyelination in the cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 7587–7592.
Miron, V.E., Zehntner, S.P., Kuhlmann, T., Ludwin, S.K., Owens, T., Kennedy, T.E., Bedell, B.J., Antel, J.P., 2009. Statin therapy inhibits remyelination in the central nervous system. Am. J. Pathol. 174, 1880–1890.
Mueller, K., Moller, H.E., Horstmann, A., Busse, F., Lepsien, J., Bluher, M., Stumvoll, M., Villringer, A., Pleger, B., 2015. Physical exercise in overweight to obese individuals induces metabolic- and neurotrophic-related structural brain plasticity. Front. Hum. Neurosci. 9, 372.

Please cite this article in press as: L. Houdebine, et al., Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis, Chem. Phys. Lipids (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.002

Muse, E.D., Jurevics, H., Toews, A.D., Matsushima, G.K., Morell, P., 2001. Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain. J. Neurochem. 76, 77–86.
Nichol, K.E., Poon, W.W., Parachikova, A.I., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., Cotman, C.W., 2008. Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. J. Neuroinflamm. 5, 13.
Nokia, M.S., Lensu, S., Ahtiainen, J.P., Johansson, P.P., Koch, L.G., Britton, S.L., Kainulainen, H., 2016. Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. J. Physiol. 594, 1855–1873.
Nury, T., Zarrouk, A., Mackrill, J.J., Samadi, M., Durand, P., Riedinger, J.M., Doria, M., Vejux, A., Limagne, E., Delmas, D., Prost, M., Moreau, T., Hammami, M., Delage-Mourroux, R., O'Brien, N.M., Lizard, G., 2015. Induction of oxiapoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7beta-hydroxycholesterol-, or 24(*S*)-hydroxycholesterol: protective effects of alpha-tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). Steroids 99, 194–203.
Park, E.K., Park, M.J., Lee, S.H., Li, Y.C., Kim, J., Lee, J.S., Lee, J.W., Ye, S.K., Park, J.W., Kim, C.W., Park, B.K., Kim, Y.N., 2009. Cholesterol depletion induces anoikis-like apoptosis via FAK down-regulation and caveolae internalization. J. Pathol. 218, 337–349.
Patel, D.I., White, L.J., 2013. Effect of 10-day forced treadmill training on neurotrophic factors in experimental autoimmune encephalomyelitis. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 38, 194–199.
Pihl-Jensen, G., Tsakiri, A., Frederiksen, J.L., 2015. Statin treatment in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. CNS Drugs 29, 277–291.
Poli, G., Biasi, F., Leonarduzzi, G., 2013. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. Redox Biol. 1, 125–130.
Pryor, W.M., Freeman, K.G., Larson, R.D., Edwards, G.L., White, L.J., 2015. Chronic exercise confers neuroprotection in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neurosci. Res. 93, 697–706.
Rossi, S., Furlan, R., De Chiara, V., Musella, A., Lo Giudice, T., Mataluni, G., Cavasinni, F., Cantarella, C., Bernardi, G., Muzio, L., Martorana, A., Martino, G., Centonze, D., 2009. Exercise attenuates the clinical, synaptic and dendritic abnormalities of experimental autoimmune encephalomyelitis. Neurobiol. Dis. 36, 51–59.
Sa, M.J., 2014. Exercise therapy and multiple sclerosis: a systematic review. J. Neurol. 261, 1651–1661.
Saher, G., Quintes, S., Nave, K.A., 2011. Cholesterol: a novel regulatory role in myelin formation. Neuroscientist 17, 79–93.
Salvayre, R., Auge, N., Benoist, H., Negre-Salvayre, A., 2002. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. Biochim. Biophys. Acta 1585, 213–221.
Schulz, K.H., Gold, S.M., Witte, J., Bartsch, K., Lang, U.E., Hellweg, R., Reer, R., Braumann, K.M., Heesen, C., 2004. Impact of aerobic training on immune-endocrine parameters, neurotrophic factors, quality of life and coordinative function in multiple sclerosis. J. Neurol. Sci. 225, 11–18.
Sharma, S., Prasanthi, R.P.J., Schommer, E., Feist, G., Ghribi, O., 2008. Hypercholesterolemia-induced Abeta accumulation in rabbit brain is associated with alteration in IGF-1 signaling. Neurobiol. Dis. 32, 426–432.
Shi, B., Ding, J., Liu, Y., Zhuang, X., Chen, X., Fu, C., 2014. ERK1/2 pathway-mediated differentiation of IGF-1-transfected spinal cord-derived neural stem cells into oligodendrocytes. PLoS One 9, e106038.
Sigwalt, A.R., Budde, H., Helmich, I., Glaser, V., Ghisoni, K., Lanza, S., Cadore, E.L., Lhullier, F.L., de Bem, A.F., Hohl, A., de Matos, F.J., de Oliveira, P.A., Prediger, R.D., Guglielmo, L.G., Latini, A., 2011. Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. Neuroscience 192, 661–674.
Son, Y., Kim, S.M., Lee, S.A., Eo, S.K., Kim, K., 2013. Oxysterols induce transition of monocytic cells to phenotypically mature dendritic cell-like cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 438, 161–168.
Soroosh, P., Wu, J., Xue, X., Song, J., Sutton, S.W., Sablad, M., Yu, J., Nelen, M.I., Liu, X., Castro, G., Luna, R., Crawford, S., Banie, H., Dandridge, R.A., Deng, X., Bittner, A., Kuei, C., Tootoonchi, M., Rozenkrants, N., Herman, K., Gao, J., Yang, X.V., Sachen, K., Ngo, K., Fung-Leung, W.P., Nguyen, S., de Leon-Tabaldo, A., Blevitt, J., Zhang, Y., Cummings, M.D., Rao, T., Mani, N.S., Liu, C., McKinnon, M., Milla, M.E., Fourie, A. M., Sun, S., 2014. Oxysterols are agonist ligands of RORgammat and drive Th17 cell differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 12163–12168.
Souza, P.S., Goncalves, E.D., Pedroso, G.S., Farias, H.R., Junqueira, S.C., Marcon, R., Tuon, T., Cola, M., Silveira, P.C., Santos, A.R., Calixto, J.B., Souza, C.T., de Pinho, R. A., Dutra, R.C., 2016. Physical exercise attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting peripheral immune response and blood-brain barrier disruption. Mol. Neurobiol..
Spann, N.J., Glass, C.K., 2013. Sterols and oxysterols in immune cell function. Nat. Immunol. 14, 893–900.
Teixeira-Lemos, E., Nunes, S., Teixeira, F., Reis, F., 2011. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. Cardiovasc. Diabetol. 10, 12.
Testa, G., Gamba, P., Badilli, U., Gargiulo, S., Maina, M., Guina, T., Calfapietra, S., Biasi, F., Cavalli, R., Poli, G., Leonarduzzi, G., 2014. Loading into nanoparticles improves quercetin's efficacy in preventing neuroinflammation induced by oxysterols. PLoS One 9, e96795.
Teunissen, C.E., Floris, S., Sonke, M., Dijkstra, C.D., De Vries, H.E., Lutjohann, D., 2007. 24S-hydroxycholesterol in relation to disease manifestations of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neurosci. Res. 85, 1499–1505.
Trejo, J.L., Carro, E., Torres-Aleman, I., 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. J. Neurosci. 21, 1628–1634.
van de Kraats, C., Killestein, J., Popescu, V., Rijkers, E., Vrenken, H., Lutjohann, D., Barkhof, F., Polman, C.H., Teunissen, C.E., 2014. Oxysterols and cholesterol precursors correlate to magnetic resonance imaging measures of neurodegeneration in multiple sclerosis. Mult. Scler. 20, 412–417.
van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat. Neurosci. 2, 266–270.
Vejux, A., Lizard, G., 2009. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. Mol. Aspects Med. 30, 153–170.
Vuletic, S., Kennedy, H., Albers, J.J., Killestein, J., Vrenken, H., Lutjohann, D., Teunissen, C.E., 2014. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E and phospholipid transfer protein activity are reduced in multiple sclerosis; relationships with the brain MRI and CSF lipid variables. Mult. Scler Relat. Disord. 3, 533–541.
Wood, H., 2016. Multiple sclerosis: biomarkers and genetic variants reflect disease course in multiple sclerosis. Nat. Rev. Neurol. 12, 553.
Yoon, H., Kleven, A., Paulsen, A., Kleppe, L., Wu, J., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., Scarisbrick, I.A., 2016. Interplay between exercise and dietary fat modulates myelinogenesis in the central nervous system. Biochim. Biophys. Acta 1862, 545–555.
Zhang, F., Wu, Y., Jia, J., 2011. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. Neuroscience 177, 170–176.
Zhornitsky, S., McKay, K.A., Metz, L.M., Teunissen, C.E., Rangachari, M., 2016. Cholesterol and markers of cholesterol turnover in multiple sclerosis: relationship with disease outcomes. Mult. Scler. Relat. Disord. 5, 53–65.

Please cite this article in press as: L. Houdebine, et al., Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis, Chem. Phys. Lipids (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.002

5. Article 5

Specific Physical Exercise Improves Energetic Metabolism in the Skeletal Muscle of Amyotrophic-Lateral-Sclerosis

Céline Desseille[1,2], Séverine Deforges[1,2], Olivier Biondi[1,2], **Léo Houdebine[1,2]**, Domenico D'amico[1,2], Antonin Lamazière[3], Cédrix Caradeuc[1,4], Gildas Bertho[1,4], Gaëlle Bruneteau[3,4], Laure Weill[1,2], Jean Bastin[1,2], Fatima Djouadi[1,2], François Salachas[3,5], Philippe Lopes[1,2,6], Christophe Chanoine[1,2], Charbel Massaad[1,2] and Frédéric Charbonnier[1,2]

1 Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales, Université Paris Descartes, Paris, France
2 INSERM, UMR-S 1124, Paris, France
3 Laboratoire de lipidomique, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie - Hôpital Saint-Antoine, Université Paris 6, Paris, France
4 UMR 8601 CNRS, Université Paris Descartes, Paris, France
5 Hôpital de la Salpêtrière, Département des Maladies du Système Nerveux, Equipe Neurogénétique et Physiologie, Institut du Cerveau et de la Moelle, Paris, France
6 UFR Sciences Fondamentales Appliquées, Département STAPS, Université d'Evry-Val-d'Essonne, Evry, France

Publié le 20 Octobre 2017 dans le journal frontiers in Molecular Neuroscience

frontiers in Molecular Neuroscience

ORIGINAL RESEARCH
published: 20 October 2017
doi: 10.3389/fnmol.2017.00332

Specific Physical Exercise Improves Energetic Metabolism in the Skeletal Muscle of Amyotrophic-Lateral-Sclerosis Mice

*Céline Desseille[1,2†‡], Séverine Deforges[1,2†‡], Olivier Biondi[1,2], Léo Houdebine[1,2], Domenico D'amico[1,2], Antonin Lamazière[3], Cédric Caradeuc[1,4], Gildas Bertho[1,4], Gaëlle Bruneteau[3,4], Laure Weill[1,2], Jean Bastin[1,2], Fatima Djouadi[1,2], François Salachas[3,5], Philippe Lopes[1,2,6], Christophe Chanoine[1,2], Charbel Massaad[1,2] and Frédéric Charbonnier[1,2]**

[1] Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales, Université Paris Descartes, Paris, France, [2] INSERM, UMR-S 1124, Paris, France, [3] Laboratoire de lipidomique, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie - Hôpital Saint-Antoine, Université Paris 6, Paris, France, [4] UMR 8601 CNRS, Université Paris Descartes, Paris, France, [5] Hôpital de la Salpêtrière, Département des Maladies du Système Nerveux, Equipe Neurogénétique et Physiologie, Institut du Cerveau et de la Moelle, Paris, France, [6] UFR Sciences Fondamentales Appliquées, Département STAPS, Université d'Evry-Val-d'Essonne, Evry, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Jean-Philippe Loeffler,
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France

Reviewed by:
Shin Hyeok Kang,
Temple University, United States
Subhabrata Sanyal,
California Life Company (Calico), United States

***Correspondence:**
Frédéric Charbonnier
frederic.charbonnier@parisdescartes.fr

†Present address:
Céline Desseille,
CrCHUM, Axe Neurosciences, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada
Séverine Deforges,
University of Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, Bordeaux, France

‡These authors have contributed equally to this work.

