



**HAL**  
open science

# Rôle des oligodendrocytes dans le continuum Sclérose Latérale Amyotrophique : démence frontotemporale liée à la protéine FUS

Marguerite Jamet

► **To cite this version:**

Marguerite Jamet. Rôle des oligodendrocytes dans le continuum Sclérose Latérale Amyotrophique : démence frontotemporale liée à la protéine FUS. Neurosciences. Université de Strasbourg, 2024. Français. NNT : 2024STRAJ005 . tel-04573441

**HAL Id: tel-04573441**

**<https://theses.hal.science/tel-04573441v1>**

Submitted on 13 May 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

INSERM U1329

**THÈSE** présentée par :

**Marguerite JAMET**

soutenue le : 28 mars 2024

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Rôle des oligodendrocytes dans le continuum Sclérose  
Latérale Amyotrophique-Démence Frontotemporale lié à  
la protéine FUS**

**THÈSE dirigée par :**

**Mr. DUPUIS Luc**

Directeur de recherche, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mr. LOBSIGER Christian**

Chargé de recherche, Institut du cerveau

**Mme DA CRUZ Sandrine**

Professeure, VIB-KU Leuven Center for Brain and Disease Research

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme. MATHIS Chantal**

Directrice de recherche, Université de Strasbourg

**Mr. NAIT OUMESMAR Brahim**

Directeur de recherche, Institut du cerveau

**Mr. GONZALEZ DE AGUILAR José-luis**

Maitre de conférences, université de Strasbourg







## Remerciements

Avant tout, je souhaiterais remercier du fond du cœur mes directeurs de thèse, **Luc Dupuis** et **José-Luis Gonzalez de Aguilar**, qui m'ont encadrée, soutenue et supportée avec patience pendant ces 4 années riches en rebondissements. **Luc**, je suis vraiment très fière d'avoir fait cette thèse avec toi, et infiniment reconnaissante de la confiance que tu m'as témoignée. Ton labo te ressemble, et c'est un labo qui rend heureux de venir travailler tous les matins. Merci pour ton enthousiasme communicatif, ton énergie, et pour ta manière de parler de la science (et du foot) pour laquelle tu es un puit sans fond de connaissances et d'idées. **José**, tu as été pour moi un exemple de patience, de rigueur et de gentillesse plus que nécessaire pour une personnalité aussi impatiente que la mienne. Merci d'avoir toujours (même quand tu n'étais pas d'accord) été à l'écoute réelle de mes suggestions parfois capillotractées, et d'avoir eu à cœur de les laisser partout. Merci en particulier pour ta patience au cours des dernières semaines de rédaction, et pour tous tes encouragements discrets. J'ai pris un réel plaisir à toutes les discussions (scientifiques ou non) que j'ai eues avec toi, et je te prie de m'excuser de n'avoir pas toujours résisté à l'envie de te taquiner. Pour me faire pardonner, je vais te préparer un dossier avec tous les outils qui existent sur Excel pour faire automatiquement les listes d'abréviations.

Je souhaite également remercier **Sandrine Da Cruz**, **Christian Lobsiger**, **Chantal Mathis** et **Brahim Nait Oumesmar**, qui ont accepté d'évaluer mon travail, et que je suis très fière de compter dans mon jury. J'espère que vous prendrez du plaisir à me lire malgré ma prose très volubile. Merci en particulier à **Christian** pour tes mails toujours encourageants et si gentils pendant la rédaction.

Je tiens également à remercier mes collaborateurs **Anne-Laurence Boutillier**, **Iris Grgurina** et **Anaëlle Burgard** pour le Cut & Tag, et pour m'avoir si gentiment accueillie quelques jours dans votre laboratoire.

Un immense merci à **Pascal Kessler** pour la plateforme de microscopie, ta disponibilité, ta rigueur et pour m'avoir fait gagner 100 ans de vie avec ta macro. Merci aussi à **Valérie Demais** pour les heures que tu as passées sur ton cher microscope grâce à moi, et pour tes mails toujours gentils et dépaynants.

A tous les membres du laboratoire, compagnons du quotidien, je voudrais vous écrire à chacun un paragraphe de 10 pages (en Arial 9 interligne 0.5). Il n'y a pas un seul jour de ma thèse (et pourtant elle a été longue), où je n'ai pas été contente de venir au labo grâce à vous, votre gentillesse et votre bonne humeur. Merci à tous d'avoir subi avec patience toutes mes questions, tous mes papotages sans fin, toutes mes théories fumeuses.

Merci à **Chantal et Sylvie**, avant tout pour votre bonne humeur permanente, mais aussi pour m'avoir aidée à compléter (ou initier) quelques expériences de ma thèse. Merci **Sylvie** d'être accourue à mon secours pendant la rédaction. Et **Chantal**, merci pour ta patience infinie quand je me suis lancée dans la culture cellulaire, et pour m'avoir aidée à résoudre le grand mystère des EMSAs ! Merci aussi à **Claudia de Tapia** pour la gestion des animaux à l'animalerie.

**Caro, Fred, Salim, Raphaëlle**, merci de m'avoir *toujours* accueillie avec le sourire à *chaque fois* que je surgissais sans prévenir dans vos bureaux avec des questions plus ou moins existentielles, plus ou moins scientifiques, et plus ou moins intelligentes. Un merci spécial à **Raphaëlle** pour ta patiente bienveillance à mon arrivée dans le labo, et à **Salim** pour t'être résigné à me laisser te suivre comme un poussin pendant tout le congrès à Edimbourg. Et à tous pour votre pertinence scientifique, votre disponibilité et votre bienveillance.

Mes co-thésards, **Félicie, Olga, Marina, Simon**, ma thèse aurait été définitivement plus terrifiante sans vous, sans nos discussions jusqu'à pas d'heure le vendredi soir, sans les grands débats plus ou moins scientifiques et les descentes traditionnelles au distributeur. **Félicie**, qu'est-ce que je vais devenir sans toi ? L'idée de ne plus pouvoir papoter avec toi par-dessus mon écran d'ordi me désespère. Tu as été ma psy, mon wikipedia, mon manuel d'utilisation d'éthovision, mon guide de survie, mon dalai lama. Merci pour tes idées brillantes comme « ne pas laisser la gourde de thé ouverte sur le bureau », et pour les Ferrero rochers mystérieux. Ne change surtout rien, tu seras une directrice de recherche formidable ! (Un jour, peut-être, on retournera courir ensemble, mais je ne suis pas encore prête.) **Olga**, ma petite Olgux, je suis trop heureuse de t'avoir rencontrée, toi, tes soupes et tes expressions qui n'existent pas. Merci pour les grands débats épiques, pour les petits post-it tordants que tu laissais sur mon bureau les jours difficiles. Merci aussi d'avoir fait un tel succès du carnet de la honte et pour les moments mémorables qu'on a passés au cinéma, voir des films surprises dont je tairai le nom ici, pour nous éviter l'humiliation. **Marina**, tes petites chansonnettes ont illuminé mes soirées, et mes longues heures d'analyse de microscopie. Merci de m'avoir appris tellement d'insultes en espagnol (je ne connaissais pas la richesse insoupçonnée de cette langue). Ton sourire et ta

bonne humeur vont me manquer beaucoup beaucoup (Vale Vale). **Simon** merci d'avoir toujours dit oui sans réfléchir : pour finir mes tups le midi, mais aussi pour résoudre instantanément tous mes problèmes d'ordinateur, ou pour me dire un petit mot gentil dès que je le demandais. Et merci pour le carnet de compliments, je sais que c'était toi et c'était une idée géniale !

Je tiens aussi à remercier le soutien technique, qui a aussi été un soutien tout court, indispensable.

Un merci spécial à **Marion**, happiness manager officielle du laboratoire, pour toutes les heures que tu as passées à faire des génotypages et du vibratome pour moi. Merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur et ta rigueur dans le travail, et pour ta personnalité en dehors du travail. Tu es comme un mini-bécher pour moi (c'est-à-dire *vraiment trop mignonne*). Merci pour tous les moments inoubliables qu'on a passés chez toi (raclettes, barbecue, soirées filles, et j'en passe) et pour être venue avec moi à ma remise des prix pour que je ne sois pas toute seule la première fois. Si un jour je deviens amie avec François civil je te promets que je lui parlerai de toi et que ça lui donnera envie de rencontrer et sans doute de t'épouser.

**Geoffrey**, œil de Moscou, je vais faire bref parce que je sais que tu n'aimes pas les compliments, mais sache que « si j'étais sur une île déserte, ça m'embêterait de devoir me passer de toi, de tes soirées gaufres/horreur, de tes citations de Desproges toujours à point nommé, de tes mots croisés (ce brave Nep, plus tout à fait divin), de ton chat, de ta culture infinie sur tout, et même de ton implacable compteur de gros mots. Le labo ne serait *vraiment* pas pareil sans toi. » Et merci pour tous les chocolats que tu m'as offerts, à chaque fois que je venais dans votre bureau à la recherche de nourriture. Tu as mis des paillettes dans ma thèse.

**Charlotte, Aurélie, Paul, Stéphane**, Merci pour votre répartie piquante et votre gentillesse à mon égard. **Aurélie** merci de m'avoir aidée avec les optimisations d'IHC et d'avoir fini les cohortes de Cuprizone (tu m'as sauvée de la folie)! **Paul et Stéphane**, merci de m'avoir aidée pour les qPCR et WB sur mes lignées infinies dont je ne voyais pas le bout ! Et aussi un merci spécial à **Charlotte** pour avoir été mon soutien aux soirées horreur, et pour m'avoir si souvent raccompagnée en voiture quand j'avais trop peur pour rentrer toute seule.

Je voudrais aussi mettre un petit mot pour les anciens, **Gina** et **Robin**, pour votre recul, vos conseils et vos encouragements. **Gina**, c'est notamment grâce à toi que je suis venue dans ce laboratoire et je n'ai *aucun* regret. Et **Robin**, bien que la thèse se finisse, ne t'inquiète pas je

serai tout de même là pour te rassurer pendant les soirées horreur. Merci d'avoir été mon bol d'air du mercredi soir.

Enfin, je voudrais ajouter des remerciements spéciaux à tous les héros de l'ombre qui ont suivi ma thèse avec une bienveillance sincère et un enthousiasme qui me dépasse. Vous n'imaginez pas à quel point vous avez été importants.

**Domi, Soso, Paupau, Pris**, merci pour les messages d'encouragements qui arrivaient de nulle part, pour votre enthousiasme permanent, pour les week-ends d'aventure bouffée d'air, les loooooongues discussions, et votre amitié indéfectible qui a tout traversé. Merci en particulier à **Domi** et **Soso** pour les heures passées à m'écouter parler de mes manips, c'était un plaisir d'être ensemble dans le même bateau ! Je voudrais aussi spécialement remercier **Fara** pour tes passages surprises et réguliers à Strasbourg, pour ta patience infinie avec moi et mes caprices, et pour tous nos rituels BD cinéma frites qui me faisaient oublier le désespoir des manips qui ne marchaient pas. De même, un merci spécial à **Quentin** pour toutes les fois où tu es venu de Bâle juste pour papoter et aller marcher en parlant de bouquins et du sens de la vie. Tu sais que j'ai raison.

Enfin, je veux particulièrement remercier ma famille qui a été un pilier du début à la fin. Pour votre enthousiasme et la confiance de dingue que vous avez en moi. **Papa et maman**, merci pour vos petits messages pleins de soutien, pour votre intérêt sincère pour mon travail. Pour votre présence discrète, permanente et pour vos commentaires toujours pleins de bon sens. **Jo**, merci pour ta présence pendant ma rédaction, j'étais trop heureuse de t'avoir avec moi pour pouvoir de parler de ce que j'apprenais, pour le recul que tu me forçais à prendre sur mes théories et pour ton soutien dans les tous les moments difficiles. Merci spécialement aussi à **Henri**, toujours là pour fusionner mes fichiers excel, ou pour venir à mon secours à chaque panique d'ordinateur ! **Euge et Alex**, merci d'avoir travaillé avec moi pour m'encourager pendant la rédaction. Enfin **Hortense et Quentin**, qui avez sans aucun doute déménagé à Nancy pour être à côté de Strasbourg, ma thèse n'aurait pas été la même sans vous ! Hortense en particulier, merci du fond du cœur (même si le cœur n'a pas de fond) pour toutes les fois où tu es accourue pour moi, pour tous les week-ends sauvages, pour toutes les aventures qui ont été des bouffées d'oxygène dans ma thèse. Pour ta conviction inébranlable que tout finira toujours par s'arranger.

Cette thèse a été financée une ANR, ainsi que par une généreuse donation de la fondation Anne-Marie et Roger Dreyfus abritée à la fondation de France.



# Table des matières

Remerciements .....	4
Table des matières .....	10
Liste des abréviations .....	12
Liste des figures .....	14
Introduction .....	15
I.Le continuum Sclérose Latérale Amyotrophique/Démence Fronto-temporale.....	16
I.A. La Sclérose Latérale Amyotrophique.....	16
I.B. Les démences frontotemporales .....	21
I.C. Un continuum aux niveaux cliniques, génétiques et histopathologiques.....	24
II. FUS dans la physiopathologie du continuum SLA-DFT.....	30
II.A. Structure et rôle de FUS.....	30
II.B. Altération de FUS dans la SLA-DFT.....	36
II.C Mécanismes pathologiques .....	42
III.Oligodendrocytes et myélinisation dans le système nerveux central.....	44
III. A. Oligodendrogenèse dans le Système Nerveux Central.....	44
III. B. La myélinisation du système nerveux central.....	51
III. C. Fonctions des oligodendrocytes myélinisants .....	61
III. D. Fonctions des oligodendrocytes non myélinisants .....	65
III. E. Le syncytium glial .....	68
III. F. Le dimorphisme sexuel .....	70
IV.Les oligodendrocytes dans le syndrome SLA-DFT.....	74
Problématique et objectifs de la thèse .....	113
Résultats .....	115
I.Publication 2: la délocalisation cytoplasmique de la protéine FUS dans les oligodendrocytes matures altère la myéline et affecte le comportement social d'un modèle murin de SLA/DFT .....	116
II. Les altérations oligodendrocytaires liées à la délocalisation de FUS affectent le cytosquelette axonal: résultats préliminaires.....	148
III. Etude chez les femelles : les preuves d'un dimorphisme sexuel au niveau comportemental ? .....	153
Discussion .....	163
I. FUS affecte la gaine de myéline – hypothèses sur les mécanismes en jeu.....	165

I.A. Perte de fonction de FUS et augmentation de la taille des gaines .....	165
I.B. Gain de fonction de FUS et augmentation de l'expression de MBP.....	165
I.C. Altération de la myélinisation ou déséquilibre neuronal ? .....	168
II. Altérations de la myéline et troubles cognitifs .....	171
II.A. Des altérations de la myéline à l'origine du déséquilibre excitation/inhibition dans la schizophrénie et l'autisme .....	171
II.B. Qu'en est-il dans notre modèle de DFT associée à FUS ?.....	172
III. Le dimorphisme sexuel .....	173
III.A. Un dimorphisme sexuel exacerbé en conditions pathologiques.....	173
III.B. Importance des oligodendrocytes dans l'apparition de ces dimorphismes sexuels..	174
IV. Les limites de l'étude .....	176
IV.A. Le modèle pan- <i>mFus</i> comme modèle de DFT.....	176
IV.B. La fragilité des « Time points ».....	177
IV.C. Les animaux CNP <sup>Cre</sup> .....	177
V. Pour aller plus loin .....	179
Conclusion.....	180
Liste des publications et communications scientifiques.....	181
Bibliographie.....	183
Annexes.....	202
Résumé .....	226
Summary .....	226



## Liste des abréviations

DFT : Démence Fronto-Temporale

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SNC : Système Nerveux Central

IMC : Indice de Masse Corporelle

ALSFERS : Echelle d'évaluation fonctionnelle de la SLA

SOD1 : Superoxyde Dismutase 1

TARDBP : Protéine de liaison à l'ADN de la réponse transactive

FUS : Fusionné dans les sarcomes

*C9orf72* : Chromosome 9 Open Reading Frame 72

TDP43 : Protéine de liaison à l'ADN de la réponse transactive de 43kDa

ASO : Oligonucleotide antisense

DLFT : Dégénérescences Lobaires Fronto-Temporales

bvFTD : variant comportemental de DFT

PPA : Aphasie Primaire Progressive

nvPPA : variant non fluide de l'aphasie primaire progressive

MMSE : Mini examen de l'état mental

MAPT : Protéine Tau associée aux microtubules

PGRN : Progranuline

TBK1 : Kinase de fixation à TANK

DPR : Répétition de protéines dipeptidiques

CHMP2B : Protéine 2B du corps multivésiculaire chargé

VCP : Protéine contenant la Valosine

SQSTM1 : sequestosome-1

UBQLN2 : Ubiquilin 2 (UBQLN2)

hnRNP : Ribonucléoprotéines Nucléaire Hétérogènes

LCD : Low Complexity Domain

TAF15 : Facteur 15 associé à la protéine de liaison TATA

CHOP : Protéine homologue à C/EBP

FET : FUS, EWSR1, TAF15

NLS : Signal de localisation nucléaire

NES : Signal d'export nucléaire

RRM : Motif de reconnaissance de l'ARN

ZnF : Doigts de Zinc

TNPO1 : Transportine 1

Kap $\beta$ 2 : Karyopherin- $\beta$ 2

HDAC1 : histone deacetylase 1

SFPQ : Facteur d'épissage riche en proline et glutamine

snRNP : petite ribonucléoprotéine nucléaire

AMPA : Récepteur à l'acide  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor

APC : Adenomatous polyposis coli  
APC-RNP : Complexe ribonucléoprotéique contenant APC  
RAN : Répétitions non associées à un AUG  
LLPS : Séparation de phase liquide-liquide  
TSS : Site de démarrage de la transcription  
CSN : cellules souches neurales  
VZ : zone ventriculaire  
OPC : Cellules précurseurs des oligodendrocytes  
NG2 : Neural/gliale 2  
PDGFR $\alpha$  : Récepteur  $\alpha$  du facteur de croissance dérivé des plaquettes  
CXCR4 : Récepteur de chimiokine 4  
Shh : Sonic Hedgehog  
pMN : domaine des précurseurs de neurones moteurs  
LINK : Lien entre le nucléosquelette et le cytosquelette  
PLP : Protéine protéolipidique  
MBP : Protéine Basique de la Myéline  
MAG : Glycoprotéine associée à la myéline  
CNP : 2,3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase  
NMDAR : récepteur au N-Méthyl-D-Aspartate  
PA : Potentiel d'action  
MCT1 : Transporteur de MonoCarboxylates 1  
GLUT1 : Transporteur de Glucose 1  
PNOG : Oligodendrocytes périneuronaux  
TWEAK : TNF faiblement inducteur de l'apoptose  
TGF  $\beta$  : Facteur de croissance transformant  $\beta$   
ApoE : Apolipoprotéine E  
LDLR : Récepteur aux lipoprotéines de basse densité  
ER : Récepteur aux œstrogènes

## Liste des figures

Figure 1 : Dégénérescence des neurones moteurs corticospinaux et motoneurone dans la SLA. .....	17
Figure 2: Génétique du syndrome SLA/DFT.....	26
Figure 3 : Les principaux agrégats pathologiques observés dans les tissus post-mortem des patients SLA et DFT. ....	29
Figure 4 : Les différents domaines de la protéine FUS.....	31
Figure 5 : Rôles nucléaires de FUS.....	34
Figure 6 : Rôles cytoplasmiques de FUS. ....	36
Figure 7 : Les changements de phase de FUS et la formation d'agrégats pathologiques .....	41
Figure 8 : Prolifération et différenciation des cellules souches neurales (CSN) dans le système nerveux central embryonnaire .....	45
Figure 9 : Vagues de migration des OPC dans la moelle épinière et le cerveau en développement. ....	47
Figure 10 : L'activité électrique de l'axone oriente la migration des OPC et stimule leur différenciation et myélinisation.....	50
Figure 11 : Les étapes de la différenciation des OPC en oligodendrocytes myélinisants.....	51
Figure 12 : Structure de la gaine de myéline.....	52
Figure 13 : Prise en charge de l'ARNm de MBP dans le cytoplasme.....	56
Figure 14 : Processus de compaction de la gaine de myéline .....	58
Figure 15 : Le rôle des oligodendrocytes dans la conduction du message nerveux et le soutien métabolique de l'axone. ....	63
Figure 16 Premières hypothèses sur les causes et conséquences possibles de l'augmentation de la protéine MBP suite à la mutation <i>Fus</i> . ....	167
Figure 17 Deuxième hypothèse sur les causes et conséquences possibles de l'augmentation de la protéine MBP suite à la mutation <i>Fus</i> . ....	169

# Introduction

# **I. Le continuum Sclérose Latérale Amyotrophique/Démence Fronto-temporale**

La démence fronto-temporale (DFT) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA) sont deux maladies incurables qui affectent le système nerveux central (SNC), entraînant une perte progressive des neurones et la dégradation rapide de l'état du patient. Ces deux maladies ont longtemps été considérées comme deux pathologies indépendantes du fait de leurs manifestations cliniques distinctes : plutôt cognitives pour l'une et plutôt motrices pour l'autre. Cependant, l'accumulation de caractéristiques communes aux niveaux génétiques, physiopathologiques et cliniques ont fait naître la notion de « continuum SLA-DFT », décrit comme une unique pathologie neurodégénérative présentant un large spectre de symptômes

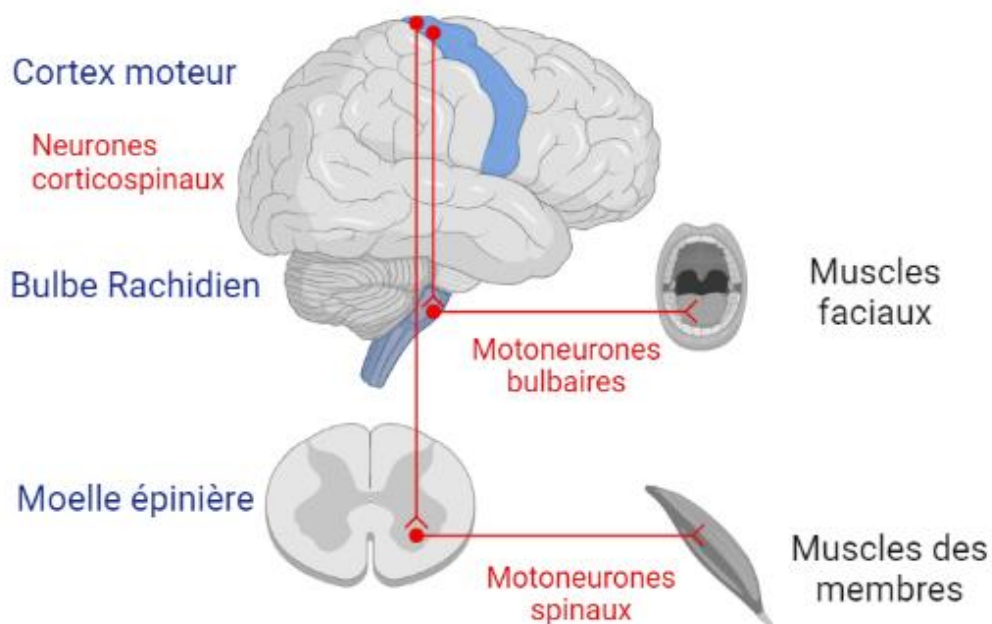
## **I.A. La Sclérose Latérale Amyotrophique**

### **I.A.1 Description**

En 1873, le neurologue Jean-Martin Charcot décrit les cas de deux patientes atteintes d'une « atrophie musculaire progressive », et observe à l'autopsie la présence d'un tissu cicatriciel (sclérose) dans les faisceaux latéraux de la moelle épinière. Ces stigmates tissulaires proviennent de la dégénérescence des neurones moteurs cortico-spinaux. Il nomme cette nouvelle maladie « Sclérose latérale amyotrophique », mais son propre nom reste associé à la pathologie qui est encore aujourd'hui plus connue en France sous l'appellation « maladie de Charcot ».

La SLA se déclare en moyenne aux alentours de 60 ans et provoque le décès du patient dans les 3 à 5 ans suivant le diagnostic (Kiernan et al., 2011). Cette courte espérance de vie entraîne une faible prévalence de la maladie (6 cas pour 100 000 habitants) malgré une incidence annuelle de 2.7 nouveaux cas pour 100 000 habitants qui en fait la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte (Talbot et al., 2016). La SLA se caractérise par la mort progressive des différents types de neurones impliqués dans le système moteur : les neurones corticospinaux situés dans la couche V du cortex moteur et qui commandent le mouvement, les motoneurones bulbaires qui innervent les muscles de la face et les motoneurones inférieurs ou spinaux,

localisés dans la corne ventrale de la moelle épinière et qui innervent les muscles des membres (Fig.1).



**Figure 1 : Dégénérescence des neurones moteurs corticospinaux et motoneurone dans la SLA.**

Les neurones corticospinaux situés dans le cortex moteur innervent d'une part les motoneurones bulbaires qui contrôlent les muscles de la face, et d'autre part les motoneurones spinaux qui contrôlent les muscles du tronc et des membres. La SLA se caractérise par la dégénérescence de ces trois types de neurones. Fait avec Biorender.

Le site initial de la dégénérescence neuronale est variable, et détermine la forme de SLA et les premières manifestations cliniques.

**La forme bulbaire** débute au niveau du tronc cérébral et se manifeste par des difficultés à articuler ou à déglutir, ainsi que par une faiblesse musculaire au niveau de la langue. Cette forme concerne 25% des cas de SLA.

**La forme spinale** débute au niveau de la moelle épinière et entraîne une faiblesse ou une gêne au niveau d'un membre supérieur ou inférieur. Elle correspond à 70% des cas de SLA (Kiernan et al., 2011).

Enfin, dans moins de 5% des cas, les patients présentent une atteinte pulmonaire qui affecte les neurones innervant les muscles respiratoires. Cette **forme pulmonaire** se manifeste initialement par des troubles respiratoires, un essoufflement, et des maux de tête sans altérations motrices. Elle est associée à une progression rapide de la maladie (Wijesekera et al., 2009; Kiernan et al., 2011).

Cependant, quelle que soit la structure initialement touchée, la dégénérescence se propage vers les zones environnantes, et tout le système moteur est progressivement atteint, entraînant une perte graduelle des capacités motrices du patient. L'atteinte des motoneurones inférieurs se manifeste par l'apparition de symptômes dits « pyramidaux », comme une spasticité, une inversion du réflexe de Babinski et l'apparition d'une faiblesse musculaire qui altère la marche, ou la préhension d'objets. Cette faiblesse évolue en paralysie des membres, du pharynx, et finalement des muscles respiratoires, ce qui entraîne le décès du patient. Dans 50% des cas de SLA, les troubles moteurs sont accompagnés d'une altération cognitive ou comportementale du patient (Masrori and Van Damme, 2020).

Le diagnostic de cette maladie reste complexe dans la mesure où aucun biomarqueur diagnostic spécifique n'a été identifié. Il se fait sur la base des critères de diagnostic « El Escorial » définis en 1994 par la fédération mondiale de neurologie et mis à jour en 2000. Ces critères se basent essentiellement sur l'élimination des autres pathologies présentant le même tableau clinique, sur l'évidence d'une perte progressive des neurones moteurs et motoneurones supérieurs et inférieurs ainsi que sur des examens cliniques de type électromyographie et imagerie (Wijesekera et al., 2009). Un dosage des neurofilaments circulants permet de mettre en évidence une neurodégénérescence et est utilisé comme biomarqueur prédictif de l'évolution de la pathologie (biomarqueur pronostique). Cependant, l'augmentation de neurofilaments circulants n'est pas spécifique de la SLA, et ce biomarqueur ne peut être utilisé pour le diagnostic de la maladie. Plusieurs paramètres influent sur son évolution. Les formes respiratoires sont par exemple plus foudroyantes que les formes spinales (Su et al., 2021) et une apparition précoce de la maladie est généralement prédictive d'une durée de vie plus longue. D'autres paramètres comme une importante masse grasseuse sont associés à un pronostic moins sévère. Un IMC (indice de masse corporelle) élevé à l'apparition des symptômes est corrélé à une progression plus lente et une espérance de vie supérieure à la moyenne (Dupuis et al., 2008; Godoy-Corchuelo et al., 2022; Ludolph et al., 2023). La sévérité et l'évolution des altérations fonctionnelles du patient sont évaluées grâce à l'ALSFRS (ALS Functional Rating Scale), un score déterminé à l'aide d'un questionnaire qui se base sur 12 paramètres fonctionnels allant de la déglutition à la capacité à monter des escaliers ou saisir des objets (Maier et al., 2022).

Bien que peu d'études se soient intéressées au dimorphisme sexuel dans la SLA, quelques différences ont été décrites (Bede et al., 2014). Les femmes sont notamment atteintes plus tard.

Elles sont également plus représentées parmi les formes bulbaires, et les hommes parmi les formes spinales (Chiò et al., 2009). De plus certains phénotypes s'expriment préférentiellement chez les hommes, comme le syndrome du bras « en fléau » dans lequel les membres supérieurs pendent sans tonus (Wijesekera et al., 2009). Quelques études suggèrent enfin que les hommes ont un meilleur pronostic que les femmes (del Aguila et al., 2003), et qu'ils développent davantage des altérations cognitives en parallèle du phénotype moteur (Portet et al., 2001). Mais d'autres études n'observent aucune implication du genre (Su et al., 2021).

## **I.A.2 Causes identifiées**

Dans 90% des cas, la SLA est dite sporadique et résulte de l'association complexe de facteurs de risques génétiques et de paramètres environnementaux (Mejzini et al., 2019). Cette maladie est donc globalement plutôt considérée comme à transmission oligogénique ou polygénique, c'est-à-dire que les manifestations cliniques sont déterminées par plus d'un gène (Hardiman et al., 2017). Cependant dans 10 % des cas les patients ont un membre de leur famille également atteint. On parle alors de SLA familiale. Plus de 50 gènes ont été identifiés comme pouvant provoquer une SLA, et parmi eux 4 gènes majoritaires sont responsables de 70% des cas de SLA familiale : *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9orf72*, codant respectivement pour les protéines SOD1, TDP43, FUS et C9orf72 (Hardiman et al., 2017).

La superoxyde dismutase 1 (SOD1) est une enzyme qui assure la protection de la cellule contre le stress oxydant en métabolisant les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène. Plus de 170 mutations ont été découvertes dans le gène *SOD1*, responsables de 20% des cas de SLA familiale, et 2% des cas de SLA sporadique (Berdyński et al., 2022).

La protéine TDP43 (TAR DNA Binding Protein 43 kDa) est une protéine essentiellement nucléaire impliquée dans le métabolisme de l'ARN. Plus de 40 mutations du gène *TARDBP* codant pour la protéine TDP43 ont été identifiées et sont responsables de 5% des cas de SLA familiale. Ces mutations affectent essentiellement la région C-terminale de la protéine, impliquée dans la liaison aux ARN (Prasad et al., 2019).

La protéine Fused in Sarcoma (FUS) est une protéine de liaison aux acides nucléiques, qui, tout comme TDP43, joue un rôle dans le métabolisme de l'ARN. Plus de 30 mutations ont été



identifiées dans le gène *FUS*, donnant lieu à des SLA précoce voire juvéniles à progression fulgurante. Ces mutations affectent majoritairement le domaine de localisation nucléaire de *FUS*, entraînant une délocalisation cytoplasmique de la protéine. Les patients SLA-*FUS* représentent 2 à 6 % des cas de SLA familiale et de 0.3 à 1 % des cas de SLA sporadiques (Mejzini et al., 2019).

Enfin, en 2011, la répétition d'une séquence nucléotidique GGGGCC dans une région non codante du gène *C9orf72* (Chromosome 9 Open Reading Frame 72) est identifiée comme la cause génétique la plus fréquente de SLA. Elle est retrouvée dans 20 à 50% des cas de SLA familiale. La protéine *C9orf72* est notamment impliquée dans le trafic endosomal et l'autophagie (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Sellier et al., 2016; Smeyers et al., 2021).

### **I.A.3 Traitement**

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif, même si des dispositions peuvent être prises pour améliorer les conditions de vie des patients. Le riluzole ou l'édavarone augmentent modestement l'espérance de vie, et la ventilation non invasive permet de suppléer à la fonction respiratoire lorsqu'elle commence à décliner. D'autres traitements peuvent apaiser les symptômes annexes comme les crampes, les spasmes ou les difficultés de déglutition et de communication (Wijesekera et al., 2009).

Avec l'identification de mutations responsables de la SLA, les chercheurs s'orientent de plus en plus vers les thérapies géniques, avec notamment le développement d'ASO (Antisens Oligonucleotides). Ces molécules se fixent spécifiquement à des ARN messagers cibles et permettent d'inhiber leur traduction. Elles présentent un intérêt lorsque le mécanisme pathologique lié à la mutation est essentiellement un gain de fonction toxique. Un essai clinique a été lancé en 2016 sur le tofersen : un ASO dirigé contre l'ARN de la protéine SOD1. Les premiers résultats, très prometteurs, montrent une diminution de l'expression de la SOD1 totale et des neurofilaments circulants, ainsi qu'une amélioration des altérations respiratoires et musculaires. Les prochains résultats sont prévus pour 2027 (Boros et al., 2022; Miller et al., 2022).

## I.B. Les démences frontotemporales

### I.B.1. Description

Les dégénérescences lobaires fronto-temporales (DLFT) ou démences fronto-temporales (DFT) sont un ensemble de pathologies caractérisées par l'atrophie des lobes frontaux et temporaux. La DFT est décrite pour la première fois par Arnold Pick en 1892. Elle se déclare essentiellement avant l'âge de 65 ans, ce qui la catégorise comme une démence « pré-sénile », avec une espérance de vie moyenne de 7,5 ans après le diagnostic (Khan and De Jesus, 2023). Son incidence varie en fonction des zones géographiques, mais elle reste globalement la troisième démence dégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer et les maladies à corps de Lewy (Vieira et al., 2013; Bang et al., 2015). La principale manifestation clinique des DFT est une altération du comportement, du langage et de la pensée abstraite pour lesquels les régions lobaires et frontotemporales jouent un rôle important. Tout comme pour la SLA, trois variants cliniques sont identifiés en fonction des zones initialement touchées qui déterminent la nature des premières manifestations cliniques (Bang et al., 2015).

**Le variant comportemental (bvFTD)** est le variant le plus commun et se manifeste notamment par des altérations précoces du comportement social. Les patients, complètement désinhibés, font preuve d'une grossièreté ou d'une jovialité excessive et ont des attitudes inappropriées qui vont jusqu'à des comportements criminels (harcèlement sexuel, vol, urination en public). La désinhibition les rend particulièrement vulnérables aux addictions, et ils développent une appétence marquée pour le sucre, l'alcool, le tabac ou les jeux d'argent, ce qui a un effet néfaste sur leur bien-être et celui de leur entourage. Ces manifestations sont associées à des comportements compulsifs et obsessionnels. Ces patients présentent également une altération des fonctions exécutives qui se manifeste par une apathie, une baisse de la libido et une perte d'intérêt général à l'égard des relations sociales. Ils n'ont pas conscience du changement de leur comportement. Ces altérations sont généralement associées à la dégénérescence du lobe temporal droit (Bang et al., 2015).

Les deux autres variants sont deux formes distinctes d'aphasie primaire progressive (APP), qui affectent les fonctions liées au langage, à la grammaire, et à la correcte utilisation des mots. Ils

résultent de la dégénérescence préférentielle du lobe temporel gauche et ne sont initialement pas associés à des troubles du comportement.

**Le variant sémantique** se caractérise par des altérations du langage et de la compréhension. Les patients ont des difficultés à reconnaître des visages, des lieux ou des objets familiers, et ne parviennent plus à les nommer. Leur discours est continu mais n'a pas de sens clair, et ils ont tendance à utiliser des expressions incompréhensibles. Cette anomie affecte plutôt les noms communs que les verbes ou les pronoms (Bang et al., 2015; Khan and De Jesus, 2023).

**Le variant non fluide de l'aphasie primaire progressive (nfvPPA)** se manifeste par un discours haché, une difficulté manifeste pour parler et une confusion dans l'utilisation des mots. Le discours est interrompu et grammaticalement bancal, avec des omissions de mots. Cependant ces altérations du langage ne sont pas présentes à l'écrit et la connaissance des objets n'est pas affectée, l'anomie affectant plutôt les verbes. Les patients atteints de nfvPPA auront du mal à comprendre une phrase grammaticalement complexe (Bang et al., 2015; Khan and De Jesus, 2023).

Tout comme pour la SLA, au fur et à mesure que la pathologie progresse, tout le système frontal et temporel est graduellement atteint et les symptômes de ces trois variants convergent (Bang et al., 2015). De plus, au-delà des manifestations comportementales et cognitives, 40 % des patients atteints de DFT présentent également des altérations motrices plus ou moins handicapantes (Burrell et al., 2011; Bang et al., 2015).

Les deux sexes sont affectés de manière équivalente, mais quelques études suggèrent une légère prédominance chez les hommes, et invitent à s'intéresser au dimorphisme sexuel dans les manifestations de la pathologie (Ratnavalli et al., 2002; de Boer et al., n.d.). Notamment, le variant comportemental affecte préférentiellement les hommes alors que l'aphasie primaire progressive touche davantage les femmes. Cette différence résulte en des différences marquées de phénotype, où les comportements obsessionnels, irritables, agressifs et hypersexuels sont significativement plus présentes chez les hommes (Bott et al., 2014; Pengo et al., 2022).

Comme pour la SLA, le diagnostic est complexe. De nombreux symptômes associés aux DFT et en particulier au variant comportemental sont communs à des pathologies psychiatriques, ce

qui entraîne souvent des erreurs de diagnostic. L'apathie et le désintérêt social peuvent être confondus avec des symptômes dépressifs, et les comportements d'euphorie ou de jovialité excessive présentent le tableau clinique des troubles bipolaires ou de la schizophrénie (Mohandas and Rajmohan, 2009; Bang et al., 2015). De nombreux tests ont donc été mis en place pour limiter l'errance et les erreurs diagnostiques. Ces tests combinent des examens cliniques avec notamment la mesure des neurofilaments circulants ou des tests de radiographie pour estimer l'atrophie des zones frontales et temporales, et des examens neurocognitifs comme le Mini-Mental State Examination (MMSE). Ce type de test permet d'évaluer des altérations de la mémoire, du langage, de l'attention, de l'orientation ou des fonctions exécutives (Khan and De Jesus, 2023). L'étude des manifestations cliniques de la maladie présente l'avantage de pouvoir classer les patients de leur vivant, mais ne fait pas l'unanimité. Certaines études préfèrent une classification basée sur des caractéristiques neuropathologiques, et notamment sur la nature des agrégats observés dans les cellules (Mohandas and Rajmohan, 2009; Bang et al., 2015). Des antipsychotiques peuvent être administrés pour alléger les symptômes, en particulier dans le cas du variant comportemental, mais il n'existe pour l'instant aucun traitement curatif (Neylan and Miller, 2023).

## **I.B.2. Causes identifiées**

Un historique familial est identifié dans 40% des cas de DFT, ce qui suggère l'importance du facteur génétique dans l'apparition de la maladie. Presque 14% des cas sont notamment à transmission autosomale dominante, avec plus de 20 gènes identifiés dont les mutations entraînent une DFT. Parmi eux, 4 gènes sont responsables de la majorité des DFT avec cause génétique :

Le gène *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau) codant pour la protéine tau est muté dans 10% de l'ensemble des cas de DFT. La protéine tau peut jouer un rôle dans la polymérisation ou la stabilisation des microtubules et sa fonction est régulée par le nombre de domaines de liaison aux microtubules, lui-même déterminé par l'épissage alternatif de son ARNm (Young et al., 2018).

Le gène *PGRN* codant pour la progranuline cause 10% de l'ensemble des cas de DFT. Ces mutations sont réparties sur tout le gène et entraînent en général l'apparition d'un codon STOP et une haploinsuffisance de la protéine. La progranuline est une glycoprotéine notamment impliquée dans l'inflammation et la croissance neuronale (Eriksen and Mackenzie, 2008).

Le gène *TBKI* est associé à un nombre croissant de cas de DFT (Gijssels et al., 2015; Lamb et al., 2019). Il code pour la kinase de fixation à TANK, une protéine qui agit comme médiateur de l'inflammation et acteur de l'autophagie (Harding et al., 2021).

Enfin, la cause génétique la plus fréquente de DFT est, comme pour la SLA, la répétition de l'hexanucléotide GGGGCC dans le gène *C9orf72*. Cette mutation est responsable de 25% des cas de DFT (Smeyers et al., 2021).

Cependant, tout comme pour la SLA, la majorité des cas sont d'origine dite « sporadique », et résultent probablement de la combinaison complexe de facteurs de risque génétiques et de paramètres environnementaux (Shpilyukova et al., 2020).

## **I.C. Un continuum aux niveaux cliniques, génétiques et histopathologiques**

La SLA et les DFT sont donc deux maladies neurodégénératives qui affectent initialement une région précise avant de se propager aux zones adjacentes, entraînant une altération graduelle de l'état du patient, au niveau moteur ou cognitif. Ni la SLA ni la DFT ne présentent les caractéristiques d'une maladie unique : on observe en effet une grande variabilité dans l'âge de survenue des premiers symptômes (en moyenne autour de 58 ans pour les deux pathologies), dans la présentation initiale de la maladie (bulbaire, spinale ou pulmonaire pour la SLA, variant comportemental ou aphasie primaire pour la DFT), dans la vitesse de progression de la maladie, et dans les causes identifiées. Ces variabilités importantes suggèrent que les noms génériques de « SLA » et « DFT » regroupent en réalité un vaste spectre d'altérations neurodégénératives, et seraient plutôt des syndromes. De plus, ces deux pathologies, bien que différentes au premier abord, présentent de nombreuses caractéristiques communes aux niveaux cliniques, génétiques

et histopathologiques. On parle ainsi de plus en plus d'un « continuum SLA-DFT » qui associerait ces deux syndromes.

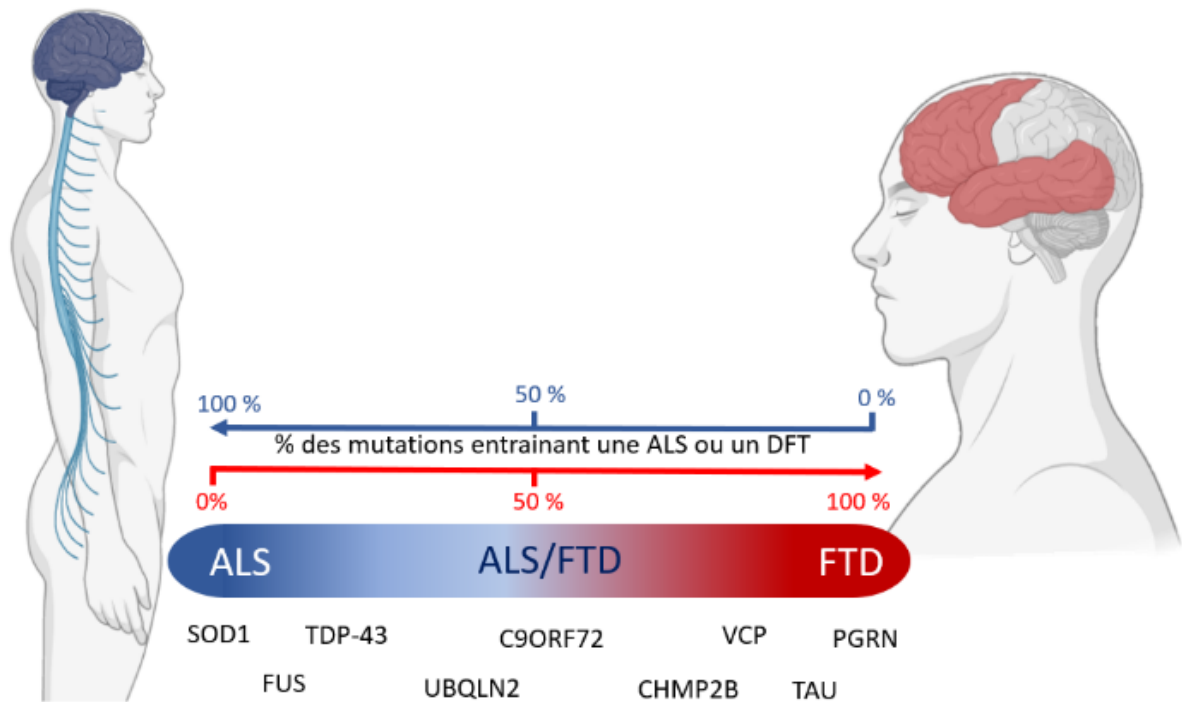
### **I.C.1 Continuum clinique**

Environ 12% des patients atteints de DFT développent une maladie du motoneurone avérée, et 27% présentent des altérations motrices mineures qui se manifestent par des symptômes de type « SLA » avec une hyperréflexie, une spasticité, des fasciculations, une atrophie des muscles ainsi que des difficultés de déglutition. Les patients atteints du variant comportemental développent préférentiellement ce type d'altérations (Burrell et al., 2011; Bang et al., 2015). En parallèle, 65% des patients atteints de SLA développent des altérations cognitives, dont 23% sont des démences avérées. Ces démences peuvent précéder ou se développer après l'apparition des premiers symptômes moteurs. (Rusina et al., 2021).

Cliniquement, ces deux pathologies sont donc liées au sein d'un continuum dont les deux manifestations extrêmes sont la SLA « pure » et la DFT « pure ».

### **I.C.2. Continuum génétique**

Comme vu précédemment, seuls 10% des patients SLA présentent un historique familial de la maladie. Cependant, 20% des patients SLA possèdent des membres de leurs familles touchés par la SLA ou la DFT, ce qui suggère l'existence de gènes pléiotropiques, c'est-à-dire de gènes ayant des effets multiples au niveau du phénotype et dont la mutation pourrait provoquer dans certains cas une SLA et dans d'autres cas une DFT (Hardiman et al., 2017). Il existe ainsi une petite dizaine de gènes associés à la fois à la SLA et la DFT, avec une tendance à provoquer préférentiellement l'une ou l'autre de ces pathologies (Fig.2). Ces gènes peuvent être catégorisés dans deux grandes familles de fonctions cellulaires : l'homéostasie protéique et le métabolisme des ARN.



**Figure 2: Génétique du syndrome SLA/DFT.**

Plusieurs gènes sont impliqués dans l'apparition des deux pathologies. La localisation sur l'axe représente l'implication du gène dans l'apparition de la SLA (en bleu) ou de la DFT (en rouge). Fait avec Biorender.