Received: 13 July 2017
Accepted: 02 October 2017
Published: 20 October 2017

Citation:
Desseille C, Deforges S, Biondi O, Houdebine L, D'amico D, Lamazière A, Caradeuc C, Bertho G, Bruneteau G, Weill L, Bastin J, Djouadi F, Salachas F, Lopes P, Chanoine C, Massaad C and Charbonnier F (2017) Specific Physical Exercise Improves Energetic Metabolism in the Skeletal Muscle of Amyotrophic-Lateral- Sclerosis Mice. Front. Mol. Neurosci. 10:332. doi: 10.3389/fnmol.2017.00332

Amyotrophic Lateral Sclerosis is an adult-onset neurodegenerative disease characterized by the specific loss of motor neurons, leading to muscle paralysis and death. Although the cellular mechanisms underlying amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-induced toxicity for motor neurons remain poorly understood, growing evidence suggest a defective energetic metabolism in skeletal muscles participating in ALS-induced motor neuron death ultimately destabilizing neuromuscular junctions. In the present study, we report that a specific exercise paradigm, based on a high intensity and amplitude swimming exercise, significantly improves glucose metabolism in ALS mice. Using physiological tests and a biophysics approach based on nuclear magnetic resonance (NMR), we unexpectedly found that SOD1(G93A) ALS mice suffered from severe glucose intolerance, which was counteracted by high intensity swimming but not moderate intensity running exercise. Furthermore, swimming exercise restored the highly ALS-sensitive *tibialis* muscle through an autophagy-linked mechanism involving the expression of key glucose transporters and metabolic enzymes, including GLUT4 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Importantly, GLUT4 and GAPDH expression defects were also found in muscles from ALS patients. Moreover, we report that swimming exercise induced a triglyceride accumulation in ALS *tibialis*, likely resulting from an increase in the expression levels of lipid transporters and biosynthesis enzymes, notably DGAT1 and related proteins. All these data provide the first molecular basis for the differential effects of specific exercise type and intensity in ALS, calling for the use of physical exercise as an appropriate intervention to alleviate symptoms in this debilitating disease.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, swimming, running, lipid, glucose metabolism, autophagy, fat deposition

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the most widespread adult-onset motor neuron disease, is a chronic neurodegenerative affection characterized by a progressive motor weakness originating from the selective loss of motor neurons. Death typically occurs within 3 years of onset, usually from respiratory failure (Al-Chalabi and Hardiman, 2013). Riluzole, the only currently available drug extends survival by approximately 3 months (Lacomblez et al., 1996), pointing out crying need for the development of new therapeutic strategies. In approximately 85–90% of cases, ALS is sporadic (sALS). The 10–15% of remaining cases, referred to as familial ALS (fALS), are characterized by the frequent (20% of the cases) occurrence of mutations in superoxide dismutase 1 (*SOD1*) gene (Rosen et al., 1993), leading to the development of mouse models of ALS (Gurney et al., 1994). The clinical and morphological abnormalities are identical in sALS and fALS, suggesting the disruption of similar mechanisms. Although the precise identity of ALS-triggered degeneration mechanisms is still elusive, growing evidence points toward alterations in metabolic status (Desport et al., 2001; Bouteloup et al., 2009; Pradat et al., 2010; Dupuis et al., 2011; Lindauer et al., 2013) thought to mainly derive from skeletal muscle lipid hypermetabolism (Poulton and Rossi, 1993; Pradat et al., 2010; Dupuis et al., 2011). This feature results in a frequent, severe and progressive weight loss, which represents an independent negative prognostic factor for survival in ALS (Desport et al., 1999; Dupuis et al., 2011; Paganoni et al., 2011). Accordingly, ALS risk and progression decrease in individuals with high body mass index and type 2 diabetes mellitus (Kioumourtzoglou et al., 2015; Mariosa et al., 2015). These data suggest that the carbohydrate metabolism could be also intrinsically altered in ALS, concurring with the significant number of ALS patients suffering from glucose intolerance (Dupuis et al., 2011; Paganoni et al., 2011). However, the data obtained in different ALS mouse models are inconsistent. Yet, no defect in glucose tolerance was found in SOD1(G93A) ALS mice (Smittkamp et al., 2014) while an excessive glucose uptake was recorded in SOD1(G86R) ALS mice (Dupuis et al., 2004b). In pre-symptomatic SOD1(G86R) ALS mice, despite more glucose consumption, a metabolic switch toward lipid use was found in fast-twitch muscles, possibly due to the inhibition of pyruvate dehydrogenase (PDH), a pivotal enzyme of carbohydrate catabolism (Kioumourtzoglou et al., 2015).

In the myofibers, as in other cells, autophagy can play a major role in the energetic metabolism balance in case of starvation or huge energetic demand. It provides energy by degrading cellular intrinsic components to produce the three main energetic macromolecules, i.e., glucose, lipids, and amino acids (Singh and Cuervo, 2011). Importantly, autophagy was found altered in ALS muscles, with in particular, abnormal expressions of several autophagic markers, including LC3B and P62, depicted in the skeletal muscle of ALS mice (Dobrowolny et al., 2008; Crippa et al., 2013) or ALS-mimicking muscle cell cultures (Onesto et al., 2011). In addition, it has been recently reported that the autophagic activity is compromised in the skeletal muscle of ALS mice (Xiao et al., 2015). These perturbations occur in ALS muscles although aggregates of mSOD1 are unexpected (Wei et al., 2012), suggesting that, in ALS muscles, it is the macro-autophagy, involved in energy supply that is affected, and not the micro-autophagy, involved in the elimination of protein aggregates. Despite all these observations, a functional link between autophagy and lipid and carbohydrate metabolisms in ALS muscles is still lacking. Thus, although further investigations are required to draw a picture of the metabolic defects occurring in ALS, all these initial results suggest that modulating skeletal muscle energetic metabolism might constitute a promising avenue for alleviating ALS symptoms.

In this context, specific physical exercises are expected to differentially shift the muscular energy metabolism either toward an oxidative pattern, notably lipidic, in case of low-intensity exercise, or toward a glycolytic metabolism, in case of high-intensity exercise (Romijn et al., 1993; van Loon et al., 2001). Furthermore, important metabolic effects of physical exercise have been linked to the activity-dependent induction of autophagy in skeletal muscle (Jaspers et al., 2017). These effects include the adaptation of muscle glucose homeostasis and the protection against glucose intolerance (He et al., 2012) and the protection of mitochondria against exercise-induced damages. Interestingly, submitting SOD1(G93A) ALS mice to a swimming-based protocol, involving a high intensity and amplitude exercise (Grondard et al., 2008), resulted in a remarkable increase in lifespan and neuroprotection at the lumbar motor neurons level (Deforges et al., 2009). By contrast, in most of the available studies, submitting mSOD1 ALS mice to different running-based programs conferred a reduced neuroprotection (Kirkinezos et al., 2003; Mahoney et al., 2004; Kaspar et al., 2005; Deforges et al., 2009; Carreras et al., 2010). Data in humans are even more confusing, and the use of exercise in ALS patients remains highly debated (Harwood et al., 2009; Pupillo et al., 2014). Although these controversies could result from the different characteristics of exercise and the heterogeneity of protocols used, the exercise-induced impact on energetic metabolism and on autophagy in ALS skeletal muscle has never been investigated.

In the present study, using human ALS muscle biopsies and SOD1(G93A) ALS mice, we report that the carbohydrate catabolism is impaired in ALS, and that physical exercise, if adequately designed, can reduce muscle metabolic defects likely through the improvement of skeletal muscle autophagy.

MATERIALS AND METHODS

Human Biopsies

Human muscle biopsies were obtained from 10 ALS patients referred from the Paris Motor Neuron Disease Center (Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France). All patients met the El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of definite, probable or possible ALS (Brooks et al., 2000). Muscle specimens were taken from the anconeus muscle for three patients and the deltoid muscle for seven patients. Six subjects with histochemically normal deltoid muscle were used

as controls. These subjects had undergone muscle biopsy as a diagnostic procedure and, after careful clinical and histological evaluation, had been considered free of any neuromuscular disorder. The study was approved by the local ethics committee, and all patients provided written informed consent before muscle biopsy, according to institutional guidelines. Biopsy specimens were immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at −80°C until use.

Ethics Statement

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

Mice, Exercise and Treatments

Transgenic male B6/SJL mice with the G93A human SOD1 mutation [B6/SJL-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J] (ALS mice) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, United States). ALS male were crossed with wild-type B6/SJL females (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France), and only males were used for this study.

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

For the autophagy analysis, specific groups of ALS males at P70 were subjected to the same swimming-based exercise for 3 days, and treated for autophagy inhibition as previously reported (Kang et al., 2014). Accordingly, each mice was intraperitoneally injected 1 h before exercise with 10 $\mu l.g^{-1}$ of either chloroquine (CQ) at 5 $\mu g.\mu l^{-1}$, or 3-methyladenine (3-MA) at 1.5 $\mu g.\mu l^{-1}$, or a placebo NaCl 0.9% solution.

Glucose Tolerance Test and Lactate Measurement

Glucose tolerance tests were performed on 4 or 12 h fasted mice at P70 and P115, with the same results. Mice were intraperitoneally injected with D-glucose (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, United States) at a dose of 2 $g.kg^{-1}$. Glucose concentration was then measured every 15 min using a Glucotrend R analyser (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) from whole blood samples taken from the tail.

Blood lactate samples were collected from right ventricle on anesthetized mice, with 1% pentobarbital solution (6 $\mu l.g^{-1}$) diluted in 0.9% saline buffer, using a 1 ml syringe mounted with a 22-gauge needle and coated with heparin (5000 $UI.ml^{-1}$, PanPharma Luitré, France), 2 h after training. Blood samples were centrifuged (1000 *g*, 10min, +4°C) and serum was frozen at −80°C. The serum lactate level was measured using Lactate assay kit (Biovision research, Mountain view, CA, United States) following manufacturer's instructions. For each mouse, 1 μl of serum were incubated at +22°C in 50 μl of incubation buffer and 50 μl of reaction mix in a 96-well plate, and read on spectrophotometer at 570 nm wavelength after 30 min of incubation. Lactate levels were given $nmol.\mu l^{-1}$.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Analysis

Sample preparation was made using the classic protocol of tissue extraction (Beckonert et al., 2007). The combined extraction of polar and lipophilic metabolites from tissues was obtained using the methanol/chloroform/water mixture.

Muscle mass ranged between 15 and 40 mg. The 13 polar sample extracts were transferred in 5 mm nuclear magnetic resonance (NMR) tubes to obtain a final volume of 580 μL/samples.

Nuclear Magnetic Resonance

1H NMR spectra of aqueous tissues extract were measured at 300 K on a Bruker Avance II 500MHz spectrometer. The spectral acquisition was based on CPMG-presat (cpmgpr) a 1D CPMG pulse sequence with pre-saturation for water suppression. Parameters used for the pulse sequence were a relaxation delay of 1 s; a mixing time of 100 ms; an acquisition time of 1.36 s; a 90° pulse length of 8 μs. 32K data points were collected during 512 scans with a spectral width of 20 ppm.

Data Preprocessing

The signal preprocessing of the NMR spectra was performed with MestReNova 8.0 software including the following standard steps: line-broadening factor (0.3 Hz), Fourier transformation, phasing, baseline correction, calibration by the TSP, exclusion of uninteresting or noisy signals (water from 4.53 to 4.97 ppm and extremities < 0.21 ppm and >9.45 ppm), equidistant bucketing (bin width of 0.04 ppm) and constant integral normalization. Thus, we obtained a matrix of an NMR spectra dataset of 13 subjects and 224 buckets.

RT-qPCR Analysis

Mouse tissues were collected 2 h after training in liquid nitrogen and RNA was extracted using TRizol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Saint-Aubin, France). 1 μg of human or mouse RNAs was reverse transcribed with oligodT using reverse transcriptase Improm II (Promega France, Charbonnières, France). Quantitative real time PCR was performed with standard protocols using SYRB Green ROX detector in ABIPrism 7000 (ABgene, Courtaboeuf, France). Specific primers were used at 300 nM (**Table 1**). The relative amounts of cDNA in each sample were determined on the basis of the threshold cycle (Ct) for each PCR product and normalized to either *RPL13* or *Rps26* Ct for human or mouse samples, respectively. These housekeeping genes has been determined as best internal controls

TABLE 1 | RT-qPCR primer sequences.

Gene	GenBank ID	Forward Sequence (5′–3′)	Reverse sequence (5′–3′)	Species
GAPDH	NM_002046	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	TCTAGACGGCAGGTCAGGTC	Human
SLC2A4 (GLUT4)	NM_001042	CTTCATCATTGGCATGGGTTT	AGGACCGCAAATAGAAGGAAGA	Human
PDK4	NM_002612	TCCACTGCACCAACGCCT	TGGCAAGCCGTAACCAAAA	Human
RPL13A	NM_012423	AAGGTCGTGCGTCTGAAG	GAGTCCGTGGGTCTTGAG	Human
Rps26	NM_013765	AGGAGAAACAACGGTCGTGCCAAA	GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG	Mouse
ACC	NM_133360	GCCTCTTCCTGACAAACGAG	TGACTGCCGAAACATCTCTG	Mouse
Bcl2	NM_177410	TGAACCGGCATCTGCACAC	CGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG	Mouse
Becn1	NM_019584	TTCAAGATCCTGGACCGGGTCAC	AGACACCATCCTGGCGAGTTTC	Mouse
Cd36	NM_007643	ATTAATGGCACAGACGCAGC	TTCAGATCCGAACACAGCGT	Mouse
Dgat1	NM_010046	CCTCAGCCTTCTTCCATGAG	ACTGGGGCATCGTAGTTGAG	Mouse
Fasn	NM_007988	AGAGATCCCGAGACGCTTCT	GCCTGGTAGGCATTCTGTAGT	Mouse
Gapdh	NM_008084	GTGGACCTCATGGCCTACAT	TGT GAG GGA GAT GCT CAG TG	Mouse
Slc2a4 (Glut4)	NM_009204	CTGCAAAGCGTAGGTACCAA	CCT CCC GCC CTT AGT TG	Mouse
Map1lc3b (Lc3b)	NM_026160	CATGCCGTCCGAGAAGACCT	GATGAGCCGGACATCTTCCACT	Mouse
Sqstm1 (P62)	NM_011018	AGGGAACACAGCAAGCT	GCC AAA GTG TCC ATG TTT CA	Mouse
Pdk4	NM_013743	TGTGATGTGGTAGCAGTAGTC	ATGTGGTGAAGGTGTGAAG	Mouse
Srebf1c	NM_011480	GGAGCCATGGATTGCACATT	GGCCCGGGAAGTCACTGT	Mouse
Ucp3	NM_009464	ATGAGTTTTGCCTCCATTCG	GGCGTATCATGGCTTGAAAT	Mouse
Vldlr	NM_013703	GAGCCCCTGAAGGAATGCC	CCTATAACTAGGTCTTTGCAGATATGG	Mouse

using Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004) and Normfinder (Andersen et al., 2004) algorithms on 10 control and 10 ALS *tibialis* and over 10 different housekeeping genes (data not shown). The analysis was done relative to respective control samples and given by $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Immunohistochemistry

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

Microscopy and Images Analysis

Epifluorescence was detected with a CMOS camera (ORCA Flash 2.8, Hamamatsu Photonics France, Massy, France) and histological images were recorded with a RGB camera (ICC1 Zeiss, Carl Zeiss SAS, Le Pecq, France) mounted on Zeiss AxioObserver (Z1) using the ZEN 2012 software (Carl Zeiss SAS) with 100 (10× Zeiss Plan NeoFluar NA 0.3) and 200 (20× Zeiss EC-Plan-Apo NA 0.8) magnifications.

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

Western Blots

Mouse muscles were dissected and frozen in liquid nitrogen and homogenized in 50 μl/5 mg of RIPA buffer [50 mM Tris/pH 8.3, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 10 mM NAF, 1X Protease inhibitor (Roche, BASEL, Switzerland), 1% Phosphatase inhibitor (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, United States)]. Protein concentration was determined in the supernatant after centrifugation (17000 *g*, 15 min, +4°C) by Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, United States). Protein samples (100 μg for LC3B, 40 μg for the other proteins) were submitted to 12.5% SDS PAGE electrophoresis (1.5 M Tris pH 8.3, 12.5% Acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.06% TEMED). The separated proteins were transferred on PVDF membranes (Bio-Rad) and incubated overnight at +4°C with either rabbit anti-PDHE1α P-Ser293 (1:1000; AP1062; Merck Millipore, Darmstadt, Germany), rabbit anti-PDHE1α (1:1000; ab110334, Abcam, Cambridge, United Kingdom), rabbit anti-LC3B (1:1000; NB100-2331, Novus Biological), mouse anti-GAPDH (1:10.000; MAB374, Millipore) or mouse anti-α-tubulin (1:20.000; T6074, Sigma) diluted in blocking solution. Membranes were washed and incubated in horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody goat anti-rabbit or goat anti-mouse (1:10.000 Jackson ImmunoResearch). Revelation was performed with Amersham™ ECL™ Western Blotting Analysis System (GE Healthcare, Bio-Science, Upsala, Sweden). Images were done using ImageQuant LS4000 (GE Healthcare Bio-Science, Upsala, Sweden) and quantification was performed using Image J v1.47 software.

Lipidomic Analysis

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

Statistical Analysis

All data are presented as mean and standard deviation (SD). For the glucose tolerance studies, a one-way ANOVA for repeated measures with Tukey *post hoc* analysis was performed on the data. For the other studies, a Kolmogorov–Smirnov normal distribution analysis was performed on all data followed by either a student's *t*-test for normally distributed data or a non-parametric Kruskal–Wallis test, to verify significant differences between groups (Systat v 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL, United States). All the data presented in this study were considered as statically different when the statistical power exceeds 95% (AnaStats.fr, France). All graphics were done with GraphPad Prism v6.01 and Adobe Illustrator CS6 v16.0.3.

RESULTS

A Significant Improvement in Glucose Tolerance Is Specifically Induced by the Swimming-Based Training in ALS Mice

The ALS-induced loss of body mass detected from the asymptomatic phase of the disease in several mouse models of ALS (Dupuis et al., 2004b) is differentially altered by two different physical exercises (Deforges et al., 2009). Indeed, unlike running, the swimming-based training significantly limited the body weight loss of ALS mice (Deforges et al., 2009). Then, we questioned whether this preservation was linked to an intrinsic change in energy metabolism. To address this question, we assessed glucose tolerance in sedentary controls and sedentary and trained ALS mice in the presymptomatic (P70) and late symptomatic (P115) phases of the disease. The results of an intraperitoneal glucose tolerance test revealed that, from P70 until death, sedentary ALS mice displayed a severely impaired glucose tolerance. The blood glucose levels remained over 16 $mmol.L^{-1}$ 1 h after a 11.1 $mmol.kg^{-1}$ glucose injection (2 $g.Kg^{-1}$), whereas in wild-type mice whole blood glucose concentration was closed to baseline levels at that time (**Figures 1A,B**). Since glucose intolerance was recorded for the first time in SOD1(G93A) ALS mice, we decided to verify and confirm these results by quantifying glycogen and glucose concentration levels using nuclear magnetic resonance (NMR) in the skeletal muscle of SOD1(G93A) ALS and control mice. We focused our study on the *tibialis* muscle, which is a fast-twitch muscle, mainly using glucose as fuel for energetic supply. Importantly, our NMR results revealed a significant decrease in glycogen concentration levels in ALS vs. control *tibialis* (**Figure 1C**). The concentration levels of free glucose converged toward a global decrease in the ALS *tibialis* compared to controls, although we found a high heterogeneity among samples, which is normally expected with a highly metabolized molecule (**Figure 1D**). All these data concurred with a glucose intolerance in SOD1(G93A) ALS mice and further substantiated a defect in glucose uptake.

We next recorded the effects of each training paradigm on glucose tolerance in SOD1(G93A) ALS mice. Very interestingly, the glucose tolerance in SOD1(G93A) ALS mice was significantly improved following specific training. The swimming-based trained in ALS mice completely restored the glucose tolerance at P115 (**Figure 1E**) while the running-based slightly improved it after 45 days of training (**Figure 1F**).

We next evaluated the effect of the swimming-induced increase in glucose tolerance on its subsequent use as an energetic substrate in SOD1(G93A) ALS mouse tissues. To this end, we measured the levels of circulating lactate in sedentary control and in sedentary and trained SOD1(G93A) ALS mice at P115 in resting conditions (**Figure 1G**). We found as expected (Ferraiuolo et al., 2011) a significant decrease of circulating lactate levels in sedentary SOD1(G93A) ALS mice, in comparison to control mice. Interestingly, unlike running, the swimming-based training induced a significant increase in the levels of circulating lactate in SOD1(G93A) ALS mice, suggesting a specific-exercise-induced activation of glycolysis in skeletal muscles.

All these results converge on the idea that glucose resistance in SOD1(G93A) ALS mice, also found in ALS patients, impacts muscle metabolism, as suggested by the abnormal decrease in circulating lactate. Interestingly, only the swimming-based training managed to limit this metabolic defect.

Expression and Distribution of GLUT4 Are Altered in the ALS Skeletal Muscle and Improved by Physical Exercise

We next investigated the molecular mechanisms underlying, in the one hand, glucose intolerance in SOD1(G93A) ALS mice and, on the other, specific exercise-induced potential restoration of glucose uptake by ALS mouse tissues, including skeletal muscles. Among glucose transporters, GLUT4 is the most abundant in skeletal muscle and its level of expression is a major determinant of glucose uptake by skeletal muscle fibers (Richter and Hargreaves, 2013). We analyzed GLUT4 expression in skeletal muscles of SOD1(G93A) ALS mice, particularly the fast-twitch *tibialis* and the slow-twitch *soleus*, affected earlier and later by the disease, respectively (Hegedus et al., 2008). We found a significant decrease of *Glut4* mRNA expression in the two muscles in ALS mice, in the late symptomatic phase of the disease (P115) (**Figures 2A,B**). Interestingly, physical exercise enhanced *Glut4* expression in ALS muscles, but with exercise and muscle specificities. Indeed, only the swimming-based training was able

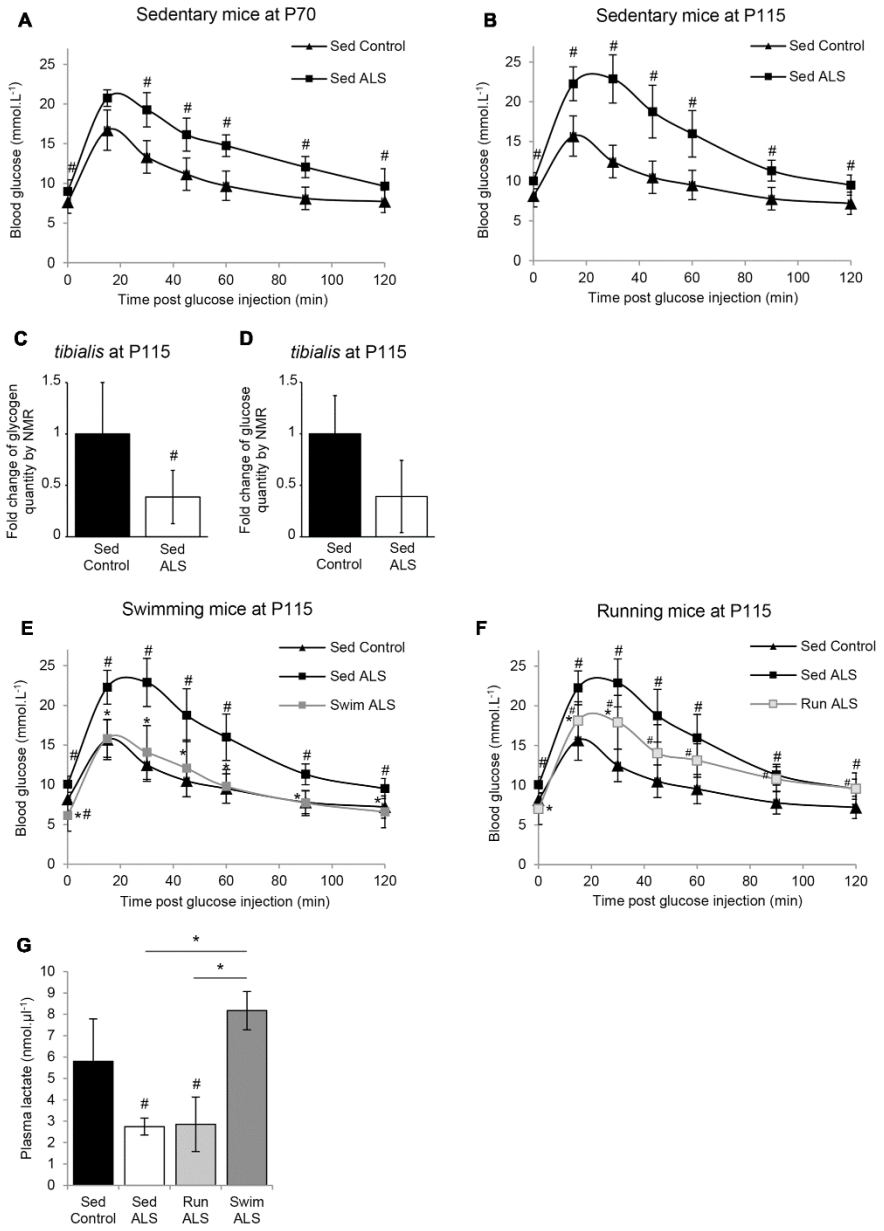


FIGURE 1 | The swimming-based training improves glucose tolerance in ALS mice. **(A,B)** Glucose tolerance test in sedentary controls (Sed Control) and ALS (Sed ALS) mice at P70 **(A)** and P115 **(B)**. **(C,D)** NMR analysis of glycogen **(C)** and glucose levels **(D)** from control and ALS mouse *tibialis* muscles (control $n = 6$ and ALS mice $n = 6$). **(E,F)** Glucose tolerance test in sedentary control (Sed Control) and sedentary (Sed ALS) and trained ALS mice at P115, after a swimming- (Swim ALS) **(E)** or a running- (Run ALS) **(F)** based training (sedentary controls and ALS mice $n = 6$; trained ALS mice $n = 4$). **(G)** Blood lactate levels at P115 in Sed control, Sed ALS, and 2 h after a running (Run ALS) or a swimming session (Swim ALS) ($n = 4$). All data are shown as mean ± standard deviation (SD). # and * indicate significance (with $P < 0.05$) relative to the control and between ALS conditions, respectively.

to significantly increased *Glut4* expression and specifically in the ALS *tibialis* (**Figures 2A,B**).