### I.C.2.a. Les gènes de l'homéostasie protéique

La répétition d'hexanucléotides GGGGCC dans une section non codante du gène *C9orf72* est la principale cause génétique des cas de SLA et de DFT. Ces répétitions sont considérées comme pathologiques au-delà de 30, mais la plupart des patients présentent des centaines voire des milliers de répétitions. Cette aberration génétique conduit à la transcription d'ARNs portant la répétition qui s'accumulent sous forme d'agrégats et sont parfois traduits en pseudo-protéines appelées DPR (Dipeptide Proteins Repeat). Les syndromes SLA et DFT associés à *C9orf72* résultent de la combinaison de la perte de fonction de *C9ORF72* et du gain de fonction toxique des agrégats d'ARNs et des DPR. Les fonctions naturelles de la protéine *C9ORF72* ne sont pas encore complètement identifiées, mais elle jouerait entre autres des rôles dans l'autophagie, le transport vésiculaire et la neuro-inflammation (Abramzon et al., 2020; Smeyers et al., 2021). En plus de *C9orf72*, d'autres gènes communs à la SLA et la DFT jouent des rôles dans la régulation de la dégradation protéique : c'est le cas de Charged Multivesicular Body Protein 2B (*CHMP2B*), Valosin Containing Protein (*VCP*), sequestosome-1 (*SQSTM1*), Tank-Binding kinase 1 (*TBK1*) et Ubiquilin 2 (*UBQLN2*) (Abramzon et al., 2020; Foster and Rea, 2020).

### I.C.2.b. Les gènes du métabolisme de l'ARN

Les gènes *FUS* et *TARDBP* font partie des causes génétiques majoritaires entraînant une SLA. Ils sont également retrouvés mutés dans quelques cas de DFT (Borroni et al., 2009 ; Langenhove et al., 2010). Les protéines FUS et TDP43 appartiennent à la famille des ribonucléoprotéines nucléaire hétérogènes (hnRNP). Ce sont des protéines ubiquitaires, essentiellement nucléaires et possédant des domaines de fixations aux acides nucléiques. Elles jouent des rôles variés dans les différentes étapes du métabolisme de l'ARN, de la transcription à la traduction en passant par l'épissage, et le transport des ARNm. En particulier, l'impact de ces mutations sur la structure et la fonction de FUS est détaillé dans la partie II. D'autres gènes codant pour des hnRNP ont été identifiés dans le continuum SLA-DFT. C'est notamment le cas des hnRNPA1 et hnRNPA2B1 (Kim et al., 2013). Tout comme FUS et TDP43, hnRNPA1 et hnRNPA2B1 possèdent plusieurs domaines de fixations aux ARN, sont essentiellement localisées dans le noyau et jouent des rôles dans la régulation transcriptionnelle, l'épissage, ainsi que la stabilisation, le transport et la traduction des ARN via la formation de granules de transport (notamment dans les neurones) (Purice and Taylor, 2018). En réponse à un stress, les hnRNP sont transloquées dans le cytoplasme et incorporées à des granules de stress grâce aux propriétés prion de leur domaine LC (low complexity) (Purice and Taylor, 2018).

### I.C.2.c. Vers des thérapies géniques pour le continuum SLA-DFT

Suite au succès du premier essai clinique utilisant un ASO pour traiter la SLA-SOD1, (cf I.A.5), un ASO ciblant l'ARN de la protéine C9ORF72 a été créé et lancé en essai clinique en 2018. Malgré des résultats prometteurs sur la souris, ce premier essai chez l'homme a empiré le score ALSFRS des patients SLA entraînant l'interruption de l'essai clinique. Une nouvelle molécule (ASO WVE-004) a été testée sur des patients SLA et DFT portant une mutation *C9orf72*. Cependant, bien que les premiers résultats montrent une diminution du taux de DPR dans le liquide cébrospinal, la molécule n'entraîne pas d'effets sur le phénotype clinique, et l'essai a été interrompu (Boros et al., 2022; Liu et al., 2022). En parallèle, suite aux résultats de plusieurs études montrant que les mutations du gène *FUS* responsables de SLA et DFT entraînaient un gain de fonction toxique de la protéine (Scekic-Zahirovic et al., 2016, 2017; Picchiarelli et al., 2019), un ASO dirigé contre l'ARN de *FUS* a été développé (le Jacifusen). Les premiers résultats chez la souris montrent une réduction de la protéine FUS pathologique et suggèrent que le traitement empêche la dégénérescence des neurones moteurs et des motoneurones



lombaires ainsi que la dénervation musculaire. Un essai clinique est actuellement en cours jusqu'à mars 2024. En attendant les résultats, le Jacifusen a été administré à quelques patients FUS, pour un usage compassionnel, c'est-à-dire avant la mise en place d'une autorisation de mise sur le marché (Boros et al., 2022; Korobeynikov et al., 2022).

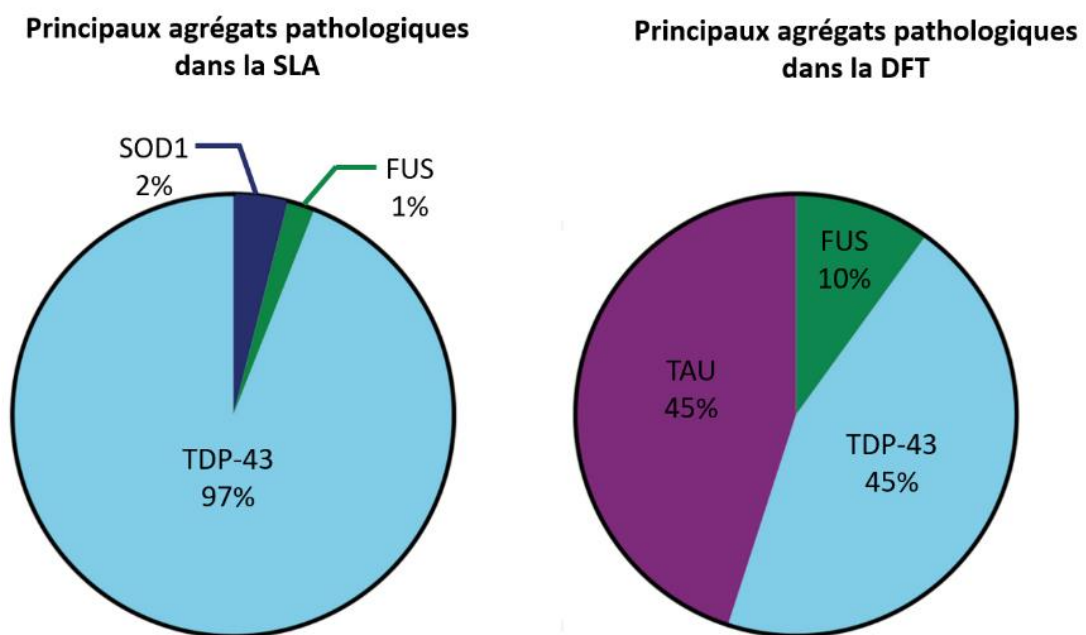
### **I.C.3. Continuum histologique**

Comme dans la plupart des maladies neurodégénératives, on retrouve dans les neurones mais aussi dans les cellules gliales des patients SLA et DFT des amas de protéines agrégées. La composition de ces agrégats dépend en partie de la cause génétique de la maladie : la protéine SOD1 est retrouvée agrégée chez les patients SLA portant une mutation *SOD1*, la protéine tau chez les patients DFT portant une mutation *MAPT* et les répétitions de dipeptides (DPR) forment des inclusions chez les patients *C9orf72* (SLA ou DFT). La grande variété des mutations identifiées dans ces deux pathologies entraîne donc une large possibilité de composants protéiques dans les agrégats (Lee et al., 2017; Strang et al., 2019; Berdyński et al., 2022). Indépendamment de la mutation portée par le patient, d'autres protéines sont retrouvées dans ces inclusions. C'est notamment le cas des protéines ubiquitine et p62 normalement impliquées dans les voies de dégradation du protéasome et de l'autophagie et retrouvées agrégées chez les patients SLA et DFT (Ramos-Campoy et al., 2018; Farrarwell et al., 2020; Davidson et al., 2022). Enfin, ces agrégats peuvent aussi contenir TDP43 ou FUS, deux protéines considérées comme des marqueurs histopathologiques de SLA-DFT.

La protéine TDP43 phosphorylée est retrouvée agrégée dans l'écrasante majorité des patients SLA (97%) et dans une part importante des patients DFT (45%). Sa présence dans les inclusions cytoplasmiques des patients n'est pas conditionnée à une mutation dans le gène *TARDBP* (Halim and Gao, 2022; Keating et al., 2023). De même que TDP43, la protéine FUS forme des agrégats cytoplasmiques insolubles chez les patients SLA portant une mutation dans le gène *FUS*. FUS est également retrouvée piégée dans des agrégats cytoplasmiques chez 10% des patients DFT (Neumann et al., 2009). Il est cependant important de noter que ces agrégats « FUS-DFT » diffèrent des agrégats « FUS-SLA » par leur composition et leur formation. En effet, ils contiennent également d'autres membres de la famille des protéines FET (cf II) et notamment l'homologue de FUS TAF15 (TATA-binding protein-associated factor 15) qui a récemment été identifié comme le cœur amyloïde des agrégats « FUS-DFT » (Tetter et al.,

2023). La présence de ces mêmes types de protéines dans les agrégats des patients SLA et DFT atteste de l'existence de mécanismes communs entre les deux pathologies, comme l'altération du métabolisme des ARN (Mandrioli et al., 2020).

Ces agrégats forment des structures denses, non solubles dont la cellule ne parvient pas à se débarrasser. Leur présence augmente le stress oxydant et contribue ainsi à la dégénérescence, ou au moins à la fragilisation des cellules. (Lévy et al., 2019). Bien que la composition précise des inclusions varie en fonction du patient et même en fonction du type cellulaire, plusieurs grandes familles d'agrégats ont été identifiées. Ces familles ne se recoupent pas. (Fig. 3) (Tan et al., 2017). Cela permet une nouvelle classification des patients, cette fois-ci basée sur leurs caractéristiques histopathologiques et non plus cliniques, ce qui permet de distinguer différents mécanismes pathologiques.



**Figure 3 : Les principaux agrégats pathologiques observés dans les tissus post-mortem des patients SLA et DFT.**

Dans la SLA, 97% des patients présentent des agrégats contenant la protéine TDP43 hyperphosphorylée. SOD1 et FUS sont retrouvées agrégées dans respectivement 2 et 1% des patients. Dans la DFT, les patients présentent des agrégats contenant TAU (45%), TDP43 (45%) ou FUS (10%). Adapté de (Tan et al., 2017).

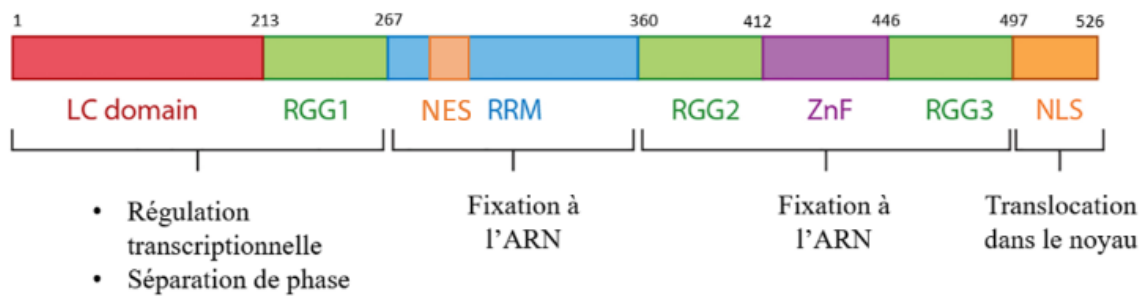
## **II. FUS dans la physiopathologie du continuum SLA-DFT**

En 1993, on montre que certains liposarcomes humains sont liés à l'expression d'une oncoprotéine de fusion générée suite à une translocation chromosomique. Cette translocation accole la partie N-terminale d'un gène inconnu avec la partie C-terminale du facteur de transcription CHOP, conduisant à l'expression aberrante de certains gènes. Ce gène inconnu ainsi mis en évidence est appelé *Fused in Sarcoma (FUS)* et code pour la protéine FUS. Il possède 15 exons et est localisé sur le chromosome 16 chez l'homme.

### **II.A. Structure et rôle de FUS**

#### **II.A.1. Structure**

FUS est une protéine ubiquitaire de 526 acides aminés et de 75 kDa qui appartient à la famille FET (FUS, EWSR1 et TAF15), trois protéines de structures similaires et partageant une forte homologie d'acides aminés. Elle est également structurellement proche de TDP43 dont l'implication dans la SLA et la DFT n'est plus à prouver, mais aussi d'autres particules ribonucleoprotéiques hétérogènes (hnRNP) comme hnRNPA2B1 et hnRNPA1 dont quelques rares mutations ont été associées à la SLA. (Kim et al., 2013). Ces observations suggèrent fortement la possibilité d'un mécanisme commun lié au dysfonctionnement de ce type de protéines. Tout comme TDP43 et les autres hnRNPs, FUS est une protéine de fixation aux acides nucléiques qui joue un rôle important dans la réparation et la transcription de l'ADN ainsi que dans différentes étapes du métabolisme des ARNs. FUS possède donc plusieurs régions essentielles à ces fonctions (Fig.4) (Schwartz et al., 2014).



**Figure 4 : Les différents domaines de la protéine FUS.**

La protéine FUS contient un domaine LC (Low complexity), notamment impliqué dans la séparation de phase de la protéine, plusieurs domaines de fixation à l'ARN, et deux domaines impliqués dans sa localisation subcellulaire : NLS et NES (Nuclear Localisation Signal et Nuclear Export Signal) qui permettent respectivement l'import et l'export nucléaire de FUS suite à sa fixation à des protéines spécifiques.

- Un domaine LC (low complexity) dans la région N terminale de la protéine. Cette région interagit avec la polymérase à ARN II et permet la transition entre l'initiation de la transcription et l'élongation. Elle joue un rôle dans la séparation de phase de la protéine FUS, processus essentiel à la formation de compartiments subcellulaires sans membrane. Ce domaine présente des propriétés de type prion.
- Un motif RRM (RNA Recognition Motif) de reconnaissance de l'ARN, très conservé chez les eucaryotes. Il contient notamment des séquences consensus caractéristiques des ribonucléoprotéines.
- 3 domaines « RGG » riches en arginine et glycine répartis de part et d'autre des domaines RRM et doigts de Zinc (ZnF). Les RGG permettent la fixation aux ARNs et ont une affinité particulière pour les séquences riches en CG (Lagier-Tourenne et al., 2012; Ozdilek et al., 2017). Les arginines contenues dans ces domaines peuvent subir une importante diméthylation, ce qui module les interactions de FUS avec ses partenaires (protéiques et ribonucléotidiques), et joue un rôle dans son transport nucléocytoplasmique (Gonzalez et al., 2021). Cette diméthylation est également impliquée dans la séparation de phase liquide-liquide de FUS (Cui et al., 2018; Hofweber et al., 2018) (discuté en II.B.2).
- Un domaine en doigts de Zinc (ZnF) qui interagit avec la ran-GTPase et permet le transport nucléo-cytoplasmique de FUS.

- Un signal de localisation nucléaire (NLS) situé dans la partie C terminale de la protéine. Il possède 3 épitopes permettant l'interaction avec les transportines qui assurent ainsi la navette de FUS depuis le cytoplasme vers le noyau. La méthylation du domaine RGG3 situé juste en amont du NLS peut moduler son interaction avec les transportines, et affecter ainsi le transport nucléocytoplasmique de FUS (Dormann et al., 2012).
- Un signal d'export nucléaire (NES) situé dans le RRM. Il permet à la protéine FUS d'être exportée activement hors du noyau et d'être maintenue en faible quantité dans le cytoplasme.

La fixation de FUS aux ARN ne dépend pas uniquement de la séquence de l'ARN, mais également de sa conformation. De plus, FUS présente une affinité plus ou moins spécifique pour ses séquences cibles, c'est-à-dire qu'elle se fixe préférentiellement sur des motifs riches en GGU, mais peut aussi interagir avec d'autres séquences. (Ozdilek et al., 2017; Takeda et al., 2017; Loughlin et al., 2019).

En plus de ses cibles acides nucléiques, FUS a également de nombreux partenaires protéiques qui se fixent sur le domaine de localisation nucléaire et sont stabilisés par le domaine RGG3. C'est le cas des transportines 1 et 2 (TNPO1 et 2) ainsi que de la Karyopherin- $\beta$ 2 (Kap $\beta$ 2), trois protéines chargées d'assurer le transport de FUS vers le noyau (Baade et al., 2021; Gonzalez et al., 2021). Une fois installée, FUS y reste piégé grâce à son affinité pour les acides nucléiques (Tsai et al., 2022). De ce fait, FUS est une protéine essentiellement nucléaire. Cependant, elle est aussi présente en faible quantité dans le cytoplasme grâce à des mécanismes de diffusion passive et par son association avec des protéines d'export nucléaire (Hock et al., 2018). Il est intéressant de noter que la répartition noyau/cytoplasme de FUS varie en fonction des types cellulaires. Notamment, les cellules gliales présentent beaucoup moins de FUS cytoplasmique que les neurones, ce qui soulève la question de sa toxicité ou de son importance particulière dans le cytoplasme des cellules gliales (Andersson et al., 2008).

## II.A.2. Fonctions de FUS

### II.A.2.a Rôles nucléaires de FUS

#### Réparation de l'ADN

La survie cellulaire dépend de l'intégrité de son information génétique. Suite à une détérioration locale de l'ADN, FUS intervient rapidement et forme autour de la lésion un compartiment liquide, grâce à ses propriétés de séparation de phase. Ce compartiment appelé corps nucléaire, lui permet de recruter et de concentrer les différents acteurs de la réparation de l'ADN. Elle interagit notamment avec l'histone désacétylase HDAC1 et le facteur d'épissage riche en proline et glutamine SFPQ, deux acteurs essentiels à la réparation de l'ADN (Fig.5) (Wang et al., 2013; Levone et al., 2021).

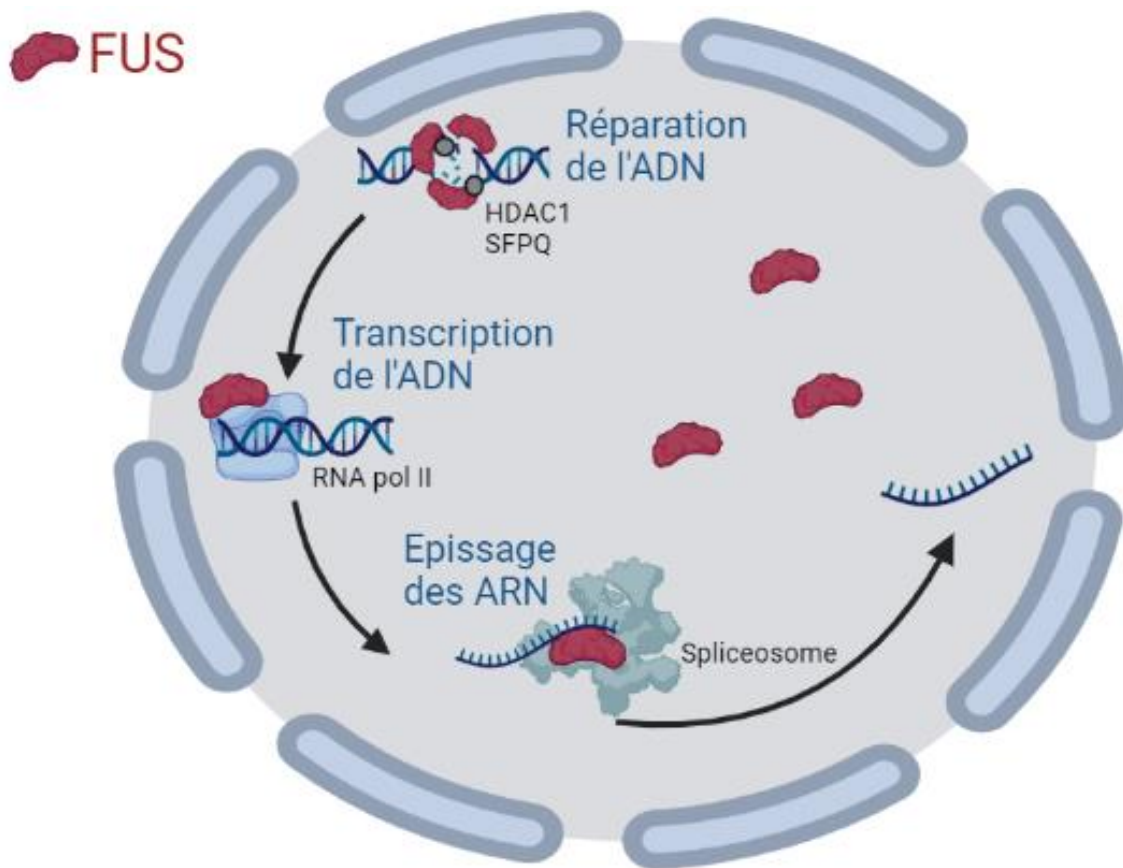
### **Transcription de l'ADN**

FUS est un régulateur transcriptionnel capable de se fixer sur les éléments de réponse des régions promotrices de certains gènes, et de réguler ainsi spécifiquement leur expression. Elle peut agir à la fois comme co-inhibiteur et comme co-activateur de la transcription de ces gènes. (Ishigaki et al., 2012). Elle joue par exemple un rôle important pour la transcription des gènes du récepteur à l'acétylcholine dans les myonoyaux sous-synaptiques (Picchiarelli et al., 2019). De plus, FUS interagit avec l'ARN polymérase II et module le passage de l'étape d'initiation à l'étape d'élongation de la transcription via la phosphorylation d'une sérine (Schwartz et al., 2014). FUS joue ainsi un rôle dans la transcription des gènes, et son altération a un impact direct sur le transcriptome (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Enfin, FUS participe à la synthèse des microARN, via le recrutement du complexe Drosha au niveau des sites de transcription de ces microARN (Morlando et al., 2012) (Fig.5).

### **Epissage des ARN**

L'épissage est un mécanisme cellulaire raffiné qui permet de générer différents ARN messagers à partir d'un unique ARN pré-messager. Grâce à ce phénomène, une même protéine pourra avoir plusieurs isoformes dont les fonctions et les caractéristiques varient de manière subtile. L'acteur majeur de ce mécanisme est le spliceosome, un large complexe constitué de plusieurs sous-unités de ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP). FUS s'intègre au spliceosome en interagissant avec les snRNP, et régule ainsi l'épissage des ARN (Reber et al., 2016). De plus, en se fixant aussi directement aux introns des ARN, FUS réduit l'accessibilité de certains sites d'épissage pour le spliceosome (Hoell et al., 2011; Ishigaki et al., 2012). Par exemple, FUS régule sa propre expression en réprimant l'épissage de son exon 7. L'ARNm qui en résulte est sensible à la dégradation, et est détruit avant d'être traduit (Zhou et al., 2013). FUS régule également l'épissage de la protéine tau, lourdement impliquée dans les DFT (Ishigaki et al.,

2012, 2017), ainsi que l'épissage d'autres protéines de fixation aux ARN (Fig.5) (Humphrey et al., 2019).



**Figure 5 : Rôles nucléaires de FUS.**

FUS est impliquée dans la réparation de l'ADN via le recrutement de HDAC1 et SFPQ. Elle joue également un rôle dans la transcription en se fixant à la RNAPol2 dont elle inhibe la phosphorylation, ce qui permet une transition correcte entre les étapes d'initiation et d'élongation. Enfin, elle interagit avec le spliceosome et régule l'épissage de nombreux ARN, y compris le sien. Fait avec Biorender.

#### II.A.2.b Rôles cytoplasmiques de FUS

Comme nous l'avons souligné précédemment, FUS est également présent dans le cytoplasme des cellules où il joue des rôles dans le transport et la traduction locale de certains ARN en se fixant à leurs régions 3'UTR (qui représentent 3 à 12% de ses cibles) (Colombrita et al., 2012). Les rôles cytoplasmiques de FUS ont essentiellement été étudiés dans les neurones du fait de la faible présence de FUS dans le cytoplasme des cellules gliales.

### **Stabilisation des ARN.**

FUS joue un rôle dans la stabilisation des ARN via le maintien de leur queue poly-A. Cette fonction est notamment importante pour l'ARN de GluA1, une sous unité du récepteur au glutamate AMPA. En l'absence de FUS, l'ARN de GluA1 est déstabilisé et dégradé, ce qui entraîne une diminution de la sous unité GluA1 et une altération de la fonction des récepteurs (Fig.6) (Udagawa et al., 2015).

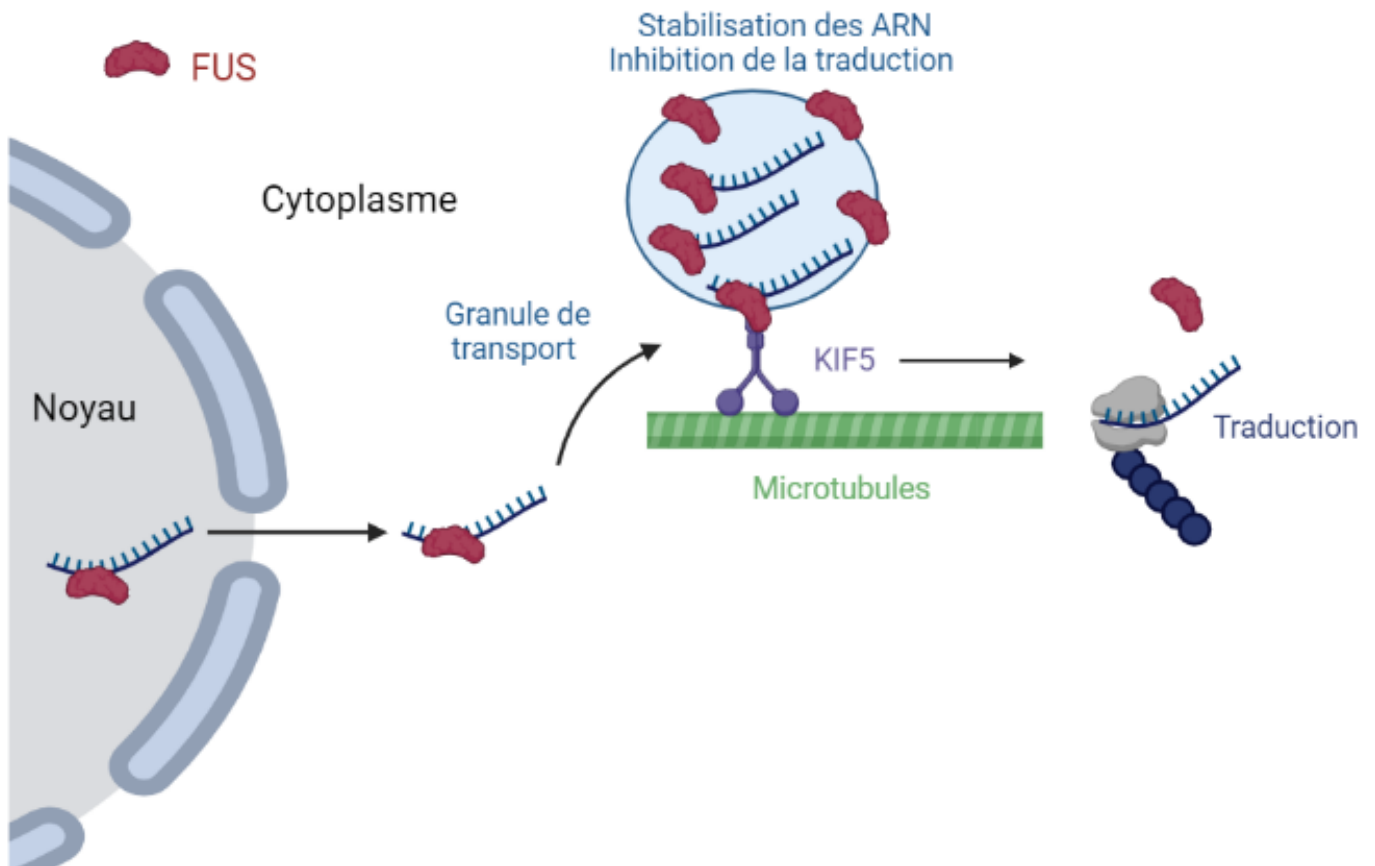
### **Transport de l'ARN**

Le transport des ARN est un mécanisme fondamental qui permet de réguler la quantité de protéines traduites sur un site précis, et de l'adapter au besoin de la cellule. Ce mécanisme représente un enjeu majeur pour les cellules à vastes prolongements comme les neurones : leur activité repose en effet sur la traduction locale de certains ARNs au niveau des synapses ou de l'axone. FUS incorpore les ARN à des « granules de transport » et recrute d'autres ribonucléoprotéines qui permettent d'inhiber la traduction au cours du trajet, ou de stabiliser les ARN pour empêcher leur dégradation. FUS se fixe également à la protéine kinésine KIF5 qui assure le transport antérograde de ces granules depuis le corps cellulaire vers les prolongements (Kanai et al., 2004). L'importance de FUS dans le transport intracellulaire est notamment décrite dans le cas spécifique de l'ARN de Nd1-L, une protéine traduite localement à l'extrémité des dendrites neuronales (Fig.6) (Fujii and Takumi, 2005; Fujii et al., 2005).

### **Traduction locale des ARN**

A l'issue du transport, FUS joue un rôle dans la traduction locale des ARN. Son importance a notamment été démontrée pour la traduction des ARN contenus dans le granule de transport APC-RNP (complexe contenant la ribonucléoprotéine APC), au niveau des protrusions cellulaires. (Yasuda et al., 2013). FUS est aussi un inhibiteur de la traduction (Sévigny et al., 2020). Elle peut notamment inhiber la traduction des RAN, en modulant leur structure. Les RAN sont de petits ARN contenant des séquences répétées de nucléotides et dont la traduction entraîne la formation de DPR (Kamelgarn et al., 2018; Fujino et al., 2023). Enfin, la localisation de FUS au niveau des terminaisons dendritiques et axonales est essentielle pour la régulation de la traduction des protéines contrôlant la morphologie des épines dendritiques et l'activité des synapses (Fig.6) (Sahadevan et al., 2021).





**Figure 6 : Rôles cytoplasmiques de FUS.**

Dans le cytoplasme, FUS se fixe aux exons et régions 3'UTR des ARN. Elle les incorpore à des granules de transport qui sont acheminées par KIF5 vers les prolongements, le long des microtubules. Au cours du transport, FUS permet de stabiliser les ARN pour empêcher leur dégradation, et d'inhiber leur traduction. A l'arrivée des ARN à l'extrémité des prolongements, FUS joue un rôle dans leur traduction locale. Fait avec Biorender.

## **II.B. Altération de FUS dans la SLA-DFT**

### **II.B.1. La délocalisation cytoplasmique de FUS**

La délocalisation cytoplasmique de FUS est l'une des caractéristiques du continuum SLA-DFT. On parle alors de SLA-FUS ou de DFT-FUS. Les SLA-FUS se distinguent en général par une apparition précoce des premiers symptômes et une progression fulgurante. Les DFT-FUS se

distinguent également par une apparition précoce (22-46 ans), et par des comportements obsessionnels et répétitifs, un retrait social et une hyper-oralité associée au syndrome de Pica (Snowden et al., 2011).

#### II.B.1.a Les causes génétiques de la délocalisation cytoplasmique de FUS

Les mutations affectant le gène *FUS* sont pour la première fois associées à la SLA en 2009 (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Aujourd'hui, plus de 50 mutations ont été identifiées dans le gène *FUS*, et on estime qu'elles sont responsables de 2 à 6 % des cas de SLA familiales et de 0.3 à 1 % des cas de SLA sporadiques (Mejzini et al., 2019). Ces mutations affectent essentiellement le signal de localisation nucléaire (NLS) de la protéine. En l'absence de NLS, les transportines TNPO1 et 2 ou la Karyopherin ne peuvent pas se fixer à FUS, ce qui empêche son importation dans le noyau et entraîne sa délocalisation pathologique dans le cytoplasme et son agrégation. Certaines études suggèrent que la sévérité de la maladie est directement liée au degré d'altération du transport nucléo-cytoplasmique (Dormann et al., 2010). Les mutations dans le gène *FUS* ont également été décrites dans quelques rares cas de DFT (Broustal et al., 2010; Van Langenhove et al., 2010).

#### II.B.1.b Les causes non génétiques de la délocalisation cytoplasmique de FUS

Cependant, cette délocalisation cytoplasmique de FUS n'est pas conditionnée à une mutation du gène. En effet, la plupart des cas de DFT-FUS ne sont associés à aucune mutation. De plus, que ce soit chez les patients SLA-FUS ou DFT-FUS, on retrouve des formes sauvages de FUS délocalisées dans le cytoplasme. D'autres phénomènes que la perte du NLS peuvent donc entraîner la délocalisation cytoplasmique de FUS (Tetter et al., 2023).

#### **Le stress cellulaire**

Plusieurs études ont montré l'impact de différentes formes de stress cellulaire sur la localisation subcellulaire de FUS. Le stress hypertonique entraîne l'accumulation cytoplasmique de la transportine TNPO1, normalement chargée d'assurer le transport de FUS vers le noyau. Ainsi bloquée dans le cytoplasme, elle ne peut plus assurer son rôle de navette (Hock et al., 2018). De même, l'excitotoxicité au glutamate provoque une entrée brutale de Ca<sup>2+</sup> dans les cellules

qui déstabilise l'équilibre nucléocytoplasmique de FUS et entraîne son accumulation cytoplasmique (Tischbein et al., 2019). Enfin, Deng a montré en 2014 que les dommages à l'ADN, et notamment les coupures double brins entraînent la phosphorylation de la partie N-terminale de FUS, ce qui provoque sa délocalisation cytoplasmique (Deng et al., 2014).

### **La méthylation des RGG**

Comme vu précédemment, les arginines des domaines RGG de FUS peuvent être méthylées. Il a notamment été montré que la méthylation aberrante du domaine RGG3 affecte la fixation des transportines au signal de localisation nucléaire de FUS. En l'absence de cette interaction, FUS n'est pas transporté dans le noyau et s'accumule dans le cytoplasme. Cette hyper-méthylation des arginines est notamment observée chez les patients SLA-FUS. Cependant, chez les patients DFT, on observe plutôt une hypo-méthylation de FUS. Le mécanisme par lequel cette hypo-méthylation pourrait impacter la localisation subcellulaire de FUS n'a pas encore été élucidé, mais plusieurs hypothèses ont été avancées :

Si cette hypo-méthylation affecte bien le domaine RGG3, elle pourrait entraîner la fixation trop ferme des transportines au NLS de FUS, et empêcher la dissociation du complexe FUS-transportine dans le noyau. FUS serait alors à nouveau acheminé vers le cytoplasme, condamné à rester fixé à sa transportine.

L'hypo-méthylation observée affecte les autres domaines RGG. Or, comme nous l'avons vu, le signal d'export nucléaire (NES) est situé juste en aval du domaine RGG1. L'hypo-méthylation de ce domaine pourrait avoir un impact sur l'interaction avec les protéines chargées de l'export nucléaire, et entraîner un export excessif de FUS hors du noyau (Dormann et al., 2012; Kaneb et al., 2012).

### **La diffusion passive**

Ce phénomène de délocalisation excessive pourrait appartenir à une boucle de rétroaction positive. FUS interagit avec la RNA pol2 pour permettre la transition entre initiation et élongation de la transcription. La délocalisation de FUS du noyau altère cette transition et bloque la RNA pol2 au niveau des sites de transcription, ce qui entraîne une diminution de la synthèse d'ARN. Or la protéine FUS est notamment ancrée dans le noyau par la présence importante d'ARN pour lesquels elle a une forte affinité. Le blocage de la transcription, entraînant une diminution de la quantité d'ARN nucléaire, provoque donc l'augmentation

conséquence de FUS cytoplasmique suite à cette perte d'ancrage nucléaire. Cette transition vers le cytoplasme se fait par diffusion passive de la protéine (Tsai et al., 2022).

### **Le piégeage dans des agrégats**

Enfin, il a été récemment montré que les agrégats des patients DFT sont peut-être formés par l'enchevêtrement filamenteux de protéines TAF15, un homologue de FUS appartenant aussi à la famille FET. Ces agrégats cytoplasmiques pourraient piéger la protéine FUS, entraînant sa localisation cytoplasmique pathologique (Tetter et al., 2023).

## **II.B.2 La formation d'agrégats**

Une autre caractéristique du continuum SLA-DFT est la formation pathologique d'agrégats non solubles dans le cytoplasme. Dans les cas des SLA-FUS et DFT-FUS, ces agrégats contiennent évidemment la protéine FUS, mais sont négatifs pour TDP43 et tau.

### **II.B.2.a La séparation de phase liquide/liquide de FUS (LLPS)**

Comme la plupart des ribonucléoprotéines, FUS a la propriété de former de petits compartiments sans membrane qui permettent de concentrer rapidement et localement une grande quantité d'acteurs. On parle de séparation de phase liquide/liquide. (LLPS). Ces compartiments de forme sphérique sont des structures très dynamiques et réversibles : ils se font et se défont rapidement, au gré des paramètres environnants. Leur formation est notamment stimulée par le stress cellulaire ce qui leur a donné le nom de « granules de stress ». Mais on les retrouve en conditions physiologiques sous formes de granules de transport dans le cytoplasme, ou de corps nucléaires dans le noyau. Le changement de phase de FUS est permis par la présence du domaine LC qui possède des caractéristiques de type prion et est enclin à l'agglomération. Via ce domaine, FUS interagit avec de nombreuses protéines possédant également un domaine LC, notamment d'autres hnRNP, dont FUS elle-même (Fig.7). La formation de ces granules permet de réguler le métabolisme de l'ARN à plusieurs niveaux et est essentielle au bon fonctionnement de la cellule : cela permet de séquestrer les ARN et limiter la traduction de nouvelles protéines en conditions de stress (granules de stress), de transporter les ARN ainsi que les RNP associées sur de longues distances, tout en stabilisant les ARN et en inhibant leur traduction (granules de transport), ou encore de concentrer rapidement les

acteurs de la réparation de l'ADN autour des lésions (corps nucléaires) (Purice and Taylor, 2018).

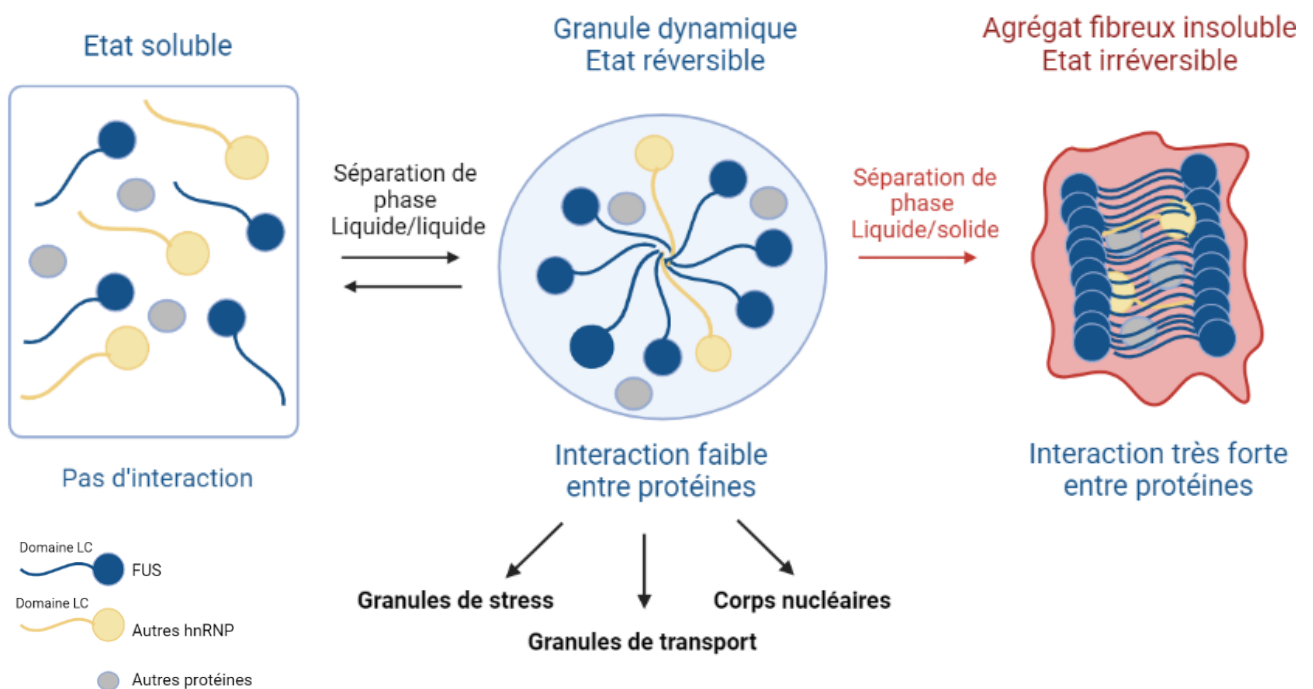
Des facteurs variés peuvent moduler la propension de FUS à former ces granules, comme les modifications post-transcriptionnelles de FUS, ou la concentration environnante en protéine FUS et en ARN. La phosphorylation du domaine LC de FUS favorise leur formation et leur stabilisation tandis que la méthylation des arginines dans les domaines RGG les diminue (Hofweber et al., 2018; Owen et al., 2020). Une forte concentration de FUS facilite également leur formation. A l'inverse, un fort ratio ARN/FUS comme c'est le cas dans le noyau, maintient FUS dans un état soluble et limite la formation de granules (Maharana et al., 2018). Enfin, certains partenaires de FUS, comme TNPO1, permettent de limiter son changement de phase (Hofweber et al., 2018).

### II.B.2.b La formation d'agrégats pathologiques

En conditions pathologiques, le processus de séparation de phase s'intensifie. Après sa transition liquide/liquide, FUS change à nouveau de phase et effectue une transition liquide/solide. Les granules se transforment alors irréversiblement en agrégats denses et insolubles qu'on observe chez les patients SLA et DFT. Cette transition à un état solide pathologique s'explique notamment par l'altération du dynamisme des granules. En conditions physiologiques, leur labilité en fait des plateformes d'échange et d'interactions avec leur environnement. Trop stables, elles deviennent des réservoirs inertes enrichis en une protéine encline à l'agrégation. La concentration importante de FUS dans ces réservoirs encourage son changement de phase liquide/solide (Fig.7). La stabilité des granules dépend notamment de la stabilité des interactions de FUS avec ses partenaires, en particulier les ARN. FUS forme normalement avec eux des interactions dynamiques. Certaines modifications post-traductionnelles sur les arginines ou glycines de FUS peuvent moduler ces interactions et ainsi stabiliser les granules (Daigle et al., 2013; Niaki et al., 2020). L'hypo-méthylation des arginines de FUS observée chez les patients DFT promeut notamment la séparation de phase (Hofweber et al., 2018). De plus, le ratio ARN/FUS est beaucoup plus faible dans le cytoplasme qu'il ne l'est dans le noyau. La délocalisation cytoplasmique de FUS favorise donc la stabilisation des granules et le changement de phase dans le cytoplasme (Maharana et al., 2018). La transition de phase pathologique peut aussi être due à l'altération de certaines interactions avec des

partenaires protéiques. Les mutations *Fus* des patients SLA empêchent la fixation de TNPO1, chargée de limiter les changements de phase aberrants de FUS dans le cytoplasme. Privée de cette interaction, FUS tend à s'agréger de manière pathologique (Hofweber et al., 2018; Baade et al., 2021). Lorsqu'elle se solidifie pour former des agrégats insolubles, FUS peut emprisonner avec elle les autres facteurs présents dans le granule, notamment p62 et ubiquitine, systématiquement retrouvés dans les agrégats.

Cette tendance de FUS à l'agrégation, aussi retrouvée dans d'autres protéines du continuum SLA/DFT (TDP43, Tau, SOD1) (McAlary et al., 2019), pose évidemment la question d'une propagation « prion like » de la pathologie. Une étude a montré dans le cas d'une mutation spécifique de FUS que les agrégats pathologiques entraînent l'agrégation des formes sauvages de la protéine (Nomura et al., 2014). Cependant, la propagation des agrégats de cellule à cellule n'a pas été démontrée.



**Figure 7 : Les changements de phase de FUS et la formation d'agrégats pathologiques**

Le domaine LC de FUS lui confère la propriété de créer de petites granules liquides qui possèdent plusieurs fonctions physiologiques, comme par exemple la réponse au stress, la réparation de l'ADN ou le transport et la stabilisation des ARN. En conditions pathologiques, l'interaction des protéines et des ARN se stabilise de manière aberrante au sein de ces granules et entraîne une agrégation irréversible de FUS par son domaine LC. Ces inclusions fibreuses piègent d'autres acteurs en se solidifiant. Fait avec Biorender.

## II.C Mécanismes pathologiques

Plusieurs mécanismes de perte et de gain de fonction ont été proposés pour expliquer la dégénérescence neuronale liée à la délocalisation et l'agrégation de FUS.

### II.C.2 Perte de fonction

FUS s'autorégule via sa fonction d'épissage. Ainsi, l'amenuisement nucléaire de FUS est compensé par une augmentation de sa production. La perte de fonction nucléaire n'est donc pas due à une diminution de la quantité de FUS. Elle résulte davantage des modifications de FUS qui altèrent ses interactions avec ses partenaires (mutations, méthylation aberrante), ou bien de son emprisonnement dans ses propres agrégats, ce qui limite sa disponibilité. La présence d'agrégats de FUS dans les noyaux de cellules de patients indique qu'une perte de fonction due à son emprisonnement pourrait avoir lieu au niveau nucléaire (Nomura et al., 2014), notamment vis-à-vis de ses fonctions transcriptionnelles. FUS joue un rôle dans l'expression des gènes via son interaction avec la RNA pol2. Les mutations de FUS et la formation subséquente d'agrégats ont un effet similaire à un KO de FUS et bloquent la RNA pol2 au niveau des sites initiateurs de la transcription (TSS). Il en résulte une altération de l'expression de certains gènes par perte de fonction de FUS (Schwartz et al., 2014). Plus spécifiquement, la mutation *Fus* empêche l'enrichissement de FUS dans les myonoyaux sous-synaptiques, ce qui affecte l'expression des récepteurs à l'acétylcholine et entraîne un dysfonctionnement des synapses, par perte de fonction (Scekic-Zahirovic et al., 2021a). Les mutations de *Fus* peuvent également affecter l'interaction de FUS avec ses partenaires et entraîner ainsi une perte de fonction de la protéine. C'est notamment le cas avec le complexe FUS-SFPQ chargé de réguler l'épissage de la protéine tau, un mécanisme lourdement affecté dans la neurodégénérescence de la DFT (Ishigaki et al., 2017). La perte de fonction de FUS suite à sa mutation entraîne également une expression non régulée des microARN dirigés contre l'ARN de *Gria2*, une sous-unité du récepteur AMPAR chargée de diminuer sa perméabilité au calcium. Il en résulte une plus grande vulnérabilité des cellules au stress excitotoxique. (Caputo et al., 2018; Tischbein et al., 2019).