Since muscle glucose uptake is not only dependent on GLUT4 expression levels, but also of its abundance at the myofiber sarcolemma level, we analyzed the sub-cellular distribution of GLUT4 in the *tibialis* and *soleus* of SOD1(G93A) mice. We found that the GLUT4 subcellular distribution was largely intracellular, throughout the cytosol, and mostly absent at the

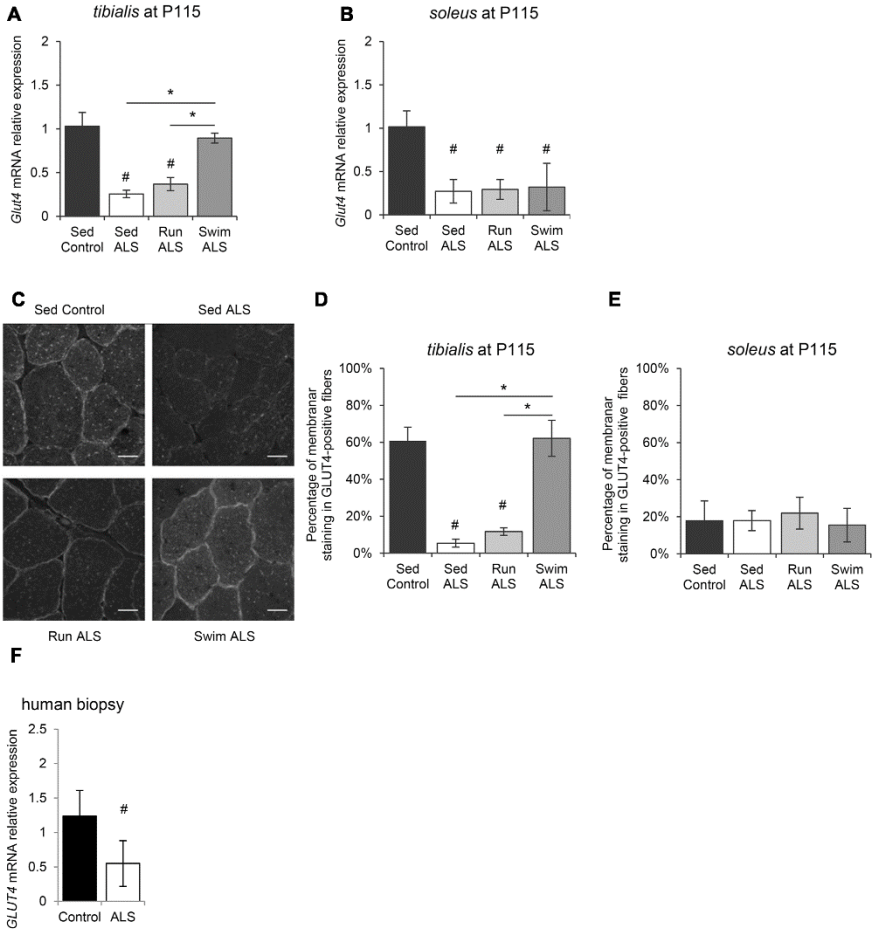


FIGURE 2 | Physical exercise enhances expression and localization of GLUT4 in ALS skeletal muscles. **(A,B)** Quantification by RT-qPCR of *Glut4* mRNA expression levels in *tibialis* **(A)** and in *soleus* **(B)** of Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115. mRNA expression levels were normalized with *Rps26* mRNA**.** **(C–E)** Immunodetection of GLUT4 in muscle transversal section in *tibialis* **(C)** (scale bar: 20 μm) and analysis of membrane staining of GLUT4 in *tibialis* stained fibers **(D)** and *soleus* **(E)** from Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115. **(F)** Quantification by RT-qPCR of *GLUT4* mRNA expression levels in human muscular biopsies (control patients $n = 4$; ALS patients $n = 7$). mRNA expression levels were normalized with *RPL13* mRNA. All data are shown as mean ± SD. # and * indicate significance (with $P < 0.05$) relative to the control and between ALS conditions, respectively.

sarcolemma level in ALS *tibialis* muscles, compared to controls (**Figures 2C,D**). By contrast, no difference in GLUT4 subcellular distribution was observed in the ALS *soleus* compared to controls (**Figure 2E**). Since exercise is thought to induce GLUT4 mobilization to the sarcolemma (Douen et al., 1990; Lauritzen et al., 2010), we next investigated whether, depending of its type, exercise training could restore GLUT4 subcellular distribution in the ALS muscles. In contrast to the running-based training, the swimming-based training induced a sub-cellular redistribution of the transporter in ALS *tibialis* as evidenced by both the increase in GLUT4 staining at the cell periphery and the decrease in GLUT4 staining throughout the cytoplasm of the muscle cells (**Figures 2C,D**). In the ALS *soleus*, both exercise types had no effect on GLUT4 subcellular distribution (**Figure 2E**).

Since these data substantiated a defect in glucose transport in myofibers in SOD1(G93A) ALS mice, we evaluated *GLUT4* expression in human samples from ALS patients by RT-qPCR. Consistent with ALS mouse data, we found a significant decrease in *GLUT4* mRNA expression in ALS human muscles compared to controls (**Figure 2F**).

Taken together, these results suggested an alteration of GLUT4 expression, the major glucose transporter in the skeletal muscle, specifically in the fast-twitch muscles of SOD1(G93A) ALS mice. More importantly, the GLUT4 expression was restored by the swimming-based training, suggesting a link between GLUT4 expression defects and the glucose tolerance status in sedentary and trained ALS mice.

GAPDH Expression Is Altered in ALS Skeletal Muscles and Promoted by Physical Exercise

In order to determine if the potential defects in glucose uptake, suggested by (1) a glucose intolerance, (2) a decrease in lactate output and (3) defects in muscular GLUT4 expression, would impact glycolysis in ALS muscles, we analyzed the expression pattern of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Indeed, GAPDH has long been recognized as a pivotal enzyme for the production of ATP and pyruvate from glucose through glycolysis. We found that, in both *tibialis* and *soleus* muscles of SOD1(G93A) ALS mice, the levels of *Gapdh* mRNA were significantly decreased in the late symptomatic phase of the disease (P115), with a more pronounced decrease in *tibialis* than in *soleus* when compared to the controls (**Figures 3A,B**). In contrast with *soleus*, we recorded a significant decrease in GAPDH protein in *tibialis* muscle consistent with mRNA expression level (**Figures 3C,D** and Supplementary Figures S1A,B).

We next investigated whether exercise training could improve GAPDH expression in ALS muscles. In the ALS *tibialis*, both exercise paradigms resulted in a significant increase in GAPDH mRNA and protein levels with the strongest efficiency observed with the swimming-based training (**Figures 3A,C**). In the ALS *soleus*, no physical training effect could be recorded on GAPDH mRNA and protein levels (**Figures 3B,D**).

Importantly, we confirmed these data in human muscle samples, where we found a significant decrease in *GAPDH* mRNA expression in ALS patients (**Figure 3E**).

Taken together, these data suggested that glycolysis is altered in ALS skeletal muscles and that high-intensity exercise could efficiently re-balanced the enzymatic equipment in ALS muscle, leading to the improvement in anaerobic capacity of fast-twitch muscles.

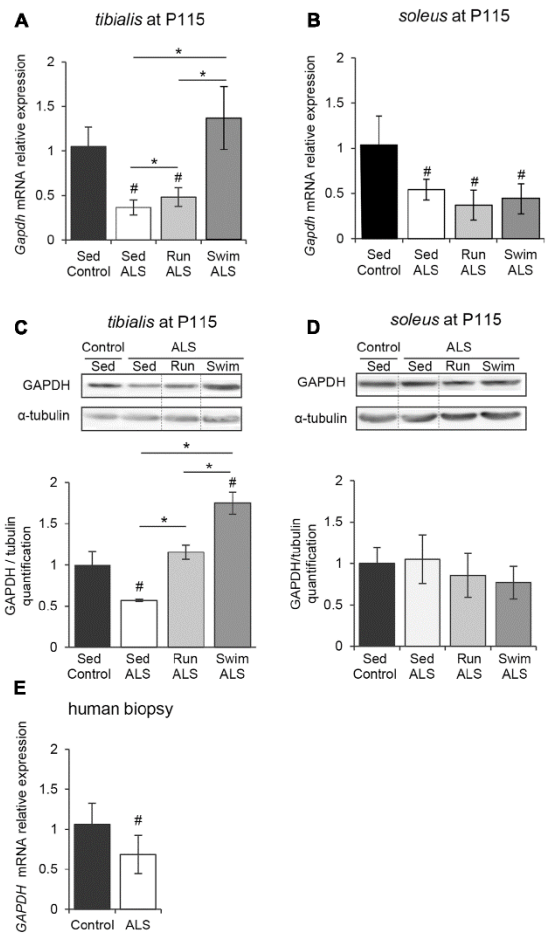


FIGURE 3 | The swimming-based training enhances the GAPDH expression in ALS skeletal muscles. **(A,B)** Quantification by RT-qPCR of *Gapdh* mRNA expression levels in *tibialis* **(A)** and *soleus* **(B)** from Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115 ($n = 5$). mRNA expression levels were normalized with *Rps26* mRNA. **(C,D)** Western blot analysis (upper panel) and quantification (lower panel) of GAPDH protein in *tibialis* **(C)** and *soleus* **(D)** of Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115 ($n = 3$). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. **(E)** Quantification by RT-qPCR of *GAPDH* mRNA expression levels in human muscular biopsies (control patient $n = 6$; ALS patient $n = 10$) mRNA expression levels were normalized with *RPL13* mRNA. All data are shown as mean ± SD. # and * indicate significance (with $P < 0.05$) relative to the control and between ALS conditions, respectively.

The Swimming-Induced Alterations of the Metabolic Routes in ALS Skeletal Muscles Are Independent of Pyruvate Dehydrogenase Modulation

Pyruvate, a glycolysis by-product, can be metabolized in two different ways in muscles, i.e., the anaerobic pathway that will result in the production of lactate, or the aerobic pathway that will result in the production of acetate. Consequently, we investigated the regulation of the PDH complex, which is pivotal in determining the partitioning of anaerobic compared with aerobic use of pyruvate produced by the glycolysis. The PDH E1-alpha subunit is considered as the on/off switch of the PDH complex, since its phosphorylation by the PDH kinase 4 (PDK4) in the muscle leads to PDH complex inactivation (Wu et al., 1999). Importantly, the alteration of PDK4 expression has been recently highlighted in ALS skeletal muscle (Palamiuc et al., 2015). Therefore, we analyzed the level of PDH E1-alpha phosphorylation in *tibialis* and *soleus* of SOD1(G93A) ALS mice. The level of PDH E1-alpha phosphorylation was significantly higher in the ALS *tibialis* compared to controls (**Figure 4A** and Supplementary Figure S2A), while no significant change was found in the *soleus* (**Figure 4B** and Supplementary Figure S2B). We next evaluated the level of *Pdk4* mRNA expression by RT-qPCR. As previously found in the SOD1(G86R) ALS mouse model (Palamiuc et al., 2015), and consistently with higher PDH phosphorylation levels, ALS *tibialis* displayed significantly higher *Pdk4* expression levels compared to control muscles (**Figure 4C**), whereas no significant

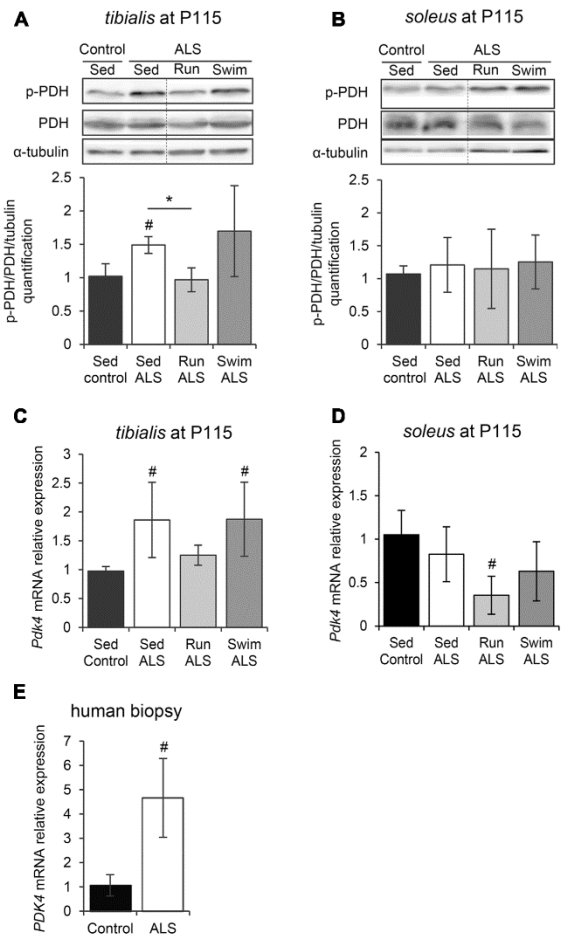


FIGURE 4 | The swimming-based training exerts its beneficial effects independently of PDH modulation. **(A,B)** Western blot analysis (upper panel) and quantification (lower panel) of the phosphorylation status of PDH-E1α in *tibialis* **(A)** and *soleus* **(B)** of Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115 ($n = 3$). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. **(C,D)** Quantification by RT-qPCR of *Pdk4* expression levels in *tibialis* **(C)** and *soleus* **(D)** of Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115 ($n = 5$). mRNA expression levels were normalized with *Rps26* mRNA. **(E)** Quantification by RT-qPCR of *PDK4* mRNA expression levels in human muscular biopsies (control patients $n = 6$; ALS patients $n = 10$). mRNA expression levels were normalized with *RPL13*. All data are shown as mean ± SD; # and * indicate significance (with $P < 0.05$) relative to the control and between ALS conditions, respectively.

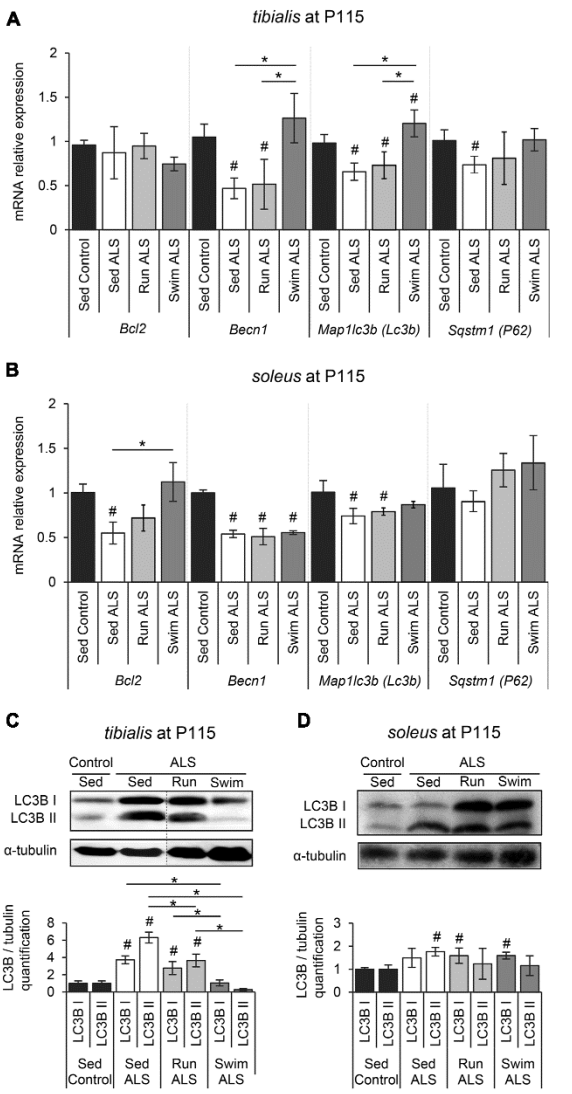


FIGURE 5 | The swimming-based training restores the autophagic flux in ALS skeletal muscles. **(A,B)** Quantification by RT-qPCR of the expression of *Bcl2*, *Becn1*, *Lc3b*, and *P62* mRNA levels in *tibialis* **(A)** and *soleus* **(B)** of Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115 ($n = 5$). mRNA expression levels were normalized with *Rps26* mRNA. **(C,D)** Western blot analysis (upper panel) and quantification (lower panel) of LC3B I and LC3B II proteins in *tibialis* **(C)** and *soleus* **(D)** of Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115 ($n = 3$). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. All data are shown as mean ± SD. # and * indicate significance (with $P < 0.05$) relative to the control and between ALS conditions, respectively.

change was found in the *soleus* (**Figure 4D**). Interestingly, the effects of physical exercise in ALS *tibialis* altered the PDH phosphorylation status in an exercise-type dependent manner. Indeed, the running-based training induced a significant decrease in PDH E1-alpha phosphorylation and *Pdk4* mRNA expression levels in ALS *tibialis* when compared to sedentary ALS mice (**Figures 4A,C**). By contrast, the swimming-based training had no effect on PDH activation pattern, nor on *Pdk4* mRNA expression levels (**Figures 4A,C**), strongly suggesting that all the swimming-induced changes in ALS *tibialis* unexpectedly occurred independently of PDH modulation. In the *soleus*, only the running-based training induced a significant decrease of *Pdk4*

mRNA expression, without a significant change in PDH E1-alpha phosphorylation pattern (**Figures 4B,D**).

We confirmed these findings in human samples from ALS patients. Indeed, we found an increase in *PDK4* mRNA expression ALS when compared to control muscle specimens (**Figure 4E**), as previously reported (Palamiuc et al., 2015).

Taken together, these data indicated that the mechanisms underlying both the ALS-induced alteration of glucose uptake and glycolysis and the beneficial effects of the swimming-based training on GLUT4 and GAPDH expression were independent of a regulation at the PDH level.

The ALS-Induced Alteration of Autophagic Molecular Component Expression in Skeletal Muscles Is Limited by Swimming Exercise

We next investigated whether autophagy, essential for the maintenance of cellular homeostasis and altered in ALS muscles (Dobrowolny et al., 2008; Onesto et al., 2011; Crippa et al., 2013; Xiao et al., 2015), could be involved in the swimming-induced benefits for carbohydrate metabolism in ALS muscles. Among the different systems of autophagy, the Bcl2/Beclin1 (BECN1)-dependent autophagic pathway seems to play an important role in the exercise-induced muscle adaptation of the glucose metabolism in healthy conditions, including GLUT4 relocalization to the sarcolemma and subsequent increase of glucose intake (He et al., 2012). These data prompted us to evaluate the status of this autophagic pathway in *tibialis* and *soleus* of SOD1(G93A) ALS mice. We first evaluated the expression levels of *Bcl2*, *Becn1*, *Map1lc3b (Lc3b)*, and *Sqstm1 (P62)* by RT-qPCR. In sedentary ALS *tibialis*, *Becn1*, *Map1lc3b (Lc3b)*, and *Sqstm1 (P62)* mRNA were significantly down-expressed when compared to controls, whereas no significant change was found for *Bcl2* expression (**Figure 5A**). In the *soleus* of sedentary ALS mice, *Bcl2*, *Becn1*, and *Map1lc3b (Lc3b)* mRNA expressions were down-regulated, with no significant change for *Sqstm1 (P62)* (**Figure 5B**). To complete these results at the protein level, we analyzed LC3B levels by western blot in ALS *tibialis* and *soleus*. Contrasting to the mRNA expression data, we found an accumulation of the two forms of LC3B, LC3B-I and LC3B-II, the lipidated version of LC3B-I involved in autophagosome formation, in ALS *tibialis* when compared to controls (**Figure 5C** and Supplementary Figure S3A). In the ALS *soleus*, we found an accumulation of LC3B-II expression levels, when compared to controls, while no statistical difference was observed for LC3B-I (**Figure 5D** and Supplementary Figure S3B).

When we looked at the ALS *tibialis* after mouse training, we found that, even if both exercise paradigms induced a significant decrease of LC3B-I and LC3B-II proteins compared to sedentary ALS muscles, only the swimming-based training induced a decrease resulting in LC3B protein levels comparable to controls (**Figure 5C**). This decrease at the protein levels was associated with an increase in *Map1lc3b (Lc3b)* mRNA expression levels in ALS *tibialis* (**Figure 5A**). This increase was also found for *Becn1* and *Sqstm1 (P62)* mRNAs, with no effect for running (**Figure 5A**). In the ALS *soleus*, only swimming exercise restored *Bcl2* mRNA expression (**Figure 5B**) while no significant effect was observed at the protein level of LC3B for both exercises (**Figure 5D**).

Taken together, these data strongly suggested that the swimming-based training only improves the expression of the main autophagic molecules in ALS muscles.

Specific Exercise-Induced GLUT4 and GAPDH Expression in ALS Muscles Is Linked to Autophagy

We next investigated whether the swimming-induced enhancement of GLUT4 and GAPDH expression in ALS muscles was dependent on autophagy. We submitted a population of P70 SOD1(G93A) ALS mice to a swimming-based training for 3 consecutive days with or without a blocking of lysosomal degradation by chloroquine (CQ) or the autophagosome formation by 3-methyladenine (3-MA). We observed that, in the early stages of the disease, the expression of *Glut4* and *Gapdh* mRNA was already altered in the *tibialis* of ALS mice and that a 3-days swimming-based training was sufficient to reactivate *Glut4* and *Gapdh* mRNA expression (**Figures 6A,B**). Interestingly, autophagy inhibition with CQ or 3-MA impaired the swimming-induced increase of *Glut4* and *Gapdh* mRNA expression in the *tibialis* of trained ALS mice (**Figures 6A,B**). Like in late stages of the disease, we observed an alteration of GLUT4 subcellular localization in the *tibialis* myofibers of sedentary ALS mice at P70 (**Figures 6C,D**), with a significant decrease of the sarcolemma level localization compared to controls (**Figures 6C,D**). As expected, a 3-day swimming exercise was sufficient to induce a relocalization of GLUT4 to the cell periphery (**Figures 6C,D**). This swimming-induced GLUT4 relocalization was totally abolished by autophagy inhibition whatever the mode of inhibition (CQ or 3-MA) (**Figures 6C,D**).

Taken together, these data suggest that the benefits induced by an anaerobic exercise such as swimming for improving glucose uptake in fast-twitch ALS muscles, are linked to autophagy.

The Swimming-Based Training Re-equilibrates Gene Expression Related to Fatty Acid Metabolism in the ALS *Tibialis*

We finally asked whether the swimming-induced improvement of glucose metabolism in ALS *tibialis* could limit the lipid hypermetabolism found in ALS muscles (Dupuis et al., 2004b).

We first looked at the expression profile of the two fatty acid transporters CD36 (Cluster of Differentiation 36) and VLDLR (Very Low Density Lipoprotein Receptor) in the *tibialis* of controls and sedentary and trained ALS mice. We found that the levels of *Vldlr* expression were decreased in ALS but no change was observed for *Cd36* expression (**Figures 7A,B**). As expected, the swimming-based training induced a significant increase in *Cd36* and *Vldlr* expression levels, suggesting an improvement in lipid uptake. By contrast, the running-based training had no effect (*Vldlr*) or even induced a significant decrease (*Cd36*) in the expression of these fatty acid transporters (**Figures 7A,B**).