Cependant, le phénomène de perte de fonction n'affecte pas que FUS. En se solidifiant, les agrégats peuvent piéger divers acteurs, protéiques ou ARN. Il a par exemple été montré que certaines sous-unités snRNA du spliceosome se retrouvaient immobilisées dans les inclusions,

entraînant une altération de l'épissage de certains ARN impliqués dans la propagation des potentiels d'action (PA) et la survie des neurones (Reber et al., 2016). De la même manière, la protéine kinésine KIF5 et son ARN sont séquestrés dans les agrégats cytoplasmiques de cellules exprimant FUS mutée. La kinésine joue notamment un rôle dans le transport des ARN, ainsi que dans l'intégrité des microtubules. Son emprisonnement dans les agrégats altère ces deux processus (Yasuda et al., 2017).

## **II.C.2 Gain de fonction**

La délocalisation cytoplasmique de FUS, ainsi que son agrégation pathologique peuvent également avoir des effets délétères par gain de fonction toxique. En effet, FUS présente une forte affinité plus ou moins spécifique pour de nombreux ARN et protéines. Délocalisée dans le cytoplasme, FUS est confrontée à une infinité de nouvelles cibles potentielles. Une étude comparative des cibles ARN de FUS a mis en évidence 916 nouveaux partenaires ARN de FUS lorsque celle-ci est mutée. Il est par ailleurs noté que suite à sa mutation et délocalisation, les cibles majoritaires de FUS sont des exons et des régions 3'UTR d'ARNs, contre des introns en conditions physiologiques (Hoell et al., 2011). Cette différence dans l'affinité pour les sites de fixation peut être simplement due au changement de nature des ARN dans le cytoplasme par rapport au noyau (beaucoup moins d'introns).

Mutée et délocalisée dans le cytoplasme, FUS entre par exemple en compétition avec FMRP pour se fixer à l'ARN de HuD. En temps normal, FMRP inhibe la traduction de cet ARN, une fonction dont FUS n'hérite pas en prenant sa place. Il en résulte une augmentation de la protéine HuD, ce qui stabilise ses cibles ARN et entraîne une croissance aberrante des axones et des branchements axonaux (Garone et al., 2021). De même, FUS mutée stabilise la fixation des acteurs de la voie de destruction des ARN à leurs ARNs cibles, ce qui altère la synthèse protéique (Kamelgarn et al., 2018) et s'associe de manière aberrante aux polyribosomes dans le cytoplasme dont elle inhibe la traduction (Sévigny et al., 2020). Dans le neurone, ces altérations par gain de fonction cytoplasmique impactent notamment les fonctions synaptiques (López-Erauskin et al., 2018; Sahadevan et al., 2021; Scekcic-Zahirovic et al., 2021a) et le transport axonal (Guo et al., 2017). Cependant, l'impact précis de cette délocalisation dans d'autres types cellulaires a été peu étudié.

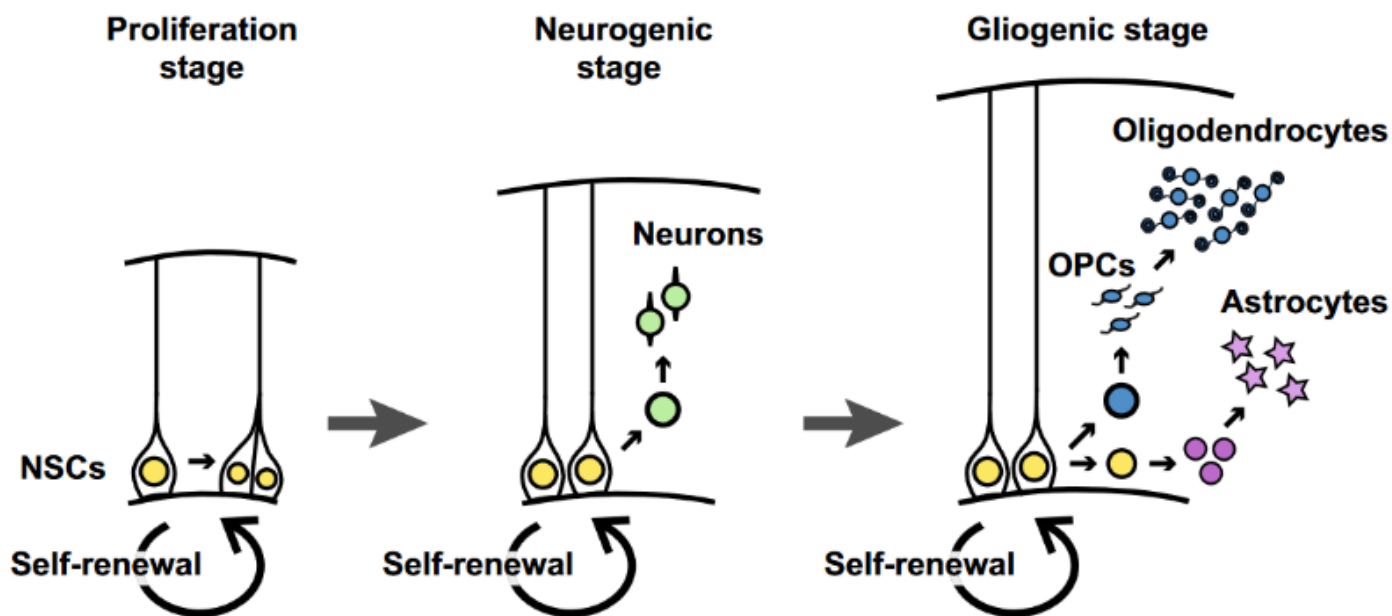


### **III. Oligodendrocytes et myélinisation dans le système nerveux central**

Au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, le naturaliste allemand Ehrenberg observe autour de certaines fibres nerveuses un manchon lipidique constitué d'enveloppes successives soigneusement compactées. Cette structure n'étant pas systématiquement présente, on suppose d'abord qu'il s'agit d'un accessoire facultatif, sécrété par l'axone lui-même et destiné à son support et à sa protection mécanique. Mais son inexistence chez les invertébrés suggère un rôle qui dépasse la simple protection mécanique. En 1878, le français Louis Ranvier propose une analogie audacieuse : ce manchon lipidique qu'on appelle maintenant myéline pourrait permettre l'isolement électrique du neurone, à la manière de la gaine qui isole le premier câble télégraphique transatlantique, posé avec succès quelques années plus tôt. Un peu plus que de l'isolement, il s'avèrera que cette gaine permet en réalité l'accélération prodigieuse du message nerveux, par un phénomène dit « de conduction saltatoire ». Il faut encore attendre une cinquantaine d'années pour que Pio del Rio-Hortega identifie des cellules de petite taille au noyau dense et au corps cellulaire irrégulier dont les filaments riches en microtubules s'étendent jusqu'aux axones : les cellules faiseuses de myéline, qu'on appellera « oligodendrocyte » (Barbara and Boullerne, 2020).

#### **III. A. Oligodendrogenèse dans le Système Nerveux Central**

Les futurs oligodendrocytes, tout comme les neurones et les astrocytes, sont issus de la différenciation de cellules souches neurales (CSN) qui prolifèrent à l'aube du développement embryonnaire au niveau d'une zone située le long des ventricules latéraux : la zone ventriculaire (VZ). Ces CSN produiront d'abord des neurones, puis, vers la fin du développement embryonnaire, des astrocytes et enfin les cellules précurseurs des futurs oligodendrocytes : les OPC (Oligodendrocytes Progenitor Cells) (Fig.8) (Bergles and Richardson, 2016).



**Figure 8 : Prolifération et différenciation des cellules souches neurales (CSN) dans le système nerveux central embryonnaire**

Les CSN (en jaune) prolifèrent au niveau de la zone ventriculaire tout au long du développement embryonnaire. Ces CSN se différencient d'abord en neurones (vert), puis en astrocytes (violet) et OPC (bleu) à la fin du stade embryonnaire. Les OPC donneront les oligodendrocytes matures (Naruse et al., 2017).

### III. A. 1. Migration et prolifération des OPC

Les OPC sont de petites cellules hautement prolifératives, bipolaires, et dotées de remarquables capacités migratoires qui leur permettront d'envahir l'ensemble du SNC et devenir une population dense et homogène dès les premiers jours après la naissance. Vers la fin du stade embryonnaire, les OPC de la zone ventriculaire (VZ) expriment sous le contrôle du facteur de transcription Olig2 deux marqueurs essentiels au lignage oligodendrocytaire : le protéoglycane NG2 indispensable à leur migration, et le récepteur au facteur de croissance PDGFR $\alpha$  (Platelet Derived Growth Factor Receptor  $\alpha$ ) qui permettra de réguler leur migration, prolifération et différenciation (Binamé et al., 2013; Hill et al., 2013). Vers la fin du développement embryonnaire, les OPC quittent la VZ pour envahir l'ensemble du SNC. Leur migration est permise par la mise en place d'un phénotype bipolaire, dans lequel le cytosquelette et les voies de trafic membranaire sont orientés dans la direction du déplacement (Binamé et al., 2013). A la sortie de la VZ, les OPC se fixent aux cellules endothéliales via leur récepteur CXCR4 et

voyagent en rampant le long des vaisseaux sanguins (Tsai et al., 2016). Cette interaction avec le système vasculaire leur permet de puiser directement l'énergie nécessaire à leur migration et prolifération simultanées (Arai and Lo, 2009; Mayoral and Chan, 2016; Tsai et al., 2016). Le déplacement des OPC est assujéti à un ensemble de molécules attractives ou répulsives, dont l'expression à la fois spatiale et temporelle est précisément régulée. C'est par exemple le cas du chimio-répulsif Netrin 1, spécifiquement exprimé au niveau de la VZ pour initier le départ des OPC à la fin du développement embryonnaire, ou du facteur de croissance PDGF présent le long de l'itinéraire des OPC, et qui joue sur eux un rôle chimio-attractif, tout en stimulant leur prolifération (Tsai et al., 2003; Hill et al., 2013). Au cours de la migration, les OPC étendent et rétractent en permanence leurs prolongements très motiles, et évitent par un mécanisme de répulsion les autres OPC dont ils peuvent sentir la présence. Cet ajustement de leur trajectoire permet d'établir une distribution très homogène des OPC sur l'ensemble du SNC (Hughes et al., 2013). Les OPC envahissent le SNC selon deux vagues temporelles pour la moelle épinière et trois pour le cerveau.

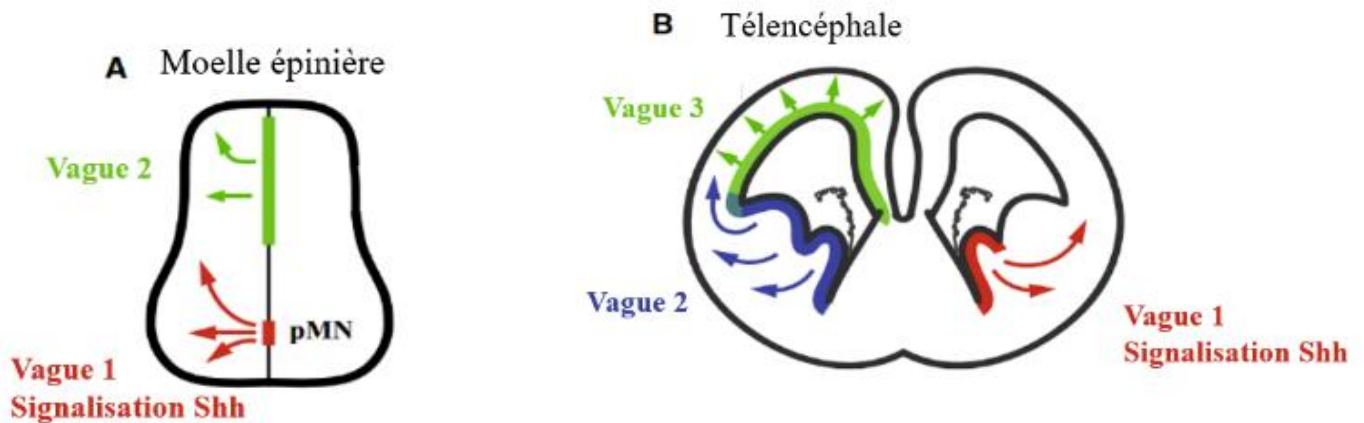
#### **Dans la moelle épinière :**

Deux vagues successives d'OPC vont peupler la moelle épinière vers la fin du développement embryonnaire. La première vague est issue du domaine des progéniteurs de motoneurones (pMN) et envahit la future zone ventrale. Son établissement dépend de la signalisation sonic hedgehog (Shh). La deuxième vague, plus tardive, provient d'une zone plus dorsale de la moelle et a lieu indépendamment du signal Shh. A l'issue de ces deux vagues de prolifération et migration, la moelle est peuplée d'OPC de différentes origines, mais qui s'entremêlent indifféremment (Fig.9) (Naruse et al., 2017).

#### **Dans le cerveau**

Trois vagues successives d'OPC vont peupler le cerveau. De la même manière que pour la moelle épinière, les deux premières vagues ont lieu au stade embryonnaire. La première vague provient de la zone ventriculaire ventrale et envahit le cerveau ventral ainsi que le futur cortex grâce à la signalisation Shh. Pour une raison encore non élucidée, ces premiers OPC corticaux vont majoritairement mourir, remplacés par les OPC de la troisième vague (Orduz et al., 2019). La deuxième vague provient d'une zone ventriculaire plus dorsale : l'éminence ganglionique latérale, et ne dépend pas du signalement Shh. Enfin, la troisième vague a lieu juste après la naissance, et provient de la zone ventriculaire dorsale, dont les OPC vont envahir le cortex,

entrer en compétition avec les OPC issus de la première vague et les remplacer (Kessaris et al., 2006; Naruse et al., 2017). Cependant, un petit nombre de ces OPC corticaux de la première vague va survivre et établir des connexions spéciales et privilégiées avec les interneurons issus du même pool de précurseurs qu'eux. Le rôle de ces OPC n'est pas exactement élucidé (Fig.9) (Orduz et al., 2019).



**Figure 9 : Vagues de migration des OPC dans la moelle épinière et le cerveau en développement.**

**A.** Deux vagues de migration se succèdent dans la moelle. La première issue du pMN dépend du signalement Shh. **B.** Trois vagues de prolifération et migration se succèdent dans le cerveau. La première provient de la VZ ventrale, et dépend du signalement Shh. Les OPC qui en sont issus sont destinés à mourir pour la grande majorité, remplacés par les OPC issus de la 3<sup>ème</sup> vague post natale. Adapté de (Naruse et al., 2017).

Etonnamment, en dépit de leurs origines variées, les oligodendrocytes matures issus de ces différentes vagues sont mélangés et semblent indistinguables d'un point de vue transcriptomique (Marques et al., 2018). Des différences subtiles ont cependant été identifiées : les OPC issus de la zone ventriculaire dorsale participent davantage à l'effort de remyélinisation en cas de lésion du SNC, et migrent, prolifèrent et se différencient plus efficacement que ceux issus de la zone ventriculaire ventrale (Crawford et al., 2016). Dans la moelle épinière, bien que les OPC issus des zones dorsales se substituent aux OPC issus de la zone ventrale en l'absence de ces derniers, ils présentent des altérations au niveau morphologique et ne sont pas capables d'assurer certaines fonctions protectrices des OPC ventraux vis-à-vis des neurones moteurs (Starikov and Kottmann, 2020).

Arrivés au terme de leur voyage, des signaux locaux inhibent la migration des OPC qui se détachent du système vasculaire et s'immobilisent (Tsai et al., 2003, 2016). A la naissance, les OPC ont ainsi envahi l'ensemble du SNC et continuent à proliférer grâce au signal PDGF, avec des spécificités liées à leurs régions. En effet, la sensibilité des OPC au PDGF peut être potentialisée ou inhibée en fonction des ligands cofixés au récepteur PDGFR $\alpha$ . Dans la substance grise, les intégrines de la matrice extracellulaire sont soupçonnées de diminuer la sensibilité des OPC à la présence de PDGF, et il en résulte une prolifération diminuée des OPC de la substance grise par rapport aux OPC de la substance blanche (Baron et al., 2002; Hill et al., 2013; Nishiyama et al., 2021). A l'issue de cette phase de prolifération, des signaux variés vont initier la différenciation des OPC en oligodendrocytes matures. La diminution importante du nombre d'OPC à cette période suggère que la majorité des OPC se différencient, sans générer de nouveaux OPC destinés à s'autorenouveler (Zhu et al., 2011). Cependant, à la limite cortico-striatale, un nombre réduit d'OPC se distingue des autres par une sensibilité réduite aux signaux de différenciation, et va se maintenir pour former une réserve de précurseurs qui, à l'âge adulte, représente 5 à 8% des cellules du SNC. Les filopodes très motiles de ces OPC leur permettent d'évaluer la densité de leurs congénères, et d'augmenter ou diminuer adéquatement leur prolifération, ce qui assure une homéostasie de la réserve. En cas d'altération du SNC, ce stock d'OPC est capable de proliférer, migrer sur le lieu de la lésion et se différencier en oligodendrocytes myélinisants. C'est ce qui permet la remyélinisation (Zawadzka et al., 2010). A l'âge adulte, ces OPC en se divisant donnent de nouveaux OPC destinés à se maintenir sans se différencier, avec parfois la formation d'un oligodendrocyte mature (Zhu et al., 2011).

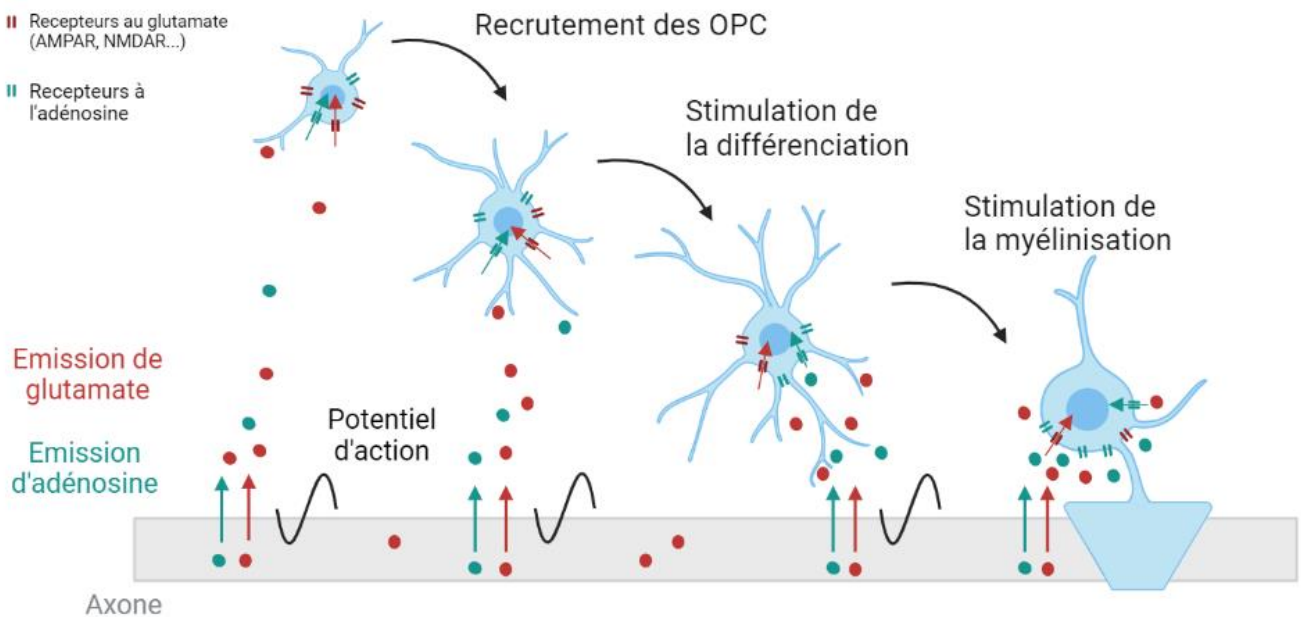
### **III. A. 2. Différenciation des OPC**

Cette différenciation post natale qui s'étale sur une période assez brève sera à l'origine de 70% des oligodendrocytes matures présents à l'âge adulte (Zhu et al., 2011; Nishiyama et al., 2021). Très tôt, l'existence d'une « horloge interne » qui initierait intrinsèquement la différenciation de l'OPC à l'issue d'un certain nombre de divisions a été soupçonnée (Temple and Raff, 1986). Mais aujourd'hui plusieurs études montrent que les signaux de différenciation proviennent majoritairement de l'environnement des OPC, et consistent notamment à inhiber les signaux de prolifération, ou à lever l'inhibition de différenciation (Mayoral and Chan, 2016). Des facteurs mécaniques comme la dureté du support ou la densité des cellules environnantes jouent

notamment un rôle dans l'initiation de la différenciation. L'hypothèse la plus vraisemblable est que l'environnement impose une contrainte au cytosquelette rigide de l'OPC. Ce cytosquelette, directement lié aux composants nucléaires via des LINK (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton pour « liens entre le nucléosquelette et le cytosquelette ») impacte la structure de la chromatine et entraîne des modifications épigénétiques qui vont initier la différenciation. Il a notamment été montré que ce type de contraintes spatiales pouvait être induit par une forte densité cellulaire (Hernandez et al., 2016). Cette hypothèse est cohérente avec l'importante prolifération des OPC observée dans le SNC en amont de leur différenciation, qui génère une population d'OPC très dense et surnuméraire par rapport aux besoins en oligodendrocytes matures. En effet, peu après l'initiation de la différenciation, 50% des oligodendrocytes mourront avant d'atteindre le stade final de leur maturité. Cette surproduction permet également d'ajuster précisément le nombre d'oligodendrocytes au besoin en myéline des axones (Barres et al., 1992).

D'autres mécanismes impliqués dans la différenciation ont été décrits, qui consistent notamment à réduire la sensibilité des OPC au facteur de croissance PDGF pro-prolifération. On observe notamment l'augmentation de micro-ARN capables de se fixer de manière spécifique à l'ARNm de PDGFR $\alpha$ , ce qui le déstabilise et entraîne une diminution de l'expression du récepteur (Dugas et al., 2010). De même, on observe une augmentation du répresseur transcriptionnel Nkx2.1 qui se lie au promoteur du récepteur PDGFR $\alpha$ , et inhibe son expression, désensibilisant peu à peu l'OPC au facteur de croissance. Les OPC peuvent alors commencer leur différenciation en oligodendrocytes matures. (Zhu et al., 2014). L'origine de ces changements n'a pas été clairement identifiée, mais l'augmentation de Nkx2.2 étant concomitante avec l'établissement des synapses OPC-neurone, elle pourrait résulter d'un signal neuronal (Zhu et al., 2014). Le rôle de l'activité électrique de l'axone dans la promotion de la différenciation a notamment été montrée à de nombreuses reprises. Les OPC expriment en effet à leur surface le récepteur au glutamate AMPAR qui les rend sensible à la libération de neurotransmetteurs par le neurone. L'activation de ce récepteur déclenche une cascade chimique menant à la différenciation (Kukley et al., 2007). Il a également été montré que la libération de glutamate par le neurone ne se limitait pas aux synapses, mais pouvait avoir lieu tout au long de l'axone, à chaque passage d'un potentiel d'action. Cette signalisation permettrait au neurone d'orienter la migration ou la polarisation des OPC vers eux, grâce à un gradient de glutamate (Fig.10) (Kukley et al., 2007; Piller et al., 2021). De même, les OPC expriment des récepteurs à adénosine activés lors du passage d'un potentiel d'action dans l'axone. Ce

mécanisme joue un rôle dans la progression de la différenciation, dans la modification de la morphologie et dans la stimulation de la myélinisation (Stevens et al., 2002). Enfin, l'activité électrique peut également se « propager » aux OPC, qui expriment à leur surface des canaux sodiques et potassiques. Ces OPC excitables joueraient un rôle important dans l'initiation de la différenciation en déclenchant des potentiels d'action (Káradóttir et al., 2008).

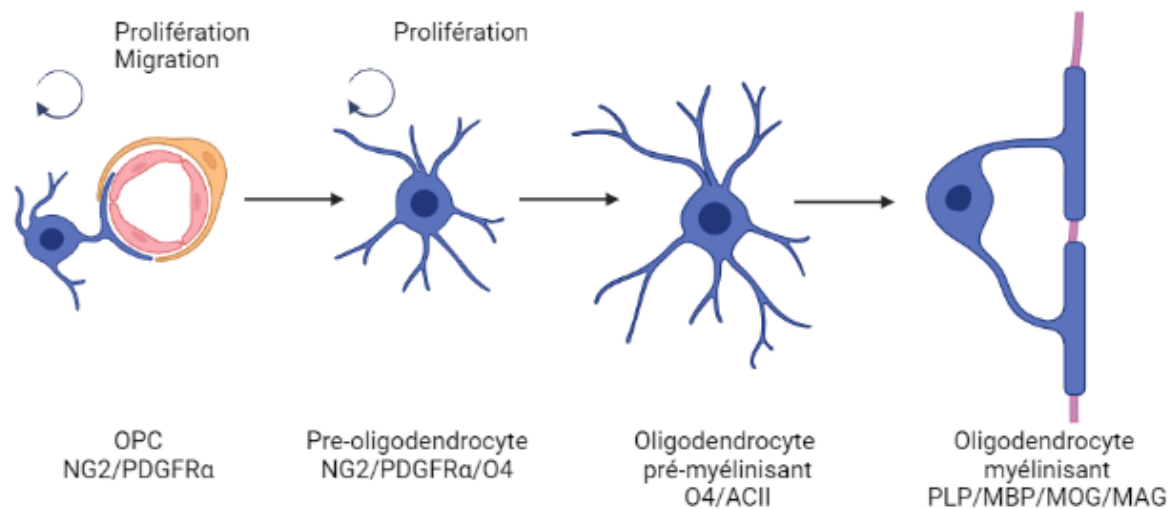


**Figure 10 : L'activité électrique de l'axone oriente la migration des OPC et stimule leur différenciation et myélinisation.**

Lors du passage d'un potentiel d'action, l'axone émet des molécules comme l'adénosine ou le neurotransmetteur glutamate. Ces molécules sont internalisées par les OPC qui présentent des récepteurs au glutamate et à l'adénosine, et permettent d'orienter leur migration et de stimuler leur différenciation en oligodendrocytes myélinisants.

Plusieurs stades de différenciation ont été identifiés, distinguables par des marqueurs spécifiques et des changements importants dans la morphologie. Les OPC tels que nous les avons décrits sont caractérisés par leur structure bipolaire, ainsi que par leurs fortes capacités migratoires et prolifératives. Ils expriment notamment NG2, un protéoglycane hautement glycosylé indispensable à leur migration, et PDGFR $\alpha$  qui joue un rôle important dans leur prolifération mais aussi dans la signalisation de leur migration. Une fois arrivés à destination, ils passent au stade post migratoire « Pre-Oligodendrocyte », et commencent à développer des ramifications tout en continuant à proliférer. Ils expriment alors le marqueur O4. Lorsque l'un des prolongements de l'oligodendrocyte entre en contact avec un axone, la kinase Fyn située

sur la membrane interne de l'oligodendrocyte est activée, et active à son tour de nombreuses cascades de signalisation aboutissant à la fabrication et au recrutement des constituants de la myéline : c'est la myélinisation, et le dernier stade de différenciation (Fig.11) (Krämer-Albers and White, 2011). Ici encore, l'activité électrique du neurone est essentielle pour stabiliser la mise en place de la gaine de myéline. En effet, *in vivo*, il a été montré que 25% des oligodendrocytes qui ont initié le processus de myélinisation et commencé à envelopper leur membrane autour de l'axone ne finissent pas le travail et rétractent leur prolongement en l'absence de stimulation électrique (Hines et al., 2015).



**Figure 11 : Les étapes de la différenciation des OPC en oligodendrocytes myélinisants.**

NG2 et PDGFR $\alpha$  qui permettent la migration et la prolifération ne sont exprimés qu'aux stades OPC et pré-oligodendrocyte. Les protéines de la myéline PLP, MBP ou MAG ne sont exprimées qu'au dernier stade de différenciation : la myélinisation

A l'issue de ce marathon de la différenciation, les oligodendrocytes ont enroulé leurs prolongements autour de l'axone pour former une structure imperméable et isolante dérivée de la membrane oligodendrocytaire : la gaine de myéline (Kuhn et al., 2019).

### III. B. La myélinisation du système nerveux central

Chez la souris, la myéline se met en place au cours des deux premiers mois suivants la naissance. Chez l'homme, le pic de myélinisation a lieu au cours de la première année post

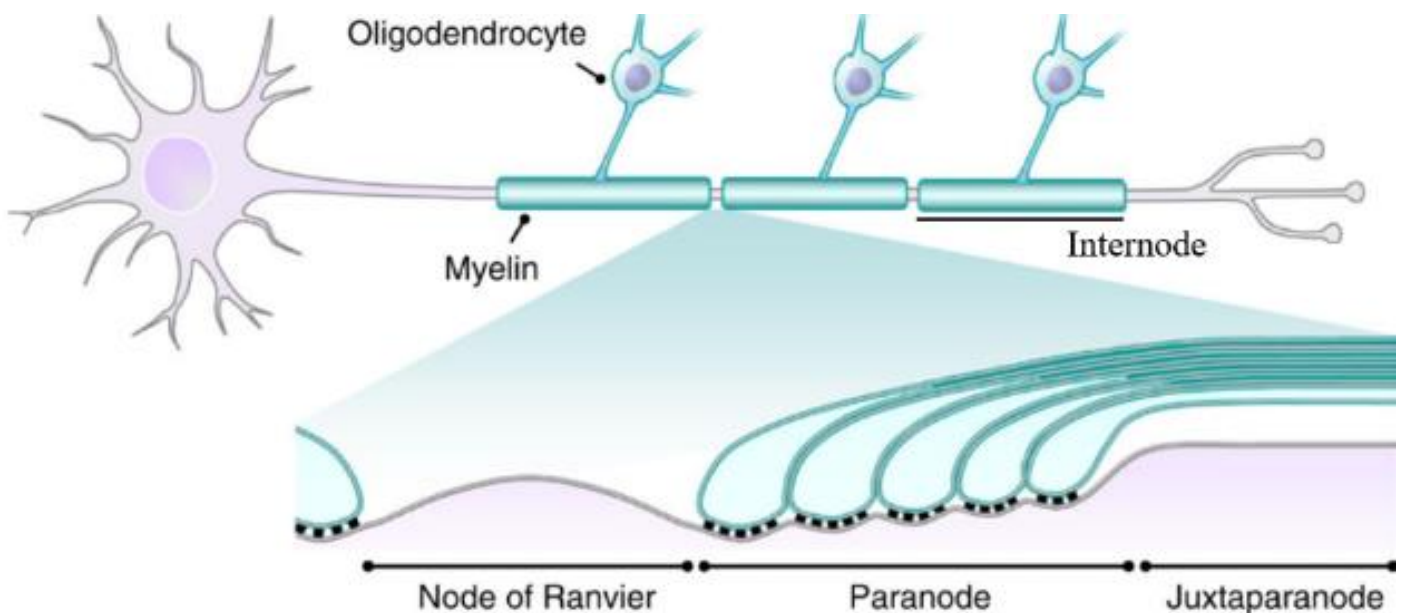


natale, mais se poursuit dans certaines régions jusqu'à l'âge de 20 ans (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

### III. B. 1. Structure, fonction et composition de la gaine de myéline

#### Structure

La gaine de myéline est une enveloppe lipidique enroulée autour de l'axone et caractérisée par la superposition de couches compactes successives. Son épaisseur est précisément régulée et dépend de la taille de l'axone. La relation qui lie l'épaisseur de la gaine au diamètre de l'axone est définie par le G-ratio et est optimale pour une valeur de 0.6 (Rushton, 1951). La gaine s'interrompt à intervalles réguliers. Ces portions d'axones non myélinisés sont appelées « nœuds de Ranvier », tandis que les segments d'axones myélinisés sont appelés entrenœuds. Les deux extrémités de l'entrenœud sont en contact avec l'axone au niveau d'une structure complexe, décompactée appelée paranœud. Dans le système nerveux central, les entrenœuds successifs ne proviennent pas nécessairement du même oligodendrocyte, et similairement, un oligodendrocyte peut myéliniser jusqu'à 50 axones différents. Un espace dit « périaxonal » sépare l'axone du feuillet interne de la gaine de myéline et permet de nombreux échanges entre l'oligodendrocyte et le neurone (Fig.12).



**Figure 12 : Structure de la gaine de myéline**

Représentation longitudinale d'un axone dont les entrenœuds sont myélinisés par différents oligodendrocytes. Les deux extrémités d'un entrenœud rejoignent l'axone au niveau des paranœuds. Les entrenœuds sont séparés par des nœuds de Ranvier. Adapté de (Chang et al., 2016).

## **Fonction**

Chez les vertébrés, l'apparition de ce manchon isolant autour des axones a permis d'augmenter considérablement la vitesse de propagation des potentiels d'action le long de l'axone grâce au phénomène de « conduction saltatoire » : au lieu de se propager de proche en proche à travers les canaux ioniques répartis tout au long de l'axone, les ions « sautent » de nœud de Ranvier en nœud de Ranvier, où l'axone nu présente une forte densité de canaux sodiques. Grâce à ce système très élégant, la vitesse de propagation de l'influx nerveux peut être multipliée entre 20 et 100 fois. (Waxman and Bennett, 1972; Nave and Werner, 2014).

## **Composition**

La myéline est une structure dérivée des extensions membranaires des oligodendrocytes. Comme la plupart des membranes, elle est donc essentiellement composée de lipides (70%). Cependant, sa composition diffère de celle des membranes classiques par son importante teneur en cholestérol (deux fois plus abondant) et en lipides particuliers : les glycosphingolipides. Ces derniers se distinguent des lipides trouvés dans les membranes communes par leurs très longues chaînes de sphingosine saturées ou mono-insaturées. L'importante teneur en cholestérol de même que la présence d'acide gras saturés limitent la fluidité de la membrane, et lui confèrent ses propriétés isolantes particulières (Bourre and Baumann, 1980; Lee, 2001; Jahn et al., 2009). Cet enrichissement singulier en lipides spécifiques se fait au niveau de l'appareil de Golgi, où se forment des radeaux de cholestérol et de glycosphingolipides qui flottent au milieu d'autres lipides. Ces radeaux sont associés à des protéines particulièrement hydrophobes et sont acheminés vers la myéline dans des endosomes tardifs (Lee, 2001; Trajkovic et al., 2006).

Les lipides de la myéline sont intimement entrelacés avec des protéines spécifiques qui représentent 30% de sa composition et sont essentiellement synthétisées par les oligodendrocytes matures. Les principales sont la Protéine Protéolipidique (PLP), la Protéine Basique de la Myéline (MBP), la Glycoprotéine associée à la myéline (MAG) et la 2,3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase (CNP), avec des rôles spécifiques à chacune dans la mise en place et le maintien de la gaine (Jahn et al., 2009).

La protéine protéolipidique PLP et son isoforme DM20 font respectivement 30 et 26 kDa, et représentent 30 à 45% des protéines de la myéline. Très hydrophobes, elles contiennent 4

hélices alpha qui les rendent essentiellement transmembranaires. Elles possèdent aussi un domaine extracellulaire en forme de boucle qui permet une connexion entre les surfaces externes des membranes. Associée au cholestérol dans l'appareil de Golgi, PLP est adressée aux endosomes tardifs de l'oligodendrocyte qui présentent l'avantage d'une grande capacité de stockage. Plusieurs hypothèses expliquent que PLP échappe à la dégradation à laquelle sont normalement destinés les cargos des lysosomes : par exemple le fait que PLP est peu dégradable, ou bien que les lysosomes oligodendrocytaires seraient à ce stade peu protéolytiques (Trajkovic et al., 2006; Jahn et al., 2009).

La protéine basique de la myéline (MBP) possède de nombreuses isoformes issues de différents épissages alternatifs. Ces isoformes sont exprimées différemment au cours du développement embryonnaire et dans le SNC adulte. MBP représente 35% des protéines de la myéline. C'est une protéine complexe très basique qui a une forte affinité pour les phospholipides de la membrane oligodendrocytaire. Du fait de son rôle dans la compaction des membranes, sa traduction dans le péricaryon de l'oligodendrocyte présenterait un danger pour les organites et l'intégrité de leur membrane. Pour cette raison, l'ARN messager de MBP est transporté le long des microtubules depuis le noyau jusque dans le feuillet interne de la gaine de myéline où la protéine sera traduite localement. Tout au long du transport de l'ARNm, la traduction est inhibée par la ribonucléoprotéine hnRNPA2 (Boggs, 2006; Jahn et al., 2009; Müller et al., 2013). En plus de son rôle dans la compaction des membranes, MBP est aussi impliquée dans la régulation du rapport protéine/lipide de la gaine, et est capable de limiter la diffusion des protéines afin de créer des régions très riches en lipides dans lesquelles seule la protéine PLP est tolérée (Aggarwal et al., 2011).

La 2,3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase (CNP) représente 4 à 15% des protéines de la myéline. Elle interagit avec les filaments d'actine et les stabilise, ce qui empêche localement la compaction de la membrane par MBP. Elle est notamment très présente au niveau des paranoeuds où elle maintient les feuillets dans un état décompacté (Jahn et al., 2009).

La glycoprotéine associée à la myéline (MAG) est une protéine de 100kDa, minoritaire dans la myéline. Très lourdement glycosylée, elle n'est présente qu'au niveau du feuillet interne de la gaine et joue un rôle important dans les interactions avec l'axone, notamment en interagissant directement avec le cytosquelette axonal (Quarles, 2007).

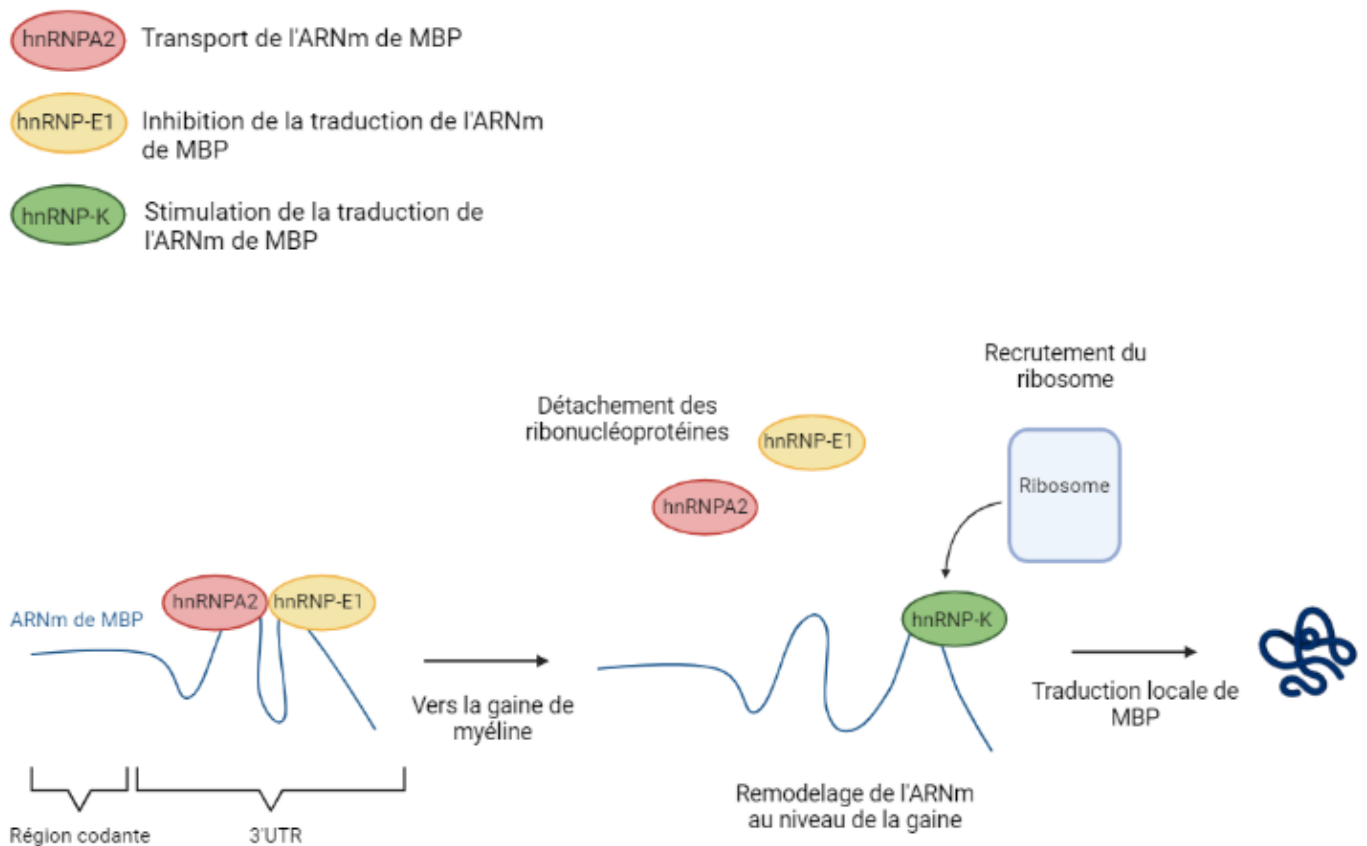
Tous ces composants rejoignent scrupuleusement leur place au sein de la gaine, dans un ballet orchestré par l'oligodendrocyte, et initié par les besoins de l'axone.

### **III. B. 2 Processus de myélinisation par l'oligodendrocyte**

Au cours de sa différenciation, l'oligodendrocyte développe des ramifications qui se déploient grâce à la polymérisation des filaments d'actine (Nawaz et al., 2015; Zuchero et al., 2015). Lorsque l'un de ces prolongements entre en contact avec l'axone, la kinase Fyn présente sur la face interne de la membrane s'active et recrute les microtubules via la protéine tau, ce qui polarise l'oligodendrocyte en direction de l'axone et dirige le transport des vésicules vers la future gaine de myéline (Krämer-Albers and White, 2011). Simultanément, via un signal impliquant l'AMP cyclique, le neurone stimule dans l'oligodendrocyte le transport rétrograde et l'exocytose des endosomes contenant PLP fixé aux radeaux lipidiques. Ainsi, suite au contact avec l'axone, l'oligodendrocyte se polarise et modifie la composition de sa membrane, l'enrichissant localement en cholestérol et glycosphingolipides (Trajkovic et al., 2006) ainsi qu'en phosphatidylinositol (Goebbels et al., 2010).

Grâce à l'assemblage des filaments d'actine, le prolongement poursuit sa croissance et enveloppe progressivement l'axone, rajoutant des couches successives entre l'axone et le feuillet interne de la gaine (Nawaz et al., 2015; Zuchero et al., 2015). Simultanément, les feuillets formés s'étendent latéralement, jusqu'à ce que leurs extrémités atteignent le futur nœud de Ranvier. Chaque feuillet s'incurve alors pour former une connexion avec l'axone, dans une structure appelée paranœud et constituée de myéline non compacte (Jahn et al., 2009; Snaidero et al., 2014). Au fur et à mesure que les couches de myéline s'empilent autour de l'axone, la protéine PLP ancrée dans la membrane fixe les feuillets les uns aux autres grâce à sa boucle extracellulaire. Conjointement, dans le cytoplasme de l'oligodendrocyte, la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène hnRNPA2 se fixe à l'ARN messenger de MBP au sein de granules de transport qui sont acheminées le long des microtubules dans la gaine en formation. La ribonucléoprotéine hnRNP-E1 également présente dans le granule et fixée à l'ARN inhibe sa traduction tout au long du transport. Lorsque le convoi arrive à la gaine de myéline, la kinase Fyn précédemment activée phosphoryle hnRNPA2 qui libère l'ARN de MBP, et la

ribonucléoprotéine hnRNP-K remplace hnRNPE1 pour activer la traduction (Fig.13) (Torvund-Jensen et al., 2014).