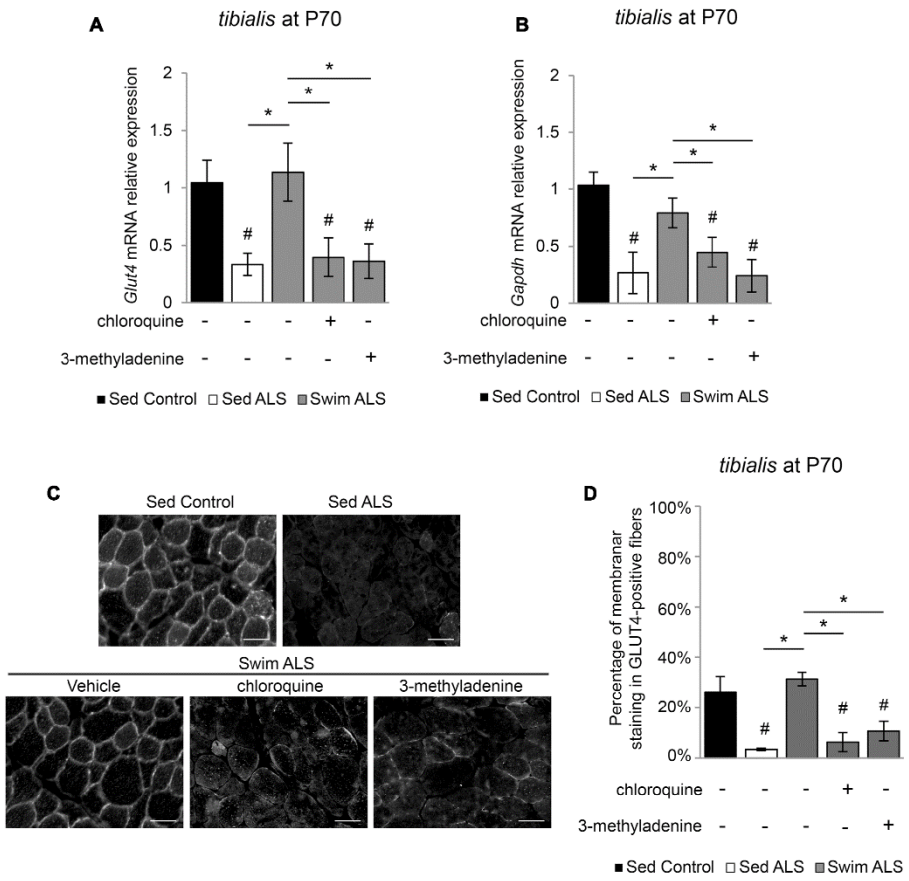


FIGURE 6 | Swimming-benefits on GLUT4 and GAPDH in ALS tibialis is linked to exercise-induced autophagy. **(A,B)** Quantification by RT-qPCR of *Glut4* **(A)** and *Gapdh* **(B)** mRNA expression levels in Sed Control, Sed ALS mice and after 3 days of swimming (Swim ALS) with or without autophagy inhibition by chloroquine (CQ) or 3-methyladenine (3-MA) ($n = 3$). mRNA expression levels were normalized with *Rps26* mRNA. **(C,D)** Immunodetection of GLUT4 in *tibialis* muscle transversal section at P70 (scale bar: 20 μm) **(C)** and analysis of GLUT4 subcellular localization in *tibialis* stained fibers **(D)** in Sed Control, Sed ALS and after 3 days of swimming (Swim ALS mice) with or without autophagy inhibitor with CQ or 3-MA. All data are shown as mean ± SD. # and * indicate significance (with $P < 0.05$) relative to the control and between ALS conditions, respectively.

We next looked at the expression levels of several major genes involved in lipogenesis (Liu et al., 2009), including genes coding for the transcription factor *Srebp-1c* (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c), *Fas* (Fatty Acid Synthase), *Ucp3* (Uncoupling protein 3), and *Acc1* (Acetyl-CoA Carboxylase 1). We found that the expression levels of *Srebp-1c* were profoundly lowered in ALS *tibialis* in comparison to controls (**Figure 7C**). The swimming-based training induced a significant reactivation of *Srebp-1c* expression in ALS *tibialis*, whereas no effects could be recorded with the running-based training (**Figure 7C**). Interestingly, the expression profile of *Fas* (**Figure 7D**) and *Ucp3* (**Figure 7E**) paralleled those of *Srebp-1c*, with a decrease in sedentary ALS *tibialis*, and a significant increase in swimming-based trained muscles. The running-based training had no effect on the expression of *Ucp3* but induced a significant increase in *Fas*. By contrast, *Acc1* expression levels did not display significant alterations in its mRNA expression, in any of the experimental conditions (**Figure 7F**).

Taken together, these data suggest that lipid metabolism is improved by swimming exercise in the ALS *tibialis*.

The Swimming-Based Training Induced Triglyceride Accumulation in ALS *Tibialis*

These results, indicating that the expression of several lipogenic genes, i.e., *Fas* and *Ucp3* (Liu et al., 2009) are enhanced by the swimming-based training, prompted us to evaluate the expression profile of diacylglycerol acyltransferase 1 (*Dgat1*), which increases muscle fat content, associated with PDH inhibition and *Ucp3* overexpression (Liu et al., 2009). We found that the levels of *Dgat1* mRNA expression were significantly lower in ALS *tibialis*, when compared to controls (**Figure 8A**). Importantly, the swimming-based training induced a significant

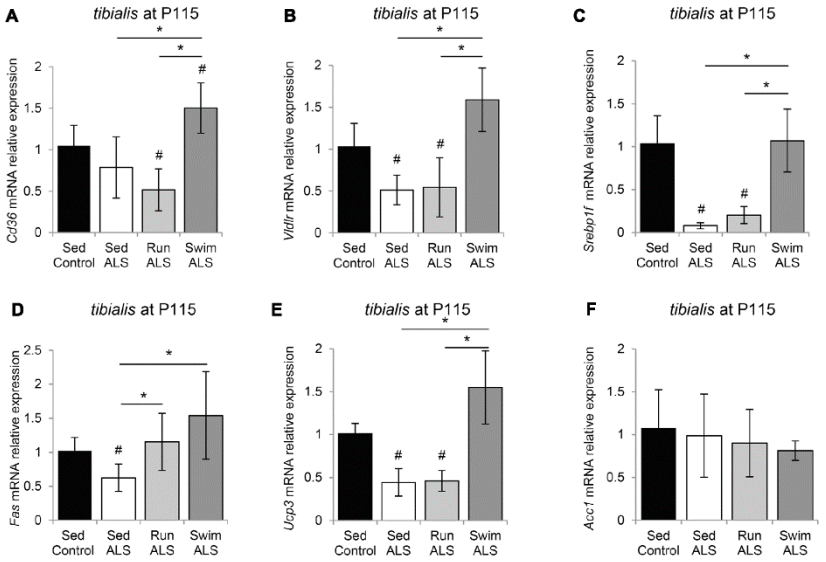


FIGURE 7 | The swimming-based training re-equilibrates gene expression related to fatty acid uptake and lipogenesis in the ALS tibialis. **(A–F)** Quantification by RT-qPCR of gene expression. *Cd36* **(A)**, *Vldlr* **(B)**, *Srebp1c* **(C)**, *Fas* **(D)**, *Ucp3* **(E)**, and *Acc1* **(F)** mRNA expression levels in *tibialis* of Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115 ($n = 5$). mRNA expression levels were normalized with *Rps26* mRNA. All data are shown as mean ± SD. # and * indicate significance (with $P < 0.05$) relative to the control and between ALS conditions, respectively.

increase in *Dgat1* expression levels (**Figure 8A**) compared to sedentary ALS, suggesting that, in addition to favoring the uptake of fatty acids, the swimming-based training might favor the neo-synthesis of lipids. Compared to sedentary ALS, a significant increase in *Dgat1* expression was also recorded in the running *tibialis*, albeit lower than in swimming (**Figure 8A**).

Finally, we quantified by HPLC the levels of triacylglyceride (TAG) in the sedentary and trained ALS *tibialis* and control muscles. As expected, we found a decrease in TAG quantity in the ALS *tibialis* when compared to controls (**Figure 8B**). Importantly, the swimming-based training induced a 2-fold increase in TAG levels in the ALS *tibialis*, reaching levels comparable to controls, whereas the running-based training only increased TAG levels by 1.4-fold (**Figure 8B**).

Taken together these data suggested that swimming could favor fat deposition in ALS muscle.

DISCUSSION

Here, we report the first lines of evidence indicating that a specific exercise paradigm, based on a high intensity and amplitude swimming exercise, significantly improves glucose metabolism in ALS mice. These swimming-induced benefits were associated with changes in skeletal muscle energetic metabolism of ALS mice, leading to energetic fuel shifts toward glucose re-use and fat deposition. Importantly, the beneficial effects of the swimming-based training occurred independently of PDH modulation, providing a promising way to synergize the benefits induced by PDK4 targeting recently shown to be efficient in reducing metabolic alterations in ALS muscles (Palamiuc et al., 2015).

In the present study, we demonstrated that a significant glucose intolerance occurs in SOD1(G93A) ALS mice since the presymptomatic phase of the disease (P70). ALS-induced glucose intolerance, albeit well established in human ALS patients (Poulton and Rossi, 1993; Pradat et al., 2010), was not found in previous studies using male SOD1(G86R) ALS mice, in which an increase in glucose tolerance was revealed (Dupuis et al., 2004b) or in a mix of male and female SOD1(G93A) ALS mice, in which no alteration of glucose tolerance could be recorded (Smittkamp et al., 2014). The latter discrepancy is likely to reflect the difference in disease severity, genetic background or sex bias (James and Walker, 1985; Mu et al., 1999; Dupuis et al., 2004a; Deforges et al., 2009; Shimizu et al., 2012). In addition, our data are strengthened by a metabolomic approach using NMR, performed for the first time on ALS mouse muscles, that showed a significant decrease in glucose concentration in the SOD1(G93A) ALS *tibialis*, which is expected, from a fast-twitch muscle, to preferentially use glucose for its energetic metabolism. Although glucose concentration levels have not been investigated in muscles of SOD1(G86R) ALS mice, an excess of glycogen associated with an inhibited glycolysis has been found in the *tibialis* of these mice (Palamiuc et al., 2015), suggesting a defect in glucose availability for ALS muscle, even in a context of an excessive glucose uptake (Fergani et al., 2007). Taken together, these data point toward a defect in free glucose availability for fueling glycolysis in fast-twitch ALS muscles.

Most importantly, the swimming-based training significantly improved glucose tolerance in SOD1(G93A) ALS mice

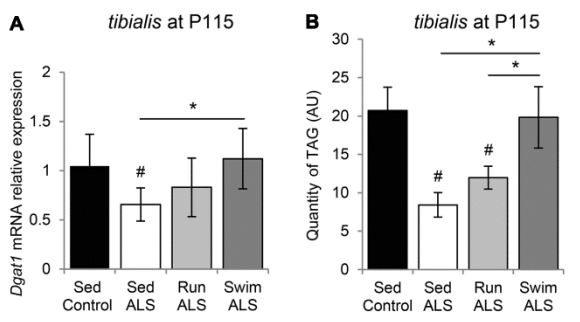


FIGURE 8 | The swimming-based training induced triglyceride accumulation in ALS tibialis. **(A)** Quantification by RT-qPCR *Dgat1* mRNA expression levels in *tibialis* of Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115 ($n = 5$). mRNA expression levels were normalized with *Rps26* mRNA. **(B)** HPLC analysis and quantification of TAG (triacylglycerol) in *tibialis* of Sed Control, Sed ALS, Run ALS, and Swim ALS mice at P115 ($n = 5$). All data are shown as mean ± SD. # and * indicate significance (with $P < 0.05$) relative to the control and between ALS conditions, respectively.

(**Figure 1**). The running-based training had much more modest effects. In the specific context of ALS, characterized by an excessive lipidic catabolism (Dupuis et al., 2004b) that is necessarily oxidative, a running-induced attenuation of the glycolytic energetic pathway is likely to reinforce the oxidative metabolism (Romijn et al., 1993; van Loon et al., 2001), which could further promote the use of lipids as energetic substrate. By contrast, favoring a metabolic shift toward a more glycolytic muscular metabolism, using high intensity exercise types including swimming, is likely to improve glucose tolerance and glucose use by the solicited muscles. The present results contrast with previous studies that have shown that high intensity running-based protocols are detrimental to ALS mice (Mahoney et al., 2004; Carreras et al., 2010). One possible explanation for this discrepancy is that, even at a relatively high intensity, a running-based training in mice would unlikely provide the necessary workload to promote the activation of the glycolytic pathways. The swimming-based training we used was shown to induce a lactate production and specific muscular adaptations (Grondard et al., 2008), including fast-twitch fiber transitions, as classically found in high intensity exercises (Grondard et al., 2008). Therefore, further work would be useful to record the evolution of metabolic indices and analyze skeletal muscle phenotype adaptations, notably the typology, in high intensity running-based training protocols to verify the workload impact on the metabolic pathways.

The important energetic needs of skeletal muscles make it one of the most voracious tissues in energetic substrates. The pumping of circulating glucose by the myofibers is regulated by insulin-elicited signals that lead to the translocation of GLUT4 glucose transporter from intracellular storage micro-vesicles to the sarcolemma. This feature makes GLUT4 a key player in normal glucose homeostasis but also an important factor in insulin resistance (Ren et al., 1995; Leturque et al., 1996; Tsao et al., 1996) and glucose intolerance, two hallmarks of ALS (Reyes et al., 1984; Pradat et al., 2010; Dupuis et al., 2011; Sacca et al., 2012). One important finding from our study is that the decrease in GLUT4 expression levels, found in human and mouse ALS muscles, is associated, in mice, with a decrease expression at the cell periphery (**Figure 2**). Both defects would explain glucose uptake inhibition by ALS muscles. In addition, we, and others, have found impairments in GAPDH expression levels in ALS muscles (**Figure 3**; Calvo et al., 2008), which were associated with a reduced GAPDH enzymatic activity (Pierce et al., 2008). This could be a consequence of glucose uptake defects that are likely to impact downstream genes in glucose metabolism pathways. Accordingly, we report here an alteration of PDH activation pattern associated with *Pdk4* over-expression in the *tibialis* of SOD1(G93A) mice as recently evidenced in SOD1(G86R) mice (Palamiuc et al., 2015). Interestingly, the swimming-based training restored muscular GLUT4 expression, and increased GAPDH expression, but was unable to restore PDH activation pattern, as shown by the persistently high levels of phospho-PDH and of *Pdk4* expression (**Figure 4**). Accordingly, blood lactate levels were significantly increased by the swimming-based training, strongly suggesting that the produced pyruvate is used, a least in part, to enhance the anaerobic glycolytic pathway in ALS muscles.

It is astonishing to note that the swimming-induced shift to anaerobic glycolytic pathway is associated with an enhanced fat storage in ALS *tibialis*, likely resulting from (1) lipid uptake, as suggested by the increase of *Vldlr* and *Cd36* expression levels, and (2) TAG synthesis, as suggested by the swimming-induced expression of lipogenesis genes such as *Fas*, *Acc1,* and *Dgat1*. Interestingly, in humans, the exercise-induced accumulation of intramuscular TAG and protection against insulin resistance correlated with an increase in DGAT1 expression levels (Schenk and Horowitz, 2007). Moreover, the skeletal muscles of mice overexpressing DGAT1 display an increase of muscular triglyceride synthesis coupled with fatty acid oxidation (Liu et al., 2009). In addition, and in line with our results in the swimming-trained ALS *tibialis*, *Glut4, Cd36, Pdk4,* and *Ucp3* expression levels were increased in DGAT1-overexpressing muscles (Liu et al., 2009).

Moreover, we report in the present study that the swimming-induced improvement in carbohydrate metabolism in the ALS *tibialis* is linked to the autophagy improvement in fast-twitch ALS muscle. Alterations in the expression of autophagy markers have been already reported in the muscles of ALS mice, albeit with variable and even contradictory results probably reflecting differences in disease severity and in muscle types (Dobrowolny et al., 2008; Onesto et al., 2011; Crippa et al., 2013; Olivan et al., 2015). Yet, while the increase in LC3B and P62 expression levels in quadriceps muscles (Crippa et al., 2013) or in unseparated hindlimb ALS muscle tissue (Olivan et al., 2015) was interpreted as an enhancement of the autophagic flux in end stage ALS muscles, the impairment of autophagosome formation in live ALS myofibers was interpreted as a suppression of the autophagic pathway (Xiao et al., 2015). Here, we compared the expression of autophagy markers in two muscles that are known to be differentially affected by the disease, i.e., the relatively spared *soleus* vs. the highly

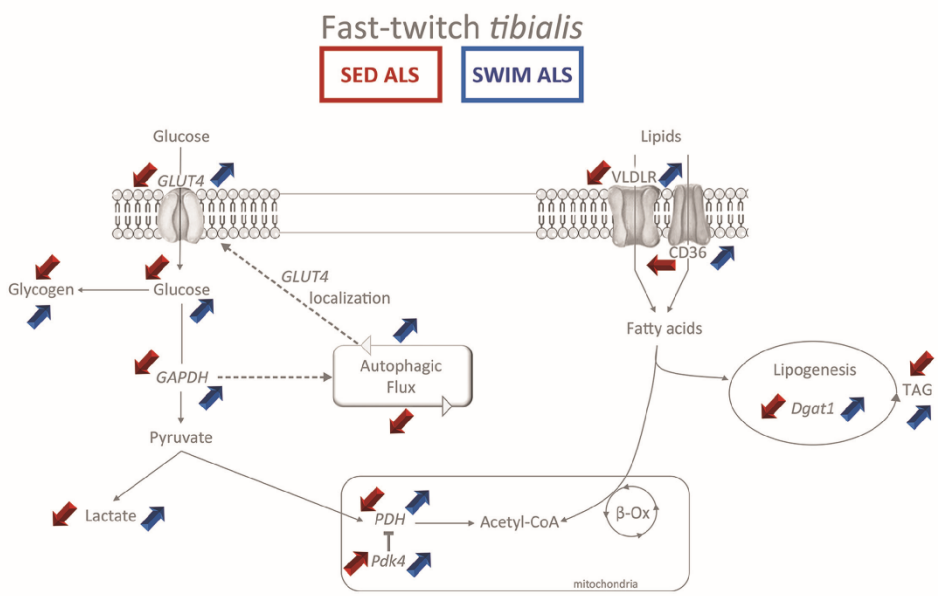


FIGURE 9 | Synthetic summary of energetic metabolism status in fast-twitch tibialis of sedentary and swimming-trained ALS mice at P115. The main experimental alterations observed in the glycolytic and lipidic metabolism (Red arrows) in the fast-twitch tibialis of sedentary ALS (SED ALS) compared to sedentary controls are contrasting with the beneficial effects (blue arrows) of the swimming-based training in ALS mice (SWIM ALS) at 115 days of age. The main metabolites appear in normal typeface while enzymes appear in italic typeface. The colored up arrows correspond to an increase while the down arrows correspond to a decrease.

affected *tibialis*. We found a dramatic accumulation (more than fivefold) of the main autophagy protein LC3B, whatever the form I or II, in the ALS *tibialis* whereas this accumulation was less than twofold in the ALS *soleus*, and only concerned LC3B II. Interestingly, LC3B protein accumulation correlated with a significant decrease in *Map1lc3b (Lc3b)* mRNA levels, suggesting a negative feedback on gene transcription due to protein accumulation. Taken together with previous observations (Xiao et al., 2015), these data substantiate the hypothesis of an autophagic flux blockade in ALS muscles. Since the saturation of the autophagic flux due to aggregation of the mutated SOD1 protein is unexpected in muscles (Wei et al., 2012), the reason for the autophagic protein expression alterations could be a consequence of the ALS-induced defective energetic metabolism. Yet, the flux of intracellular vesicles, including autophagosome, mainly depends on anaerobic glycolysis that occurs directly at the level of the moving vesicles (Zala et al., 2013). The glucose intolerance found in ALS would compromise the whole vesicular traffic in muscle, leading both to a reduction in the autophagic flux, and in turn to an even more important decrease in GLUT4 concentration at the plasma membrane, progressively worsening muscular metabolic impairments. In this context, the strong glucose demand induced by high intensity swimming exercise in the fast-twitch glycolytic *tibialis* muscle, would force glucose uptake to the exercised muscle, feeding the glycolytic pathway, mobilizing the vesicular flux leading to GLUT4 mobilization to the cell membrane, and ultimately resulting in an improvement in muscular energetic metabolism. Accordingly, we report here that autophagy inhibition leads to a significant reduction in the swimming-induced increase of GLUT4 and GAPDH expression levels in the ALS *tibialis* (**Figure 6**). However, the exact mechanism(s) triggered by swimming exercise and resulting in the improvement of both autophagy and GLUT4 expression still remains to be identified (**Figure 9**).

One important question raised by our results is the potential impact of muscle metabolic alterations, including autophagy impairments, on ALS motor neuron survival. An altered muscle metabolism might destabilize neuromuscular junctions, ultimately resulting in muscle denervation and motor neuron death (Dupuis et al., 2009). Accordingly, the present data show that *tibialis*, which is mostly innervated by ALS-sensitive fast motor neurons, is more severely affected by metabolic alterations compared to the *soleus*, innervated by ALS-spared slow motor neurons. Moreover, the swimming-induced metabolic shift to the glycolytic pathway, notably in the fast-twitch *tibialis*, correlated with a significant neuroprotection at the level of the fast motor neurons in the mouse ALS spinal cord (Deforges et al., 2009), suggesting that muscle metabolism status may impact motor neuron survival. The running-based training induced no (Veldink et al., 2003; Deforges et al., 2009), transient (Carreras et al., 2010) or weak and sustained (Kaspar et al., 2005) neuroprotection. As expected for a lower intensity exercise, the running would favor the oxidative metabolism in solicited muscles. Likewise, reinforcing the oxidative pathway by a running-based training is seemingly contributing to alter energetic metabolism in ALS muscle and ultimately favor the neurodegenerative process. Thus, the present data suggest that,

in addition to PDK4 inhibition (Palamiuc et al., 2015), the switching to glycolytic muscle metabolism, induced by well-designed exercise programs, may provide synergistic beneficial effects for ALS patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CD and SD made the majority of the cellular and molecular experiments and analyzed the data. CD contributed to the writing of the manuscript. AL performed the lipidomic analysis. CCa and GBe performed the RMN analysis. GBr and FS provided the human muscle samples, contributed to data collection (human samples) and analyzed the data. JB and FD performed the enzyme analysis and contributed to the editing of the manuscript. OB, LW, LH, and DD' performed the analysis of autophagy inhibition, analyzed the data and OB, LW, and LH contributed to the writing of the manuscript. CCh and CM contributed to the analysis of the energetic data and to the editing of the manuscript. FC contributed to data collection, analyzed data and wrote the manuscript. All authors contributed to the design and completion of the experiments.

FUNDING

This research was supported by a grant from Inserm, CNRS and Paris Descartes University.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank B. Gasnier (UMR 8250 CNRS-Paris Descartes university, France), L. Dupuis and J.-P. Loeffler (University of Strasbourg, France) for fruitful discussions and advices, C. Forest, S. Bortoli, and C. Benelli (UMR-S 1124 INSERM-Paris Descartes university, France) for help in metabolic analysis, Thomas Simonet (ENS Lyon, France) for mRNA of human samples, and C. Mader (Paris Descartes university, France) for animal care.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00332/full#supplementary-material

REFERENCES

Al-Chalabi, A., and Hardiman, O. (2013). The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 617–628. doi: 10.1038/nrneurol.2013.203

Andersen, C. L., Jensen, J. L., and Orntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496

Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C., et al. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.* 2, 2692–2703. doi: 10.1038/nprot.2007.376

Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. doi: 10.1139/o59-099

Bouteloup, C., Desport, J. C., Clavelou, P., Guy, N., Derumeaux-Burel, H., Ferrier, A., et al. (2009). Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J. Neurol.* 256, 1236–1242. doi: 10.1007/s00415-009-5100-z

Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., Munsat, T. L., and World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 1, 293–299. doi: 10.1080/146608200300079536

Calvo, A. C., Moreno-Igoa, M., Manzano, R., Ordovas, L., Yague, G., Olivan, S., et al. (2008). Determination of protein and RNA expression levels of common housekeeping genes in a mouse model of neurodegeneration. *Proteomics* 8, 4338–4343. doi: 10.1002/pmic.200701091

Carreras, I., Yuruker, S., Aytan, N., Hossain, L., Choi, J. K., Jenkins, B. G., et al. (2010). Moderate exercise delays the motor performance decline in a transgenic model of ALS. *Brain Res.* 1313, 192–201. doi: 10.1016/j.brainres.2009.11.051

Crippa, V., Boncoraglio, A., Galbiati, M., Aggarwal, T., Rusmini, P., Giorgetti, E., et al. (2013). Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. *Front. Cell. Neurosci.* 7:234. doi: 10.3389/fncel.2013.00234

Deforges, S., Branchu, J., Biondi, O., Grondard, C., Pariset, C., Lecolle, S., et al. (2009). Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol.* 587, 3561–3572. doi: 10.1113/jphysiol.2009.169748

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

Desport, J. C., Preux, P. M., Truong, T. C., Vallat, J. M., Sautereau, D., and Couratier, P. (1999). Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. *Neurology* 53, 1059–1063. doi: 10.1212/WNL.53.5.1059

Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., et al. (2008). Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab.* 8, 425–436. doi: 10.1016/j.cmet.2008.09.002

Douen, A. G., Ramlal, T., Cartee, G. D., and Klip, A. (1990). Exercise modulates the insulin-induced translocation of glucose transporters in rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 261, 256–260. doi: 10.1016/0014-5793(90)80566-2

Dupuis, L., Gonzalez De Aguilar, J. L., Echaniz-Laguna, A., Eschbach, J., Rene, F., Oudart, H., et al. (2009). Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLOS ONE* 4:e5390. doi: 10.1371/journal.pone.0005390

Dupuis, L., Muller, A., Meininger, V., and Loeffler, J. P. (2004a). Molecular mechanisms of amyotrophic lateral sclerosis: recent contributions from studies in animal models. *Rev. Neurol.* 160, 35–43.

Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., Gonzalez De Aguilar, J. L., and Loeffler, J. P. (2004b). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11159–11164.