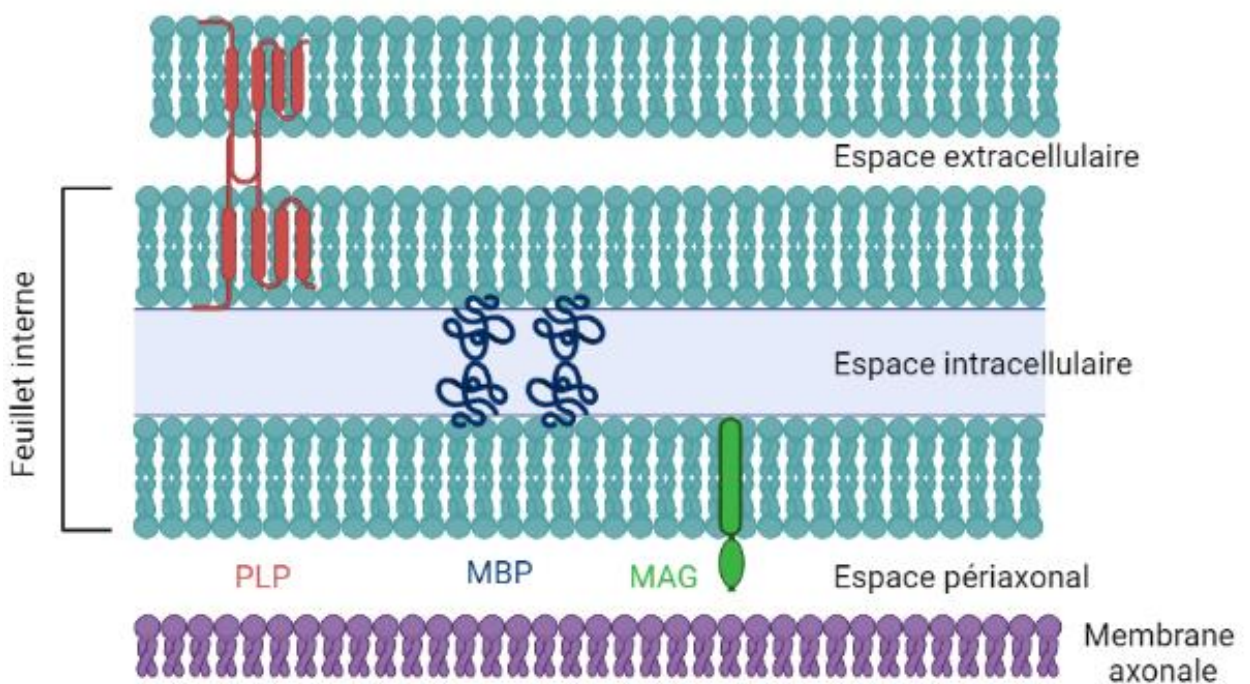
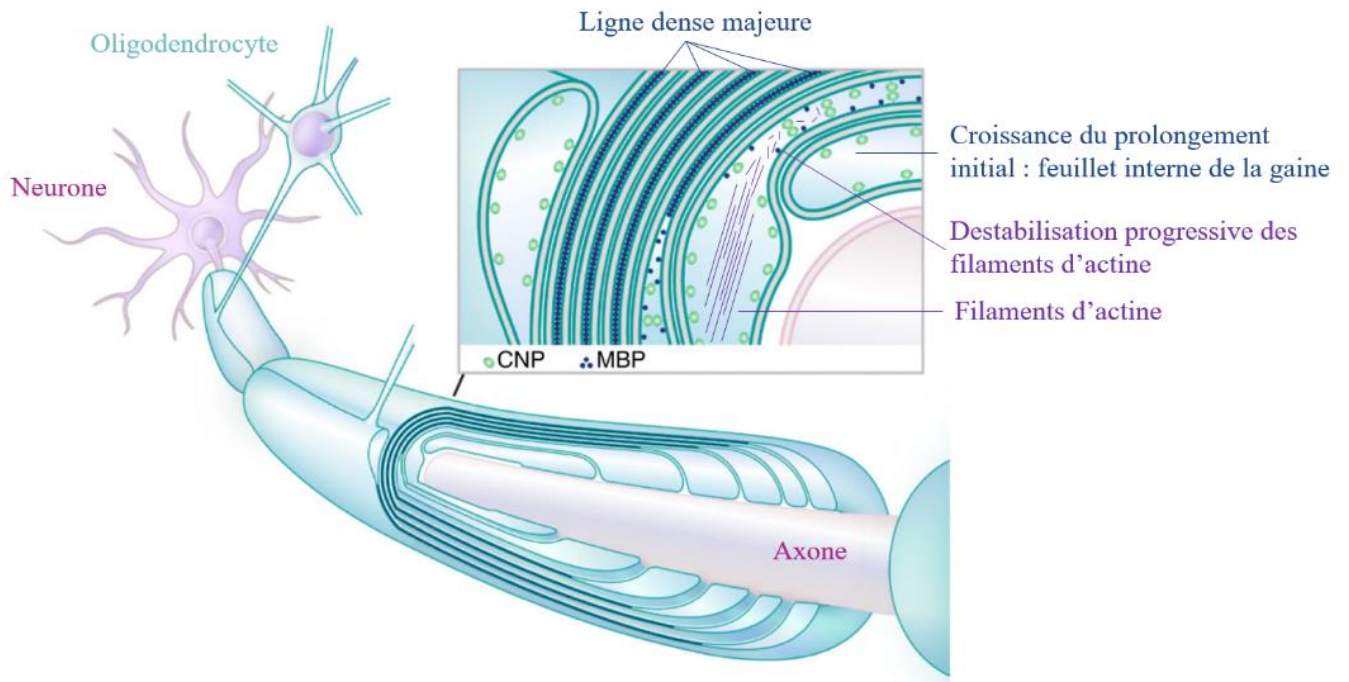
**Figure 13 : Prise en charge de l'ARNm de MBP dans le cytoplasme**

L'ARNm de MBP est pris en charge par la ribonucléoprotéine hnRNP-A2 et incorporée dans des granules de transport pour être acheminée vers la gaine de myéline. Au cours du transport, sa traduction est inhibée par la ribonucléoprotéine hnRNP-E1. Au niveau de la gaine de myéline, hnRNP-A2 se détache de l'ARN et hnRNP-E1 est remplacée par hnRNP-K qui stimule la traduction locale de MBP.

Très basique, la protéine MBP présente une forte affinité pour les phospholipides de la membrane. Elle entre donc en compétition avec les précédents partenaires des phospholipides membranaires : la cofilin et la gelsolin, deux facteurs de désassemblage des filaments d'actine qui sont alors libérées dans le cytoplasme tandis que MBP s'associe aux phospholipides. Leur libération entraîne le désassemblage des filaments d'actine qui maintenaient la structure, et provoque l'inévitable effondrement des membranes l'une sur l'autre (Klein et al., 2002; Jahn et al., 2009). Les protéines MBP ancrées dans les deux membranes opposées en profitent pour s'associer et expulsent d'entre elles le cytoplasme oligodendrocytaire à la manière d'une fermeture éclair. C'est la compaction. Ces deux membranes fermement accolées forment des « lignes denses majeures » visibles en microscopie électronique à transmission. Ce processus

est cependant moins rapide que la croissance et l'enroulement du prolongement, et lorsque la compaction a lieu, le feuillet concerné n'est déjà plus celui accolé à l'axone. Ainsi la compaction se fait d'abord sur les couches externes de la myéline (Fig.14) (Baron and Hoekstra, 2010; Snaidero et al., 2014; Nawaz et al., 2015; Zuchero et al., 2015).

Cette compaction est un phénomène essentiel au bon fonctionnement de la gaine, cependant, certaines régions de la myéline restent décompactées grâce à la présence de la protéine CNP qui interagit avec les filaments d'actine et empêche leur désassemblage, maintenant le cytoplasme oligodendrocytaire au sein du feuillet (Snaidero et al., 2017). Le maintien de ces régions décompactées permet à l'oligodendrocyte de continuer à acheminer des substrats vers la gaine, ou à destination de l'axone. Ainsi, la gaine reste dynamique et cette plasticité permet à l'oligodendrocyte de s'adapter aux besoins du neurone (Fig.14) (Snaidero et al., 2017).



**Figure 14 : Processus de compaction de la gaine de myéline**

**A** La protéine MBP est traduite au niveau du feuillet interne de la gaine, et entraîne la déstabilisation des filaments d'actine qui maintiennent la structure. La protéine CNP maintient les filaments d'actine dans certaines régions, ce qui empêche leur compaction. Adapté de (Chang et al., 2016).

**B** Organisation des différentes protéines de la myéline dans la gaine. MBP permet la compaction du compartiment cytoplasmique, PLP la fixation des feuillets les uns aux autres. Fait avec Biorender.



### III. B. 3. Plasticité et remyélinisation

L'histoire ne se termine pas à l'issue de la myélinisation du neurone. En effet, la gaine de myéline est une structure dynamique qui, même après sa formation, continue à recevoir des signaux, à évoluer et à s'adapter.

#### Plasticité

A l'âge adulte, l'épaisseur de la gaine de myéline diminue lorsque les animaux sont isolés plutôt qu'en groupe. Leur réinsertion dans un groupe social rétablit la taille de gaine initiale. Cette observation prouve que la gaine de myéline est plastique, et peut se modifier de manière réversible en fonction de l'activité de l'axone (Liu et al., 2012). En effet, l'activité électrique de l'axone peut moduler la longueur des internœuds et des nœuds de Ranvier, la taille de l'espace périaxonal ou l'épaisseur de la gaine. Ces modifications auront un impact important sur la vitesse de conduction du message nerveux, et sur la synchronicité des signaux au niveau de la synapse (Gibson et al., 2014; Etxeberria et al., 2016; Cullen et al., 2021). Le mécanisme sous-jacent semble impliquer la libération de glutamate par les axones. Nous avons vu précédemment que la libération de glutamate n'est pas limitée à la synapse, et que les axones pouvaient en libérer sur toute leur longueur. Si ce mécanisme permet à un axone nu d'attirer les OPC, on peut supposer que cette signalisation est toujours présente sous la gaine dans les axones myélinisés, et permet une communication axone/myéline (Kukley, 2023). Hypothèse d'autant plus probable qu'il a été montré que la gaine de myéline exprime des récepteurs NMDAR sensibles au glutamate et à la glycine, activés par le passage des potentiels d'action (Micu et al., 2016). La présence de récepteurs AMPAR n'a pas été proprement démontrée, mais elle est probable dans la mesure où l'inhibition de ces récepteurs entraîne une diminution du calcium intracellulaire oligodendrocytaire. Cependant il faut mentionner que l'activité de ces récepteurs n'a été mise en évidence que dans des conditions ischémiques, ce qui pose la question de l'expression constitutive de ces récepteurs dans la gaine, ou conditionnée à un environnement pathologique (Káradóttir et al., 2005; Micu et al., 2006, 2007). Ainsi, la plasticité de la myéline pourrait dépendre de ces « synapses axo-myéliniques » situées au sein des entrenœuds de la gaine. Une autre question non résolue est la plasticité de la myéline pour des neurones non glutamatergiques, notamment les neurones GABAergiques. On soupçonne un mécanisme similaire qui impliquerait cette fois-ci des récepteurs à ATP (Wake et al., 2011).



La plasticité de la myéline nécessite la capacité à recevoir et intégrer les signaux provenant de l'axone, mais aussi à réagir. Pour cela, le maintien de régions décompactées dans la myéline est nécessaire et permet le trafic des composants de la myéline. Ces « zones décompactées » sont très présentes au cours du développement, mais tendent à se refermer à la fin de la myélinisation. Cependant, il a été montré que sous l'action du phosphatidylinositol-(3,4,5) triphosphate (PI(3,4,5)P3), ces canaux pouvaient être rouverts ponctuellement, et permettre la modulation de la gaine (Snaidero et al., 2014).

### **Remyélinisation : apprentissage ou lésion du SNC**

En plus de la modulation des paramètres de la gaine de myéline, des facteurs extrinsèques peuvent également induire la formation de nouvelles gaines de myéline. Ce processus peut avoir lieu lors de l'apprentissage de nouvelles tâches, ou en cas d'altération pathologique du SNC. On parle alors de remyélinisation. En effet, même à l'âge adulte, l'apprentissage du piano ou de langues étrangères entraîne l'augmentation du volume de substance blanche, suggérant la synthèse de nouvelle myéline (Bengtsson et al., 2005; Scholz et al., 2009). Lors de l'apprentissage, l'activité électrique joue encore une fois un rôle essentiel dans cette myélinisation en stimulant la prolifération des OPC et leur différenciation en nouveaux oligodendrocytes myélinisants, mais aussi en incitant la formation de nouvelles gaines par des oligodendrocytes déjà myélinisants (Mensch et al., 2015). Ce mode de myélinisation « activité dépendant » lors de l'apprentissage est mis en place par la neuregulin 1 qui stimule l'expression des récepteurs NMDAR sur les oligodendrocytes, et entraîne une augmentation de toute sorte de trafic en direction du neurone, et notamment le trafic des composants de la myéline (Lundgaard et al., 2013; Young et al., 2013; Gibson et al., 2014).

En cas d'altération du SNC, le stock d'OPC maintenu à l'issue de la première phase de différenciation est capable de proliférer, migrer et se différencier pour remyéliniser tant bien que mal le SNC. On parle de remyélinisation. De premières études semblaient montrer une remyélinisation moins efficace que l'initiale myélinisation post-natale, avec notamment une rupture de la correspondance entre la taille de l'axone et celle de la gaine, des épaisseurs de gaine plus faibles et des entrenœuds plus courts (Blakemore and Franklin, 2008). Mais il semble que ces altérations de la myéline ne sont présentes que dans les premiers temps de la remyélinisation, et qu'après plusieurs mois cette nouvelle myéline est identique à la myéline néonatale (Powers et al., 2013). Il est intéressant de noter que les oligodendrocytes matures autour de la lésion ne participent pas à la remyélinisation, mais c'est bien le pool d'OPC qui a

été conservé à la VZ à l'issue du développement qui va proliférer, migrer, et se différencier sur le lieu de la lésion (Nait-Oumesmar et al., 1999; Crawford et al., 2016). Les OPC issus des régions dorsales seront préférentiellement réquisitionnés pour la remyélinisation (Crawford et al., 2016).

### **III. C. Fonctions des oligodendrocytes myélinisants**

Le rôle des oligodendrocytes dans le SNC dépasse la seule formation de la gaine isolante qui permet l'accélération de la conduction de l'influx nerveux. En effet, ils jouent également un rôle dans le renouvellement des potentiels d'action et dans le soutien métabolique de l'axone et régulent certains paramètres axonaux comme le transport, la phosphorylation des neurofilaments ou la croissance.

#### **III. C. 1. Conduction du message nerveux**

La conduction efficace du signal électrique le long de l'axone myélinisé ne peut avoir lieu qu'à deux conditions : d'une part la concentration des canaux sodiques au niveau du nœud de Ranvier, et d'autre part le siphonnage des ions potassiques hors de l'espace périaxonal après le passage d'un potentiel d'action.

##### **Concentration des canaux sodiques au niveau du nœud de Ranvier**

L'oligodendrocyte et la gaine de myéline induisent la formation d'un regroupement de canaux sodiques au niveau des nœuds de Ranvier (Kaplan et al., 1997). Certaines études montrent que cette ségrégation intervient en amont du contact entre le neurone et l'oligodendrocyte, et qu'elle est initiée par un facteur soluble oligodendrocytaire (Kaplan et al., 1997, 2001). D'autres études montrent l'implication des jonctions paranodales dans la répartition des canaux sodiques le long de l'axone, et suggèrent que ces structures entraînent l'accumulation de canaux sodiques à une forte densité au niveau du nœud (Fig.15) (Rasband et al., 1999; Rasband and Peles, 2016).

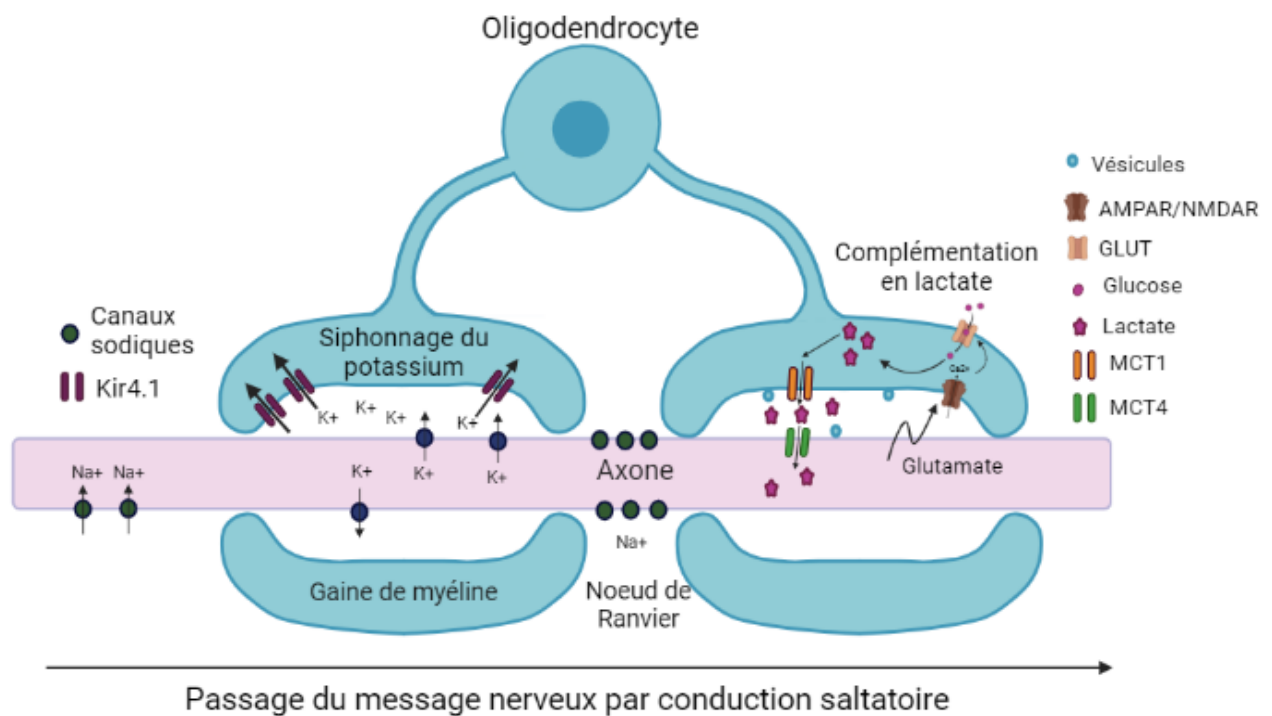
### **Siphonnage du potassium extracellulaire**

Lors du passage d'un potentiel d'action le long de l'axone, l'entrée brutale des ions sodium  $\text{Na}^+$  va entraîner une sortie importante des ions potassium  $\text{K}^+$ . Les canaux potassiques étant situés dans l'entrenoed, les ions potassium sont relargués dans l'espace périaxonal. La vidange rapide de cet espace est donc indispensable pour rétablir le potentiel de repos qui permettra le passage d'un nouveau potentiel d'action. Pour cela, des canaux potassiques comme Kir4.1 sont présents dans la gaine et permettent l'évacuation du potassium hors de cet étroit espace extracellulaire. La délétion de Kir4.1 chez des souris entraîne une altération de la vitesse de propagation des potentiels d'action, une dégénérescence axonale et des déficits moteurs (Schirmer et al., 2018). La régulation du potassium extracellulaire est également assurée par les OPC, qui expriment eux aussi le canal Kir4.1 (Fig.15) (Maldonado et al., 2013).

### **III. C. 2. Soutien métabolique de l'axone**

Une étude de Harris et Attwell sur la gestion du budget énergétique dans la substance blanche estime que les neurones de petit calibre sont en déficit énergétique de 38%. Ce qui signifie que 38% de l'énergie nécessaire au fonctionnement de ces neurones doit leur être fournie par l'extérieur (Harris and Attwell, 2012). En effet le fonctionnement du neurone est un gouffre énergétique : en plus des activités énergivores communes à toutes les cellules, il faut encore assurer le transport des vésicules synaptiques et leur recyclage, le fonctionnement des pompes ATPasiques essentielles au maintien du potentiel de repos, et le maintien du cytosquelette qui structure un axone dont la taille peut dépasser un mètre chez l'Homme. Pour couronner le tout, contrairement à d'autres cellules comme les astrocytes ou les oligodendrocytes, le neurone n'est pas capable de stocker de l'énergie (Philips and Rothstein, 2017). Ainsi l'ATP doit être produit en flux tendu par les nombreuses mitochondries réparties le long de l'axone, et doit être produit localement. En effet, l'ATP se diffuse mal au sein des cellules, en particulier sur d'aussi grandes distances. Les oligodendrocytes dont la myéline engaine la majorité de la surface des axones, offrent une surface d'échange gigantesque avec l'axone. Ils peuvent ainsi apporter un important soutien énergétique à l'axone en lui fournissant localement des substrats via le transporteur de monocarboxylate MCT1, ancré dans la gaine. Les substrats comme le lactate ou le pyruvate, directement utilisables par l'axone, sont libérés dans l'espace périaxonal, puis internalisés par l'axone via les transporteurs MCT4 ou MCT2 situés sur la membrane axonale. Ce transfert se

fait essentiellement de manière passive, dans la mesure où l'oligodendrocyte est capable de stocker du lactate, ce qui crée un gradient de concentration vers le neurone (Fig.15) (Fünfschilling et al., 2012). Le transfert de lactate vers le neurone peut être augmenté en fonction des besoins métaboliques de l'axone. En effet, comme pour la modulation de la myéline, le passage des potentiels d'action le long de la membrane libère du glutamate dans l'espace périaxonal, ce qui active les récepteurs oligodendrogliaux NMDAR et AMPAR. L'entrée subséquente d'ions calcium dans l'oligodendrocyte stimule la prise de glucose par l'oligodendrocyte via GLUT1 et augmente la synthèse de lactate et sa libération dans l'espace périaxonal (Kukley et al., 2007; Fünfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012; Saab et al., 2016; Micu et al., 2018). En plus du lactate, le calcium oligodendrocytaire stimule également l'exocytose de vésicules à destination du neurone (Frühbeis et al., 2013). Ces vésicules contiennent notamment la désacétylase Sirtuine 2 qui entraîne la désacétylation des translocases mitochondriales et augmente ainsi la production d'ATP par les mitochondries de l'axone. Ce mécanisme permet de stimuler la production d'énergie axonale grâce aux oligodendrocytes (Fig.15) (Chamberlain et al., 2021).



**Figure 15 : Le rôle des oligodendrocytes dans la conduction du message nerveux et le soutien métabolique de l'axone.**

L'oligodendrocyte permet la conduction efficace du message nerveux en condensant les canaux sodiques au niveau des nœuds de Ranvier, et en assurant le nettoyage des ions potassiques hors de l'espace périaxonal. Lors du passage d'un potentiel d'action, l'axone libère du glutamate dans l'espace périaxonal, ce qui active les récepteurs au

glutamate de l'oligodendrocyte et stimule l'entrée de glucose et la synthèse de lactate. Le lactate est transféré à l'axone via les transporteurs MCT1 et 4. Fait avec Biorender.

### **III. C. 3. Cytosquelette et transport axonal**

Chez la souris « shiverer » qui présente une délétion du gène codant pour la MBP ou bien suite à une démyélinisation chimique, on observe des altérations dans l'organisation et la composition du cytosquelette axonal, en particulier une augmentation du nombre et de la densité des microtubules, ainsi qu'une désorganisation des neurofilaments, anormalement déphosphorylés (Brady et al., 1999; Sun et al., 2016). De même, on observe que l'agencement et la phosphorylation des neurofilaments est différente dans les segments myélinisés de l'axone par rapport aux segments non myélinisés (Hsieh et al., 1994). Toutes ces observations suggèrent un rôle de la myéline dans l'organisation du cytosquelette axonal. La protéine MAG fixée au feuillet interne de la gaine est directement en contact avec l'axone, et la perte de MAG diminue l'activité des kinases neuronales ERK1/2 et cdk5, ce qui diminue la phosphorylation des neurofilaments. De plus, MAG joue un rôle dans l'expression de certaines Protéines Associées au Microtubules (MAP), comme MAP2 ou Tau (Dashfield et al., 2002; Quarles, 2007). Ainsi, MAG est un acteur principal de l'impact de la myéline sur la structure du cytosquelette axonal.

Les souris « shiverer » et démyélinisées manifestent également une altération du transport axonal, ce qui peut être une conséquence de la désorganisation du cytosquelette, mais aussi de la diminution de certaines protéines impliquées dans le transport, comme la kinésine (Brady et al., 1999; Sun et al., 2016). Dans des conditions de privation nutritionnelle, les oligodendrocytes parviennent à maintenir le transport axonal via la sécrétion d'exosomes. Les protéines PLP et CNP jouent un rôle dans la formation des vésicules exocytées, mais aussi dans leur contenu. En effet, les exosomes issus d'oligodendrocytes n'exprimant pas PLP ou CNP ne sont pas capables de rétablir le transport axonal dans des conditions de privation (Frühbeis et al., 2020). Edgar suggère que ce mécanisme de régulation du transport axonal dépendant de PLP pourrait impliquer les protéines de transport dynéine et dynactine (Edgar et al., 2004).

### **III. C. 4. Survie et croissance du neurone**

Enfin, les oligodendrocytes ont également une fonction protectrice vis-à-vis de l'axone. Ils augmentent sa tolérance au stress oxydatif en lui fournissant de la SOD1 via l'exocytose de vésicules, et activent des voies de signalisation qui favorisent sa maturation, sa stabilité et sa survie, notamment via MAG (Quarles, 2007; Frühbeis et al., 2013; Geoffroy and Zheng, 2014). MAG est également connue pour son rôle dans l'inhibition de la croissance axonale, via l'activation du récepteur neuronal Nogo. En effet, elle entraîne l'effondrement du cône de croissance en cas de lésion au système nerveux, et limite la croissance des neurites (Li et al., 1996). Cependant, certaines études ont montré que MAG pouvait avoir des rôles contradictoires en fonction des neurones. Par exemple en stimulant la croissance axonale chez les jeunes neurones et en inhibant celle des neurones âgés ou abimés (Quarles, 2007).

### **III. D. Fonctions des oligodendrocytes non myélinisants**

La plupart de ces fonctions dans la modulation du cytosquelette axonal ou la conduction du message nerveux sont conditionnées à l'existence de la gaine de myéline, qui permet le transfert de signaux de l'axone vers l'oligodendrocyte, et la libération via la myéline de molécules de soutien ou de contrôle. Cependant les oligodendrocytes non myélinisants jouent également des rôles dans l'organisation de la structure et du fonctionnement du SNC. Il existe deux types d'oligodendrocytes non myélinisants : les Oligodendrocytes Périneuronaux (PNOG) non myélinisants, et les OPC.

#### **III. D. 1. Les oligodendrocytes périneuronaux**

Les PNOG (Oligodendrocytes périneuronaux) sont un type minoritaire d'oligodendrocytes différenciés mais non myélinisants. Ils sont situés dans la matière grise (Bernstein et al., 2019) et ont une signature génétique spécifique (Szuchet et al., 2011). Contrairement aux oligodendrocytes myélinisants généralement situés près des dendrites, les PNOGs sont accolés aux péricaryons neuronaux. Leurs prolongements sont petits, peu nombreux, tordus et torsadés autour du corps cellulaire neuronal (Yamazaki et al., 2018). Ils jouent probablement un rôle dans le support métabolique du neurone. Mais on les soupçonne aussi d'être capables de développer des prolongements et de devenir myélinisants sous la contrainte. Ces deux

caractéristiques les rendent importants dans des conditions pathologiques, ou en cas de dommage occasionné au SNC. De plus, ils permettent de contraindre l'activité à haute fréquence des neurones (Yamazaki et al., 2018). Enfin, tout comme les oligodendrocytes myélinisants, ils expriment la glutamine synthétase, et jouent un rôle dans le métabolisme du glutamate, nécessaire au correct fonctionnement des synapses (Bernstein et al., 2019).

### **III. D. 2. OPC et régulation des interneurones**

Comme nous l'avons vu précédemment, la première vague d'OPC qui envahit le cortex au cours du développement est destinée à majoritairement disparaître dans les deux premières semaines suivant la naissance (chez les rongeurs). Ces OPC de la première vague commencent leur migration conjointement avec les interneurones issus des mêmes précurseurs qu'eux, mais vont peu à peu repousser ces interneurones loin des vaisseaux sanguins, forçant une distribution particulière d'interneurones au sein du cortex. Ce mécanisme de répulsion de contact unidirectionnel se fait grâce aux protéines Sema6a et 6b exprimées par l'OPC, et est essentiel pour la correcte distribution des interneurones dans le cortex (Lepienne et al., 2022). A l'issue du développement embryonnaire, les interneurones n'ayant pas correctement migré loin des vaisseaux sanguins seront brutalement éliminés par des OPC grâce à l'activation de la voie apoptotique TWEAK. Cette mise à mort nécessite la libération par les interneurones d'un signal GABAergique, et entraîne la perte de la majorité des interneurones dans les deux semaines suivant la naissance. On soupçonne que les OPC de la première vague régulent la migration et la correcte répartition des interneurones au cours du développement, mais que ce sont les OPC de la troisième vague qui sont responsables de la mise à mort des interneurones et des OPC de la première vague, après la naissance (Fang and Bai, 2023). Cette hypothèse de fonctions différentes pour les OPC de la première et de la troisième vague est d'autant plus probable que ces deux populations ont une signature transcriptomique différente (Marques et al., 2018). Quelques OPC de la première vague vont cependant survivre, et seront présents dans le SNC adulte, associés aux interneurones (Orduz et al., 2019). Cette régulation de la répartition des interneurones est indispensable à l'équilibre excitation/inhibition et au bon fonctionnement cortical à l'âge adulte. Lorsque la communication gabaergique OPC/interneurones est altérée, il en résulte une augmentation de la densité d'interneurones à l'âge adulte, un défaut de

myélinisation et des altérations des performances cognitives avec notamment un impact sur le comportement social (Fang and Bai, 2023).

### **III. D. 3. OPC et barrière hématoencéphalique**

Les OPC jouent également un rôle majeur dans l'intégrité et la fonction de la barrière hématoencéphalique. Tout d'abord, en contribuant à l'angiogenèse, notamment au niveau du corps calleux, mais aussi en favorisant la prolifération des cellules endothéliales et des péricytes, composants essentiels de la barrière (Yuen et al., 2014; Maki et al., 2015). De plus, les OPC expriment le facteur de croissance TGF beta qui stimule la formation entre les cellules épithéliales de jonctions serrées, nécessaires à l'intégrité de la barrière hémato encéphalique (Seo et al., 2014).

### **III. D. 4. OPC et inflammation**

Les OPC jouent un rôle essentiel dans l'inflammation. Ils présentent des récepteurs aux cytokines et chémokines, ce qui les rend sensibles à l'environnement inflammatoire, mais sont également capables d'en sécréter pour réguler l'inflammation et éventuellement recruter les cellules du système immunitaire. Notamment l'expression de la cytokine IL17 ou des chimiokines CCL2 et CCL10 va permettre le recrutement des neutrophiles, monocytes, microglies, macrophages et leucocytes. D'autres cytokines comme IL6 et IL12, sécrétées par les OPC, vont jouer un rôle important dans la différenciation des lymphocytes B et T et leur expression d'interféron gamma. Enfin, la libération et le recrutement d'inflammasomes par les OPC permet de réguler l'inflammation et donne aux OPC un rôle immunomodulateur. Au niveau de la myéline, l'expression du cluster de différenciation 47 (CD47) par les OPC diminue la phagocytose de la myéline et l'expression de la sémaphorine 3 induit l'apoptose des microglies. Ces mécanismes permettent de limiter les réactions inflammatoires dans le cerveau (Zeis et al., 2016).

Enfin, les OPC sont capables d'agir comme des cellules présentatrices d'antigènes (Kirby et al., 2019).



### **III. E. Le syncytium glial**

Les oligodendrocytes interagissent avec les autres cellules gliales. Les astrocytes apportent un soutien métabolique aux oligodendrocytes tandis que les microglies jouent un rôle dans le maintien de la myéline, et la gestion de l'environnement inflammatoire.

#### **III. E. 1 Le dialogue oligodendrocytes-astrocytes**

On estime la surface de myéline produite par un oligodendrocyte en phase de myélinisation à  $5000\mu\text{m}^2$  par jour. Ce qui signifie que chaque jour, l'oligodendrocyte produit en myéline plus de 50 fois la surface de son corps cellulaire (Pfeiffer et al., 1993). Malgré ses remarquables capacités métaboliques, l'oligodendrocyte n'est pas capable de métaboliser seul de telles quantités de lipides ou de protéines. Il est donc en contact étroit avec l'astrocyte qui lui fournit en permanence de l'énergie sous forme de nutriments, et du cholestérol qui pourra être directement ajouté à la gaine en formation. Ancrées à la membrane de l'astrocyte, les connexines Cx30 et Cx43 s'associent aux connexines oligodendrogiales Cx47 et Cx32 pour former des jonctions communicantes (GAP). Ces jonctions permettent le passage de métabolites comme du glucose et du lactose, depuis l'astrocyte vers l'oligodendrocyte (Niu et al., 2016; Meyer et al., 2018). Cette énergie pourra être directement utilisée par l'oligodendrocyte, ou bien transférée au neurone pour le soutenir métaboliquement via les transporteurs MCT1, déjà mentionnés précédemment. Les astrocytes livrent également des substrats énergétiques aux OPC, ce qui est essentiel pour maintenir leur prolifération (Niu et al., 2016). En plus de l'énergie brute, les astrocytes fournissent aux oligodendrocytes du cholestérol qui pourra être directement intégré dans la gaine de myéline. La suppression de ce transfert de cholestérol entraîne une importante hypomyélinisation. Le cholestérol est synthétisé *de novo* par l'astrocyte à partir d'acétyl-CoA, puis son transport est assuré par l'apolipoprotéine E (ApoE). La lipoprotéine ApoE/cholestérol est ensuite internalisée par l'oligodendrocyte via le récepteur LDLR (Low Density Lipoprotein) (Saher and Stumpf, 2015; Camargo et al., 2017).

### III. E. 2. Le dialogue oligodendrocytes-microglie

Comme nous l'avons vu, les OPC jouent un rôle immunitaire autonome. Cependant, ils interagissent aussi beaucoup avec les microglies pour réguler l'environnement inflammatoire du SNC. En retour, les microglies jouent un rôle dans la régulation de la myélinisation. En effet, l'oligodendrocyte est caractérisé par une capacité remarquable à synthétiser en peu de temps une importante surface de membrane. Sa capacité à se débarrasser de ses membranes excessives est moins prouvée, en particulier quand on considère la taille du corps cellulaire où ont lieu en général les processus de dégradation. L'oligodendrocyte régule donc l'excès de myéline en générant par exocytose des vésicules internalisées par les microglies. Les microglies capables d'internaliser ces vésicules oligodendrocytaires appartiennent à une sous-population n'exprimant pas de complexe majeur d'histocompatibilité, et donc incapable de présenter des antigènes ou de provoquer une réponse inflammatoire. Ainsi, ces microglies « silencieuses » permettent de réguler l'excès de membrane oligodendrocytaire sans initier de réponse immunitaire. Dans un contexte inflammatoire, ces microglies bénéfiques et silencieuses se transforment en microglies « pro inflammatoires », capables de participer à la réponse immunitaire. Simultanément, elles perdent leur capacité à intégrer les vésicules oligodendrocytaires par macropinocytose et donc à réguler la quantité de myéline (Fitzner et al., 2011).

De la même manière qu'elles régulent l'excès de membrane oligodendrocytaire par un mécanisme de transfert vésiculaire, les microglies jouent également un rôle important dans l'élagage de la myéline, par phagocytose. Ce processus a lieu essentiellement au cours du développement, où la myéline est produite en excès et nécessite un élagage sélectif. La déplétion des microglies sur cette période entraîne une hypermyélinisation. L'élimination de la myéline par les microglies est régulée par l'activité neuronale, et fait partie intégrante de sa plasticité (Hughes and Appel, 2020). Les microglies sont également chargées en conditions physiologiques de phagocyter les OPC eux-mêmes. Ce mécanisme est essentiel pour assurer l'homéostasie de leur population, et adapter leur densité aux besoins en myéline des neurones adjacents. La phagocytose des OPC intervient avant la myélinisation, et dépend de l'expression par les microglies du récepteur à la fractalkine. En l'absence de ce récepteur, les microglies ne reconnaissent pas les OPC et ne les phagocytent pas. Il en résulte une densité anormalement

élevée d'OPC qui ne se différencient pas correctement et échouent à myéliniser suffisamment les axones (Nemes-Baran et al., 2020).

Enfin, en cas de démyélinisation, les microglies jouent un rôle important dans le processus de remyélinisation. Elles libèrent du glutamate qui, comme nous l'avons déjà vu, peut stimuler la prolifération et la myélinisation des OPC. Encore une fois, il semble que les microglies « silencieuses » aient un rôle opposé aux microglies activées, et soient plus propices à stimuler la remyélinisation (Lombardi et al., 2019).

### **III. F. Le dimorphisme sexuel**

Des études du cerveau et de la substance blanche par imagerie ont montré que le volume du corps calleux rapporté au volume du cerveau était significativement plus important chez les femmes que chez les hommes. La même observation a été faite pour les régions frontales antérieures (Shiino et al., 2017). Cependant il semble que cette différence soit davantage liée au fait qu'il existe une relation linéaire négative entre la taille du cerveau et la taille du corps calleux qu'au sexe de l'individu : indépendamment du sexe, un plus gros cerveau présentera un plus petit corps calleux (Leonard et al., 2008). Bien qu'encore minoritaires, quelques études se sont intéressées au dimorphisme sexuel dans les cellules de la lignée oligodendrocytaire et dans la myélinisation, et ont mis à jour des différences importantes.

Chez les rats, on observe une myélinisation plus importante du corps calleux chez les mâles que chez les femelles (Yasuda et al., 2020). Simultanément, PLP1 est augmentée deux à trois fois et MBP et CNP sont augmentées de 20 à 160% dans le corps calleux et la moelle épinière des mâles par rapport aux femelles, et ce dès le jeune âge (Cerghet et al., 2006). Cependant, cette différence de myélinisation pourrait dépendre des structures dans la mesure où les femelles rats présentent un cortex orbitofrontal plus riche en MBP que les mâles (Darling and Daniel, 2019). Le taux de renouvellement de la myéline chez les femelles est très supérieur à celui des mâles. En effet, la myéline dégénère plus rapidement chez les femelles, probablement du fait de l'augmentation de la protéase  $\mu$ -Calpain (Cerghet et al., 2006), ce qui stimule la remyélinisation. On observe en effet une prolifération d'OPC plus importante dans le corps calleux des femelles que dans celui des mâles (Yasuda et al., 2020), cohérente avec l'important renouvellement des oligodendrocytes matures chez les femelles, dont la durée de vie est plus courte que celle des

oligodendrocytes mâles (Cerghet et al., 2006). Cependant, malgré ce renouvellement plus important, la quantité d'oligodendrocytes *in vivo* reste plus faible chez les femelles, avec une densité dans le corps calleux égale à 70% de celle observée chez les mâles (Cerghet et al., 2006). Enfin, il semble que le secrétome des OPC femelles ait un impact bénéfique sur l'intégrité de la barrière hématoencéphalique, à l'inverse des OPC mâles (Yasuda et al., 2020).

### **III. F. 1. Un dimorphisme sexuel lié aux hormones**

Les hormones jouent évidemment un rôle dans l'apparition de ce dimorphisme sexuel. Preuve en est que les oligodendrocytes matures, de même que la myéline, expriment des récepteurs aux œstrogènes et androgènes (Caruso et al., 2004; Zhang et al., 2004). Les études qui se sont penchées sur la question se sont pourtant plutôt intéressées aux OPC et à leur comportement en présence de différentes hormones comme les œstrogènes, la progestérone ou la testostérone. Il a notamment été montré que la progestérone pouvait augmenter le nombre d'oligodendrocytes *in vitro* alors que la testostérone avait plutôt tendance à le diminuer (Swamydas et al., 2009). Après quelques jours de culture *in vitro*, le nombre d'oligodendrocytes dépend d'une part de la survie et d'autre part de la prolifération et différenciation des oligodendrocytes. Les hormones sexuelles impactent ces deux mécanismes. La progestérone et les œstrogènes ont un rôle protecteur vis à vis des oligodendrocytes, alors que la testostérone les rend vulnérables aux dégâts cytotoxiques induits par l'activation des récepteurs AMPAR (Caruso et al., 2004; Takao et al., 2004; Swamydas et al., 2009). De plus, la progestérone stimule la prolifération des OPC et les œstrogènes prolongent la phase de prolifération des OPC, en retardant leur différenciation (Marin-Husstege et al., 2004; Swamydas et al., 2009).

Les hormones sexuelles ont donc bien un impact sur la survie, la prolifération et la différenciation des OPC. Cependant, quelques études suggèrent qu'il existe également une différence intrinsèque entre les OPC issus de mâles ou de femelles, indépendamment de l'environnement hormonal. (Swamydas et al., 2009).

### **III. F. 2. Un dimorphisme sexuel indépendant des hormones**

Après quelques jours de culture, les oligodendrocytes issus des cerveaux de souris femelles sont 10 à 15% plus nombreux que les oligodendrocytes issus des mâles, bien qu'ils aient été

initialement ensemencés au même taux. Dans la mesure où le milieu de culture est privé de toute hormone sexuelle, cette observation n'autorise que deux possibilités : avant leur mise en culture, l'exposition des oligodendrocytes aux hormones pré- et néonatales a suffi à induire un dimorphisme sexuel dans les OPC (prélevés sur des animaux P2 ou P3). Ou bien des facteurs génétiques induisent une différence intrinsèque dans la nature des OPC mâles et femelles (Swamydas et al., 2009). L'existence d'un dimorphisme sexuel est déjà présent chez les OPC prélevés à un stade néonatal dans des cerveaux de rat, notamment au niveau transcriptomique. Les OPC femelles expriment préférentiellement des gènes liés à leur prolifération, migration et leur métabolisme énergétique (OLIG 1, OLIG 2, NF1 et PDGFR $\alpha$ ), tandis que les OPC mâles expriment préférentiellement des gènes de différenciation, myélinisation et cytotoxicité (mbp, mag, cnp, myrf, ...). Ces différences transcriptomiques se répercutent dans la physiologie des OPC : les OPC issus de cerveaux de rats femelles ont une meilleure capacité de prolifération et de migration *in vitro* tandis que les OPC issus de cerveaux de rats mâles ont une meilleure capacité de différenciation et myélinisation (Yasuda et al., 2020). Ces résultats suggèrent la possibilité d'un dimorphisme intrinsèque, ou acquis très tôt de manière permanente.

### **III. F. 3. Un dimorphisme sexuel qui se manifeste en conditions pathologiques ?**

Malheureusement encore très peu étudié, quelques études suggèrent l'existence d'un dimorphisme sexuel « silencieux » qui ne se manifeste qu'en conditions pathologiques : les OPC, oligodendrocytes et la myéline pourraient réagir différemment suite à une confrontation avec un environnement délétère. Les OPC issus de cerveaux néonataux de femelles rats sont par exemple plus résistants dans des conditions d'ischémie (privation d'oxygène et de glucose) que des OPC issus de cerveaux mâles (Yasuda et al., 2020).

Ainsi, il existe un fort dimorphisme sexuel au niveau des OPC, qui se répercute sur la densité d'oligodendrocytes matures et la quantité de myéline dans le SNC. Ce dimorphisme est évidemment lié à la circulation d'hormones différentes chez les mâles et les femelles, mais aussi à des propriétés intrinsèques des OPC. Une étude suggère que ces différences de myélinisation en fonction des structures pourraient se manifester au niveau du comportement. Le cortex orbitofrontal est par exemple une structure impliquée dans les fonctions exécutives et les

attitudes impulsives. La diminution de MBP dans cette structure chez les mâles par rapport aux femelles pourrait expliquer la plus forte propension des mâles à l'impulsivité (Darling and Daniel, 2019). Dans la mesure où certains dimorphismes sexuels des OPC et de la myéline ne se manifestent qu'en conditions pathologiques, on pourrait supposer que certaines pathologies affectant les cellules du lignage oligodendrocytaire ou le processus de myélinisation entraînent des altérations différentes chez les mâles et les femelles. C'est notamment le cas dans plusieurs troubles du comportement comme l'autisme, la schizophrénie, ou le trouble bipolaire. Ces pathologies sont caractérisées par des altérations des oligodendrocytes et de la myéline (Takahashi et al., 2011; Graciarena et al., 2019; Galvez-Contreras et al., 2020; Ju et al., 2021; Valdés-Tovar et al., 2022), et de nombreux dimorphismes sexuels ont été décrits dans ces pathologies (Lewine et al., 1990; Mendrek, 2007; Lai et al., 2013; Mendrek and Mancini-Marie, 2016; Mitjans et al., 2017; Schumann et al., 2017).

## **IV. Les oligodendrocytes dans le syndrome SLA-DFT**

Les oligodendrocytes jouent ainsi un rôle essentiel dans l'architecture fonctionnelle du système nerveux central en participant à de nombreuses fonctions comme la propagation du signal ou le soutien métabolique des axones. Du fait de leurs échanges privilégiés avec les neurones et de leur implication dans plusieurs pathologies du système nerveux central, de nombreuses études se sont intéressées à la place de ce type cellulaire dans différents modèles de SLA ou de DFT. Afin de synthétiser l'ensemble de ces études, j'ai participé à la rédaction d'une revue intitulée « Oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia : the new players on stage », présentée dans les pages suivantes.

Oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: the new players on stage

Marguerite JAMET <sup>1</sup>, Luc DUPUIS <sup>1</sup>, Jose-Luis GONZALEZ DE AGUILAR <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, INSERM, Strasbourg Translational Neuroscience and Psychiatry, STEP, UMR\_S 1329, Strasbourg, France

\* Corresponding author:

gonzalez@unistra.fr

Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, CRBS

STEP, UMR\_S 1329

1 rue Eugène Boeckel

CS 60026

67084 Strasbourg Cedex

France



## Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD) are fatal adult-onset neurodegenerative disorders that share clinical, neuropathological and genetic features, which forms part of a multi-system disease spectrum. The pathological process leading to ALS and FTD is the result of the combination of multiple mechanisms that operate within specific populations of neurons and glial cells. The implication of oligodendrocytes has been the subject to a number of studies conducted on patients and related animal models. In this review we summarize our current knowledge on the alterations specific to myelin and the oligodendrocyte lineage occurring in ALS and FTD. We also consider different ways by which specific oligodendroglial alterations influence neurodegeneration and highlight the important role of oligodendrocytes in these two intrinsically associated neurodegenerative diseases.

**Keywords:** amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia, myelin, oligodendrocyte

## 1. A brief overview on amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD) are fatal neurodegenerative disorders. ALS is the most frequent motor neuron disease in adults and is primarily characterized by the degeneration of upper and lower motor neurons, progressive muscle wasting, fasciculations, dysarthria, dysphagia, altered reflexes and spasticity, leading to total paralysis and death within two to five years after diagnosis (Hardiman et al., 2017; Feldman et al., 2022). Most cases are sporadic, with a family history being observed in 10% of patients. The most common genetic causes identified until now account for about 70% of familial ALS and include expansions of a hexanucleotide repeat in chromosome 9 open reading frame 72 (*C9orf72*), involved in endosomal trafficking and autophagy; mutations in superoxide dismutase 1 (*SOD1*), encoding an antioxidant enzyme ; transactive response DNA binding protein 43 (*TARDBP*); and fused in sarcoma (*FUS*), which encodes the DNA/RNA binding proteins TDP43 and FUS, respectively. Additional genes have been associated with ALS although they only account for a minority of cases (Ghasemi and Brown, 2018).

FTD is the second most common cause of presenile dementia and is primarily characterized by the degeneration of the frontal and temporal lobes, leading to two main clinical manifestations: progressive alterations in social behavior and personality, known as behavioral variant FTD ; and language and speech difficulties, referred to as primary progressive aphasia. Life expectancy ranges from 7 to 13 years from onset in cases that do not have motor involvement (Grossman et al., 2023). A family history is observed in 40% of patients. Known major genetic causes include *C9orf72* repeat expansions, and mutations in progranulin, involved in lysosomal function and protein trafficking, and microtubule-associated protein Tau (*MAPT*), responsible for microtubule assembly and stability. Other causative genes and susceptibility factors have also been identified (Antonioni et al., 2023). Taken together, these reports emphasize the importance of the genetic overlap between ALS and FTD, with *C9orf72* repeat expansions being the most common genetic cause responsible for about 10% of all ALS and FTD cases (Abramzon et al., 2020; Tang et al., 2020). Besides common genetics, ALS and FTD also share clinical and neuropathological features. Up to 50% of ALS patients exhibit alterations in behavior and cognition reminiscent or typical of FTD, and around 30% of FTD patients meet criteria of ALS-like motor impairment (van Es et al., 2017). At the histological level, TDP43, irrespective of the presence or absence of *TARDBP* mutations, forms aggregates delocalized in the cytoplasm of affected populations of neurons and glial cells in the vast majority of ALS cases and in almost the half of FTD cases (Neumann

et al., 2006). It is therefore now commonly accepted that ALS and FTD are the two ends of a multi-system disease spectrum.