Dupuis, L., Pradat, P. F., Ludolph, A. C., and Loeffler, J. P. (2011). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 10, 75–82. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70224-6

Fergani, A., Oudart, H., Gonzalez De Aguilar, J. L., Fricker, B., Rene, F., Hocquette, J. F., et al. (2007). Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Lipid Res.* 48, 1571–1580. doi: 10.1194/jlr.M700017-JLR200

Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M., and Shaw, P. J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 616–630. doi: 10.1038/nrneurol.2011.152

Grondard, C., Biondi, O., Pariset, C., Lopes, P., Deforges, S., Lecolle, S., et al. (2008). Exercise-induced modulation of calcineurin activity parallels the time

course of myofibre transitions. *J. Cell. Physiol.* 214, 126–135. doi: 10.1002/jcp.21168

Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775. doi: 10.1126/science.8209258

Harwood, C. A., Mcdermott, C. J., and Shaw, P. J. (2009). Physical activity as an exogenous risk factor in motor neuron disease (MND): a review of the evidence. *Amyotroph Lateral Scler.* 10, 191–204. doi: 10.1080/17482960802549739

He, C., Bassik, M. C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., et al. (2012). Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* 481, 511–515. doi: 10.1038/nature10758

Hegedus, J., Putman, C. T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol.* 586, 3337–3351. doi: 10.1113/jphysiol.2007.149286

Hutchins, P. M., Barkley, R. M., and Murphy, R. C. (2008). Separation of cellular nonpolar neutral lipids by normal-phase chromatography and analysis by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 49, 804–813. doi: 10.1194/jlr.M700521-JLR200

James, P. A., and Walker, D. G. (1985). A comparison of glucose metabolism and related hormonal parameters in two strains of mice having differing hepatic glucokinase activities. *Comp. Biochem. Physiol. B* 82, 815–819. doi: 10.1016/0305-0491(85)90529-2

Jaspers, R. T., Zillikens, M. C., Friesema, E. C., Delli Paoli, G., Bloch, W., Uitterlinden, A. G., et al. (2017). Exercise, fasting, and mimetics: Toward beneficial combinations? *FASEB J.* 31, 14–28. doi: 10.1096/fj.201600652R

Kang, Y. L., Saleem, M. A., Chan, K. W., Yung, B. Y., and Law, H. K. (2014). The cytoprotective role of autophagy in puromycin aminonucleoside treated human podocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 628–634. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.015

Kaspar, B. K., Frost, L. M., Christian, L., Umapathi, P., and Gage, F. H. (2005). Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 57, 649–655. doi: 10.1002/ana.20451

Kioumourtzoglou, 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. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0910

Kirkinezos, I. G., Hernandez, D., Bradley, W. G., and Moraes, C. T. (2003). Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 53, 804–807. doi: 10.1002/ana.10597

Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P. N., Guillet, P., and Meininger, V. (1996). Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 347, 1425–1431. doi: 10.1016/S0140-6736(96)91680-3

Lauritzen, H. P., Galbo, H., Toyoda, T., and Goodyear, L. J. (2010). Kinetics of contraction-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle fibers from living mice. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 59, 2134–2144. doi: 10.2337/db10-0233

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

Lindauer, E., Dupuis, L., Muller, H. P., Neumann, H., Ludolph, A. C., and Kassubek, J. (2013). Adipose tissue distribution predicts survival in amyotrophic lateral sclerosis. *PLOS ONE* 8:e67783. doi: 10.1371/journal.pone.0067783

Liu, S., Wang, L., Wang, N., Wang, Y., Shi, H., and Li, H. (2009). Oleate induces transdifferentiation of chicken fibroblasts into adipocyte-like cells. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 154, 135–141. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.05.011

Mahoney, D. J., Rodriguez, C., Devries, M., Yasuda, N., and Tarnopolsky, M. A. (2004). Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 29, 656–662. doi: 10.1002/mus.20004

Mariosa, D., Kamel, F., Bellocco, R., Ye, W., and Fang, F. (2015). Association between diabetes and amyotrophic lateral sclerosis in Sweden. *Eur. J. Neurol.* 22, 1436–1442. doi: 10.1111/ene.12632

Mu, J. L., Naggert, J. K., Svenson, K. L., Collin, G. B., Kim, J. H., Mcfarland, C., et al. (1999). Quantitative trait loci analysis for the differences in susceptibility to atherosclerosis and diabetes between inbred mouse strains C57BL/6J and C57BLKS/J. *J. Lipid Res.* 40, 1328–1335.

Olivan, S., Calvo, A. C., Rando, A., Munoz, M. J., Zaragoza, P., and Osta, R. (2015). Comparative study of behavioural tests in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Anim.* 64, 147–153. doi: 10.1538/expanim.14-0077

Onesto, E., Rusmini, P., Crippa, V., Ferri, N., Zito, A., Galbiati, M., et al. (2011). Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 118, 266–280. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07298.x

Paganoni, S., Deng, J., Jaffa, M., Cudkowicz, M. E., and Wills, A. M. (2011). Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 44, 20–24. doi: 10.1002/mus.22114

Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S. T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., et al. (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol. Med.* 7, 526–546. doi: 10.15252/emmm.201404433

Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515. doi: 10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47

Pierce, A., Mirzaei, H., Muller, F., De Waal, E., Taylor, A. B., Leonard, S., et al. (2008). GAPDH is conformationally and functionally altered in association with oxidative stress in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Biol.* 382, 1195–1210. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.088

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

Pradat, P. F., Bruneteau, G., Gordon, P. H., Dupuis, L., Bonnefont-Rousselot, D., Simon, D., et al. (2010). Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 11, 166–171. doi: 10.3109/17482960902822960

Pupillo, E., Messina, P., Giussani, G., Logroscino, G., Zoccolella, S., Chio, A., et al. (2014). Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: a European population-based case-control study. *Ann. Neurol.* 75, 708–716. doi: 10.1002/ana.24150

Ren, J. M., Marshall, B. A., Mueckler, M. M., Mccaleb, M., Amatruda, J. M., and Shulman, G. I. (1995). Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J. Clin. Invest.* 95, 429–432. doi: 10.1172/JCI117673

Reyes, E. T., Perurena, O. H., Festoff, B. W., Jorgensen, R., and Moore, W. V. (1984). Insulin resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 63, 317–324. doi: 10.1016/0022-510X(84)90154-0

Richter, E. A., and Hargreaves, M. (2013). Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol. Rev.* 93, 993–1017. doi: 10.1152/physrev.00038.2012

Romijn, J. A., Coyle, E. F., Sidossis, L. S., Gastaldelli, A., Horowitz, J. F., Endert, E., et al. (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am. J. Physiol.* 265, E380–E391.

Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62. doi: 10.1038/362059a0

Sacca, F., Quarantelli, M., Rinaldi, C., Tucci, T., Piro, R., Perrotta, G., et al. (2012). A randomized controlled clinical trial of growth hormone in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, neuroimaging, and hormonal results. *J. Neurol.* 259, 132–138. doi: 10.1007/s00415-011-6146-2

Schenk, S., and Horowitz, J. F. (2007). Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 117, 1690–1698. doi: 10.1172/JCI30566

Shimizu, R., Sakazaki, F., Okuno, T., Nakamuro, K., and Ueno, H. (2012). Difference in glucose intolerance between C57BL/6J and ICR strain mice with streptozotocin/nicotinamide-induced diabetes. *Biomed. Res.* 33, 63–66. doi: 10.2220/biomedres.33.63

Singh, R., and Cuervo, A. M. (2011). Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* 13, 495–504. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.004

Smittkamp, S. E., Morris, J. K., Bornhoff, G. L., Chertoff, M. E., Geiger, P. C., and Stanford, J. A. (2014). SOD1-G93A mice exhibit muscle-fiber-type-specific decreases in glucose uptake in the absence of whole-body changes in metabolism. *Neurodegen. Dis.* 13, 29–37. doi: 10.1159/000351606

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

van Loon, L. J., Greenhaff, P. L., Constantin-Teodosiu, D., Saris, W. H., and Wagenmakers, A. J. (2001). The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J. Physiol.* 536, 295–304. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.00295.x

Veldink, J. H., Bar, P. R., Joosten, E. A., Otten, M., Wokke, J. H., and Van Den Berg, L. H. (2003). Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul. Disord.* 13, 737–743. doi: 10.1016/S0960-8966(03)00104-4

Wei, R., Bhattacharya, A., Chintalaramulu, N., Jernigan, A. L., Liu, Y., Van Remmen, H., et al. (2012). Protein misfolding, mitochondrial dysfunction and muscle loss are not directly dependent on soluble and aggregation state of mSOD1 protein in skeletal muscle of ALS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 1275–1279. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.126

Wu, P., Inskeep, K., Bowker-Kinley, M. M., Popov, K. M., and Harris, R. A. (1999). Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 48, 1593–1599. doi: 10.2337/diabetes.48.8.1593

Xiao, Y., Ma, C., Yi, J., Wu, S., Luo, G., Xu, X., et al. (2015). Suppressed autophagy flux in skeletal muscle of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model during disease progression. *Physiol. Rep.* 3:e12271. doi: 10.14814/phy2.12271

Zala, D., Hinckelmann, M. V., Yu, H., Lyra Da Cunha, M. M., Liot, G., Cordelieres, F. P., et al. (2013). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* 152, 479–491. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.029

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Desseille, Deforges, Biondi, Houdebine, D'amico, Lamazière, Caradeuc, Bertho, Bruneteau, Weill, Bastin, Djouadi, Salachas, Lopes, Chanoine, Massaad and Charbonnier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résumé

Les amyotrophies spinales infantiles (ASI) sont des maladies génétiques autosomiques récessives caractérisées par une dégénérescence des motoneurones de la corne ventrale de la moelle épinière. La mort des motoneurones spinaux entraine un déficit moteur principalement lié à une faiblesse des muscles proximaux. Le phénotype des patients atteints de cette maladie est très hétérogène. Ainsi, les ASI sont classées en trois types selon l'âge d'apparition des premiers symptômes et la sévérité des symptômes. L'origine de la maladie est une mutation du gène Survival of Motor Neuron (SMN) qui induit un déficit en protéine SMN. Il existe une copie SMN2 du gène qui, en raison d'un épissage alternatif, abouti à la formation d'un transcrit dont l'exon 7 est manquant dans 90% des cas. Or, cet exon code pour une partie du domaine d'oligomérisation de la protéine, qui la stabilise. Par conséquent, la majorité des transcrits provenant du gène SMN2 produisent une protéine SMN qui est peu fonctionnelle et rapidement dégradée. La protéine SMN est impliquée notamment dans le métabolisme des ARN, principalement dans l'assemblage des composants du spliceosome.

Les études menées au laboratoire sur le modèle murin mimant une ASI de type 2 développé par Hung Li en 2000 ont montré que la pratique d'un exercice de course 10 jours après la naissance permettait d'augmenter la durée de vie des animaux de 60% (Grondard, 2005). Plus tard, des études moléculaires ont mis en évidence que, suite au protocole d'exercice physique ou bien par l'injection de NMDA dans la moelle épinière, la voie intracellulaire AKT/CREB est activée tandis que la voie ERK/Elk-1 est inhibée (Biondi et al., 2008, 2010). Ces travaux ont permis d'identifier que la voie ERK/Elk-1 est constitutivement activée et que la voie AKT/CREB est inhibée dans la moelle épinière des souris ASI par rapport au souris contrôles.

Nous avons montré que le niveau d'expression du récepteur à l'IGF-1 est augmentée dans la moelle épinière des souris ASI de type 2 et que la pratique de l'exercice physique permet de réduire son expression. L'IGF-1R est connu pour moduler l'activité des voies de signalisation AKT/CREB, ERK/Elk-1. Nous avons partiellement réduit le niveau d'expression de l'IGF-1R en croisant des souris ASI de type 2 avec des souris invalidées génétiquement pour un allèle du gène de l'*Igf1r* (Holzenberger et al., 2003). La réduction de l'IGF-1R a doublé la durée de vie des souris ASI de type 2 et augmenté les capacités motrices. Nous rapportons également une augmentation du nombre de motoneurones dans la moelle épinière ainsi qu'une augmentation de l'expression de SMN. L'augmentation d'expression de SMN est également associée à un inversement de la balance d'activation des voies AKT/CREB et ERK/Elk-1 dans la moelle épinière des souris ASI de type 2.

Nous mettons en évidence, pour la première fois, une altération de l'homéostasie du cholestérol dans l'ASI. La concentration en cholestérol et ses intermédiaires est perturbée dans la moelle épinière de souris ASI de type 2. Nous rapportons que cette altération est associée à une diminution de l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol dans trois modèles différents de souris ASI et dans des fibroblastes de patients ASI. Nous montrons que l'une des enzymes de la biosynthèse du cholestérol, DHCR24, est capable de moduler le niveau d'expression de SMN. L'inhibition de l'activité de cette enzyme dans des fibroblastes contrôles entraine une diminution de l'expression de SMN. A l'inverse, la surexpression de cette enzyme dans des fibroblastes de patients ASI permet d'augmenter le niveau d'expression de SMN et le nombre de gems dans le noyau. Par ailleurs, le trafic nucléocytoplasmique de DHCR24 est modifiée dans les motoneurones de souris ASI par rapport aux souris contrôles. La réduction de l'expression de l'IGF-1R permet de restaurer le niveau d'expression des enzymes de la voie de biosynthèse du cholestérol et de rétablir l'homéostasie du cholestérol dans la moelle épinière des souris ASI de type 2.

Une meilleure compréhension des modifications physiologiques liées à la pathologie permettrait de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques complémentaires aux traitements déjà existants pour l'ASI.