## 2. Some notes on the physiology of oligodendrocytes

Based on the genetic diversity of ALS and FTD, multiple pathogenic mechanisms have been proposed to contribute to neurodegeneration, although the precise nature of the selective loss of specific populations of neurons remains elusive. Furthermore, since not only neurons but also other cells in the central nervous system (CNS) are affected by the pathological process, the situation is even more complex than previously thought, adding considerable complexity to its understanding (Ling et al., 2013; Hardiman et al., 2017; Mejjini et al., 2019; Abramzon et al., 2020; Antonioni et al., 2023). Growing evidence has accumulated during the last decade supporting the implication of oligodendrocytes, which are the myelinating cells in the CNS responsible for trophic support and the rapid propagation of electrical signals along the axons. The development of oligodendrocytes starts at the end of the embryonic period, when committed oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) from the ventricular zones in the brain and spinal cord intensively proliferate and migrate to invade the entire CNS according to precisely regulated mechanisms. A few weeks after birth, OPCs begin to differentiate into mature oligodendrocytes (Kuhn et al., 2019). The balance between axon needs and the availability of mature oligodendrocytes depends on the amount and localization of OPCs (Emery, 2010). The extent of OPC proliferation and migration also influences the density and repartition of interneurons during late embryonic stages (Fang and Bai, 2023). Therefore, impairments in OPC development may bring about important consequences for mature oligodendrocyte localization and availability as well as for neuronal excitatory/inhibitory balance.

Once they are differentiated, the majority of oligodendrocytes insulate axons with a multilayered sheath wrapped around them. This structure consists of internodes of individual myelin segments separated by tiny unmyelinated gaps called nodes of Ranvier. One oligodendrocyte is able to myelinate segments of up to 50 different axons. The myelin sheath contains around 70% lipids (of dry mass), of which major lipid components include 40% cholesterol, 40% glycerophospholipids and 20% glycosphingolipids. The amount of cholesterol is twice as important as in other cellular membranes, and its metabolic regulation is instrumental in forming and maintaining the myelin sheath. Proteins represent 30% of the dry myelin mass. Proteolipid protein (PLP) is the most abundant protein of CNS myelin and plays a central role in

the formation of its multilamellar structure. Myelin basic protein (MBP) is the second most abundant protein and is essential for the compaction of the myelin sheath. Other important proteins include 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP), which contributes to the formation of cytoplasmic open spaces within the myelin sheath to allow for local translation of *MBP* mRNA, myelin-associated glycoprotein (MAG) and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), two adhesion molecules mostly involved in cell-cell interactions, and myelin-associated oligodendrocyte basic protein (MOBP) which, similarly to MBP, seems to participate in myelin compaction (Han et al., 2013; Stadelmann et al., 2019).

The presence of a compacted myelin sheath around the axon prevents current leakage and allows electrical impulses to transmit faster thanks to a phenomenon called saltatory conduction, whereby the current flows longitudinally along the myelinated segments of the axon, generating axon potentials that "jump" from one node of Ranvier to the next one. This process of saltatory conduction may be subject to changes, since the myelin sheath is a dynamic structure able to receive signals from the axon and adapt its characteristics to axonal needs (Almeida and Lyons, 2017). By modifying the length of the internodes or thickness of the myelin sheath, oligodendrocytes control the speed of conduction along the axons and, subsequently, the synchrony of signals between distant neuronal locations. This synchrony between multiple synaptic inputs is essential for proper function, as if inputs are not received coincidentally they will not be integrated by the postsynaptic neuron, possibly leading to dysfunctional neuronal circuits (Kato et al., 2020). Besides their role in the propagation of electrical impulses, oligodendrocytes are also meant to metabolically support the axons by providing monocarboxylated substrates, such as lactate, through the specific oligodendroglial monocarboxylate transporter MCT1, which helps maintain axonal activity and ensure neuronal survival (Nave et al., 2023).

Pathological alterations in oligodendrocytes and/or myelin have a direct impact on neuronal activity, as shown in the context of several neurodegenerative conditions, such as multiple sclerosis, multiple system atrophy, Alzheimer's disease and Parkinson's disease (Han et al., 2022). The purpose of this review is to summarize our current knowledge of the alterations specific to myelin and the oligodendrocyte lineage occurring in ALS and FTD. However, we do not address those alterations affecting several cell types simultaneously, such as, for instance, defective autophagy or mitochondrial dysfunction. We recommend readers to refer to recent articles published elsewhere that address these

topics in detail (Anoar et al., 2021; Motataianu et al., 2022; Chua et al., 2022). Finally, we consider the different ways that specific oligodendroglial alterations influence neurodegeneration in ALS and FTD, highlighting the important role of oligodendrocytes in these two intrinsically associated neurodegenerative diseases.

### **3. Pathological hallmarks of mature oligodendrocytes in ALS and FTD**

#### **3.1. Protein aggregation in mature oligodendrocytes**

Neuronal cytoplasmic inclusions have been extensively described in ALS and FTD, but many studies have also reported the presence of inclusions in oligodendrocytes, as well as other glial cells. In general, these oligodendroglial inclusions mainly appear in the ventral horns of the spinal cord, corticospinal tracts and frontal cortex, which are the most affected areas in ALS or FTD, but also appear around the nucleus and periaxonal cytoplasm (Stieber et al., 2000; Fatima et al., 2015; Ferraiuolo et al., 2016) (Table 1 and 2).

##### **3.1.1. TDP43 aggregates**

Cytoplasmic inclusions containing TDP43 are typically observed in 95% of ALS and 50% of FTD patients, regardless of the presence or absence of *TARDBP* mutations (Bright et al., 2021). These aggregates were found in sporadic and familial ALS, yet display variable intensity, with oligodendrocytes frequently appearing as the most affected cells (Philips et al., 2013; Brettschneider et al., 2014; Rohan et al., 2014; Fatima et al., 2015). In particular, oligodendroglial TDP43 inclusions were specifically associated with mutations in several genes linked to ALS (e.g., angiogenin, *C9orf72* and optineurin) or FTD (e.g., *C9orf72*, progranulin and sequestosome 1) (Seilhean et al., 2009; Kovacs et al., 2016). Moreover, the aggregates in the frontal cortex were more abundant in ALS patients carrying a *C9orf72* repeat expansion mutation compared to sporadic cases (Lorente Pons et al., 2020). An increased oligodendroglial aggregation of TDP43 also correlated with a more severe form of FTD (Ho et al., 2021). In accordance with these findings, mice overexpressing wild-type *Tardbp* (*Tardbp*<sup>WT</sup> mice) exhibited an increase in TDP43 content in the spinal cord that was higher in glial cells than in neurons, highlighting the importance of the TDP43 proteinopathy for astrocytes and oligodendrocytes (Yang et al., 2022).

Several studies conducted on ALS patients showed that grey matter oligodendrocytes had more TDP43 inclusions than white matter oligodendrocytes suggesting that the aggregates could propagate from grey to white matter oligodendrocytes. In addition, the inclusions were observed in myelinating oligodendrocytes but not in immature oligodendrocytes or perineuronal non-myelinating oligodendrocytes, suggesting that these cells, being resistant to protein aggregation, could be affected by the disease in a different manner (Brettschneider et al., 2014; Fatima et al., 2015). Another study, however, did not find any difference between white and grey matter TDP43 pathology in the corticospinal tracts of ALS patients (Rohan et al., 2014). Further to this, an ALS case carrying an optineurin mutation showed hyperphosphorylated TDP43 predominantly accumulated in white matter oligodendrocytes (Nolan et al., 2021). The recruitment of patients at different disease stages could explain these *a priori* contradictory findings.

### **3.1.2. FUS aggregates**

Neuronal cytoplasmic inclusions containing FUS are generally associated with early onset and fast progression of ALS and FTD. Unsurprisingly FUS aggregates were also observed in the cytoplasm of oligodendrocytes in ALS patients carrying a *FUS* mutation. The morphology of these inclusions appeared heterogeneous (including round, crescentic or flame-shaped), and occasionally extending into single or ramified processes. Consistent with these findings, FUS accumulated in the cytoplasm of oligodendrocytes of mice expressing a truncated form of FUS lacking the nuclear localization signal (*Fus<sup>ΔNLS</sup>* mice) (Scekic-Zahirovic et al., 2017). Similarly, 10% of FTD patients showed oval or flame-shaped cytoplasmic glial inclusions, which were tested positive for FUS and ubiquitin. Interestingly, these cases did not carry *FUS* mutations, and although the hippocampus was damaged, the frontal and temporal lobes were affected only moderately (Neumann et al., 2009).

### **3.1.3. C9orf72 RNA foci**

ALS and FTD patients carrying a *C9orf72* repeat expansion mutation typically show neuronal accumulations of the expanded RNA repeats into cytoplasmic RNA foci. These aggregates were also observed in oligodendrocytes. Indeed, the burden of cytoplasmic RNA foci per cell was heavier in neurons and oligodendrocytes than in other cells (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Mizielinska et al., 2013). However, although aggregates containing dipeptide repeat proteins generated by repeat-

associated non-ATG (RAN) translation are typically found in neurons (Ash et al., 2013), it is currently not clear if this kind of inclusions are also present in oligodendrocytes.

#### **3.1.4. SOD1 aggregates**

Inclusions of misfolded SOD1 were found in iPSC-derived oligodendrocytes obtained from sporadic and familial cases of ALS carrying a *SOD1* mutation but they were absent from oligodendrocytes of those carrying a *C9orf72* repeat expansion (Ferraiuolo et al., 2016). These inclusions consisted of poorly oriented filaments containing misfolded SOD1 and were observed in the cytoplasm, particularly in the perikaryon, as well as extracellularly, in the periaxonal space between the myelin sheath and the axon (Stieber et al., 2000). In contrast to TDP43, SOD1 aggregates were less abundant in oligodendrocytes than in other cells (Forsberg et al., 2011). Misfolded SOD1 aggregates were also found in oligodendrocytes of mice overexpressing the ALS-linked *SOD1* mutation G93A (*SOD1<sup>G93A</sup>* mice) (Ferraiuolo et al., 2016). Of note, these mice, as well as mice carrying the ALS-linked profilin mutation, also displayed aggregates containing MBP and PLP, two major proteins of the myelin sheath. These inclusions were localized in the spinal cord and increased in size and number as the disease progressed (Yusuf et al., 2022). At present, it is not known whether these myelin proteins also appear in the pathological inclusions of ALS and FTD patients.

#### **3.1.5. Tau protein aggregates**

Inclusions containing Tau protein were observed in oligodendrocytes of FTD patients, independently of the presence or absence of *MAPT* mutations. These aggregates consisted of coiled structures of filamentous and tubular material (Kahlson and Colodner, 2016; Hosokawa et al., 2017). Strikingly, the accumulation of Tau protein in oligodendrocytes appeared specific to FTD, since its accumulation preferentially in neurons was rather associated with Alzheimer's disease (Richter-Landsberg and Bauer, 2004).

### **3.2. Degeneration of mature oligodendrocytes**

Whether oligodendrocytes degenerate in ALS and FTD is a matter of controversy. iPSC-derived oligodendrocytes obtained from sporadic and familial ALS patients did not display any sign of degeneration, suggesting that their death, if it occurs, may depend on the disease cellular environment

(Ferraiuolo et al., 2016). In fact, grey matter oligodendrocytes in the ventral spinal cord of *SOD1<sup>G93A</sup>* mice and zebrafish did express markers of apoptosis (Philips et al., 2013; Kim et al., 2019). In addition, the death of these cells started before the onset of overt disease, with only less than half of the oligodendrocytes produced during the first post-natal months surviving by the end stage, causing a decrease in the absolute number of mature oligodendrocytes in both grey and white matter (Kang et al., 2013; Bonfanti et al., 2020). Similarly, the specific deletion of *Tardbp* in mouse oligodendrocytes (oligo-*Tardbp*-KO mice reduced the number of grey matter oligodendrocytes that reach the symptomatic stage, although it did not affect white matter oligodendrocytes (Ho et al., 2021). Oligodendroglial degeneration also occurred in *Tardbp<sup>WT</sup>* mice, as deduced from the localization of the pro-apoptotic factor caspase-3 in cells positive for the oligodendrocyte marker adenomatous polyposis coli, or APC (Yang et al., 2022).

It has also been postulated that the proliferation and differentiation of OPCs could compensate for the loss of mature oligodendrocytes (Philips et al., 2013; Cui et al., 2014). In support of this notion, loss of cells positive for oligodendrocyte transcription factor 2 (OLIG2) that was observed in the corpus callosum of a FTD mouse model lacking the gene encoding the lysosomal transmembrane protein 106B (TMEM106B), affected differentiated but not undifferentiated oligodendrocytes. It was proposed that these undifferentiated cells represented a population of reactive precursors trying to replace the lost oligodendrocytes (Zhou et al., 2020). Perhaps more surprisingly, the number of mature oligodendrocytes was unaltered when knocking out *Fus* specifically in mouse oligodendrocytes (oligo-*Fus*-KO mice) (Guzman et al., 2020), and *Fus<sup>ANLS</sup>* mice even showed an increase in the number of white matter oligodendrocytes in the ventral horns of the spinal cord (Scekic-Zahirovic et al., 2017).

#### **4. Pathological hallmarks of OPC in ALS and FTD**

As mentioned above, several studies postulated an increase in the proliferation of OPCs as a mean of compensating mature oligodendroglial degeneration. Thus, OPCs positive for the oligodendrocyte precursor cell marker NG2 appeared activated in the motor cortex and spinal cord of ALS patients (Kang et al., 2013). In addition, the transcriptomic analysis of samples from frontal and temporal cortex of FTD patients with TDP43 proteinopathy revealed a gene expression signature indicative of increased oligodendroglial activity (Hasan et al., 2022). These results were corroborated in *SOD1<sup>G93A</sup>* mice and zebrafish, where an excess of OPC proliferation was observed in the grey matter of the ventral spinal



cord at a pre-symptomatic age, as well as later, though less importantly, in the white matter (Guan et al., 2007; Kang et al., 2013; Philips et al., 2013; Kim et al., 2019; Bonfanti et al., 2020). However, in oligo-*Tardbp*-KO mice, OPCs were shown to proliferate preferentially in the white matter of the spinal cord at pre-symptomatic and end stages (Wang et al., 2018). These differences in preferential proliferation between white and grey matter could be due to the fact that the regeneration capacity of grey matter oligodendrocytes tends to decline in an age-dependent manner (Ho et al., 2021), likely making OPC proliferation in the grey matter only present in younger animals. In contrast with these findings, OPCs appeared unaltered in oligo-*Fus*-KO mice (Guzman et al., 2020). Moreover, the increase in the number of mature oligodendrocytes observed in the white matter of end stage *Fus*<sup>ANLS</sup> mice occurred without any mature oligodendrocyte degeneration, which suggests that the presumed proliferation of OPCs preceding the increase in mature oligodendrocytes could serve purposes other than compensating oligodendrocyte cell death (Scekic-Zahirovic et al., 2017).

Together with an abnormal rate of proliferation, the differentiation of OPCs into mature cells could also be affected in ALS and FTD. Newly born OPCs in the spinal cord of *SOD1*<sup>G93A</sup> mice failed to differentiate into fully mature myelinating oligodendrocytes, resulting in immature and dystrophic cells unable to provide efficient myelination or metabolic support to axons (Kang et al., 2013; Bonfanti et al., 2020). With thicker and more elongated cell bodies, these immature oligodendrocytes were detectable before neuronal loss and tended to increase in number upon disease progression, with almost all being completely dysmorphic by the end stage (Philips et al., 2013; Cui et al., 2014; Peric et al., 2021). Consistent with these morphological alterations observed *in vivo*, cultured oligodendrocytes from *SOD1*<sup>G93A</sup> mice also displayed a reduction in the number and extent of branched processes (Bonfanti et al., 2020).

## 5. Altered myelin in ALS and FTD

Although ALS and FTD are not considered as pure demyelinating diseases, increasing evidence strongly suggests that the myelin sheath shows important modifications in terms of (ultra)structure and chemical composition. These modifications have been studied in patients and animal models (**Table 1** and **2**, and **Figure 1**).

### 5.1. Alterations in myelin structure

Diffuse myelin pallor, spongiosis and demyelination were observed in the spinal cord, brainstem, motor cortex and subcortical white matter of patients with sporadic and familial ALS (Hayashi et al., 2001; Kang et al., 2013; Nolan et al., 2021). Of note, the grey matter was more affected in the motor cortex than in the ventral spinal cord (Kang et al., 2013). In contrast, these findings were not confirmed in *Tardbp<sup>WT</sup>* mice since demyelination rather appeared in the white matter, mainly in the lumbar spinal cord, and became less severe toward the rostral areas of the brain (Yang et al., 2022). These observations emphasize, once again, the differences between white and grey matter as well as between cortical and spinal cord involvement. It should be mentioned, however, that other studies did not corroborate these findings. Spectral confocal reflectance imaging of samples from sporadic and familial ALS cases showed a normal compact myelin and no changes in myelin density in at least the motor cortex white matter (Sadler et al., 2022).

The main myelin alteration in the motor cortex of ALS patients was the presence of water, both inside and outside the myelin sheath (Kolind et al., 2013). A similar alteration was observed in the spinal cord of *SOD1<sup>G93A</sup>* mice and rats even at a pre-symptomatic stage, accompanied by the vacuolization and detachment of myelin lamellae eventually leading to the loss of compaction and destruction of the myelin sheath, and to the accumulation of myelin debris around degenerating axons suggestive of Wallerian degeneration. Moreover, the severity of these modifications increased as the disease progressed (Niebroj-Dobosz et al., 2007; Kang et al., 2013). The myelin sheath in the grey matter of the ventral spinal cord of *SOD1<sup>G93A</sup>* and *Fus<sup>ΔNLS</sup>* mice also exhibited a lower ratio of the inner-to-outer diameter of myelinated axons (also referred to as the g-ratio), suggesting an abnormally thick myelin sheath and potential disturbances to axon function (Kang et al., 2013; Scekcic-Zahirovic et al., 2017).

### 5.2. Alterations in myelin lipid composition

High levels of cholesterol esters were detected in the white matter of the cortex and spinal cord of sporadic ALS patients, with this increase also correlating to a shorter disease duration (Cutler et al., 2002; Sadler et al., 2022). This alteration was also observed in the spinal cord of *SOD1<sup>G93A</sup>* mice (Chaves-Filho et al., 2019). Similarly, an accumulation of cholesterol esters was found in the frontal and parietal white matter of FTD patients carrying a progranulin mutation, although it was not observed in

*C9orf72* repeat expansion carriers. Since excess cholesterol typically accumulates in the form of esters, the increased amounts of these lipids could result from myelin breakdown (Marian et al., 2023). In contrast to these findings, oligo-*Fus*-KO mice showed an increase in cholesterol in the corpus callosum, associated with an increase in the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), the rate-limiting enzyme for cholesterol synthesis, which suggests the formation rather than destruction of myelin. In accordance with this hypothesis, these mice exhibited a decreased g-ratio, indicating thicker myelin sheaths (Guzman et al., 2020).

Low levels of sphingomyelin and ceramides were found in the cortical white matter of patients with sporadic and familial ALS (Sadler et al., 2022). Conversely, significant amounts of these lipids were detected in the cerebrospinal fluid, suggesting a progressive destruction of the myelin sheath (Blasco et al., 2017). A decreased content of sphingolipids was also observed in the hippocampus of FTD patients carrying the risk allele of *TMEM106B* (Lee et al., 2023), as well as in the frontal cortex white matter of FTD patients carrying the progranulin or *C9orf72* repeat expansion mutation (Marian et al., 2023). In contrast, levels of sphingomyelin were increased in the spinal cord white matter of ALS patients, and in pre-symptomatic and symptomatic *SOD1<sup>G93A</sup>* mice (Cutler et al., 2002), highlighting clear-cut differences in terms of lipid alterations in different areas of the CNS.

### **5.3. Alterations in myelin protein composition**

The studies investigating the protein composition of myelin in ALS and FTD reported contrasting changes at the mRNA and protein level. The expression of *Mbp*, *Mag*, *Mog*, and *Cnp* was decreased in end stage oligo-*Tardbp*-KO mice, along with *HMGCR* in patients with TDP43 proteinopathy (Ho et al., 2021). Additional genes, characteristic of peripheral myelin, such as myocilin, *Pmp2* and *Prx*, were also down-regulated in the spinal cord of *Fus<sup>ALS</sup>* mice (Scekic-Zahirovic et al., 2017). On the other hand, symptomatic oligo-*Fus*-KO mice showed an increase in the expression of *Hmgcr* but no changes in other major myelin genes were detected (Guzman et al., 2020).

The alterations in gene expression mentioned above did not always correlate with changes in protein content, suggesting different mechanisms of dysregulation at transcriptional, translational and/or post-translational level. MBP content was dramatically reduced in the grey matter of the motor cortex and

spinal cord of patients with sporadic and familial ALS, specifically carrying a *SOD1* or *C9orf72* repeat expansion mutation (Kang et al., 2013; Rohan et al., 2014). This was not observed in the cortical white matter of sporadic or familial ALS cases (Sadler et al., 2022), consistent with the general trend that grey matter seems to be more affected than white matter. Decreased MBP levels were also found in the white and grey matter of the frontal cortex of FTD patients carrying a progranulin or *C9orf72* repeat expansion mutation but not in sporadic cases (Lorente Pons et al., 2020; Sirisi et al., 2022; Marian et al., 2023). The decrease in MBP was associated with a reduction in the contents of other major myelin proteins, including CNP and PLP, in FTD patients carrying a progranulin (but not *C9orf72* repeat expansion) mutation, as well as in ALS patients carrying a *TARDBP* mutation (Kang et al., 2013; Marian et al., 2023). Finally, MBP levels were decreased in *Tardbp*<sup>WT</sup> mice (Yang et al., 2022) but unaffected in *SOD1*<sup>G93A</sup> rats (Niebroj-Dobosz et al., 2007).

## **6. Mechanisms of oligodendroglial pathology**

### **6.1. Cell-autonomous alterations in myelin and oligodendrocytes**

Several studies have interrogated whether oligodendrocytes are affected by ALS and FTD in a cell-autonomous manner. Abnormal aggregates are well known to perturb numerous cellular functions, and this can be especially relevant for oligodendrocytes in which the accumulation of certain pathogenic factors is particularly enhanced, as compared to other cell types. Thus, the expression of *C9orf72*, which is normally high in oligodendrocytes, was increased specifically in regions affected by ALS, hence favoring the toxic accumulation of expanded *C9orf72* RNA repeats particularly in oligodendrocytes (Langseth et al., 2017). In contrast, mature oligodendrocytes contained less misfolded *SOD1* inclusions than other cell types (Forsberg et al., 2011), possibly due to the fact that oligodendrocytes highly express the heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin, which prevents the conversion of soluble *SOD1* into insoluble forms prone to aggregate (Wang et al., 2005). Despite such a protective mechanism, *SOD1* still accumulated in oligodendrocytes of *SOD1*<sup>G93A</sup> zebrafish associated with fluid vacuoles located between decompacted myelin lamellae (Kim et al., 2019). These vacuoles also appeared in oligo-*Tardbp*-KO mice, combined with a decrease in myelin sheath thickness and the down-regulated expression of several major myelin genes, including *Mbp*, *Plp*, *Mog* and *Mag*, which resulted in a concomitant reduction in the content of at least MBP and MOG. Interestingly, these alterations occurred in the grey and white matter of the spinal cord even in the absence of motor neuron cell death and were sufficient to trigger a progressive

decrease in muscle strength and motor coordination together with a shortened lifespan (Wang et al., 2018). Likewise, another mouse model of ALS obtained by knocking out optineurin in mature oligodendrocytes exhibited abnormal myelination in the ventrolateral white matter of the spinal cord (Ito et al., 2016). Finally, oligo-*Fus*-KO and *Fus*<sup>ΔNLS</sup> mice showed FTD-like behavioral alterations, mainly hyperactivity and disinhibition, which correlated with an increase in myelin thickness without signs of neuronal death (Scekic-Zahirovic et al., 2017; Guzman et al., 2020; Scekic-Zahirovic et al., 2021). Taken together, these findings point to cell-autonomous alterations occurring specifically in oligodendrocytes that very likely contribute to the whole disease picture.

## **6.2. Mechanisms triggering mature oligodendrocyte cell death**

Several mechanisms have been postulated to explain the degeneration of mature oligodendrocytes in ALS and FTD (Ito et al., 2009; Iuchi et al., 2021). Firstly, oligodendrocytes can die due to the loss of function of key proteins necessary for their survival that frequently appear trapped in the cytoplasmic inclusions characteristically seen in these conditions. Deleting *Tardbp* expression in cultured oligodendrocytes triggered cell death through the activation of a necroptosis mechanism mediated by receptor-interacting protein kinase 1, which highlights the essential role of TDP43 in oligodendrocyte survival (Wang et al., 2018; Ho et al., 2021). Strikingly, deleting *Tardbp* expression *in vivo* specifically in astrocytes also triggered a selective reduction in the number of mature oligodendrocytes, and it was suggested that the loss of TDP43 could contribute to kill oligodendrocytes (and neurons) by modifying the gene expression program of astrocytes toward a pro-inflammatory phenotype (Peng et al., 2020).

Mature oligodendrocytes are sensitive to glutamate excitotoxicity and, like neurons, they can die from excessive glutamate exposure (Xu et al., 2008). Normally, OPCs express Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors that become impermeable upon differentiation to mature oligodendrocytes. This transition was impaired in oligodendrocytes from ALS patients carrying a *Tardbp* mutation, rendering AMPA receptors still permeable to Ca<sup>2+</sup> and enhancing vulnerability to excitotoxicity (Barton et al., 2021). Under physiological conditions, free fatty acids, such as oleic acid and linoleic acid, help to inhibit glutamate-induced cell death. The levels of oleic acid and linoleic acid stayed low in the plasma of *SOD1*<sup>G93A</sup> mice prior to disease onset, which could be related to a higher vulnerability to excitotoxicity. In fact, feeding *SOD1*<sup>G93A</sup> mice with a cocktail rich in oleic acid and linoleic acid suppressed oligodendrocyte cell death

in the spinal cord of these mice, further reinforcing the link between glutamate excitotoxicity and mature oligodendrocyte degeneration (Maruyama et al., 2023).

Finally, not all the alterations affecting proteins essential for maintaining the activity of oligodendrocytes triggered their degeneration. The decreased expression of the monocarboxylate transporter MCT1 observed in sporadic ALS patients and *SOD1<sup>G93A</sup>* mice was implicated in affecting the metabolic support of axons by oligodendrocytes, causing axonal damage and neuronal loss. However, such a decrease in MCT1 expression did not cause any death of cultured oligodendrocytes, or oligodendrocytes from heterozygous MCT1 null mice, which showed unchanged morphology and number (Lee et al., 2012).

### **6.3. Mechanisms triggering impaired OPC proliferation and differentiation**

Several mechanisms have been proposed to contribute to the impairment of OPC differentiation seen in ALS and FTD. Under physiological conditions, the expression of G protein-coupled receptor 17 (*GPR17*) is normally down-regulated to enable the differentiation of OPCs. Increasing the expression of this receptor is enough to block the maturation process (Fumagalli et al., 2015). *GPR17* levels appeared increased in the spinal cord of *SOD1<sup>G93A</sup>* mice even at a pre-symptomatic stage. In addition, the percentage of mature cells derived from cultured OPCs obtained from *SOD1<sup>G93A</sup>* mice was increased by blocking *GPR17*. Overall, these findings suggest a role for *GPR17* in ALS (Bonfanti et al., 2020). ErbB2 receptor tyrosine kinase 4 (*ERBB4*) is also known to play an important role in oligodendrocyte maturation and is also involved in myelin formation. Interestingly, several mutations in *ERBB4* were identified as causing late-onset ALS, and the expression of *ERBB4* was decreased in the spinal cord of sporadic cases (Takahashi et al., 2019). Since *ERBB4* expression is in part controlled by interacting with TDP43, it was postulated that the cytoplasmic delocalization of TDP43, typically observed in ALS and FTD, could affect *ERBB4* mRNA transport and/or translation and hence impair oligodendrocyte maturation (Schwenk et al., 2016). Von Hippel Lindau protein (VHL) is another key player in OPC differentiation and myelination (Yuen et al., 2014), shown to colocalize with phosphorylated TDP43 in cytoplasmic inclusions of OPCs and oligodendrocytes in the spinal cord of sporadic ALS patients. This interaction was more defined in these cells than in any other cell type and was promoted in the presence of misfolded TDP43. In fact, VHL and TDP43 stabilized and enhanced the formation of perinuclear inclusions of each other, thus preventing their degradation. A similar mechanism was found to occur

with mutant SOD1. It was proposed that the aggregates of phosphorylated TDP43 stimulate the accumulation of VHL in insoluble fractions, and hence limits OPC differentiation and myelination (Uchida et al., 2016). Finally, notch receptor 1 (NOTCH1) is an important negative regulator of OPC differentiation, and its expression was decreased in ALS patients and *SOD1<sup>G93A</sup>* mice (Zhang et al., 2009). However, follow-up studies did not corroborate these findings (Liu et al., 2020), and the conditional deletion of *Notch1* in OPCs failed to improve oligodendroglial function and disease outcome in *SOD1<sup>G93A</sup>* mice (Eykens et al., 2018).

Oxidative stress has been shown to play a crucial role in ALS and FTD (Motataianu et al., 2022). Regarding oligodendrocytes, oxidative stress impaired the maturation of OPCs not only by decreasing the expression of genes promoting their differentiation, such as SRY-box transcription factor 10 and *OLIG2*, but also by increasing the expression of genes known to inhibit it, such as the family of inhibitors of DNA binding and cell differentiation (Id) genes. Oxidative stress also affected the deacetylation of histones necessary to initiate OPC differentiation (French et al., 2009). Lastly, since the process of differentiation into mature oligodendrocytes can be interrupted through the activation of a toll-like receptor 3-dependent pathway, it was postulated that the implication of pro-inflammatory mechanisms, commonly observed in ALS and FTD, could alter, at least in part, OPC differentiation (Boccazzi et al., 2021).

#### **6.4. Mechanisms affecting the myelination process**

Besides the loss of mature oligodendrocytes and the impairment in OPC maturation, the formation and maintenance of the myelin sheath can also be affected in ALS and FTD (**Figure 1**). In agreement with this notion, the reduction in the content of MBP in the spinal cord of ALS and FTD patients with TDP43 proteinopathy did not correlate with the decrease in the number of mature oligodendrocytes, which strongly suggests that certain myelin modifications can take place, at least in part, as an independent event (Rohan et al., 2014). The fact that myelin defects were observed around uninjured axons in *SOD1<sup>G93A</sup>* mice also suggests that the alterations of the myelin sheath may occur prior to motor neuron loss (Kang et al., 2013). Several mechanisms have been proposed to explain the modifications of the myelin sheath observed in ALS and FTD.

Several genes whose mutations have been linked to ALS and/or FTD, such as *TARDBP*, *FUS*, angiogenin and *HNRNP1*, are normally implicated in different aspects of the metabolism of RNA. For example TDP43 is known to bind to mRNAs encoding major myelin proteins, including MBP, PLP, MOG and MAG. Not surprisingly, these mRNAs were progressively down-regulated in the spinal cord of oligo-*Tardbp*-KO mice (Wang et al., 2018). Similarly, FUS was shown to bind to *Mbp* mRNA, and knocking out *Fus* produced aberrant splice variants of *Mobp* and *Mag* RNA (Hoell et al., 2011; Lagier-Tourenne et al., 2012). Overall, these findings point to an equilibrium between myelin RNAs and associated RNA binding proteins necessary to ensure proper myelination. Particularly for *MBP* mRNA, binding to HNRNPA2 is required for transport to the myelin sheath, where it is then translated. Interestingly, mutant forms of ALS and FTD-linked TDP43 and C9orf72 were shown to trap HNRNPA2, likely compromising the transport of *Mbp* mRNA toward the myelin sheath (Buratti et al., 2005; DeJesus-Hernandez et al., 2011; Lorente Pons et al., 2020). Consistent with these findings, the trafficking of *MBP* mRNA was altered in ALS patients carrying a *C9orf72* repeat expansion mutation, although this alteration did not cause any noticeable modification in the general structure of myelin (Barton et al., 2021). In oligodendrocytes, as in neurons, microtubule dynamics and stabilization are essential not only to allow the formation of cellular processes and myelin extensions but also to assure mRNA transport. The microtubule associated protein Tau, which appears frequently aggregated in cases of FTD, is involved in these processes. Thus, the oligodendroglial knock-down of *Mapt*, the gene encoding Tau protein, triggered the retention of *Mbp* mRNA in the cell soma, causing a decrease in peripheral *Mbp* expression and subsequent impaired myelination (Carson et al., 1997; Seiberlich et al., 2015). Finally, the analysis of the brain transcriptome in a mouse model of FTD lacking *TMEM106B* showed a generalized down-regulation of genes implicated in myelination and axonal ensheathment. This was associated with the delocalization of the myelin protein PLP1 in lysosomes instead of being properly assembled into the membrane sheath, indicating the importance of *TMEM106B* for PLP1 transport (Zhou et al., 2020).

Cholesterol is the most present lipid component of the myelin sheath. Under physiological conditions, TDP43 binds to the mRNAs encoding HMGCR and sterol regulatory element binding transcription factor 2 (SREBF2) and promotes the expression of these genes involved in cholesterol synthesis. The expression of *HMGCR* was reduced in oligodendrocytes of FTD patients with TDP43 proteinopathy, and that of *Srebf2* was also decreased in oligo-*Tardbp*-KO mice. However, re-expressing *Srebf2* in these



mice restored cholesterol levels and protected against the demyelination caused by the lack of TDP43 (Ho et al., 2021). Many genes implicated in cholesterol metabolism also display binding motifs for FUS but, in contrast to what was observed with TDP43, the expression of *Hmgcr* was rather increased in oligo-*Fus*-KO mice concomitantly with an increase in cholesterol content and myelin thickness (Guzman et al., 2020). Oligodendrocytes need large amounts of cholesterol for the formation and maintenance of the myelin sheath. The import of cholesterol from astrocytes mediated by low-density lipoprotein receptor (LDLR) is one of the mechanisms making cholesterol available to oligodendrocytes. TDP43 co-aggregated with LDLR in oligodendrocytes of FTD patients with TDP43 proteinopathy, and the expression of LDLR itself was decreased in oligo-*Tardbp*-KO mice, suggesting a reduction in the transfer of cholesterol and a defect of myelination. Consistent with these findings, supplementing cultured oligodendrocytes of oligo-*Tardbp*-KO mice with cholesterol restored their myelinating capacity lost in the absence of TDP43 (Ho et al., 2021). Astrocytes also provide oligodendrocytes with lactate, via MCT1, and lactate is then used to synthesize different classes of myelin lipids (Rinholm et al., 2011). The generalized reduction in MCT1 levels observed in the CNS of ALS patients and related animal models could therefore result in deficient intake of lactate by oligodendrocytes and subsequent impaired myelination.

Sphingolipids are also important constituents of the myelin sheath. The presence of the disease risk allele of *TMEM106B* was associated with reduced levels of myelin sphingolipids in the hippocampus of patients with FTD (Lee et al., 2023). Similarly, a loss of myelin sphingolipids was found in FTD patients carrying a progranulin mutation, and a mouse model of FTD lacking progranulin showed changes in the activity of enzymes involved in sphingolipid metabolism, which strongly suggests the implication of such genes in maintaining oligodendroglial function (Huang et al., 2020; Lok and Kwok, 2021).

It has been observed in several neurodegenerative diseases that the structure and function of certain proteins may be affected by post-translational citrullination. Levels of citrullinated proteins, as well as those of the peptidylarginine deiminases responsible for citrullination, were increased in the spinal cord of mice carrying an ALS-linked *SOD1*<sup>G93A</sup> or profilin mutation. Interestingly, these citrullinated proteins formed aggregates containing MBP and PLP. In fact, the citrullination of MBP caused its dissociation from the membrane, and dissociated MBP formed extended structures prone to aggregate or be

proteolyzed. It was hypothesized that the proteolysis of such structures could release immunogenic peptides, eventually triggering a kind of autoimmune response and the subsequent destruction of the myelin sheath (Yusuf et al., 2022). Of note, myelin phagocytosis could be also caused by macrophages stimulated in response to abnormally high levels of glycine, as deduced from an increase in glycine content found in the plasma of ALS patients (Carmans et al., 2010).

## **7. Contribution of affected oligodendrocytes to neuronal alterations in ALS and FTD**

### **7.1. Impaired axonal function**

Given the intimate connection with axons, it seems very likely that oligodendrocytes affected by ALS and/or FTD make an impact on axonal structure and function, potentially leading to neuronal cell death (**Figure 2**). In accordance with this hypothesis, oligodendrocytes derived from ALS patients carrying disease-related mutations in *SOD1*, *TARDBP*, *C9orf72* or *FIG4* phosphoinositide 5-phosphatase induced *in vitro* neuronal hyperexcitability and subsequent motor neuron cell death (Ferraiuolo et al., 2016). Mice and zebrafish expressing *SOD1<sup>G93A</sup>* specifically in mature oligodendrocytes (oligo-*SOD1<sup>G93A</sup>* mice and zebrafish) showed a reduction in axonal conduction velocity and neuromuscular transmission, as well as progressive axonal degeneration (Kang et al., 2013; Kim et al., 2019). Another mouse model lacking optineurin in mature oligodendrocytes did not exhibit any defect in the number and morphology of spinal cord motor neurons but showed swollen motor axons and muscle denervation, reminiscent of the axonal pathology observed in ALS patients at early disease stages (Ito et al., 2016). Similarly, fast and slow axonal transport was reduced in mice expressing mutant Tau protein specifically in oligodendrocytes, triggering an age-dependent motor deficit that preceded neurodegeneration (Higuchi et al., 2005). Additional studies showed that mice expressing the FTD-linked *MAPT* mutation P301 exhibited dysmorphic ad-axonal myelin lamellae and impaired conduction of action potentials, which could account for the loss of performance in the object recognition test used to assess learning and memory in these mice (Jackson et al., 2018).

Inwardly rectifying Kir4.1 channels, normally expressed by oligodendrocytes (and astrocytes), are responsible for the clearance of excess accumulation of K<sup>+</sup> in the extracellular space and contribute to the regulation of neuronal excitability (Schirmer et al., 2018). The expression of Kir4.1 channels was decreased in the spinal cord of *SOD1<sup>G93A</sup>* rats, particularly in regions exhibiting degenerating motor

neurons and dysmorphic oligodendrocytes. It was postulated that the reduction of inward currents observed in cultured oligodendrocytes derived from these animals could compromise proper axonal conduction (Peric et al., 2021). The expression of connexins Cx47 and Cx32, implicated in transferring excess extracellular K<sup>+</sup> between oligodendrocytes and astrocytes, was also reduced in oligodendrocytes in the ventral horns of the spinal cord of *SOD1<sup>G93A</sup>* mice, especially in those containing accumulated mutant SOD1 (Cui et al., 2014), which further reinforces the notion of a defective buffering of K<sup>+</sup> in the extracellular environment surrounding motor neurons. Altering the functionality of voltage-gated K<sup>+</sup> channels represents another way of affecting the propagation of axonal action potentials. Oligo-*SOD1<sup>G93A</sup>* zebrafish developed behavioral and learning abnormalities and motor defects in the early symptomatic stage associated with an impaired axonal conduction capacity, and this phenotype was ameliorated by administering the pan voltage-gated K<sup>+</sup> channel inhibitor 4-aminopyridine (Kim et al., 2019), highlighting the pathological influence of genetically altered oligodendrocytes on global neuronal activity.

## **7.2. Impaired metabolic support to neurons**

MCT1 is the most important monocarboxylate transporter expressed by oligodendrocytes (and astrocytes) that supplies lactate and other metabolites to axons. MCT1 levels were decreased in the CNS of ALS patients and *SOD1<sup>G93A</sup>* mice and zebrafish (Lee et al., 2012; Philips et al., 2013; Ferraiuolo et al., 2016; Kim et al., 2019). Moreover, the expression of *SOD1<sup>G93A</sup>* in human embryonic kidney cells reduced MCT1 content although only at the protein level, indicating the implication of a post-transcriptional mechanism (Philips et al., 2013). Of note, the conditioned medium obtained from cultured oligodendrocytes lacking MCT1 caused motor neuron cell death *in vitro*, which was partly restored upon lactate supplementation (Ferraiuolo et al., 2016). On the other hand, the removal of mutant SOD1 from the oligodendrocyte lineage in *SOD1<sup>G37R</sup>* mice increased MCT1 content, delayed disease onset and prolonged lifespan (Kang et al., 2013). Collectively, these findings suggest that the down-regulation of MCT1 observed in patients and related animal models can affect neuronal function and should not be exclusively considered as a consequence of the loss of oligodendrocytes during the pathological process.

Other studies, however, failed to show any implication of oligodendroglial MCT1 in affecting neuronal function. In fact, cultured oligodendrocytes derived from ALS patients carrying a *Tardbp* mutation did not exhibit any deficit in lactate transport (Barton et al., 2021). In addition, the AAV-mediated delivery of *MCT1* to mature oligodendrocytes did not provide functional rescue nor survival benefit to *SOD1<sup>G93A</sup>* mice (Eykens et al., 2021). Deleting *Mct1* specifically in mouse oligodendrocytes caused a very modest axonal damage not noticed until two years of age (Philips et al., 2021). Finally, an axonopathy similar to that observed in ALS was detected in mice by 8 months of age only when *Mct1* was heterozygously deleted in all cells (Lee et al., 2012). These findings strongly suggest that the role of MCT1 in supplying metabolic support could result from its expression in other cell types, such as astrocytes. Alternatively, the presence of MCT1 in non-myelinating perineuronal oligodendrocytes, which seem to resist to the pathological process, could also play a relevant role in maintaining the metabolic support to neurons (Rohan et al., 2014).

### **7.3. Neuronal excitotoxicity**

Glutamine synthetase is responsible for the synthesis of glutamine, which is in turn converted into glutamate as part of the glutamate/glutamine cycle that maintains appropriate glutamate concentrations to allow neuronal excitability but, at the same time, impede excitotoxicity. Besides the major contribution of astrocytes, it has been recognized that oligodendrocytes can also participate in the regulation of this cycle. Interestingly, the number of mature oligodendrocytes expressing glutamine synthetase was increased in the ventral spinal cord of *SOD1<sup>G93A</sup>* mice from the pre-symptomatic to end stage, and it was suggested that the resulting accumulation of glutamine could lead to the production of glutamate in excess and subsequent excitotoxicity (Haim et al., 2021).

### **7.4. Transfer of pathogenic proteins**

The histological analysis of *post-mortem* samples of spinal cord from ALS patients allowed the establishment of four neuropathological stages defined according to the extension of TDP43 inclusions. The regional localization of these inclusions strongly suggested a possible propagation of TDP43 aggregates from grey matter oligodendrocytes to neurons and to white matter oligodendrocytes (Brettschneider et al., 2014; Fatima et al., 2015). Consistent with this notion, the overexpression of *TARDBP* in cultured oligodendrocytes, when the proteasome was inhibited, led to the formation of

cytoplasmic aggregates containing TDP43 that were able to spread into contiguous cells (Ishii et al., 2017). *In vivo* studies also reported that the unilateral inoculation of homogenates derived from tauopathy patients in the lateral corpus callosum of mice resulted in the pathological aggregation of Tau protein in oligodendrocytes and the spreading of these aggregates from the injection site to the contralateral corpus callosum (Ferrer et al., 2019). In addition, the time course of the chimeric expression in the mouse spinal cord of fluorescent *SOD1<sup>G85R</sup>* showed the transfer of mutant SOD1 between motor neurons as well as between motor neurons and grey matter oligodendrocytes. Since the highest degree of protein transfer occurred when oligodendrocytes deployed their projections toward axons, it was suggested that oligodendrocytes could mediate the propagation of pathogenic proteins between motor neurons (Thomas et al., 2017). Last but not least, the co-culture of naive motor neurons with oligodendrocytes derived from ALS patients triggered the death of motor neurons likely via cell-to-cell contacts or, at least, when the two cell types were in close vicinity (Ferraiuolo et al., 2016). In fact, mature oligodendrocytes are able to release exosomes containing SOD1 that then are internalized by neurons. Under physiological conditions, this mechanism enhances the neuron's tolerance toward oxidative stress, but it can be postulated that such a mechanism could also account for cell-to-cell propagation of pathological SOD1 in an ALS context (Fröhlich et al., 2014). Taken together, these findings further reinforce the implication of oligodendrocytes in disease propagation.

## **8. Concluding remarks**

We have reviewed our current knowledge of the alterations specific to myelin and oligodendrocytes in ALS and FTD, and several conclusions can be drawn. Oligodendroglial modifications are clearly observed in patients and related animal models, some of them being already detected at pre-symptomatic stages. Grey matter oligodendrocytes appear to be affected earlier than white matter oligodendrocytes. These alterations mainly concern pathological cytoplasmic aggregates containing disease-related proteins, increased expression of apoptotic markers, and changes in the structure and composition of the myelin sheath, notably pertaining to the amounts of MBP and cholesterol. In general, TDP43, SOD1 and other disease-related animal models recapitulate quite well the common features characteristic of a decrease in myelination as seen in patients. However, the *FUS*-based models rather show increases in myelin thickness and cholesterol, which raises the question as to whether *FUS* mutations orchestrate a different specific disease mechanism while leading to a similar clinical outcome.

Finally, the degeneration of mature oligodendrocytes occurs simultaneously with an increase in the proliferation and differentiation of OPCs, as a means to compensate the loss of oligodendrocytes. Unfortunately, this compensatory mechanism does not seem to work efficiently and the newly generated oligodendrocytes become dysfunctional.

Beyond the well-known implication of other types of glial cells, such as astrocytes and microglial cells, the contribution of oligodendrocytes represents a major advance in understanding the pathological process underlying ALS and FTD. Not only do oligodendrocytes suffer from disease by themselves, they also induce morphological and physiological alterations at the axon level, including axonal swelling, perturbed axonal transport and impaired conduction of action potentials, which all together trigger denervation at the neuromuscular junction. Genetic animal models have provided evidence that the alterations in the axon caused by defective oligodendrocytes are sufficient to induce ALS and FTD-like phenotypes, even in the absence of neuronal loss. It is therefore tempting to suggest that the modifications in the structure and composition of the myelin sheath could cause alterations in conduction velocity and signal synchronicity leading to subsequent motor and cognitive deficits prior to overt neuronal degeneration.

The conditions in which the motor and cognitive alterations coexist in the ALS/FTD syndrome are not yet determined. However, the theory of a progressive propagation of the disease from the brain to the spinal cord or vice versa is likely. At least in the case of ALS, it is commonly accepted that neurodegeneration spreads from a focal site to neighboring areas although the precise underlying mechanism remains obscure. Each oligodendrocyte myelinates up to 50 different axons and, for this reason, it can be considered as a link between neurons and a good candidate for spreading the neurodegenerative process. Thus, having a marked oligodendroglial pathology could facilitate the propagation of neurodegeneration between cognitive and motor areas. In accordance with this hypothesis, the presence of oligodendroglial inclusions in FTD or demented patients correlated with the development of motor alterations (Noda et al., 1999; Forno et al., 2002; Arai et al., 2003; Kovacs et al., 2008). Moreover, oligodendrocytes were more affected in ALS patients carrying a *C9orf72* repeat expansion mutation, common to FTD, than patients presenting with only sporadic ALS (Lorente Pons et al., 2020). On the contrary, patients carrying a *SOD1* mutation, which exclusively leads to ALS, showed

a less pronounced oligodendroglial pathology as compared to other cell types (Forsberg et al., 2011). Even though assuming oligodendrocytes could act as intermediaries of disease propagation, the precise mechanisms at work in specific CNS regions might not be the same, since it is well-known that there are phenotypic differences in oligodendrocytes in grey versus white matter, as well as in oligodendrocytes in brain versus spinal cord.

Understanding the correlation between the expression of disease genes in the cell types of concern and the clinical outcome represents another area of research. Interestingly, an intense aggregation of TDP43 in the cytoplasm of FTD oligodendrocytes was associated with a more severe form of the disease (Ho et al., 2021). However, the presence of FUS inclusions in the cytoplasm of ALS oligodendrocytes was correlated with later onset and slower progression than when FUS accumulated preferentially in the cytoplasm of neurons (Mackenzie et al., 2011). More surprisingly, although it is known that mutant presenilin typically causes Alzheimer's disease, the coexistence of such a mutation and nuclear inclusions of ubiquitin in oligodendrocytes triggered FTD (Riudavets et al., 2013). Similarly, while the existence of a tauopathy in neurons usually leads to Alzheimer's disease, its presence in glial cells caused FTD (Chung et al., 2021). These studies prompt to consider the nature of the oligodendrocyte pathology as part of the criteria to distinguish between subtypes of ALS and FTD, and of neurodegenerative diseases in general.

### **Abbreviations**

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; C9orf72, chromosome 9 open reading frame 72; CNP, 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase; CNS, central nervous system; Cx, connexin; ERBB4, erb-B2 receptor tyrosine kinase 4; FTD, frontotemporal dementia; FUS, fused in sarcoma; GPR17, G protein-coupled receptor 17; HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; HNRNP, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; LDLR, low-density lipoprotein receptor; MAG, myelin-associated glycoprotein; MAPT, microtubule-associated protein Tau; MBP, myelin basic protein; MCT1, monocarboxylate transporter 1; MOBP, myelin-associated oligodendrocyte basic protein; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; NOTCH1, notch receptor 1; OLIG2, oligodendrocyte transcription factor 2; OPC, oligodendrocyte progenitor cell; PLP, proteolipid protein; PMP2, peripheral myelin protein 2; PRX, periaxin; SOD1, superoxide dismutase 1; SREBF2, sterol regulatory element binding transcription factor 2; TARDBP,

transactive response DNA binding protein 43; TMEM106B, transmembrane protein 106B; VHL, Von Hippel Lindau protein

## Acknowledgments

MJ was supported by the French National Research Agency (grant agreement No. ANR-19-CE17-0016, SPREADALS) and the *Fondation Anne-Marie et Roger Dreyfus* under the aegis of the *Fondation de France* (grant agreement No. 00129229/PR-145775). We thank Daniel Beckett for proofreading the manuscript.

## Author contributions

MJ: Writing - original draft. LD: Writing - review and editing. JLGDA: Writing - review and editing, Supervision.

## Conflict of interest

The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

## References

- Abramzon, Y. A., Fratta, P., Traynor, B. J., and Chia, R. (2020). The overlapping genetics of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Front. Neurosci.* 14, 42. doi: 10.3389/fnins.2020.00042.
- Almeida, R. G., and Lyons, D. A. (2017). On myelinated axon plasticity and neuronal circuit formation and function. *J. Neurosci.* 37, 10023–10034. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3185-16.2017.
- Anoar, S., Woodling, N. S., and Niccoli, T. (2021). Mitochondria dysfunction in frontotemporal dementia/amyotrophic lateral sclerosis: lessons from Drosophila models. *Front. Neurosci.* 15, 786076. doi: 10.3389/fnins.2021.786076.
- Antonioni, A., Raho, E. M., Lopriore, P., Pace, A. P., Latino, R. R., Assogna, M., et al. (2023). Frontotemporal dementia, where do we stand? A narrative review. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 11732. doi: 10.3390/ijms241411732.
- Arai, T., Nonaka, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Yoshida, M., Hashizume, Y., et al. (2003). Neuronal and glial inclusions in frontotemporal dementia with or without motor neuron disease are immunopositive for p62. *Neurosci. Lett.* 342, 41–44. doi: 10.1016/s0304-3940(03)00216-7.
- Ash, P.E., Bieniek, K.F., Gendron, T.F., Caulfield, T., Lin, W.L., DeJesus-Hernandez, M. et al. (2013). Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77, 639–646. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.004.
- Barton, S. K., Gregory, J. M., Selvaraj, B. T., McDade, K., Henstridge, C. M., Spires-Jones, T. L., et al. (2021). Dysregulation in subcellular localization of myelin basic protein mRNA does not result in altered myelination in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Neurosci.* 15, 705306. doi: 10.3389/fnins.2021.705306.



- Blasco, H., Veyrat-Durebex, C., Bocca, C., Patin, F., Vourc'h, P., Kouassi Nzougnet, J., et al. (2017). Lipidomics reveals cerebrospinal-fluid signatures of ALS. *Sci. Rep.* 7, 17652. doi: 10.1038/s41598-017-17389-9.
- Boccazzi, M., Van Steenwinckel, J., Schang, A.-L., Faivre, V., Le Charpentier, T., Bokobza, C., et al. (2021). The immune-inflammatory response of oligodendrocytes in a murine model of preterm white matter injury: the role of TLR3 activation. *Cell Death Dis.* 12, 1–12. doi: 10.1038/s41419-021-03446-9.
- Bonfanti, E., Bonifacino, T., Raffaele, S., Milanese, M., Morgante, E., Bonanno, G., et al. (2020). Abnormal upregulation of GPR17 receptor contributes to oligodendrocyte dysfunction in SOD1 G93A mice. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2395. doi: 10.3390/ijms21072395.
- Brettschneider, J., Arai, K., Del Tredici, K., Toledo, J. B., Robinson, J. L., Lee, E. B., et al. (2014). TDP-43 pathology and neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 423–437. doi: 10.1007/s00401-014-1299-6.
- Bright, F., Chan, G., van Hummel, A., Ittner, L. M., and Ke, Y. D. (2021). TDP-43 and inflammation: implications for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7781. doi: 10.3390/ijms22157781.
- Buratti, E., Brindisi, A., Giombi, M., Tisminetzky, S., Ayala, Y. M., and Baralle, F. E. (2005). TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J. Biol. Chem.* 280, 37572–37584. doi: 10.1074/jbc.M505557200.
- Carmans, S., Hendriks, J. J. A., Thewissen, K., Van den Eynden, J., Stinissen, P., Rigo, J.-M., et al. (2010). The inhibitory neurotransmitter glycine modulates macrophage activity by activation of neutral amino acid transporters. *J. Neurosci. Res.* 88, 2420–2430. doi: 10.1002/jnr.22395.
- Carson, J. H., Worboys, K., Ainger, K., and Barbarese, E. (1997). Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38, 318–328.
- Chaves-Filho, A. B., Pinto, I. F. D., Dantas, L. S., Xavier, A. M., Inague, A., Faria, R. L., et al. (2019). Alterations in lipid metabolism of spinal cord linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* 9, 11642. doi: 10.1038/s41598-019-48059-7.
- Chua, J. P., De Calbiac, H., Kabashi, E., and Barmada, S. J. (2022). Autophagy and ALS: mechanistic insights and therapeutic implications. *Autophagy* 18, 254–282. doi: 10.1080/15548627.2021.1926656.
- Chung, D. C., Roemer, S., Petrucelli, L., and Dickson, D. W. (2021). Cellular and pathological heterogeneity of primary tauopathies. *Mol. Neurodegener.* 16, 57. doi: 10.1186/s13024-021-00476-x.
- Cui, Y., Masaki, K., Yamasaki, R., Imamura, S., Suzuki, S. O., Hayashi, S., et al. (2014). Extensive dysregulations of oligodendrocytic and astrocytic connexins are associated with disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J. Neuroinflammation* 11, 42. doi: 10.1186/1742-2094-11-42.
- 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. doi: 10.1002/ana.10312.

- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., et al. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011.
- Emery, B. (2010). Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330, 779–782. doi: 10.1126/science.1190927.
- Eykens, C., Nonneman, A., Jensen, C., Iavarone, A., Van Damme, P., Van Den Bosch, L., et al. (2018). Conditional deletion of *Id2* or *Notch1* in oligodendrocyte progenitor cells does not ameliorate disease outcome in SOD1G93A mice. *Neurobiol. Aging* 68, 1–4. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.03.026.
- Eykens, C., Rossaert, E., Duqué, S., Rué, L., Bento-Abreu, A., Hersmus, N., et al. (2021). AAV9-mediated gene delivery of MCT1 to oligodendrocytes does not provide a therapeutic benefit in a mouse model of ALS. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 20, 508–519. doi: 10.1016/j.omtm.2021.01.006.
- Fang, L.-P., and Bai, X. (2023). Oligodendrocyte precursor cells: the multitaskers in the brain. *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.* 475, 1035–1044. doi: 10.1007/s00424-023-02837-5.
- Fatima, M., Tan, R., Halliday, G. M., and Kril, J. J. (2015). Spread of pathology in amyotrophic lateral sclerosis: assessment of phosphorylated TDP-43 along axonal pathways. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 47. doi: 10.1186/s40478-015-0226-y.
- Feldman, E.L., Goutman, S.A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M.G., Shaw, P.J., et al. (2022). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 400, 1363–1380. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01272-7.
- Ferraiuolo, L., Meyer, K., Sherwood, T. W., Vick, J., Likhite, S., Frakes, A., et al. (2016). Oligodendrocytes contribute to motor neuron death in ALS via SOD1-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E6496–E6505. doi: 10.1073/pnas.1607496113.
- Ferrer, I., Aguiló García, M., Carmona, M., Andrés-Benito, P., Torrejón-Escribano, B., Garcia-Esparcia, P., et al. (2019). Involvement of oligodendrocytes in Tau seeding and spreading in tauopathies. *Front. Aging Neurosci.* 11, 112. doi: 10.3389/fnagi.2019.00112.
- Forno, L. S., Langston, J. W., Herrick, M. K., Wilson, J. D., and Murayama, S. (2002). Ubiquitin-positive neuronal and tau 2-positive glial inclusions in frontotemporal dementia of motor neuron type. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 103, 599–606. doi: 10.1007/s00401-001-0509-1.
- Forsberg, K., Andersen, P. M., Marklund, S. L., and Brännström, T. (2011). Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 121, 623–634. doi: 10.1007/s00401-011-0805-3.
- French, H. M., Reid, M., Mamontov, P., Simmons, R. A., and Grinspan, J. B. (2009). Oxidative Stress Disrupts Oligodendrocyte Maturation. *J. Neurosci. Res.* 87, 3076–3087. doi: 10.1002/jnr.22139.
- Fröhlich, D., Kuo, W. P., Frühbeis, C., Sun, J.-J., Zehendner, C. M., Luhmann, H. J., et al. (2014). Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130510. doi: 10.1098/rstb.2013.0510.
- Fumagalli, M., Bonfanti, E., Daniele, S., Zappelli, E., Lecca, D., Martini, C., et al. (2015). The ubiquitin ligase Mdm2 controls oligodendrocyte maturation by intertwining mTOR with G protein-

- coupled receptor kinase 2 in the regulation of GPR17 receptor desensitization. *Glia* 63, 2327–2339. doi: 10.1002/glia.22896.
- Ghasemi, M., and Brown, R. H. (2018). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8, a024125. doi: 10.1101/cshperspect.a024125.
- Grossman, M., Seeley, W. W., Boxer, A. L., Hillis, A. E., Knopman, D. S., Ljubenov, P. A., et al. (2023). Frontotemporal lobar degeneration. *Nat. Rev. Dis. Primer* 9, 40. doi: 10.1038/s41572-023-00447-0.
- Guan, Y., Wang, X., Wang, H., Kawagishi, K., Ryu, H., Huo, C., et al. (2007). Increased stem cell proliferation in the spinal cord of adult amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *J. Neurochem.* 102, 1125–1138. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04610.x.
- Guzman, K., Brink, L., Rodriguez-Bey, G., Bodnar, R., Kuang, L., Xing, B., et al. (2020). Conditional depletion of Fus in oligodendrocytes leads to motor hyperactivity and increased myelin deposition associated with Akt and cholesterol activation. *Glia* 68, 2040–2056. doi: 10.1002/glia.23825.
- Haim, L. B., Schirmer, L., Zulji, A., Sabeur, K., Tiret, B., Ribon, M., et al. (2021). Evidence for glutamine synthetase function in mouse spinal cord oligodendrocytes. *Glia* 69, 2812–2827. doi: 10.1002/glia.24071.
- Han, H., Myllykoski, M., Ruskamo, S., Wang, C., and Kursula, P. (2013). Myelin-specific proteins: a structurally diverse group of membrane-interacting molecules. *BioFactors Oxf. Engl.* 39, 233–241. doi: 10.1002/biof.1076.
- Han, S., Gim, Y., Jang, E.-H., and Hur, E.-M. (2022). Functions and dysfunctions of oligodendrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 16:1083159. doi: 10.3389/fncel.2022.1083159.
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., et al. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17071. doi: 10.1038/nrdp.2017.71.
- Hasan, R., Humphrey, J., Bettencourt, C., Newcombe, J., NYGC ALS Consortium, Lashley, T., et al. (2022). Transcriptomic analysis of frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 pathology reveals cellular alterations across multiple brain regions. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 143, 383–401. doi: 10.1007/s00401-021-02399-9.
- Hayashi, S., Sakurai, A., Amari, M., and Okamoto, K. (2001). Pathological study of the diffuse myelin pallor in the anterolateral columns of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 188, 3–7. doi: 10.1016/S0022-510X(01)00531-7.
- Higuchi, M., Zhang, B., Forman, M. S., Yoshiyama, Y., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M.-Y. (2005). Axonal degeneration induced by targeted expression of mutant human Tau in oligodendrocytes of transgenic mice that model glial tauopathies. *J. Neurosci.* 25, 9434–9443. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2691-05.2005.
- Ho, W. Y., Chang, J.-C., Lim, K., Cazenave-Gassiot, A., Nguyen, A. T., Foo, J. C., et al. (2021). TDP-43 mediates SREBF2-regulated gene expression required for oligodendrocyte myelination. *J. Cell Biol.* 220, e201910213. doi: 10.1083/jcb.201910213.
- Hoell, J. I., Larsson, E., Runge, S., Nusbaum, J. D., Duggimpudi, S., Farazi, T. A., et al. (2011). RNA targets of wild-type and mutant FET family proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1428–1431. doi: 10.1038/nsmb.2163.

- Hosokawa, M., Kondo, H., Serrano, G. E., Beach, T. G., Robinson, A. C., Mann, D. M., et al. (2017). Accumulation of multiple neurodegenerative disease-related proteins in familial frontotemporal lobar degeneration associated with granulin mutation. *Sci. Rep.* 7, 1513. doi: 10.1038/s41598-017-01587-6.
- Huang, M., Modeste, E., Dammer, E., Merino, P., Taylor, G., Duong, D. M., et al. (2020). Network analysis of the progranulin-deficient mouse brain proteome reveals pathogenic mechanisms shared in human frontotemporal dementia caused by GRN mutations. *Acta Neuropathol. Commun.* 8, 163. doi: 10.1186/s40478-020-01037-x.
- Ishii, T., Kawakami, E., Endo, K., Misawa, H., and Watabe, K. (2017). Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by time-lapse imaging. *PLoS One* 12, e0179375. doi: 10.1371/journal.pone.0179375.
- Ito, Y., Ofengeim, D., Najafov, A., Das, S., Saberi, S., Li, Y., et al. (2016). RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. *Science* 353, 603–608. doi: 10.1126/science.aaf6803.
- Ito, Y., Yamada, M., Tanaka, H., Aida, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., et al. (2009). Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol. Dis.* 36, 470–476. doi: 10.1016/j.nbd.2009.08.013.
- Iuchi, K., Takai, T., and Hisatomi, H. (2021). Cell death via lipid peroxidation and protein aggregation diseases. *Biology* 10, 399. doi: 10.3390/biology10050399.
- Jackson, J., Bianco, G., Rosa, A. O., Cowan, K., Bond, P., Anichtchik, O., et al. (2018). White matter tauopathy: transient functional loss and novel myelin remodeling. *Glia* 66, 813–827. doi: 10.1002/glia.23286.
- Kahlson, M. A., and Colodner, K. J. (2016). Glial Tau pathology in tauopathies: functional consequences. *J. Exp. Neurosci.* 9, 43–50. doi: 10.4137/JEN.S25515.
- Kang, S. H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D. W., Ostrow, L. W., et al. (2013). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* 16, 571–579. doi: 10.1038/nn.3357.
- Kato, D., Wake, H., Lee, P. R., Tachibana, Y., Ono, R., Sugio, S., et al. (2020). Motor learning requires myelination to reduce asynchrony and spontaneity in neural activity. *Glia* 68, 193–210. doi: 10.1002/glia.23713.
- Kim, S., Chung, A.-Y., Na, J. E., Lee, S. J., Jeong, S. H., Kim, E., et al. (2019). Myelin degeneration induced by mutant superoxide dismutase 1 accumulation promotes amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 67, 1910–1921. doi: 10.1002/glia.23669.
- Kolind, S., Sharma, R., Knight, S., Johansen-Berg, H., Talbot, K., and Turner, M. R. (2013). Myelin imaging in amyotrophic and primary lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 14, 562–573. doi: 10.3109/21678421.2013.794843.
- Kovacs, G. G., Majtenyi, K., Spina, S., Murrell, J. R., Gelpi, E., Höftberger, R., et al. (2008). White matter tauopathy with globular glial inclusions: a distinct sporadic frontotemporal lobar degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 963–975. doi: 10.1097/NEN.0b013e318187a80f.
- Kovacs, G. G., van der Zee, J., Hort, J., Kristoferitsch, W., Leitha, T., Höftberger, R., et al. (2016). Clinicopathological description of two cases with SQSTM1 gene mutation associated with

- frontotemporal dementia. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 36, 27–38. doi: 10.1111/neup.12233.
- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., and Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. *Cells* 8, 1424. doi: 10.3390/cells8111424.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K. R., Vu, A. Q., Baughn, M., Huelga, S. C., et al. (2012). Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat. Neurosci.* 15, 1488–1497. doi: 10.1038/nn.3230.
- Langseth, A. J., Kim, J., Ugolino, J. E., Shah, Y., Hwang, H.-Y., Wang, J., et al. (2017). Cell-type specific differences in promoter activity of the ALS-linked C9orf72 mouse ortholog. *Sci. Rep.* 7, 5685. doi: 10.1038/s41598-017-05864-2.
- Lee, J. Y., Harney, D., Kwok, J., Larance, M., and Don, A. S. (2023). The major TMEM106B dementia risk allele affects TMEM106B protein levels and myelin lipid homeostasis in the ageing human hippocampus. *Mol. Neurodegener.* 18, 63. doi: 10.1186/s13024-023-00650-3.
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., et al. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487, 443–448. doi: 10.1038/nature11314.
- Ling, S.-C., Polymenidou, M., and Cleveland, D. W. (2013). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79, 416–438. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.033.
- Liu, C., Li, D., Lv, C., Gao, Z., Qi, Y., Wu, H., et al. (2020). Activation of the Notch signaling pathway and cellular localization of Notch signaling molecules in the spinal cord of SOD1-G93A ALS model mice. *Neuroscience* 432, 84–93. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.02.034.
- Lok, H. C., and Kwok, J. B. (2021). The role of white matter dysfunction and leukoencephalopathy/leukodystrophy genes in the aetiology of frontotemporal dementias: implications for novel approaches to therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2541. doi: 10.3390/ijms22052541.
- Lorente Pons, A., Higginbottom, A., Cooper-Knock, J., Alrafiah, A., Alofi, E., Kirby, J., et al. (2020). Oligodendrocyte pathology exceeds axonal pathology in white matter in human amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pathol.* 251, 262–271. doi: 10.1002/path.5455.
- Mackenzie, I. R. A., Ansorge, O., Strong, M., Bilbao, J., Zinman, L., Ang, L.-C., et al. (2011). Pathological heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations: two distinct patterns correlating with disease severity and mutation. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 122, 87–98. doi: 10.1007/s00401-011-0838-7.
- Marian, O. C., Teo, J. D., Lee, J. Y., Song, H., Kwok, J. B., Landin-Romero, R., et al. (2023). Disrupted myelin lipid metabolism differentiates frontotemporal dementia caused by GRN and C9orf72 gene mutations. *Acta Neuropathol. Commun.* 11, 52. doi: 10.1186/s40478-023-01544-7.
- Maruyama, T., Tanabe, S., Uyeda, A., Suzuki, T., and Muramatsu, R. (2023). Free fatty acids support oligodendrocyte survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 17, 1081190. doi: 10.3389/fncel.2023.1081190.
- Mejzini, R., Flynn, L. L., Pitout, I. L., Fletcher, S., Wilton, S. D., and Akkari, P. A. (2019). ALS genetics, mechanisms, and therapeutics: where are we now? *Front. Neurosci.* 13, 1310. doi: 10.3389/fnins.2019.01310.

- Mizielinska, S., Lashley, T., Norona, F. E., Clayton, E. L., Ridler, C. E., Fratta, P., et al. (2013). C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 845–857. doi: 10.1007/s00401-013-1200-z.
- Motataianu, A., Serban, G., Barcutean, L., and Balasa, R. (2022). Oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis: synergy of genetic and environmental factors. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 9339. doi: 10.3390/ijms23169339.
- Nave, K.-A., Asadollahi, E., and Sasmita, A. (2023). Expanding the function of oligodendrocytes to brain energy metabolism. *Curr. Opin. Neurobiol.* 83, 102782. doi: 10.1016/j.conb.2023.102782.
- Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretschmar, H. A., and Mackenzie, I. R. A. (2009). A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* 132, 2922–2931. doi: 10.1093/brain/awp214.
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., et al. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133. doi: 10.1126/science.1134108.
- Niebroj-Dobosz, I., Rafałowska, J., Fidziańska, A., Gadamski, R., and Grieb, P. (2007). Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in SOD1<sup>G93A</sup> transgenic rats. *Folia Neuropathol.* 45, 236–241.
- Noda, K., Katayama, S., Watanabe, C., Yamamura, Y., and Nakamura, S. (1999). Gallyas- and tau-positive glial structures in motor neuron disease with dementia. *Clin. Neuropathol.* 18, 218–225.
- Nolan, M., Barbagallo, P., Turner, M. R., Keogh, M. J., Chinnery, P. F., Talbot, K., et al. (2021). Isolated homozygous R217X OPTN mutation causes knock-out of functional C-terminal optineurin domains and associated oligodendroglialopathy-dominant ALS–TDP. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 92, 1022–1024. doi: 10.1136/jnnp-2020-325803.
- Peng, A. Y. T., Agrawal, I., Ho, W. Y., Yen, Y.-C., Pinter, A. J., Liu, J., et al. (2020). Loss of TDP-43 in astrocytes leads to motor deficits by triggering A1-like reactive phenotype and triglial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 29101–29112. doi: 10.1073/pnas.2007806117.
- Peric, M., Nikolic, L., Andjus, P. R., and Bataveljic, D. (2021). Dysfunction of oligodendrocyte inwardly rectifying potassium channel in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 54, 6339–6354. doi: 10.1111/ejn.15451.
- Philips, T., Bento-Abreu, A., Nonneman, A., Haeck, W., Staats, K., Geelen, V., et al. (2013). Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 136, 471–482. doi: 10.1093/brain/aws339.
- Philips, T., Mironova, Y. A., Jouroukhin, Y., Chew, J., Vidensky, S., Farah, M. H., et al. (2021). MCT1 deletion in oligodendrocyte lineage cells causes late-onset hypomyelination and axonal degeneration. *Cell Rep.* 34, 108610. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108610.
- Richter-Landsberg, C., and Bauer, N. G. (2004). Tau-inclusion body formation in oligodendroglia: the role of stress proteins and proteasome inhibition. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 443–451. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2004.07.003.
- Rinholm, J. E., Hamilton, N. B., Kessar, N., Richardson, W. D., Bergersen, L. H., and Attwell, D. (2011). Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate. *J. Neurosci.* 31, 538–548. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3516-10.2011.

- Riudavets, M. A., Bartoloni, L., Troncoso, J. C., Pletnikova, O., St George-Hyslop, P., Schultz, M., et al. (2013). Familial dementia with frontotemporal features associated with M146V presenilin-1 mutation. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 23, 595–600. doi: 10.1111/bpa.12051.
- Rohan, Z., Matej, R., Rusina, R., and Kovacs, G. G. (2014). Oligodendroglial response in the spinal cord in TDP-43 proteinopathy with motor neuron involvement. *Neurodegener. Dis.* 14, 117–124. doi: 10.1159/000362929.
- Sadler, G. L., Lewis, K. N., Narayana, V. K., De Souza, D. P., Mason, J., McLean, C., et al. (2022). Lipid metabolism is dysregulated in the motor cortex white matter in amyotrophic lateral sclerosis. *Metabolites* 12, 554. doi: 10.3390/metabo12060554.
- Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H. E., Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., et al. (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 887–906. doi: 10.1007/s00401-017-1687-9.
- Scekic-Zahirovic, J., Sanjuan-Ruiz, I., Kan, V., Megat, S., De Rossi, P., Dieterlé, S. et al. (2021). Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects. *Nat. Commun.* 12, 3028. doi: 10.1038/s41467-021-23187-9.
- Schirmer, L., Möbius, W., Zhao, C., Cruz-Herranz, A., Ben Haim, L., Cordano, C., et al. (2018). Oligodendrocyte-encoded Kir4.1 function is required for axonal integrity. *eLife* 7, e36428. doi: 10.7554/eLife.36428.
- Schwenk, B. M., Hartmann, H., Serdaroglu, A., Schludi, M. H., Hornburg, D., Meissner, F., et al. (2016). TDP-43 loss of function inhibits endosomal trafficking and alters trophic signaling in neurons. *EMBO J.* 35, 2350–2370. doi: 10.15252/embj.201694221.
- Seiberlich, V., Bauer, N. G., Schwarz, L., Ffrench-Constant, C., Goldbaum, O., and Richter-Landsberg, C. (2015). Downregulation of the microtubule associated protein tau impairs process outgrowth and myelin basic protein mRNA transport in oligodendrocytes. *Glia* 63, 1621–1635. doi: 10.1002/glia.22832.
- Seilhean, D., Cazeneuve, C., Thuriès, V., Russaouen, O., Millecamps, S., Salachas, F., et al. (2009). Accumulation of TDP-43 and alpha-actin in an amyotrophic lateral sclerosis patient with the K171 ANG mutation. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 118, 561–573. doi: 10.1007/s00401-009-0545-9.
- Sirisi, S., Querol-Vilaseca, M., Dols-Icardo, O., Pegueroles, J., Montal, V., Muñoz, L., et al. (2022). Myelin loss in C9orf72 hexanucleotide expansion carriers. *J. Neurosci. Res.* 100, 1862–1875. doi: 10.1002/jnr.25100.
- Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., and Simons, M. (2019). Myelin in the central nervous system: structure, function, and pathology. *Physiol. Rev.* 99, 1381–1431. doi: 10.1152/physrev.00031.2018.
- Stieber, A., Gonatas, J. O., and Gonatas, N. K. (2000). Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal processes of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perikarya of mice expressing the SOD1(G93A) mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 177, 114–123. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00351-8.
- Takahashi, Y., Uchino, A., Shioya, A., Sano, T., Matsumoto, C., Numata-Uematsu, Y., et al. (2019). Altered immunoreactivity of ErbB4, a causative gene product for ALS19, in the spinal cord of patients with sporadic ALS. *Neuropathology* 39, 268–278. doi: 10.1111/neup.12558.

- Tang, X., Toro, A., T G, S., Gao, J., Chalk, J., Oskarsson, B., et al. (2020). Divergence, convergence, and therapeutic implications: a cell biology perspective of C9ORF72-ALS/FTD. *Mol. Neurodegener.* 15, 34. doi: 10.1186/s13024-020-00383-7.
- Thomas, E. V., Fenton, W. A., McGrath, J., and Horwich, A. L. (2017). Transfer of pathogenic and nonpathogenic cytosolic proteins between spinal cord motor neurons in vivo in chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E3139–E3148. doi: 10.1073/pnas.1701465114.
- Uchida, T., Tamaki, Y., Ayaki, T., Shodai, A., Kaji, S., Morimura, T., et al. (2016). CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. *Sci. Rep.* 6, 19118. doi: 10.1038/srep19118.
- van Es, M. A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R. J., Veldink, J. H., et al. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* 390, 2084–2098. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31287-4.
- Wang, J., Ho, W. Y., Lim, K., Feng, J., Tucker-Kellogg, G., Nave, K.-A., et al. (2018). Cell-autonomous requirement of TDP-43, an ALS/FTD signature protein, for oligodendrocyte survival and myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E10941–E10950. doi: 10.1073/pnas.1809821115.
- Wang, J., Xu, G., Li, H., Gonzales, V., Fromholt, D., Karch, C., et al. (2005). Somatodendritic accumulation of misfolded SOD1-L126Z in motor neurons mediates degeneration: alphaB-crystallin modulates aggregation. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2335–2347. doi: 10.1093/hmg/ddi236.
- Xu, G.-Y., Liu, S., Hughes, M. G., and McAdoo, D. J. (2008). Glutamate-induced losses of oligodendrocytes and neurons and activation of caspase-3 in the rat spinal cord. *Neuroscience* 153, 1034–1047. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.02.065.
- Yang, C., Qiao, T., Yu, J., Wang, H., Guo, Y., Salameh, J., et al. (2022). Low-level overexpression of wild type TDP-43 causes late-onset, progressive neurodegeneration and paralysis in mice. *PLoS ONE* 17, e0255710. doi: 10.1371/journal.pone.0255710.
- Yuen, T. J., Silbereis, J. C., Griveau, A., Chang, S. M., Daneman, R., Fancy, S. P. J., et al. (2014). Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis. *Cell* 158, 383–396. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.052.
- Yusuf, I. O., Qiao, T., Parsi, S., Tilvawala, R., Thompson, P. R., and Xu, Z. (2022). Protein citrullination marks myelin protein aggregation and disease progression in mouse ALS models. *Acta Neuropathol. Commun.* 10, 135. doi: 10.1186/s40478-022-01433-5.
- Zhang, Y., Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zameer, A., Snyder, B. J., Ge, C., et al. (2009). Notch1 signaling plays a role in regulating precursor differentiation during CNS remyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19162–19167. doi: 10.1073/pnas.0902834106.
- Zhou, X., Nicholson, A. M., Ren, Y., Brooks, M., Jiang, P., Zuberi, A., et al. (2020). Loss of TMEM106B leads to myelination deficits: implications for frontotemporal dementia treatment strategies. *Brain J. Neurol.* 143, 1905–1919. doi: 10.1093/brain/awaa141.



**Table 1.** Alterations observed in ALS and FTD patients.

Patient	Mutation	Inclusions in mature oligodendrocytes	OPCs	Myelin	References
ALS	Sporadic and familial cases	TDP43 and misfolded SOD1	Reactive changes and aberrant proliferation	Water accumulation, diffuse myelin pallor and demyelination, decrease in MBP *, sphingomyelin and HMGCR mRNA, and increase in cholesterol esters	Hayashi et al., 2001; Cutler et al., 2002; Kang et al., 2013; Kolind et al., 2013; Philips et al., 2013; Brettschneider et al., 2014; Rohan et al., 2014; Fatima et al., 2015; Blasco et al., 2017; Ho et al., 2021; Sadler et al., 2022
ALS	<i>SOD1</i>			Decrease in MBP in grey matter motor cortex and spinal cord	Kang et al., 2013
ALS	Optineurin			Myelin pallor and spongiosis in motor cortex	Nolan et al., 2021
ALS	Angiogenin	TDP43, ubiquitin and p62			Seilhean et al., 2009
ALS/FTD	<i>C9orf72</i>	p62, TDP43 and expanded RNA repeats into cytoplasmic RNA foci	Increase in number	Demyelination in motor cortex and lumbar spinal cord, decrease in MBP and sphingolipid in cortex but no alteration in cholesterol	DeJesus-Hernandez et al., 2011; Kang et al., 2013; Mizielinska et al., 2013; Kovacs et al., 2016; Lorente-Pons et al., 2020; Marian et al., 2023
FTD	Sporadic and familial cases	Tau protein, TDP43, p62, LDLR, FUS	Increased oligodendroglial signature	Decrease in gene expression related to cholesterol metabolism	Neuman et al., 2009; Kahlson and Colodner, 2016; Hosokawa et al., 2017; Ho et al., 2021; Hasan et al., 2022
FTD	Sequestosome 1	TDP43, p62			Kovacs et al., 2016
FTD	Progranulin			Decrease in MBP, CNP PLP and sphingolipids, increase in cholesterol esters in white matter	Marian et al., 2023
FTD	<i>TMEM106B</i>			Decrease in sphingolipids	Lee et al., 2023
IPSC-derived oligodendrocytes of ALS patients	<i>TARDBP</i>	TDP43			Barton et al., 2021
IPSC-derived oligodendrocytes of ALS patients	<i>SOD1</i> , <i>C9orf72</i>	<i>FIG4</i> , Misfolded SOD1			Ferraiuolo et al., 2016

\* MBP content was normal in white matter, according to Sadler et al., 2022.

**Table 2.** Alterations observed in animal models of ALS and FTD.

Animal model	Feature		Mature oligodendrocytes	OPCs	Myelin	References
<i>SOD1</i> <sup>G93A</sup> mice	Mice carrying <i>SOD1</i> mutation	human G93A	TDP43, SOD1, MBP and PLP inclusions, thicker cell bodies, elongated and hypertrophic morphology, expression of apoptotic marker, and reduced number	Aberrant proliferation and impaired differentiation	Decreased g-ratio, water accumulation, vacuolization, lamellae detachment, loss of compaction, myelin debris, decrease in MCT1 and MBP, and increase in cholesterol esters	Kang et al., 2013; Philips et al., 2013; Skang et al., 2013; Cui et al., 2014; Ferraiuolo et al., 2016; Chaves-Filho et al., 2019; Bonfanti et al., 2020; Peric et al., 2021; Yusuf et al., 2022
Cultured oligodendrocytes of <i>SOD1</i> <sup>G93A</sup> mice	Cells carrying <i>SOD1</i> mutation	human G93A	Increase in number and extension of branched processes			Bonfanti et al., 2020
<i>SOD1</i> <sup>G93A</sup> rats	Rats carrying human G93A <i>SOD1</i> mutation				Desorganisation and decompaction, decrease in PLP, DM-20, phospholipids and cholesterol but no alteration decrease in MBP	Niebroj-Dobosz et al., 2007
<i>SOD1</i> <sup>G93A</sup> zebrafish	Zebrafish carrying human <i>SOD1</i> mutation	human G93A	Expression of apoptotic marker	Aberrant proliferation		Kim et al., 2019
<i>Fus</i> <sup>ANLS</sup> mice	Mice expressing truncated <i>FUS</i> lacking nuclear localization signal		<i>FUS</i> cytoplasmic delocalisation and increase in number in white matter spinal cord		Decreased g-ratio, decrease in myocilin, Pmp2 and Prx expression	Scekic-Zahirovic et al., 2017
Oligo- <i>Fus</i> -KO mice	Mice lacking oligodendrocyte <i>Fus</i>				Decreased g-ratio, and increase in cholesterol and HMGCR	Guzman et al., 2020
Oligo- <i>Tardbp</i> -KO mice	Mice lacking oligodendrocyte <i>Tardbp</i>		Decrease in number in grey matter		Decrease in <i>Mbp</i> , <i>Mag</i> , <i>Mog</i> , and <i>Cnp</i> expression	Ho et al., 2021
<i>Tardbp</i> <sup>WT</sup> mice	Mice expressing wild-type <i>Tardbp</i>		Increase in TDP43 and expression of apoptotic marker		Demyelination in white matter spinal cord and decrease in MBP	Yang et al., 2022
<i>PFN1</i> <sup>C71G</sup> mice	Mice carrying human <i>PFN1</i> mutation	human C71G	MBP and PLP inclusions			Yusuf et al., 2022
<i>Tmem106b</i> -KO mice	Mice lacking <i>Tmem106b</i>		Decrease in number		PLP1 delocalization	Zhou et al., 2020

## Figure legends

**Figure 1.** Main mechanisms underlying myelin alterations in ALS and FTD.

**(A)** Myelination in a healthy oligodendrocyte. The myelin sheath is made of proteins, such as MBP, and lipids, cholesterol being the most abundant. *MBP* mRNA is transported along oligodendroglial protrusions toward the myelin sheath where it is locally translated. Cholesterol is synthesized by the oligodendrocyte but is also provided by neighboring astrocytes through oligodendroglial LDL receptors. Astrocytes also provide metabolites to the oligodendrocyte through the monocarboxylate transporter MCT1. The oligodendrocyte receives glutamate signals from the axon through AMPA receptors to adapt the ensheathment to axonal needs.

**(B)** Altered myelination in an ALS/FTD oligodendrocyte. Pathological aggregates form in the cytoplasm of the oligodendrocyte. LDL receptors, together with other proteins, are trapped in these aggregates, leading to impaired cholesterol import. Oligodendroglial lipid metabolism is also impaired, leading to a global decrease in lipid content in the myelin sheath. *MBP* mRNA transport toward the myelin sheath is altered resulting in a decrease in MBP content. MBP is also trapped in cytoplasmic aggregates. The myelin sheath degenerates and myelin debris stimulate phagocytosis. Decreased MCT1 expression results in impaired nutrient import into the oligodendrocyte. Oligodendroglial AMPA receptor dysregulation triggers aberrant Ca<sup>2+</sup> permeability and glutamate excitotoxicity.

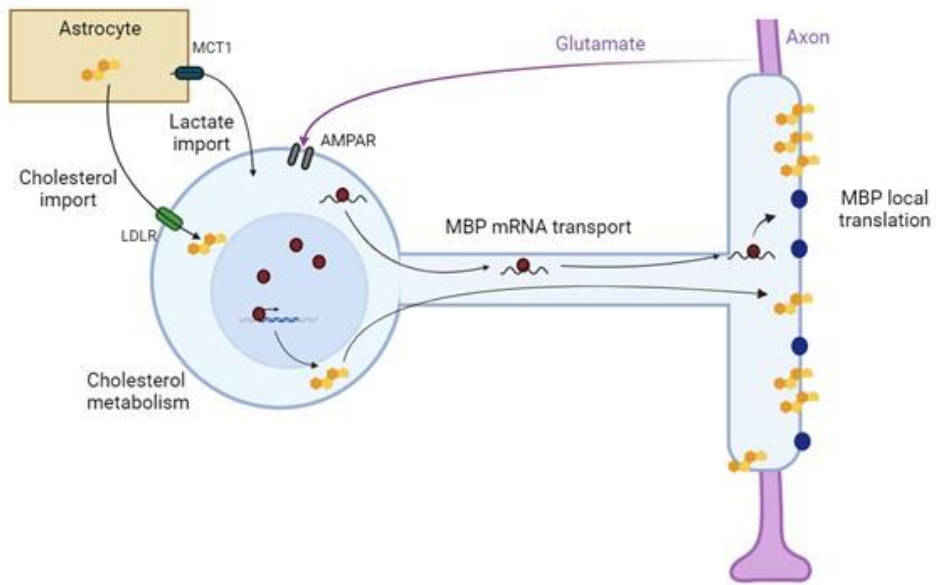
**Figure 2.** Main mechanisms underlying axonal impairment caused by oligodendrocytes in ALS and FTD.

**(A)** Functional interactions between oligodendrocytes and axons in a healthy CNS. Oligodendrocytes ensure K<sup>+</sup> clearance from the periaxonal space to enable the propagation of action potentials. K<sup>+</sup> is taken up by the oligodendrocyte through inwardly rectifying Kir4.1 channels, and transferred to the astrocyte through connexins. Oligodendrocytes also provide metabolic support to axons by supplying lactate through MCT1 transporters.

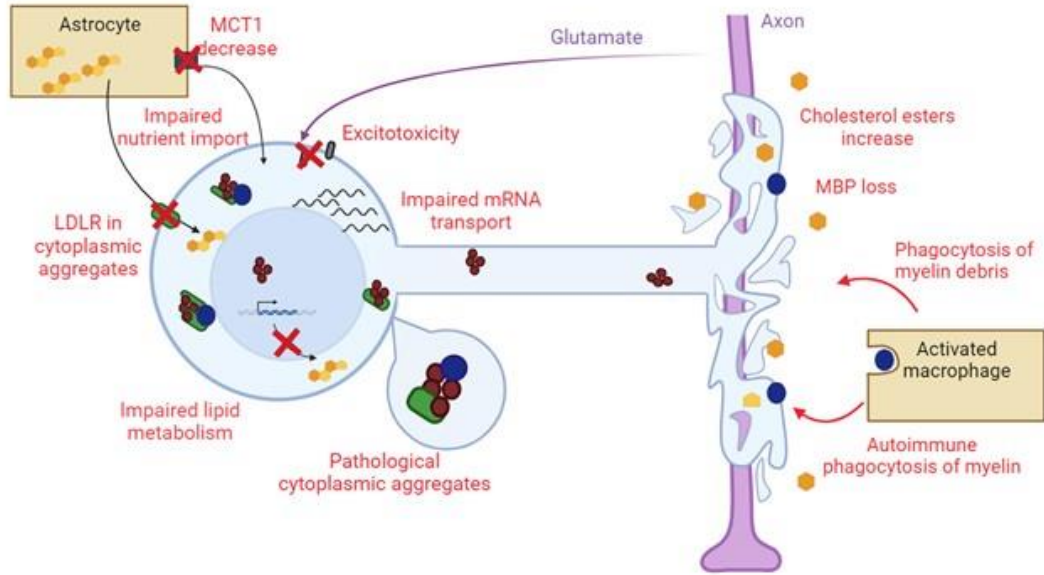
**(B)** Altered functional interactions between oligodendrocytes and axons in ALS/FTD. Decreases in Kir4.1 channels and connexin lead to impaired K<sup>+</sup> clearance in the periaxonal space resulting in impaired action potential generation. Decreased MCT1 expression leads to failure in metabolic supply to the axon. Pathological aggregates formed in the cytoplasm of oligodendrocytes may diffuse from into the axon. All together, these alterations results in axonal damage and degeneration.






**Figure 1.**





**A.**



**B.**

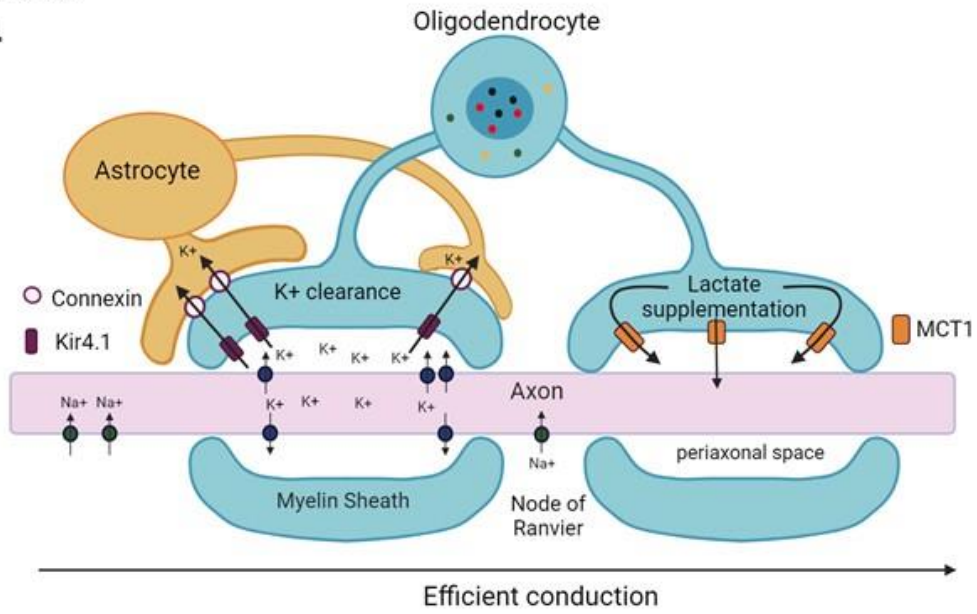


-  MBP mRNA
-  MBP protein
-  Protein implicated in ALS and FTD pathologies (TDP43 ; C9orf72...)
-  Pathological aggregates
-  Cholesterol

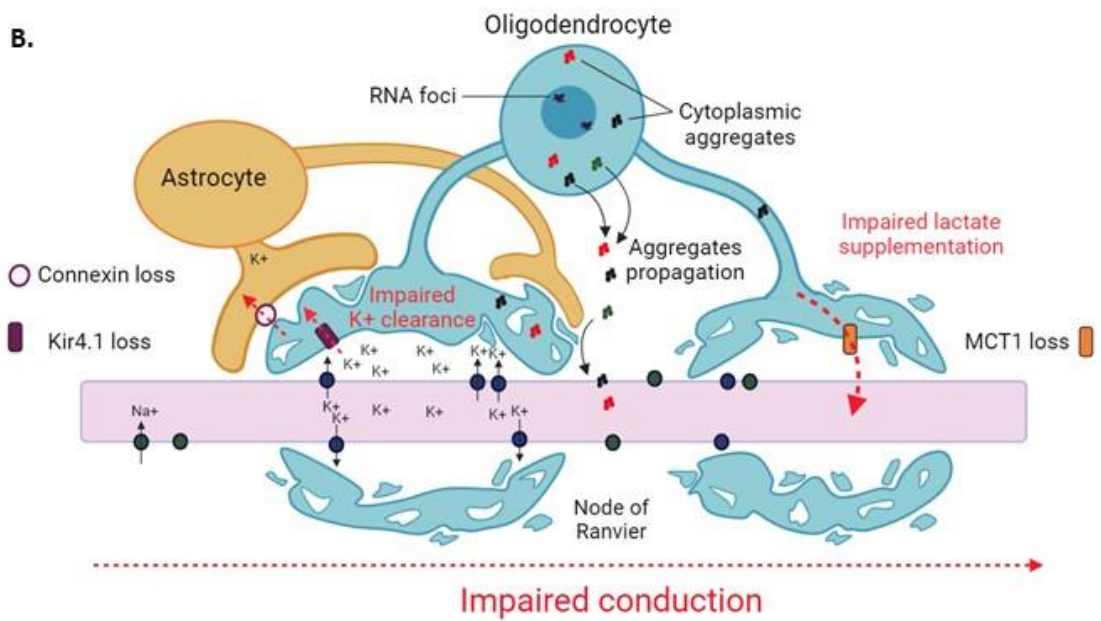
-  Cholesterol esters
-  LDL Receptor
-  MCT1 transporter
-  AMPA receptor

**Figure 2.**

**A.**



**B.**



ALS/FTD linked proteins

● TDP43

● FUS

● C9orf72

● SOD1

○ Connexin

■ Kir4.1

■ MCT1

## Problématique et objectifs de la thèse

Ainsi, cette vaste introduction nous a permis de voir que la SLA-DFT est une pathologie dramatique qui entraîne la perte progressive des neurones et la dégradation rapide de l'état du patient. Parmi les mécanismes cellulaires identifiés dans ce syndrome, le métabolisme de l'ARN est lourdement incriminé. Notamment la protéine FUS, grand partenaire des acides nucléiques, est impliquée dans certaines formes de SLA et de DFT dans lesquelles elle est retrouvée mutée, délocalisée et pathologiquement agrégée dans le cytoplasme. Cependant, bien que la contribution des oligodendrocytes dans le développement de ce syndrome soit de plus en plus évidente, peu d'études se sont intéressées à la manière dont la mutation ou la délocalisation de FUS affectent le fonctionnement des oligodendrocytes, et dans quelle mesure ces altérations jouent un rôle l'apparition d'un phénotype moteur ou cognitif. Pourtant, les oligodendrocytes sont particulièrement sensibles au dysfonctionnement du métabolisme de l'ARN, essentiel à une myélinisation correcte. Dans cette mesure, la question de leur implication dans la SLA-DFT liées à FUS se pose.

En nous appuyant sur le modèle murin de SLA-DFT liée à FUS précédemment développée au laboratoire (pan-*mFus*), l'objectif de cette étude a donc été tout d'abord d'identifier les altérations des oligodendrocytes et de la myéline présentes dans ce modèle. Puis, à l'aide d'un nouveau modèle exprimant la mutation *Fus* uniquement dans les oligodendrocytes matures (Oligo-*mFus*) nous avons cherché à déterminer le caractère cellulaire-autonome de ces altérations, et enfin à comprendre si ces altérations sont suffisantes pour entraîner l'apparition de phénotypes de type SLA et/ou DFT. En parallèle, nous avons également cherché à comprendre par quels mécanismes la mutation *Fus* pouvait entraîner des altérations oligodendrocytaires, et par quels mécanismes ces altérations oligodendrocytaires pouvaient affecter les neurones et leur fonctionnement.

# Résultats



# **I. Publication 2: la délocalisation cytoplasmique de la protéine FUS dans les oligodendrocytes matures altère la myéline et affecte le comportement social d'un modèle murin de SLA/DFT**

Les oligodendrocytes sont essentiels à la survie et au bon fonctionnement des neurones notamment via la formation de la gaine de myéline. Une altération des oligodendrocytes ou de leurs fonctions peut entraîner le dysfonctionnement voire la mort des neurones, et est impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives ou neurologiques (Galvez-Contreras et al., 2020; Han et al., 2022; Yu et al., 2022). De plus, un nombre croissant de publications montre l'implication des oligodendrocytes dans le développement de la SLA et la DFT (cf. article de revue Jamet, 2024). Bien que la mutation *FUS* entraîne des formes précoces et fulgurantes de SLA, et que sa délocalisation cytoplasmique soit associée à des DFT précoces (Snowden et al., 2011), aucune étude ne s'est intéressée à l'implication des oligodendrocytes dans le développement d'un syndrome SLA-DFT lié à la mutation *FUS*. La mutation *FUS* affecte-t-elle les oligodendrocytes et leurs fonctions ? Et si oui, ces altérations sont-elles suffisantes pour entraîner l'apparition de phénotypes moteurs ou cognitifs similaires à ceux observés chez les patients FUS-SLA et FUS-DFT ?

Pour répondre à ces questions, nous avons créé un modèle murin n'exprimant la mutation *Fus* que dans les oligodendrocytes matures, sous forme hétérozygote ou homozygote (respectivement souris Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et souris Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup>) sous le contrôle du promoteur du gène *Cnp*, et nous avons fait une étude longitudinale de cette nouvelle lignée à l'échelle moléculaire, cellulaire et comportementale. Les résultats de cette étude se trouvent ci-annexés sous forme de manuscrit.

En résumé, nous montrons que la mutation *Fus* ubiquitaire des souris pan-*mFus* entraîne des altérations de la structure et de la composition de la gaine de myéline visibles à un âge symptomatique, mais que les gaines de myéline et oligodendrocytes sont déjà vulnérables à un âge présymptomatique dans la mesure où une démyélinisation précoce des animaux

pan-*mFus* entraîne l'apparition accélérée des symptômes moteurs. Nous montrons également que la mutation *Fus* spécifiquement oligodendrocytaire est suffisante pour provoquer certaines des altérations de la myéline observées chez les souris pan-*mFus*, ainsi que pour entraîner l'apparition d'un phénotype cognitif de type DFT, sans apparition d'un phénotype moteur.

In preparation

Specific delocalisation of ALS/FTD-linked FUS in mouse oligodendrocytes affects myelin and social behavior

Marguerite JAMET <sup>1</sup>, and collaborators

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, INSERM, Strasbourg Translational Neuroscience and Psychiatry, STEP, UMR\_S 1329, Strasbourg, France

\* Corresponding authors:

gonzalez@unistra.fr, Idupuis@unistra.fr

Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, CRBS

STEP, UMR\_S 1329

1 rue Eugène Boeckel

CS 60026

67084 Strasbourg Cedex

France

## Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD) are fatal neurodegenerative disorders that share clinical, neuropathological and genetic overlap. Cytoplasmic delocalization and aggregation of the DNA/RNA binding protein fused in sarcoma (FUS) is found in a proportion of ALS and FTD cases. Our previous studies suggested the presence of affected oligodendrocytes in transgenic mice lacking the nuclear localization signal (NLS) of FUS. Here we used Cre/loxP-dependent mouse lines expressing the *Fus*<sup>ΔNLS</sup> mutation specifically in mature oligodendrocytes to determine the effects of both ubiquitous and oligodendroglial FUS delocalization at the molecular, cellular and behavioral level. We show that the ubiquitous *Fus*<sup>ΔNLS</sup> mutation leads to thicker myelin sheaths and higher myelin basic protein (MBP) content in 10-month-old pan-*mFus* mice. At earlier stages, these mice, although asymptomatic, are already vulnerable to cuprizone-induced demyelination displaying accelerated motor deficit. We also show that the specific expression of *Fus*<sup>ΔNLS</sup> mutation in mature oligodendrocytes is sufficient to cause increased *Mbp* expression at mRNA and protein level in 10-month-old oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> and oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice. These mice also developed alterations in social and motivation behavior, as evaluated with the resident-intruder and marble burying tests, respectively. Overall, our findings strongly suggest the contribution of oligodendrocytes to neurological manifestations reminiscent of that observed in the ALS/FTD syndrome.

**Keywords:** amyotrophic lateral sclerosis, cuprizone, frontotemporal dementia, fused in sarcoma, motor behavior, myelin, myelin basic protein, oligodendrocyte, social behavior

## Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD) are fatal neurodegenerative disorders. ALS is the most common motor neuron disease in adults and is primarily characterized by the degeneration of upper and lower motor neurons resulting in progressive paralysis and death within two to five years after diagnosis (Feldman et al., 2022). FTD is the second most frequent cause of dementia in adults under 65 years old and is primarily characterized by the degeneration of the frontal and temporal lobes, leading to diverse clinical manifestations, including progressive alterations in social behavior and personality, and language and speech difficulties. Life expectancy ranges from 7 to 13 years from onset in cases without motor involvement (Grossman, 2023). Up to 15% of ALS patients exhibit concomitant alterations in behavior and cognition typical of FTD, and around 12% of FTD cases meet criteria of ALS motor impairment (van Es, 2017). *Post-mortem* samples reveals mislocalized cytoplasmic aggregates containing transactive response DNA binding protein 43 (TDP43) in neurons and glial cells in the vast majority of ALS cases and in almost the half of FTD cases (Rademakers et al., 2012). Moreover, expansions of a hexanucleotide repeat in chromosome 9 open reading frame 72 (*C9orf72*) are the most common genetic cause responsible for about 10% of all ALS and FTD cases (Abramzon, 2020). For all these reasons, it is commonly accepted that ALS and FTD are the two ends of a disease continuum characterized by motor and cognitive alterations affecting different parts of the central nervous system.

Mutations in the nuclear localization signal (NLS) of fused in sarcoma (*FUS*) are responsible for about 5% of familial ALS cases and result in cytoplasmic FUS mislocalization and aggregation. Strikingly, FUS aggregates are also observed in up to 10% of FTD cases in the absence of *FUS* mutations (Rademakers et al., 2012; Deng et al., 2014). FUS is a nuclear DNA/RNA binding protein that regulates different facets of DNA and RNA metabolism, including DNA repair and transcription, and RNA splicing, transport and translation. In previous studies, we generated a disease-relevant heterozygous knock-in mouse model that ubiquitously expresses a truncated form of FUS lacking the NLS. These *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice showed FUS mislocalized in the cytoplasm of motor neurons and late-onset motor neuron loss, which was associated with mild motor and cognitive alterations reminiscent of ALS and FTD phenotypes. Interestingly, removing the *Fus*<sup>ΔNLS</sup> mutation specifically from motor neurons prevented their loss, although the motor deficit still persisted, suggesting the implication of, at least in part, other cell types.

In fact, our preliminary findings showed changes in the expression of several myelin-related genes in the spinal cord and morphological alterations of peripheral myelin, pointing to myelinating cells as potential contributors to FUS-mediated disease (Scekic-Zahirovic et al., 2016, 2017, 2021).

Oligodendrocytes are the myelinating cells in the central nervous system responsible for the rapid propagation of electrical signals along the axons and providers of trophic support (Stadelmann et al., 2019). Growing evidence has accumulated during the last decade supporting their implication in ALS and FTD. The majority of the studies have been conducted on animal models carrying mutations in disease-related genes, such as superoxide dismutase 1 (*SOD1*) and *TARDBP* (the gene encoding TDP43) (Jamet, 2024). However, little is known about the contribution of *Fus* mutations in oligodendrocytes to the development of motor and/or cognitive alterations typical of ALS and FTD. To gain insight into this question, we built on our previously obtained *Fus*<sup>ANLS/+</sup> mice to generate a Cre/loxP-dependent model in which the *Fus*<sup>ANLS</sup> mutation was expressed specifically in mature oligodendrocytes, and we determined the effects of the oligodendroglial *Fus*<sup>ANLS</sup> mutation on these transgenic lines at the molecular, cellular and behavioral level.

## **Materials and methods**

### **Compliance with ethical standards**

Animal experiments were approved by the local ethical committee of the University of Strasbourg under reference numbers APAFIS#28838-2020122816004071 and APAFIS#27875-2020103013311691. Mice were bred in our animal facility of the Faculty of Medicine at the University of Strasbourg, with a regular 12-h light and dark cycle (light on at 7:00 am) under constant conditions (21 ± 1 °C and 60% humidity). Standard laboratory rodent chow and water were available *ad libitum*. Mice were socially-housed in stable groups with compatible cage mates. They were handled by authorized investigators. Only males were used. Behavioral tests were conducted blind to mouse genotypes. For biochemical and histological experiments, animals were anesthetized with intraperitoneal injection of 80 mg/kg ketamine (Imalgène 1000, Merial) and 20 mg/kg xylazine (Rompun 2%, Bayer). The depth of anesthesia was assessed by an inability to remain upright, loss of movement, loss of blink reflex, muscle relaxation and loss of response to reflex stimulation by toe pinch. Movement of the chest wall and observation of abdominal movements were used to assess respiratory rate.

## Generation and genotyping of transgenic mouse lines

Wild-type (WT)  $Fus^{+/+}$  and  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice (referred to as pan-m $Fus$  mice) were generated in a C57Bl/6 J background as described previously (Scekic-Zahirovic et al., 2016).  $Fus^{NLS-fl/fl}$  males, with  $Fus$  NLS flanked by loxP sequences, were obtained on demand at the *Institut Clinique de la Souris* (Illkirch-Graffenstaden, France) and were crossed with  $Cnp^{cre/+}$  females in which the open reading frame of  $Cnp1$  (encoding oligodendrocyte-specific 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase, or CNP) was replaced by the coding region of the *cre* recombinase gene expressed under the control of the  $Cnp1$  regulatory sequence (kind gift of Prof. Dr. K.A. Nave, Max Planck Institute of Multidisciplinary Sciences, Göttingen, Germany) (Lappe-Siefke et al., 2003). The obtained  $Fus^{NLS-fl/+}Cnp^{cre/+}$  mice were then crossed again with  $Fus^{NLS-fl/fl}$  mice to generate  $Fus^{NLS-fl/fl}Cnp^{+/+}$  and  $Fus^{NLS-fl/+}Cnp^{+/+}$  mice (both referred to as WT mice), as well as heterozygous  $Fus^{NLS-fl/+}Cnp^{cre/+}$  mice (referred to as oligo-m $Fus^{NLS/+}$  mice) and homozygous  $Fus^{NLS-fl/fl}Cnp^{cre/+}$  mice (referred to as oligo-m $Fus^{NLS/NLS}$  mice). Genotyping was performed by DNA PCR on ear fragments taken before 10 days of age. To detect  $Fus^{NLS-fl/+}$  and  $Fus^{NLS-fl/fl}$  alleles, primers were as follows: forward 5'-GCAGATACTGAGGAGAGAGAACTGG-3' and reverse 5'-CCACTGTTATCTACACATGATCACCC-3'. To detect WT and  $Cnp^{cre}$  alleles, primers were as follows: forward 5'-GCCTTCAAAGTCCATCTC-3', reverse 5'-CCCAGCCCTTTTATTACCAC-3' and forward 5'-CATAGCCTGAAGAACGAGA-3'. Crossing  $Cnp^{cre/+}$  females with homozygous Ai14 males, having a loxP-flanked STOP cassette preventing transcription of tdTomato (The Jackson Laboratory), generated  $Cnp^{cre/+}$ -tdTomato mice expressing fluorescent tdTomato following Cre-mediated recombination under the control of the  $Cnp1$  regulatory sequence.

## Inverted grid test

The inverted grid test was used to evaluate muscle strength as described previously (Scekic-Zahirovic et al., 2017). Tests were conducted in the morning, and mice were habituated for 30 min to the test room prior testing. The wire grid hanging time was defined as the time that it takes the mouse to fall down from the inverted grid placed at 35 cm of height to a cage containing wood chips and was measured visually with a stopwatch. The test was repeated 3 times during 5 min with 5 min break between tests. The holding impulse was calculated as the hanging time normalized with mouse body mass and gravitational force.

### **Open field test**

The open field test was used to evaluate locomotor activity during 15-min sessions in an open arena (72 × 72 × 36 cm) as described previously (Scekic-Zahirovic et al., 2021). Tests were conducted in the afternoon. Each mouse was placed in the center of the arena and allowed to freely move while being video recorded. Data were analyzed offline with EthoVision XT software (Noldus Information Technology). The total distance moved in the arena and mean velocity of movement were calculated.

### **Resident-intruder test**

The resident-intruder test was used to evaluate social interactions in the home cage as described previously (Gascon et al., 2014). Tests were conducted in the morning. Resident and intruder mice were housed individually for 2 days before the task. After 30 min of habituation to the test room, the intruder mouse (a WT non-littermate of same age and sex, and similar body mass) was introduced in the home cage, and the two mice were allowed to interact for 5 min while videotaped. Social activities, such as time spent investigating, grooming, following and sniffing, were considered, whereas aggressive activities, such as attacks, bites and tail rattles, were discarded. The total physical interaction was as defined as the time during which the resident mouse actively explores the intruder and was quantified separately for each minute and for the whole time of the task. For experiments with repeated measures, intruder mice were changed between time points.

### **Light/dark test**

The light/dark test was used to evaluate anxiety as described previously (Scekic-Zahirovic et al., 2021), using a box that consisted of two compartments: the light compartment was brightly illuminated and represents 2/3 of the box, and the dark compartment was opaque and represented the remainder 1/3 of the box. The two compartments were separated by a wall with a square opening. Tests were conducted in the afternoon. Each mouse was placed alone in the light compartment and allowed to freely move from one compartment to the other for a 10-min period while being video recorded. The number of transitions from one compartment to the other and the time spent in each compartment were analyzed offline with EthoVision XT software.



### **Rotarod test**

The rotarod test was used to evaluate motor coordination as described previously (Vernay et al., 2016), using a 7650 rotarod (Ugo Basile). Tests were conducted in the morning after 30 min of habituation to the test room. Each trial consisted of 300 seconds with an acceleration period (4-20 rpm during 150 seconds) followed by 150 seconds at constant maximal speed. The time that it takes the mouse to fall down from the rolling rod was measured. Results are the mean of three consecutive trials performed at intervals of 5 min.

### **Marble burying test**

The marble burying test was used to evaluate obsessive/compulsive behavior as described previously (Keszycki et al., 2023). Tests were conducted in the afternoon in the dark. After 30 min of habituation to the test room, each mouse was placed alone for 30 min in a cage containing a clean bedding of 3 cm deep and 12 regularly spaced marbles. A marble was considered buried if 2/3 of it had been covered, and the number of buried marbles was noted.

### **Cuprizone treatment**

WT and pan-*mFus* mice 5 months old were treated with cuprizone, which is a copper chelator known to induce the death of mature oligodendrocytes and to trigger subsequent demyelination, particularly in the white matter of the brain with minimal changes in the spinal cord (Sen et al., 2020). According to previous recommendations (Gingele et al., 2020), mice were fed with either powdered pellets or 0.3% w/w cuprizone (Merck Millipore) mixed with powdered pellets. The treatment was given for 6 weeks, and cuprizone was renewed every 2-3 days.

### **CUT&Tag analysis**

Isolation of hippocampal non-neuronal NeuN<sup>-</sup> nuclei was achieved following the Fluorescent Activated Nuclei Sorting method (Tzeplaeff et al., 2023). The genome-wide H3K27ac chromatin state was determined by CUT&Tag analysis as described previously in detail (Paiva et al., 2022), using a method based on digitonin-induced cell permeabilization and concanavalin A-coated magnetic beads immobilization, followed by incubation with a primary antibody against H3K27ac (Abcam). Library preparation was conducted using Nextera primers (Illumina). Reads (paired-end) were mapped to the

*Mus musculus* genome (assembly mm10) using Bowtie2. Peak calling was done with SICER v1.1. Detected peaks were combined to get the union of all peaks using the tool BedTools merge v2.30.0. Differentially bound regions were detected using SICER v1.1 and annotated relative to genomic features using Homer v4.11.1. An FDR score less than  $1 \times 10^{-5}$  was used for further analysis.

### **Electron microscopy**

Electron microscopy was performed as described previously (Scekic-Zahirovic et al., 2021). Anesthetized mice were perfused transcardially with 2% paraformaldehyde/2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Service) in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 following a standard surgical procedure. Then, brain slices were obtained and postfixed with 1% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M phosphate buffer for 1 h. Samples were dehydrated in graded ethanol series and embedded in Embed 812 (Electron Microscopy Service) according to a standard protocol. Ultrathin sections were cut with an ultramicrotome (Leica Biosystems), stained with 1% uranyl acetate in 50% ethanol and examined with an H7500 transmission electron microscope (Hitachi High Technologies Corporation) equipped with an AMT digital camera (Hamamatsu Photonics). Fifty randomly selected microphotographs per animal were taken from the corpus callosum oriented in a coronal plane. The ratio of the inner-to-outer diameter of myelinated axons, referred to as the g-ratio, was calculated as an index of the thickness of the myelin sheath. Fibers on the edge of the picture and those impacted by artefacts or poorly oriented were omitted. Diameter analysis was performed using Image J software by averaging 8 radial measurements per fiber.

### **RT-qPCR analysis**

Gene expression was determined by RT-qPCR as described previously (Scekic-Zahirovic et al., 2017). Cortex and spinal cord samples were harvested from mice 5 and 10 months old, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Sigma-Aldrich) following manufacturer's instructions. One  $\mu\text{g}$  of total RNA was reverse transcribed using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad), and qPCR was performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), according to standard protocols. Quantification was carried out with CFX Manager software (Bio-Rad). The expression of housekeeping *Pol2*, *Tbp*, and *Actn* genes was used to compute a normalization factor using Genorm software (Vandesompele et al., 2002). Primer sequences were as follows: *Mbp* forward 5'-CAGAAGAGACCCTCACAGCG-3' and reverse 5'-CTCTGTGCCTTGGGAGGAAG-3'; *Pol2* forward 5'-GCTGGGAGACATAGCACCA-3' and reverse 5'-TTACTCCCCTGCATGGTCTC-3'; *Tbp* forward 5'-CCAATGACTCCTATGACCCCTA-3' and reverse 5'-CAGCCAAGATTCACGGTAGAT-3'; *Actn* forward 5'-CCACCAGTTCGCCATGGAT-3' and reverse 5'-GGCTTTGCACATGCCGGAG-3'.

### **Western blot analysis**

Cortex, including the corpus callosum, and spinal cord samples were harvested from mice 10 months old, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Total proteins were extracted in RIPA buffer following a standard procedure as described previously (Scekic-Zahirovic et al., 2016). Protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Pierce). Equal amounts of protein were separated using 4–20% SDS-PAGE (Bio-Rad) and transferred onto a  $0.45\ \mu\text{m}$  nitrocellulose membrane using a semi-dry Transblot Turbo system (Bio-Rad). After saturation with 10% non-fat milk in phosphate buffer saline (PBS), membranes were incubated with rat anti-MBP antibody (Merck Millipore) diluted 1:1000 in 3% non-fat milk, followed by goat anti-rat secondary antibody (Rockland) diluted 1:5000. Blots were revealed by enhanced chemiluminescence (Luminata Forte Kit, Merck Millipore) and analyzed using a Molecular Imager Chemidoc XRS detection system (Biorad).

### **Peroxidase immunohistochemistry**

Anesthetized mice were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 following a standard surgical procedure. Brains were dissected, post-fixed by immersion in 4% paraformaldehyde overnight and stored until processing. After embedding in 4% agar, serial sections of 40 µm thick were obtained using a S2000 vibratome (Leica Biosystems). Antigen retrieval was achieved by incubation with 10 mM sodium citrate buffer at pH 6 for 30 min at 80 °C. Endogenous peroxidases were inactivated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. After treating with blocking solution containing 5% horse serum and 0.5% Triton X-100 in PBS for 1 h, sections were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies prepared in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% normal goat serum, as follows: chicken anti-MBP (Invitrogen) diluted 1:700, rabbit anti-PLP (Abcam) diluted 1:500 or mouse anti-NeuN (Merck Millipore) diluted 1:250. Then, samples were incubated for 1 h at room temperature with, respectively, biotinylated donkey anti-chicken, donkey anti-rabbit and donkey anti-mouse secondary antibodies (Jackson) diluted 1:500 in PBS containing 0.1% Triton X-100. Immunostaining was revealed using the horseradish peroxidase Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) and 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) following a standard protocol. The enzymatic reaction was stopped by adding PBS, and sections were mounted with DPX mounting medium (Sigma-Aldrich). Photographs were taken from the ventral primary motor cortex on both sides of the brain using an Eclipse Ci-Lplus microscope equipped with a plan Apo x20 objective (Nikon). The intensity of the staining was measured with Fiji software.

### **Immunofluorescence**

Serial sections were obtained and processed as explained above. Then, sections were incubated overnight at 4 °C with goat anti-FUS 839N (Bethyl) diluted 1:100, guinea pig anti-NeuN (Synaptic Systems) diluted 1:200 and rabbit anti-CA-II (kind gift of Dr. S. Ghandour, University of Strasbourg) diluted 1:100. Donkey anti-rabbit Alexa-555, donkey anti-guinea pig Alexa-488 and donkey anti-goat Alexa-647 secondary antibodies (Jackson) were diluted 1:500. Nuclei were labeled with Hoechst solution (Sigma-Aldrich) diluted 1:1000 for 5 min, and sections were mounted with Mowiol mounting medium (Sigma-Aldrich). Single-layer images were acquired using a confocal SP5 microscope (Leica Microsystems GmbH) and analyzed with ImageJ software. CNP immunolabeling in *Cnp<sup>cre/+</sup>-tdTomato* mice was carried out with a mouse anti-CNP antibody (Abcam).

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 8 software (GraphPad). Unless otherwise indicated, data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. To achieve normalization for statistical analysis, data were systematically transformed by applying  $y=\log(y)$ . Graphs represent raw data before transformation. Tests are indicated in the figure legends, and results were considered significant if  $p < 0.05$ .

## Results

### The epigenetic signature of myelin-specific genes is altered in non-neuronal cells of pan-m*Fus* mice

Cytoplasmic mislocalization of FUS is found in a non-negligible proportion of patients with ALS and FTD, and our previous studies showed that such accumulation of FUS is also present in the spinal cord and frontal cortex of pan-m*Fus* mice, a heterozygous knock-in model that ubiquitously expresses a truncated form of FUS relevant to ALS and FTD (Scekic-Zahirovic et al., 2016, 2017, 2021). Since FUS neuropathology also appears in the hippocampus of FUS-linked FTD patients, we recently wished to investigate the effects of mutant FUS on chromatin remodeling processes that occur during memory formation, and we observed an increase of epigenetic marks, including H3K27ac, associated with active gene transcription in hippocampal neurons of pre-symptomatic 5-months old pan-m*Fus* mice (Tzeplaëff et al., 2023). In the present study, we extended these findings by investigating if mutant FUS could also affect the H3K27ac histone mark, as an index of transcriptionally active chromatin, in hippocampal non-neuronal NeuN<sup>-</sup> cells. Detection of the regions differentially bound to H3K27ac showed more H3K27ac-depleted genes in NeuN<sup>-</sup> nuclei of pan-m*Fus* mice than that of WT littermates (**Figure 1A**). In addition, myelination and axon ensheathment were among the most affected biological processes in the set of 1575 H3K27ac-depleted genes (**Figure 1B**). A genome browser visualization of H3K27ac peaks confirmed the decrease in acetylation in several myelin-specific genes, including *Mag*, *Myrf*, *Mog*, *Plp*, *Sox10*, *Olig2* and *Mbp* (**Figure 1C**).

### **The myelin sheath and MBP content are altered in pan-*mFus* mice**

The fact that part of the epigenetic modifications observed in hippocampal non-neuronal cells in pan-*mFus* mice concerned genes specifically expressed in oligodendrocytes prompted us to evaluate the general aspect of the myelin sheath. To this aim, we examined myelinated axons in the corpus callosum of mice at 10 months of age, when mild motor and cognitive alterations should be expected to occur (Scekic-Zahirovic et al., 2017, 2021). The number of axons having a thicker myelin sheath was higher in pan-*mFus* mice compared to WT littermates (**Figure 2A, B**). Accordingly, the g-ratio of individual axons and averaged g-ratio in pan-*mFus* mice were significantly lower than in WT mice, indicating thicker myelin sheaths irrespective of axon calibers (**Figure 2C**). The process of myelin compaction by oligodendrocytes is mainly dependent on myelin basic protein (MBP) (Stadelmann et al., 2019). *Mbp* mRNA levels were significantly reduced in brain (including cortex and corpus callosum) of 10-month-old pan-*mFus* mice compared to WT littermates but no difference was observed in spinal cord (**Figure 2D**). In contrast, we found a significant increase in MBP content in both brain and spinal cord of pan-*mFus* mice (**Figure 2E, F**).

### **Motor behavior is altered late in pan-*mFus* mice**

To evaluate if the modifications detected in the myelin sheath of pan-*mFus* mice could affect behavioral tasks related to ALS or FTD, we first assessed motor performance using the inverted grid test. Measures of body mass showed that pan-*mFus* mice had a general lower body mass with a significant interaction between the effects of genotype and age on gain weight (**Figure 3A**). The inverted grip test revealed a significant decrease in the holding impulse of 10-month-old pan-*mFus* mice compared to WT littermates, indicating a loss of muscle strength only at that age (**Figure 3B, E**). Total distance moved and velocity of movement in an open field arena were not significantly affected in pan-*mFus* mice at 4 (**Figure 3C, D**) or 10 months of age (**Figure 3F, G**), indicating the absence of a deficit in overall ambulatory ability.

### **Social behavior is not altered late in pan-*mFus* mice**

We assessed social behavior using the resident-intruder test. Pan-*mFus* mice spent the same time as WT mice interacting with the intruder mouse at 4 and 10 months of age (**Figure 4A, B**). Analysis of the responses at 1-min intervals revealed a significant interaction between the effects of genotype and time on interaction at 10 months of age ( $F_{x,x}=x$ ,  $p=0.0146$ ), indicating that pan-*mFus* mice, in contrast to WT

littermates, showed more interest for the intruder mouse at least during the late phase of the test, despite the general downward trend observed over time in both groups of animals (**Figure 4A, B**). To evaluate if the social behavior of mice could be affected by anxiety, we submitted 10-month-old WT and pan-*mFus* mice to the light/dark test, and we did not find any difference (**Figure 4C**).

### **Pan-*mFus* mice exhibit an earlier motor deficit when affected by cuprizone-induced demyelination**

The previous experiments demonstrated that pan-*mFus* mice do not seem to display pronounced neurological defects. To evaluate if they could respond differently under stress conditions, we treated 4-month-old WT and pan-*mFus* mice with 0.3% cuprizone for 6 weeks, which is known to cause the death of mature oligodendrocytes and subsequent demyelination (Gingele et al., 2020; Sen et al., 2020). As expected, a general decrease in body mass confirmed the efficacy of the treatment in the two groups of mice (**Figure 5A**). Then, we examined motor coordination in the rotarod test before and after 6 weeks of cuprizone treatment. Both WT and pan-*mFus* mice treated with cuprizone exhibited a significant decrease in the hanging time on the rolling rotarod compared to non-treated mice (**Figure 5B**). These findings were associated at the histological level with significant decreases in intensity of immunostaining in the corpus callosum and close cortical areas against MBP and proteolipid protein (PLP), the two most abundant proteins in the myelin sheath (**Figure 5C-F**). Quantification of MBP content in brain lysates revealed that the loss of MBP induced by cuprizone was more noticeable in pan-*mFus* mice than in WT littermates, mainly because of the high levels of MBP detected in non-treated pan-*mFus* mice (**Figure 6A, B**).

We further performed resident-intruder and inverted grid tests to evaluate social behavior and motor performance in response to cuprizone-induced demyelination. Non-treated pan-*mFus* mice showed a trend toward hypersociability compared to non-treated WT littermates. As a consequence, the interaction time with the intruder mouse in cuprizone-treated pan-*mFus* mice was significantly lower than in non-treated littermates. This difference was not observed in WT mice (**Figure 6C**). Measures of holding impulse in the inverted grid test revealed a significant interaction between the effects of treatment and genotype. Thus, while cuprizone administration had no effect in WT mice, pan-*mFus* mice showed a significant decrease in holding impulse after 6 weeks of cuprizone treatment compared to

non-treated littermates (**Figure 6D**). Along with this effect, cuprizone caused a significant decrease in the number of cortical neurons in pan-*mFus* mice compared to non-treated littermates, but it had no effect in WT mice (**Figure 6E, F**). Overall, these findings strongly suggest that pan-*mFus* mice at a pre-symptomatic age are more prone to manifest motor alterations than healthy animals in response to a demyelinating insult. This vulnerability seems to be the consequence of oligodendrocytes and neurons fragilized by mutant FUS.

### **Oligo-*mFus* mice exhibit FUS delocalization in mature oligodendrocytes**

To evaluate if the alterations observed in pan-*mFus* mice could be explained, at least in part, by the presence of mutant FUS specifically in mature oligodendrocytes, we generated oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> and oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice that express the *Fus*<sup>ΔNLS</sup> mutation only in these cells. First, we assessed the specificity of the model in *Cnp*<sup>cre/+</sup>-tdTomato mice expressing fluorescent tdTomato following Cre-mediated recombination under the control of the *Cnp1* regulatory sequence. Pictures of whole brain slices showed intense CNP immunofluorescence in typical regions enriched in white matter, indicating the presence of myelinated axons. The tdTomato signal was more diffuse and distributed in similar areas but also present in other regions in contrast to CNP labeling (**Figure 7A**). Then, we analyzed in more detail the localization of FUS in both oligodendrocytes and neurons. Quantification of the ratio between cytoplasmic and nuclear FUS immunolabeling in cells identified by neuronal or oligodendroglial markers revealed a significant increase in the amount of cytoplasmic FUS in callosal oligodendrocytes of oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> and oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice compared to WT littermates (**Figure 7B, C**). We did not observe differences in cortical neurons (**Figure 7D, E**). Overall, these findings validate the expected cytoplasmic delocalization of mutant FUS in mature oligodendrocytes but also suggest its relative presence in regions other than white matter.

### **Oligodendroglial mutant FUS alters *Mbp* expression**

To evaluate if the increase in MBP content observed in pan-*mFus* mice could be due to the presence of mutant FUS specifically in mature oligodendrocytes, we measured *Mbp* expression in cortex and spinal cord of 10-month-old WT and oligo-*mFus* mice. *Mbp* mRNA was significantly increased in the cortex of oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> mice, and showed trends to increase in both tissues of oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice (**Figure**



**8A).** At the protein level, MBP content was significantly increased in cortex and spinal cord of oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> and oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice compared to WT littermates (**Figure 8B, C**). We also counted the number of mature oligodendrocytes in the corpus callosum and close cortical areas and, in general, we did not observe significant differences (**Figure 8D, E**). Overall, these findings point to the expression of the *Fus*<sup>ΔNLS</sup> mutation in oligodendrocytes as being responsible for the increased levels of MBP.

### **Oligodendroglial mutant FUS triggers behavioral alterations**

To evaluate if the presence of mutant FUS specifically in mature oligodendrocytes could cause alterations in motor performance and social behavior, we submitted 4- and 10-month-old WT and oligo-*mFus* mice to a battery of tests. We did not find differences in body mass between any experimental group (**Figure 9A**). Neither oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> nor oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice developed significant loss of muscle strength in the inverted grid test (**Figure 9B, E**). Similarly, no differences were observed between oligo-*mFus* and WT littermates in the open field arena (**Figure 9C,D,F,G**).

We also analyzed social behavior with the resident-intruder test. The interest of oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> mice for the intruder mouse was significantly increased at 10 months of age compared to WT littermates but no differences were observed in oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice (**Figure 10A, C**). Then, we performed marble burying tests as an index of apathetic or obsessive/compulsive manifestations. No differences were found at 4 months of age (**Figure 10B**). However, the number of marbles buried at 10 months was significantly increased in oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> mice compared to WT littermates and showed a clear trend to increase in oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice (**Figure 10D**). To evaluate if these behavioral alterations could be due to anxiety, we applied the light/dark test and did not find any differences (**Figure 10E**). Overall, these findings strongly suggest that the delocalization of FUS in the cytoplasm of oligodendrocytes does not affect motor performance but is sufficient to provoke significant changes in social and individual behavior.

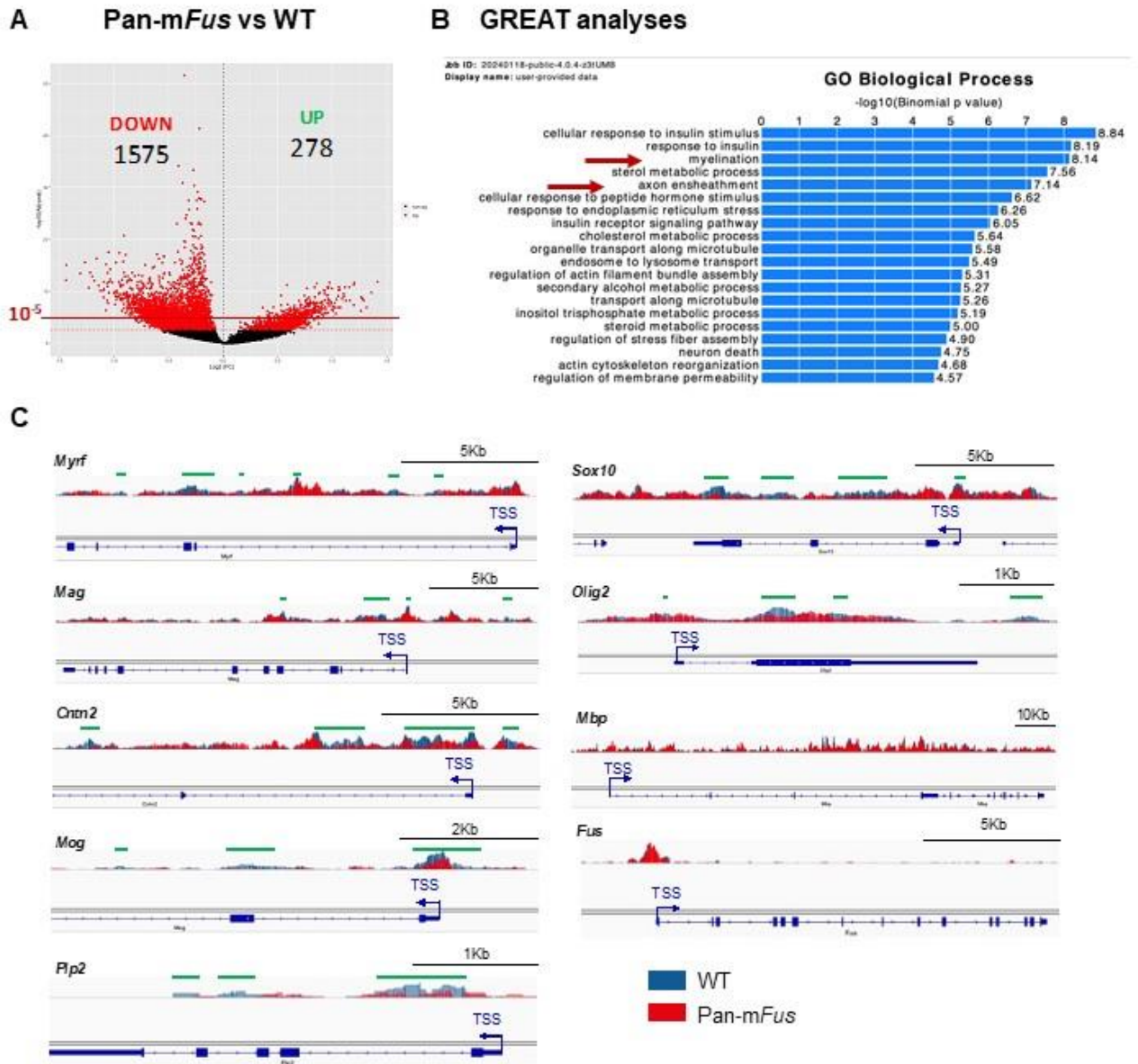
### **Discussion**

In this study, we have shown that the *Fus*<sup>ΔNLS</sup> mutation in mature oligodendrocytes was sufficient to trigger a cell-autonomous increase in *Mbp* expression, which was associated at the behavioral level with hypersociability and a compulsive trait. However, the expression of *Fus*<sup>ΔNLS</sup> mutation in oligodendrocytes

was unable to induce any kind of motor deficit, questioning the implication of these cells in developing ALS-like manifestations in mutant FUS carriers. Previous studies proposed the existence of non cell-autonomous mechanisms as being responsible for motor neuron damage and subsequent motor impairment in pan-*mFus* mice (Scekic-Zahirovic et al., 2017). Since we did not observe any motor alteration in our oligo-*mFus* mice, such non cell-autonomous mechanisms might not involve mature oligodendrocytes. Alternatively, our experimental follow-up could have been stopped too early to find out potential motor alterations in very old animals. Indeed, a delayed disease onset occurred upon removal of the ALS-linked superoxide dismutase 1 mutation from the oligodendrocyte lineage (Kang et al., 2013). One can speculate that the limited expression of a disease mutation in only one cell type could also lead to much more later symptoms. In support of this notion, we observed that young pan-*mFus* mice having no clinical signs did show a motor deficit when fragilized in response to cuprizone-induced demyelination. Other studies reported an increase in the thickness of the myelin sheath in oligodendrocyte-specific FUS-depleted mice (Guzman et al., 2020). It is therefore very likely that the increase in myelin thickness found in our pan-*mFus* model is the result of a loss of function of FUS, due to its truncated nature or its cytoplasmic delocalization, or both. That pan-*mFus* mice exhibit abnormally thick myelin sheaths and are more prone to motor disturbances in response to a demyelinating insult suggest that such a hypermyelination trait could be considered as a compensatory mechanism protecting axons and preventing the occurrence of motor impairment.

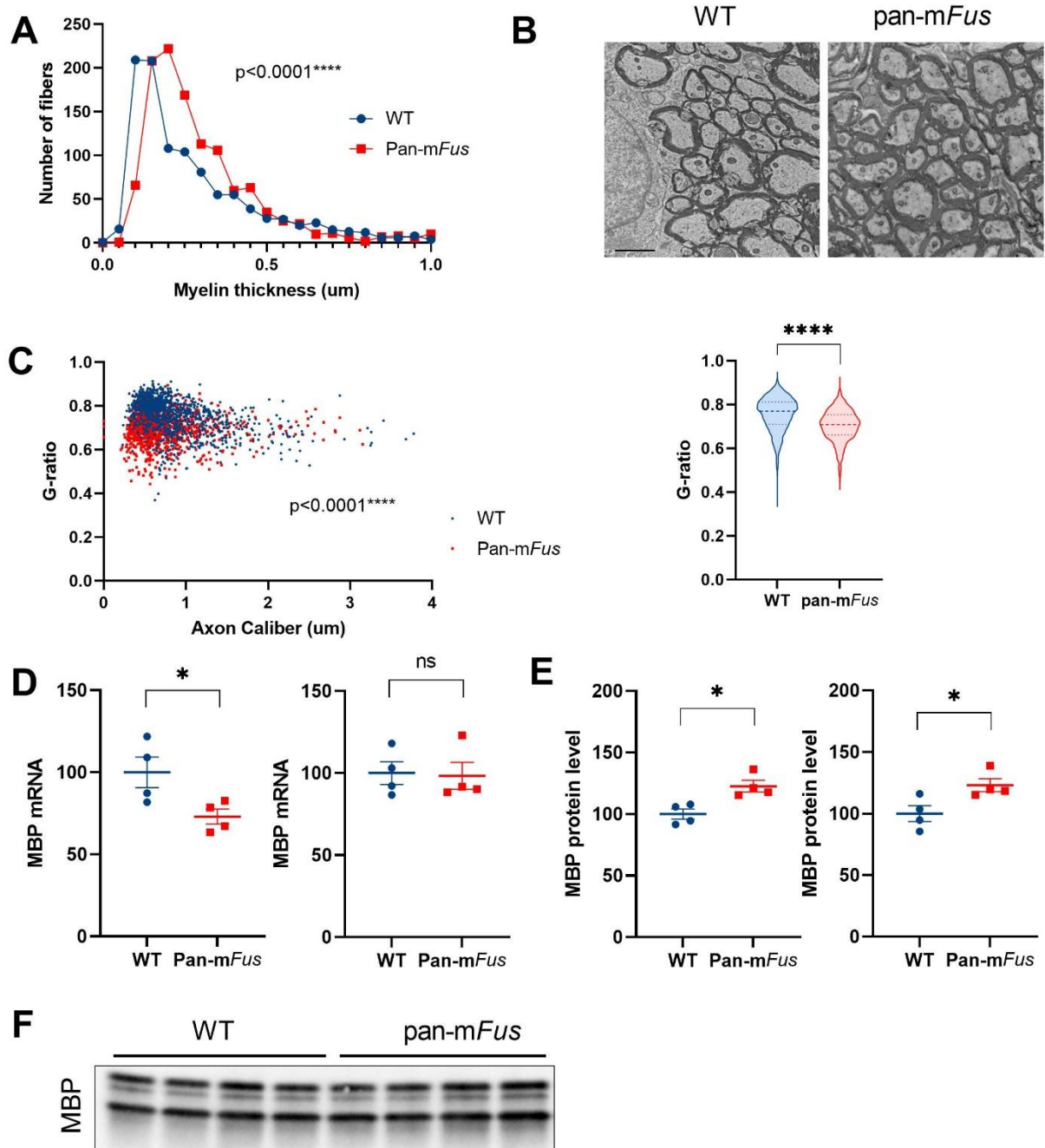
Since the specific deletion of *Fus* in mature oligodendrocytes does not trigger any increase in *Mbp* expression (Guzman et al., 2020), we hypothesize that the higher levels of MBP observed in our mouse models should be the result of a cytoplasmic gain of function of FUS that would interfere with, for instance, the processing of *Mbp* mRNA. Several lines of evidence support this hypothesis. First, it is known that very small amounts of FUS are normally present in the cytoplasm of glial cells under physiological conditions (Andersson et al., 2008). Second, the metabolism of *Mbp* mRNA is tightly regulated. Once in the cytoplasm, it is recruited by specific heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) to be incorporated into granules and transported toward the myelin sheath where it is locally translated (Müller et al., 2013). During the transport, hnRNPs assure protection against degradation and hamper translation until arrival at destination (Torvund-Jensen et al., 2018). As a ribonucleoprotein, FUS is also able to bind mRNAs and proteins, and its aberrant delocalization in glial cells could bring about

devastating consequences (Loughlin et al., 2019). In this scenario, excessive cytoplasmic FUS in oligodendrocytes may interact with the components of the transport granules and affect *Mbp* mRNA processing before or during its transport toward the myelin sheath. Several studies seem to be in agreement with this interpretation. Cytoplasmic aggregates containing MBP were observed in oligodendrocytes of mice carrying an ALS-linked *SOD1<sup>G93A</sup>* or profilin 1 mutation (Yusuf et al., 2022), suggesting that MBP can be abnormally translated in the cytoplasm. Also, accumulation of Tau protein, which is a pathological hallmark in certain cases of FTD, was shown to alter the trafficking of *Mbp* mRNA (Seiberlich et al., 2015). The link between the increases in *Mbp* expression and myelin thickness has not been elucidated yet. It is, however, recognized that MBP plays an essential role in the compaction of myelin lamellae leading to the proper formation of the myelin sheath (Stadelmann et al., 2019). Under physiological conditions, oligodendrocytes can modify the thickness of the myelin sheath and, subsequently, influence the speed of conduction along the axons and the synchrony of signals between distant neuronal locations. Disruption of this dynamic process has been associated with cognitive dysfunction (Kato et al., 2020). It is tempting to speculate that the alterations in social and motivation behavior that we observed in oligo-*mFus* mice could be related, at least in part, to the increased MBP content triggered by cytoplasmic FUS delocalization. Overall, our findings strongly suggest the contribution of oligodendrocytes to neurological manifestations reminiscent of that observed in the ALS/FTD syndrome.



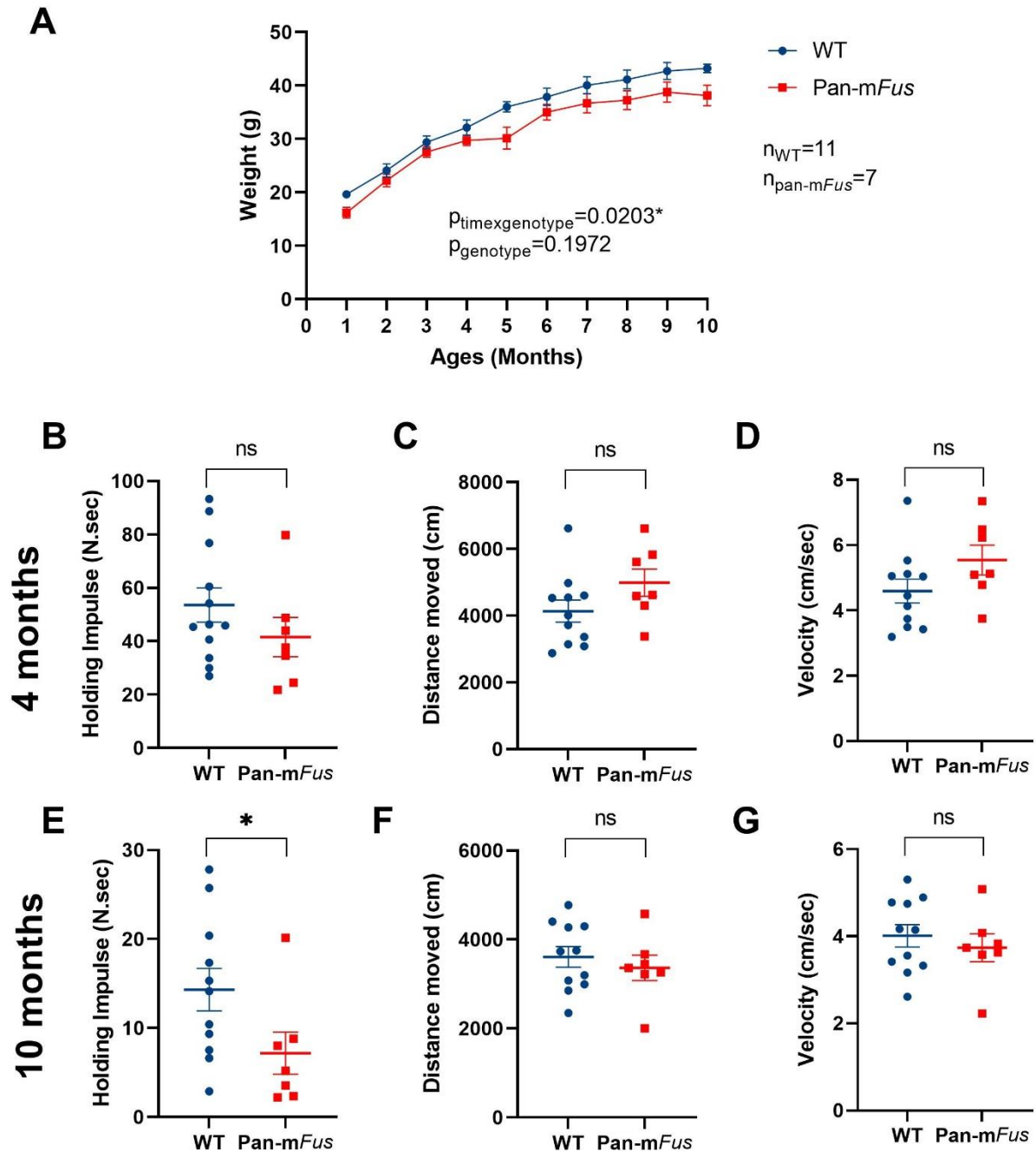
**Figure 1. H3K27ac binding in the non neuronal (NeuN-) cell population of the hippocampus in pan-mFus mice.**

**A** Volcano plot of the significant differential H3K27ac peaks showing more H3K27ac depleted genes in NeuN- nuclei of 5-month-old pan-mFus versus WT mice. The red line represents the cut-off of significance (adjusted p-value <  $10^{-5}$  using FDR with no fold-change selection). Red dots show all peaks with significant difference in H3K27ac enrichment in pan-mFus versus WT mice (n = 1 using hippocampi from two animals). **B** GREAT analysis showing biological processes of 1575 H3K27ac-depleted genes in the hippocampus of pan-mFus versus WT mice. Myelin-related pathways are indicated by red arrows. **C** Genome browser visualization of H3K27ac peaks on specific myelination-related genes (*Myrf*, *Mag*, *Cntn2*, *Mog*, *Plp2*, *Sox10*, *Olig2*, *Mbp*) and on *Fus* gene in WT (blue) and pan-mFus (red) hippocampi. Data are presented as an overlay obtained using Integrative Genomics Viewer (IGV2.3.44). Green lines indicate genomic loci bearing less H3K27ac in pan-mFus than in WT mice. TSS, transcription start site.



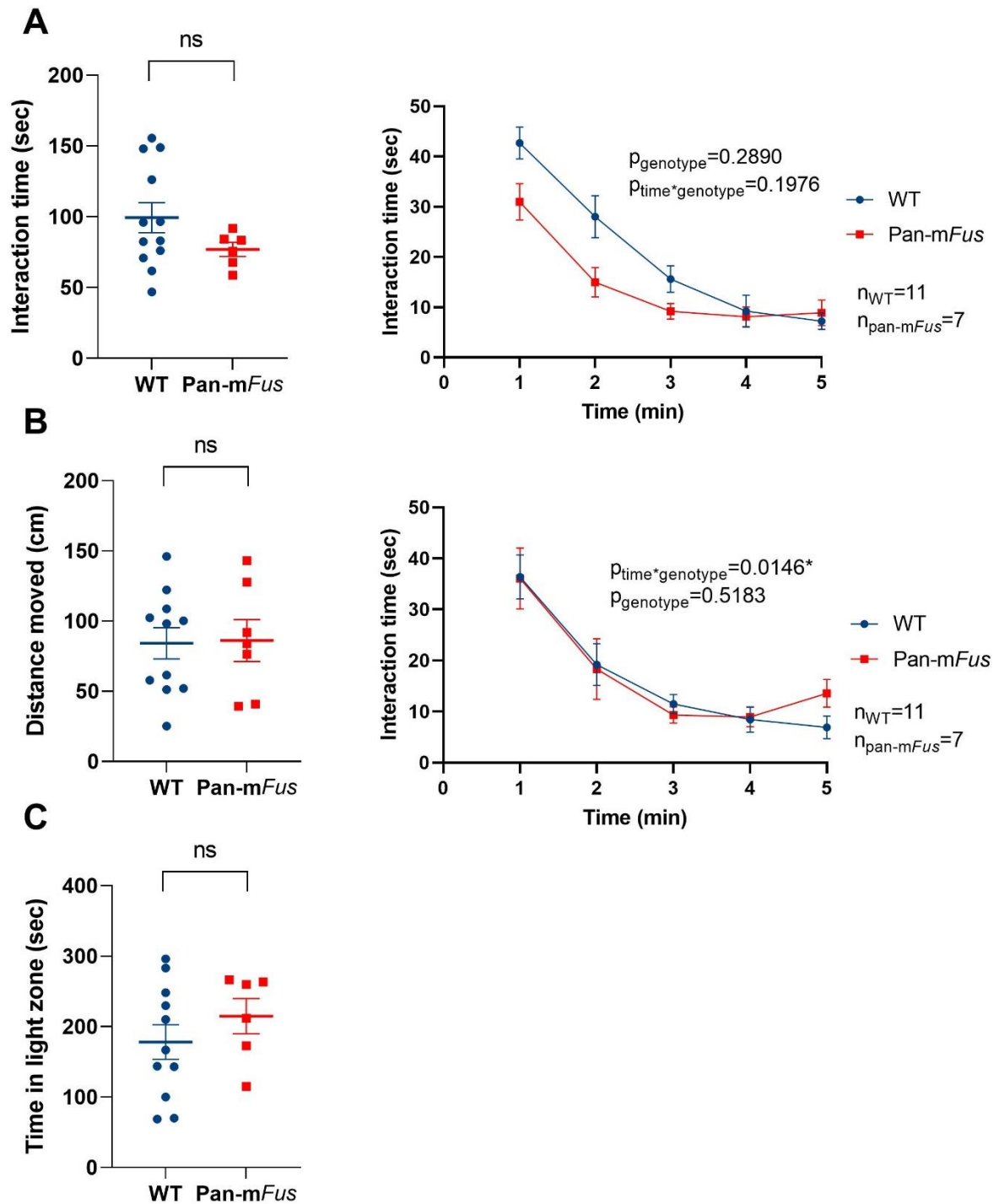
**Figure 2. Myelin ultrastructure and *Mbp* expression in pan-mFus mice.**

**A** Frequency distribution of myelinated fibers according to myelin thickness in the corpus callosum of 10-month-old WT (blue) and pan-mFus (red) mice. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , Kolmogorov-Smirnov test,  $n = 1065$  for WT mice and  $n = 1159$  for pan-mFus mice from 3 animals per group. **B** Representative electron microscopy photographs showing the aspect of myelinated fibers in the corpus callosum of 10-month-old WT and pan-mFus mice. Scale bar = 2 um. **C** Scatter plots showing the correlation between g-ratio and axon caliber (left), and violin plots representing the g-ratio (right) of myelinated fibers in the corpus callosum of 10-month-old WT (blue) and pan-mFus (red) mice. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , extra sum-of-squares F test for comparison of correlations and unpaired t-test on log-transformed data for mean g-ratio as in A. **D, E** Quantification of mRNA (D) and protein (E) levels of MBP in cortex (left) and spinal cord (right) of 10-month-old WT and pan-mFus mice. Data are expressed as percentage of WT. \*  $p < 0.05$ , unpaired t-test on log-transformed data,  $n = 4$ . **F** Representative immunoblot showing MBP in protein extracts from mice as in E.



**Figure 3. Motor phenotype in pan-*mFus* mice.**

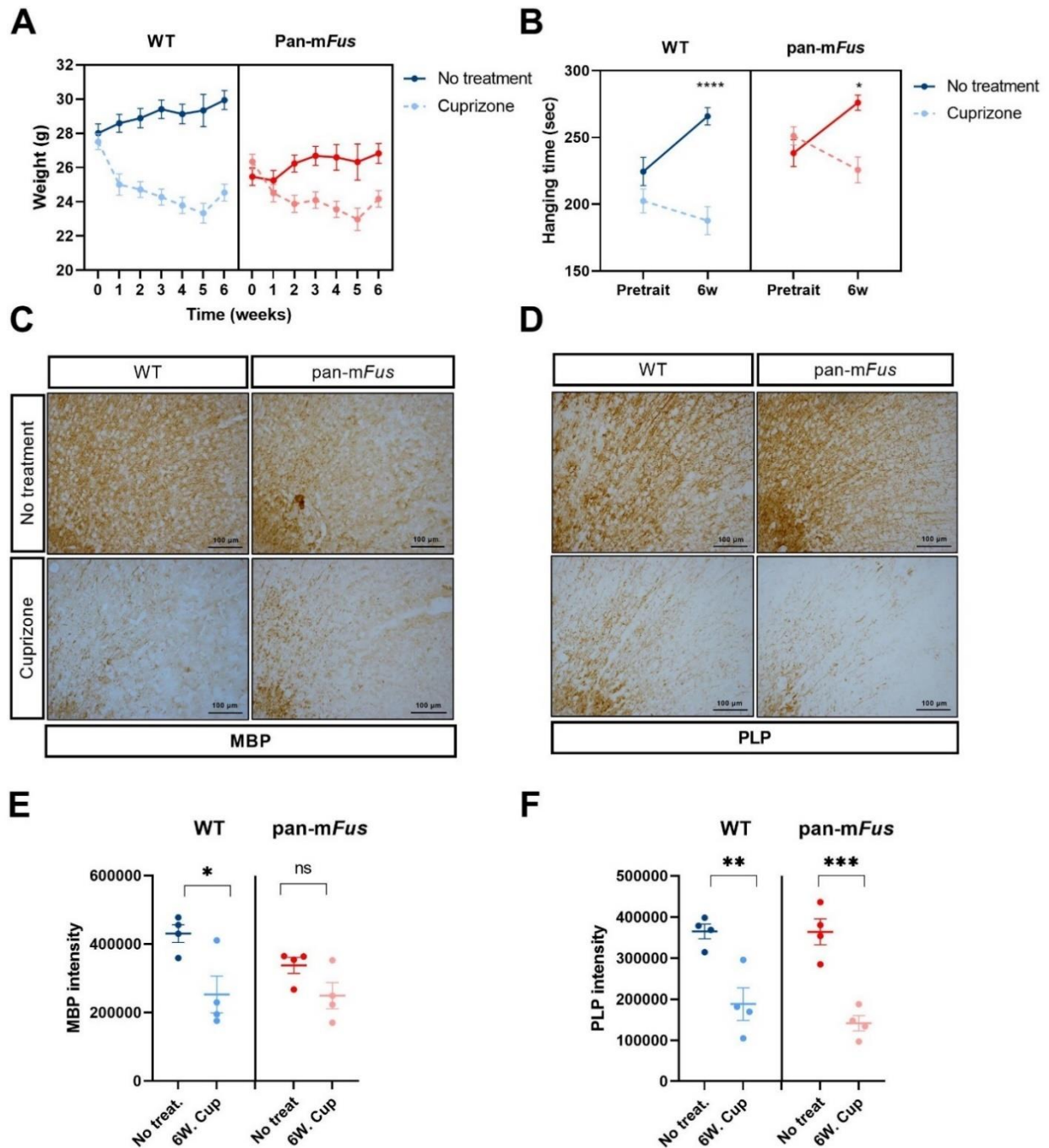
**A** Body mass of WT (blue) and pan-*mFus* (red) mice.  $F(9,135)=2.285$ ,  $p=0.0203$  for time/genotype interaction effect; repeated measures two-way ANOVA on log-transformed data;  $n=11$  for WT mice and  $n=7$  for pan-*mFus* mice. **B, E** Holding impulse in the inverted grid test of 4- (**B**) and 10-month-old (**E**) WT and pan-*mFus* mice. \*  $p<0.05$ , unpaired t-test on log-transformed data,  $n=11$  for WT mice and  $n=7$  for pan-*mFus* mice. **C, D, F, G** Motor activity in the open field test showing distance moved (**C, F**) and velocity (**D, G**) of 4- (**C, D**) and 10-month-old (**F, G**) WT and pan-*mFus* mice. Data are analyzed as in **B**. ns, non-significant.



**Figure 4. Social phenotype in pan-*mFus* mice.**

**A, B** Total (left) and 1-min intervals (right) interaction time in the resident intruder test of 4- (A) and 10-month-old (B) WT and pan-*mFus* mice. Unpaired t-test for total interaction time and repeated measures two-way ANOVA for 1-min intervals interaction time on log-transformed data;  $F(4,60)=3.294$ ,  $p=0.0166$  for time/genotype interaction effect at 10 months old;  $n=11$  for WT mice and  $n=7$  for pan-*mFus* mice. **C** Time spent in the light compartment in the light/dark test of 10-month-old WT and pan-*mFus* mice. Data are analyzed as in B. ns, non-significant.

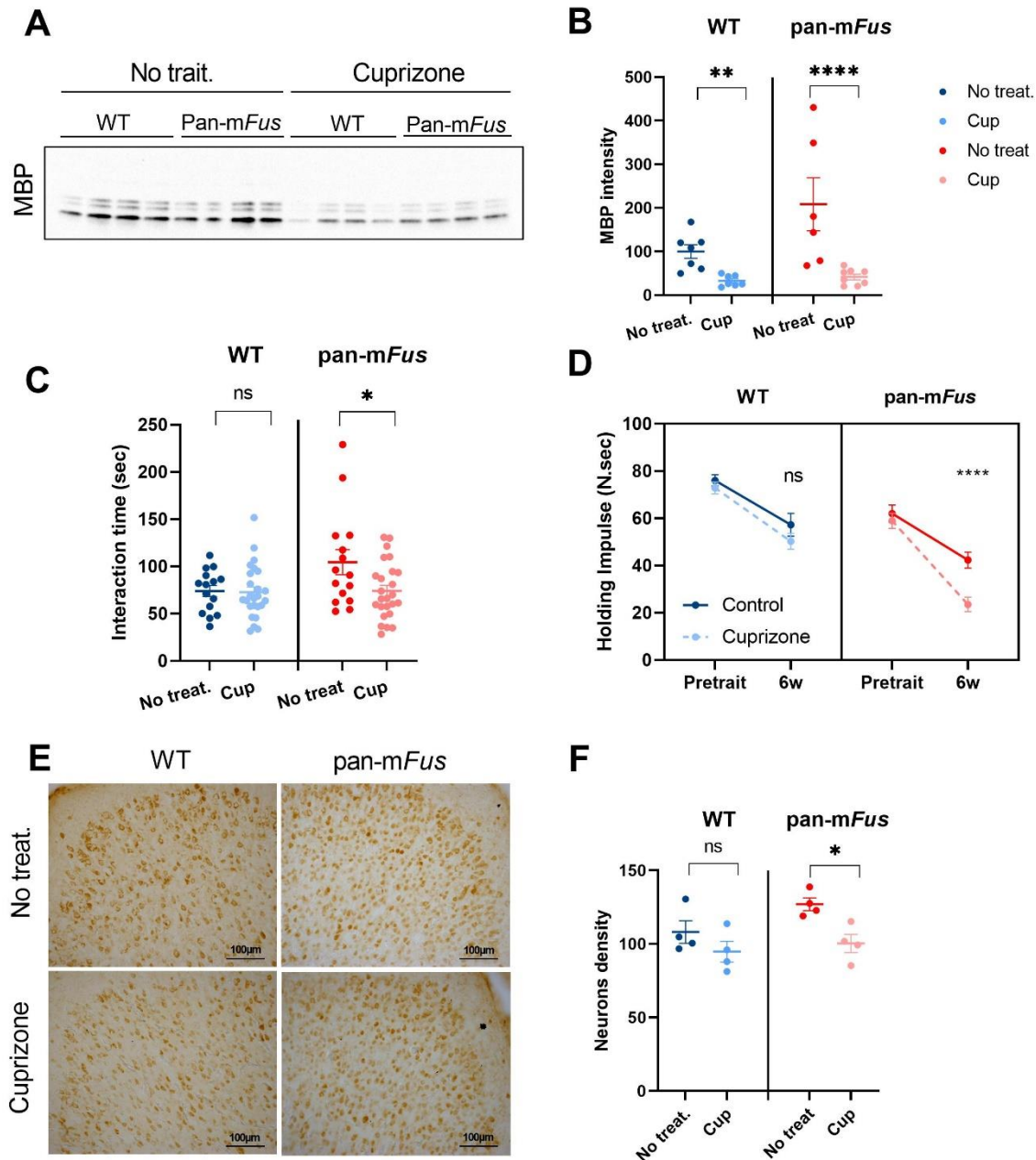




**Figure 5. Cuprizone-induced demyelination in pan-mFus mice.**

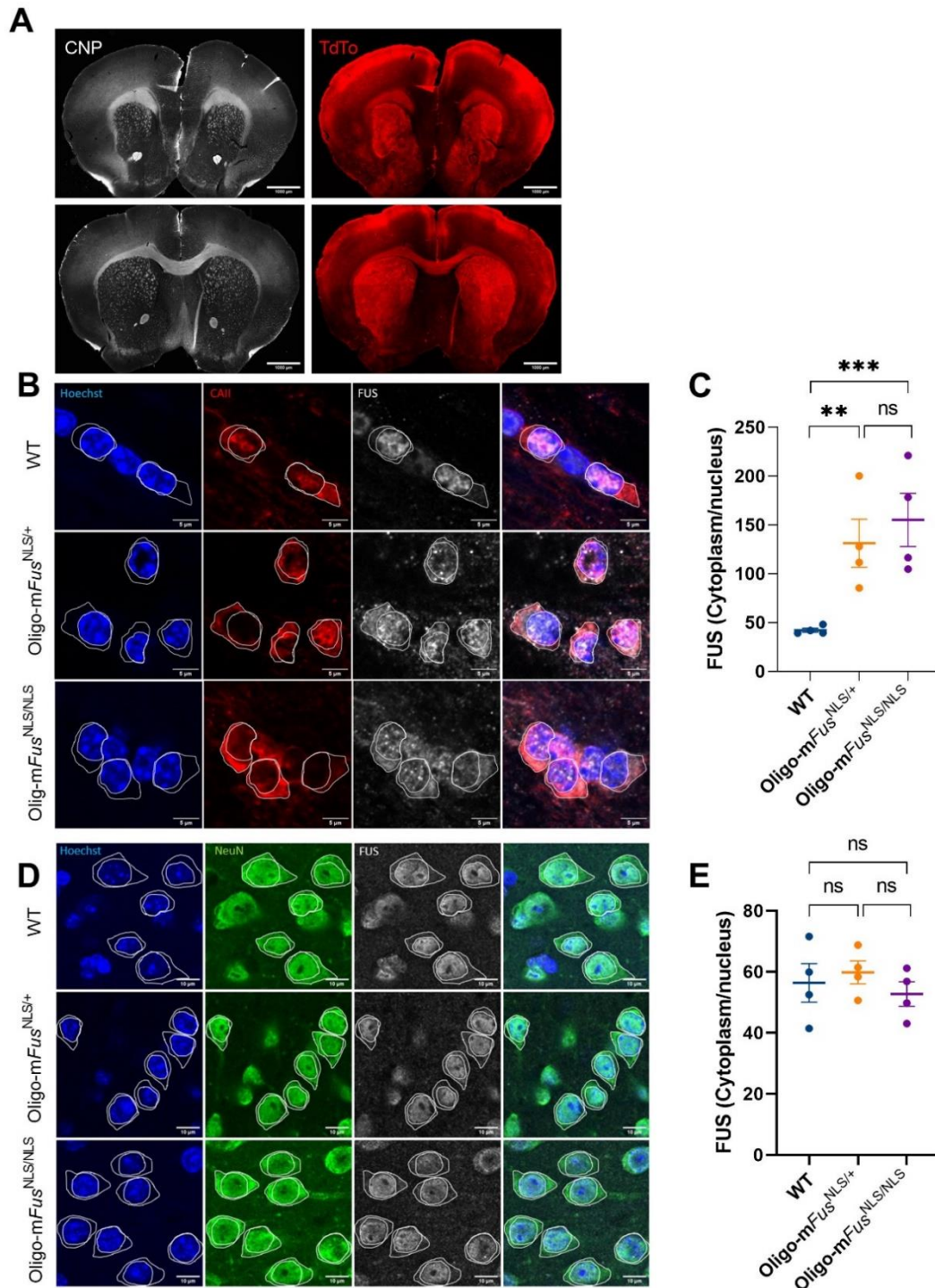
**A** Body mass of 4-month-old WT (blue) and pan-mFus (red) mice with (dashed line) or without (solid line) cuprizone treatment for 6 weeks.  $F(1,322)=124$ ,  $p<0.0001$  for treatment effect;  $F(1,331)=120$ ,  $p<0.0001$  for genotype effect,  $F(6,331)=5.052$ ,  $p<0.0001$  for time/genotype interaction effect;  $F(1,322)=57.37$ ,  $p<0.0001$  for treatment/genotype interaction effect; repeated measures three-way ANOVA on log-transformed data;  $n=20-34$  **B** Hanging time in the rotarod test of animals as in **A** before and after 6 weeks of cuprizone treatment. Data were analyzed as in **A**.  $F(1,148)=23.18$ ,  $p<0.0001$  for treatment effect;  $F(1, 148)=15.44$ ,  $p=0.0001$  for genotype effect,  $F(1,148)=16.31$ ,  $p<0.0001$  for time/treatment interaction effect;  $F(1,148)=5.828$ ,  $p=0.017$  for genotype/treatment interaction effect.  $n=15-25$  **C, D** Representative photographs showing cortical areas of animals as in **A** revealed using MBP (**C**) and PLP (**D**) immunoperoxidase staining. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . **E, F** Intensity of MBP (**E**) and PLP (**F**) immunostaining of animals as in **A**. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ ; two-way ANOVA followed by Sidak's test on log-transformed data;  $n=4$  (2 cortical areas per animal). ns, non-significant.





**Figure 6. Effects of cuprizone-induced demyelination in pan-mFus mice.**

**A** Representative immunoblot showing MBP in protein extracts from 4-month-old WT and pan-mFus mice with or without cuprizone treatment for 6 weeks. **B** Quantification of MBP in cortex of animals as in A. Data are expressed as percentage of non-treated WT mice. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test on log-transformed data;  $n = 6-8$  per condition. **C** Interaction time in the resident intruder test of animals as in A. Data were analyzed as in B, \*  $p < 0.05$ ,  $n = 15-25$  per condition. **D** Holding impulse in the inverted grid test of WT (blue) and pan-mFus (red) mice before and after 6 weeks with (dashed line) or without (solid line) cuprizone treatment.  $F(1, 124) = 12.34$ ,  $p = 0.0006$  for treatment effect;  $F(1, 120) = 54.78$ ,  $p < 0.0001$  for genotype effect,  $F(1, 124) = 7.173$ ,  $p = 0.084$  for time/treatment interaction effect;  $F(1, 120) = 9.762$ ,  $p = 0.0022$  for genotype/treatment interaction effect; repeated measures three-way ANOVA on log-transformed data;  $n = 21-41$  per condition. **E** Representative photographs showing cortical areas of animals as in A revealed using NeuN immunoperoxidase staining. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . **F** Quantification of the number of NeuN-positive cells in cortical areas of animals as in A. \*  $p < 0.05$ , two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test on log-transformed data,  $n = 4$  (2 cortical areas per animal). ns, non-significant.

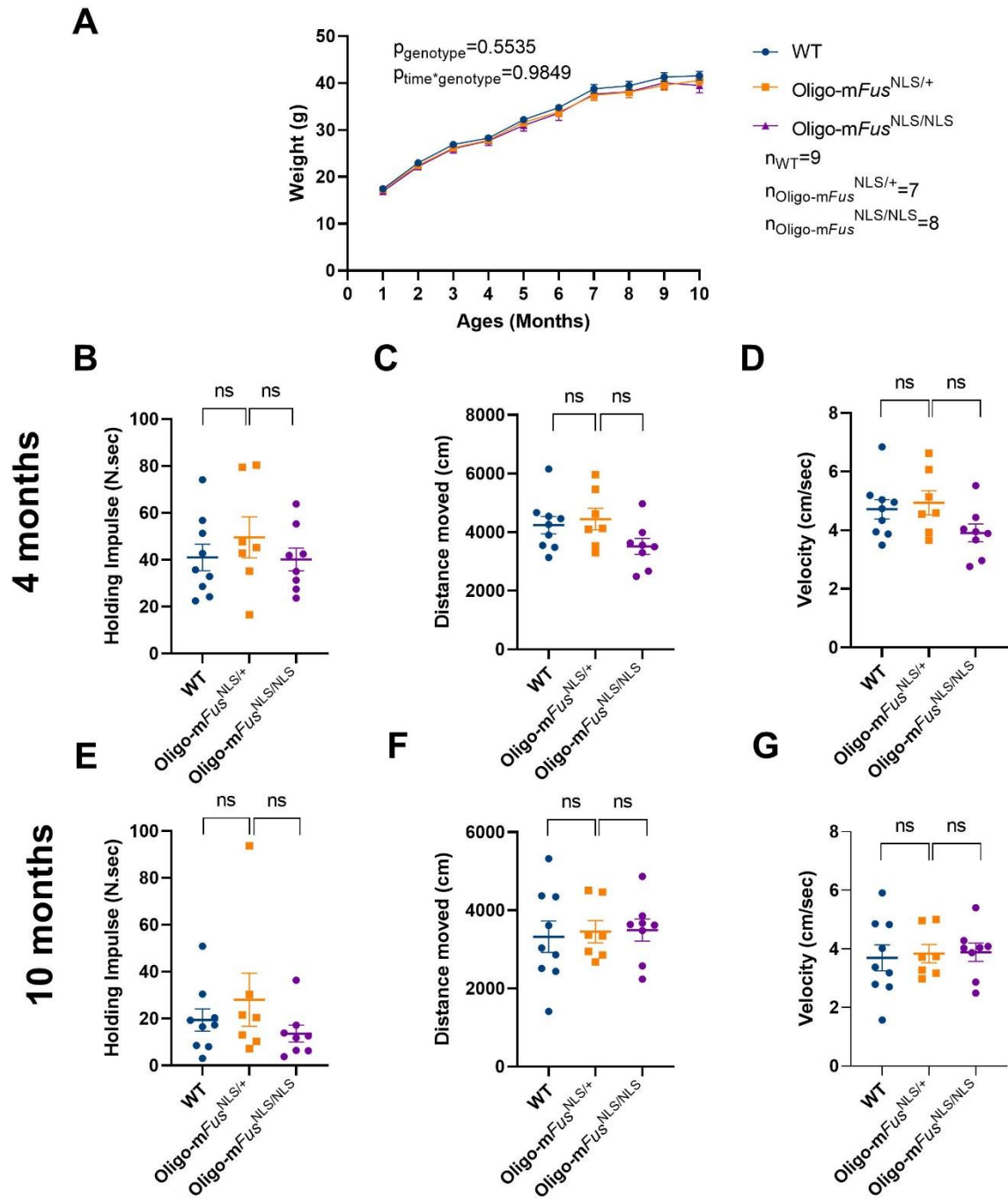


**Figure 7. Cytoplasmic delocalization of FUS in oligo-mFus mice.**

**A** Representative photographs showing whole brain sections of 2-month-old *Cnp<sup>cre/+</sup>*-tdTomato reporter mice revealed using CNP immunofluorescence (white) and tdTomato (red). Scale bar = 1000  $\mu$ m. **B, D** Representative photographs showing areas of the corpus callosum (B) and cortex (D) of 10-month-old WT and oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> mice revealed using FUS immunofluorescence (white). Carbonic anhydrase II (B, red) or NeuN (D, green) immunofluorescence were used to delimit cytoplasm (white circle). Hoechst labeling (blue) was used to delimit nuclei (white circles). Scale bar = 5  $\mu$ m. **C, E** Quantification of cytoplasm-to-nucleus ratio of FUS labeling in carbonic anhydrase II-positive cells in the corpus callosum (C) and NeuN-positive cells in the cortex (E) of 10-month-old WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; nested ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test on log-transformed data;  $n = 4$  (at least 30 cells per animal). ns, non-significant.

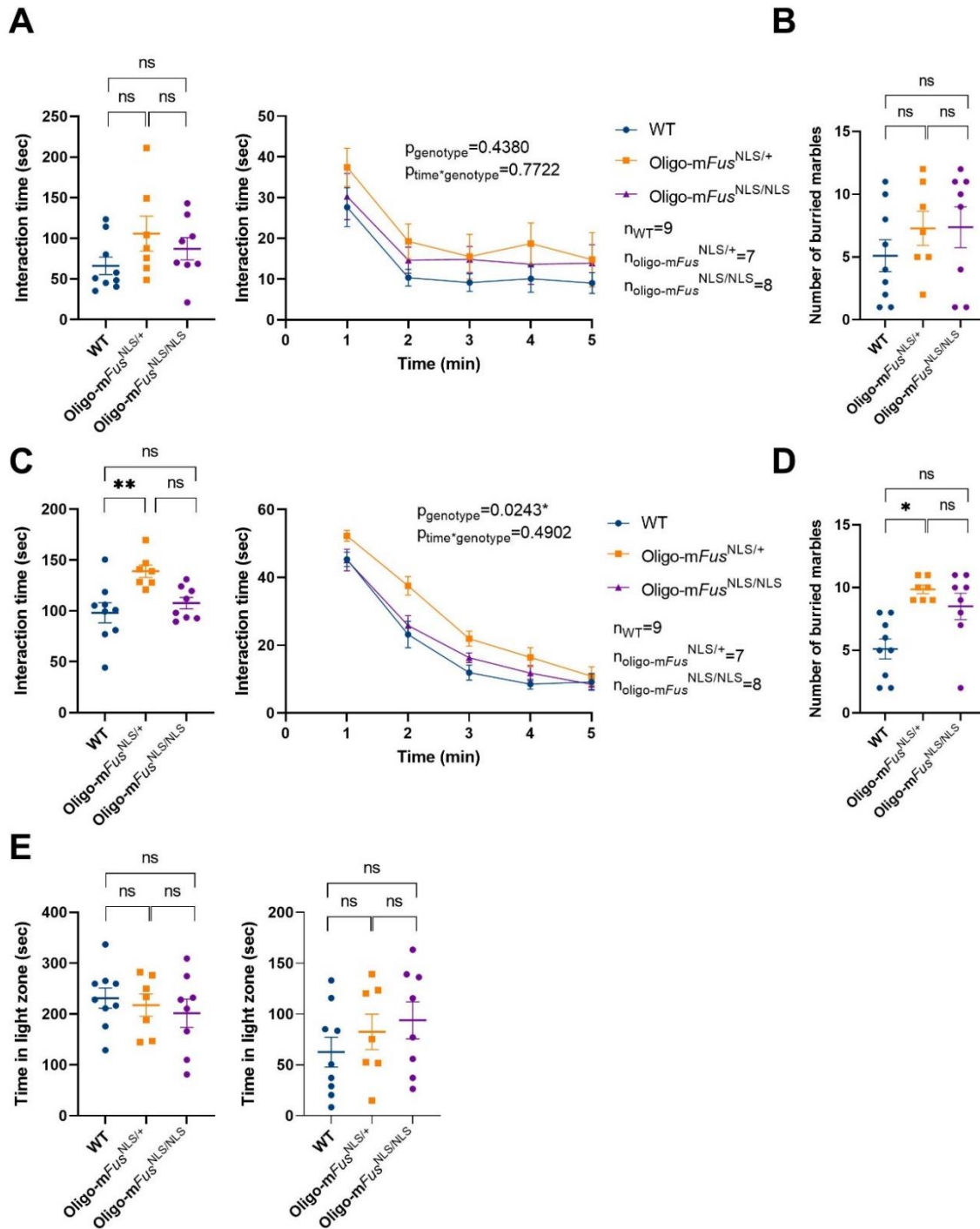






**Figure 9. Motor phenotype in oligo-mFus mice.**

**A** Body mass of WT (blue), oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> (orange) and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> (purple) mice. Repeated measures two-way ANOVA on log-transformed data;  $n=9$  for WT mice,  $n=7$  for oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> mice and  $n=8$  for oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. **B, E** Holding impulse in the inverted grid test of 4- (**B**) and 10-month-old (**E**) WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup>, and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. One-way ANOVA on log-transformed data;  $n$  as in **A**. **C, D, F, G** Motor activity in the open field test showing distance moved (**C, F**) and velocity (**D, G**) of 4- (**C, D**) and 10-month-old (**F, G**) WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup>, and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. Data are analyzed as in **B**. ns, non-significant.



**Figure 10. Social phenotype in oligo-mFus mice.**

**A, C** Total (left) and 1-min intervals (right) interaction time in the resident intruder test of 4- (A) and 10-month-old (C) WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup>, and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. One Way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test for total interaction time and repeated measures two-way ANOVA for 1-min intervals interaction time on log-transformed data; \*\*  $p < 0.01$  at 10 months old;  $F(2, 21) = 4.460$   $p = 0.0243$  for genotype effect,  $n = 9$  for WT mice,  $n = 7$  for oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> mice and  $n = 8$  for oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. **B, D** Number of marbles buried in the marble burying test by 4- (B) and 10-month-old (D) WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup>, and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. \*  $p < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test on log-transformed data,  $n$  as in A. **E** Time spent in the light compartment in the light/dark test of 4- and 10-month-old WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup>, and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. Data are analyzed as in B. ns, non-significant.

## References

- Abramzon, Y. A., Fratta, P., Traynor, B. J., and Chia, R. (2020). The Overlapping Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Front. Neurosci.* 14, 42. doi: 10.3389/fnins.2020.00042
- Andersson, M. K., Ståhlberg, A., Arvidsson, Y., Olofsson, A., Semb, H., Stenman, G., et al. (2008). The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol.* 9, 37. doi: 10.1186/1471-2121-9-37
- Deng, H., Gao, K., and Jankovic, J. (2014). The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 337–348. doi: 10.1038/nrneuro.2014.78
- Feldman, E. L., Goutman, S. A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M. G., Shaw, P. J., et al. (2022). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* 400, 1363–1380. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01272-7
- Gascon, E., Lynch, K., Ruan, H., Almeida, S., Verheyden, J., Seeley, W. W., et al. (2014). Alterations in microRNA-124 and AMPA receptors contribute to social behavioral deficits in frontotemporal dementia. *Nat. Med.* 20, 1444–1451. doi: 10.1038/nm.3717
- Gingele, S., Henkel, F., Heckers, S., Moellenkamp, T. M., Hümmert, M. W., Skripuletz, T., et al. (2020). Delayed Demyelination and Impaired Remyelination in Aged Mice in the Cuprizone Model. *Cells* 9, 945. doi: 10.3390/cells9040945
- Grossman, M., Seeley, W. W., Boxer, A. L., Hillis, A. E., Knopman, D. S., Ljubenov, P. A., et al. (2023). Frontotemporal lobar degeneration. *Nat. Rev. Dis. Primer* 9, 40. doi: 10.1038/s41572-023-00447-0
- Guzman, K., Brink, L., Rodriguez-Bey, G., Bodnar, R., Kuang, L., Xing, B., et al. (2020). Conditional depletion of Fus in oligodendrocytes leads to motor hyperactivity and increased myelin deposition associated with Akt and cholesterol activation. *Glia* 68, 2040–2056. doi: 10.1002/glia.23825
- Kang, S. H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D. W., Ostrow, L. W., et al. (2013). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* 16, 571–579. doi: 10.1038/nn.3357
- Kato, D., Wake, H., Lee, P. R., Tachibana, Y., Ono, R., Sugio, S., et al. (2020). Motor learning requires myelination to reduce asynchrony and spontaneity in neural activity. *Glia* 68, 193–210. doi: 10.1002/glia.23713
- Keszycki, R., Rodriguez, G., Dunn, J. T., Locci, A., Orellana, H., Hauptfear, I., et al. (2023). Characterization of apathy-like behaviors in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 126, 113–122. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2023.02.012
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., et al. (2003). Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat. Genet.* 33, 366–374. doi: 10.1038/ng1095
- Loughlin, F. E., Lukavsky, P. J., Kazeeva, T., Reber, S., Hock, E.-M., Colombo, M., et al. (2019). The Solution Structure of FUS Bound to RNA Reveals a Bipartite Mode of RNA Recognition with

- Both Sequence and Shape Specificity. *Mol. Cell* 73, 490-504.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2018.11.012
- Müller, C., Bauer, N. M., Schäfer, I., and White, R. (2013). Making myelin basic protein -from mRNA transport to localized translation. *Front. Cell. Neurosci.* 7. doi: 10.3389/fncel.2013.00169
- Paiva, I., Cellai, L., Meriaux, C., Poncelet, L., Nebie, O., Saliou, J.-M., et al. (2022). Caffeine intake exerts dual genome-wide effects on hippocampal metabolism and learning-dependent transcription. *J. Clin. Invest.* 132, e149371. doi: 10.1172/JCI149371
- Rademakers, R., Neumann, M., and Mackenzie, I. R. (2012). Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 423–434. doi: 10.1038/nrneurol.2012.117
- Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H. E., Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., et al. (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 887–906. doi: 10.1007/s00401-017-1687-9
- Scekic-Zahirovic, J., Sanjuan-Ruiz, I., Kan, V., Megat, S., De Rossi, P., Dieterlé, S., et al. (2021). Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects. *Nat. Commun.* 12, 3028. doi: 10.1038/s41467-021-23187-9
- Scekic-Zahirovic, J., Sendscheid, O., El Oussini, H., Jambeau, M., Sun, Y., Mersmann, S., et al. (2016). Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J.* 35, 1077–1097. doi: 10.15252/embj.201592559
- Seiberlich, V., Bauer, N. G., Schwarz, L., Ffrench-Constant, C., Goldbaum, O., and Richter-Landsberg, C. (2015). Downregulation of the microtubule associated protein tau impairs process outgrowth and myelin basic protein mRNA transport in oligodendrocytes. *Glia* 63, 1621–1635. doi: 10.1002/glia.22832
- Sen, M. K., Almuslehi, M. S. M., Coorsen, J. R., Mahns, D. A., and Shortland, P. J. (2020). Behavioural and histological changes in cuprizone-fed mice. *Brain. Behav. Immun.* 87, 508–523. doi: 10.1016/j.bbi.2020.01.021
- Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., and Simons, M. (2019). Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol. Rev.* 99, 1381–1431. doi: 10.1152/physrev.00031.2018
- Tang, X., Toro, A., T G, S., Gao, J., Chalk, J., Oskarsson, B., et al. (2020). Divergence, Convergence, and Therapeutic Implications: A Cell Biology Perspective of C9ORF72-ALS/FTD. *Mol. Neurodegener.* 15, 34. doi: 10.1186/s13024-020-00383-7
- Torvund-Jensen, J., Steengaard, J., Askebjerg, L. B., Kjaer-Sorensen, K., and Laursen, L. S. (2018). The 3'UTRs of Myelin Basic Protein mRNAs Regulate Transport, Local Translation and Sensitivity to Neuronal Activity in Zebrafish. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 185. doi: 10.3389/fnmol.2018.00185
- Tzeplaëff, L., Seguin, J., Le Gras, S., Megat, S., Cosquer, B., Plassard, D., et al. (2023). Mutant FUS induces chromatin reorganization in the hippocampus and alters memory processes. *Prog. Neurobiol.* 227, 102483. doi: 10.1016/j.pneurobio.2023.102483
- van Es, M. A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R. J., Veldink, J. H., et al. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* 390, 2084–2098. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31287-4

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.1. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Vernay, A., Therreau, L., Blot, B., Risson, V., Dirrig-Grosch, S., Waegaert, R., et al. (2016). A transgenic mouse expressing CHMP2Bintron5 mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum. Mol. Genet.* 25, 3341–3360. doi: 10.1093/hmg/ddw182
- Yusuf, I. O., Qiao, T., Parsi, S., Tilvawala, R., Thompson, P. R., and Xu, Z. (2022). Protein citrullination marks myelin protein aggregation and disease progression in mouse ALS models. *Acta Neuropathol. Commun.* 10, 135. doi: 10.1186/s40478-022-01433-5



## II. Les altérations oligodendrocytaires liées à la délocalisation de FUS affectent le cytosquelette axonal: résultats préliminaires.

### II.A. Justification des résultats

La gaine de myéline régule plusieurs propriétés neuronales, notamment la phosphorylation des neurofilaments et leur organisation dans l'axone via la protéine de la myéline MAG (Dashiell et al., 2002; Quarles, 2007). Afin d'identifier si les altérations de la gaine provoquées par la mutation *Fus* affectent le cytosquelette axonal, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques des neurones dans la moelle épinière des mâles pan-*mFus* et Oligo-*mFus*. Nous avons évalué l'expression des neurofilaments et de MAG, ainsi que le nombre de neurones et leur taille.

### II.B. Matériel et méthodes

Les protocoles d'immunofluorescence, Western blot et RT-qPCR, ainsi que les analyses statistiques et les génotypes des animaux, sont les mêmes que ceux précédemment décrits dans la section 1 du chapitre Résultats, à laquelle nous renvoyons le lecteur. Les détails nouveaux de ces protocoles sont décrits ci-dessous.

Pour le Western blot, nous avons utilisé les anticorps primaires suivants : le souris anti-MAG (Santa-Cruz, 166849, 1:1000), le lapin anti-Neurofilament (fabriqué à la demande par Eurogentec, NF 575, 1 :1000).

Pour la RT-qPCR, nous avons utilisé les primers suivants :

Mag	AATTCAGAATCTCTGGGGCA	CCCAGGTCTGAGTGGGAATA
Nefh	CATTGAGATTGCCGCTTACA	GACTCGGACCAAAGCCAAT

L'immunofluorescence a été réalisée sur des coupes sériées de la moelle épinière lombaire. Nous avons marqué les neurones avec l'anticorps de cochon d'Inde anti-NeuN (Synaptic

Systems 266 004, 1/200). Les analyses ont été faites dans la substance grise de la moelle épinière grâce au logiciel d'analyse d'images FIJI. La surface de neurones marqués a été évaluée sur deux zones symétrique bilatérales par coupe, en établissant un seuil d'intensité et en mesurant la surface marquée NeuN-positive rapportée à la surface totale de la zone étudiée. Nous avons utilisé entre 1 et 3 coupes/animal.

## **II.C. Résultats**

### **La mutation *Fus* oligodendrocytaire est suffisante pour affecter l'expression des neurofilaments lourds et la taille des neurones chez les mâles.**

Nous avons quantifié l'expression des neurofilaments (NF-H) dans la moelle épinière des mâles pan-*mFus* âgés de 10 mois. La quantité de neurofilaments est significativement augmentée au niveau protéique, sans modification au niveau de l'ARNm. (Fig.1 A,B). Afin de voir si cette augmentation dépend de la mutation *Fus* oligodendrocytaire, nous avons quantifié les neurofilaments dans la moelle épinière des mâles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup>. La mutation *Fus* hétérozygote et homozygote dans les oligodendrocytes matures est suffisante pour entraîner l'augmentation des neurofilaments au niveau protéique (Fig.1 C,D). L'expression des neurofilaments n'est pas affectée au niveau de l'ARNm (Fig.1 A,C). Afin d'évaluer si cette augmentation des niveaux des neurofilaments est associée à une augmentation du nombre de neurones, nous avons quantifié les neurones dans la substance grise de la moelle épinière des mâles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> à l'aide d'un marquage NeuN. Aucune différence n'a été observée dans le nombre de neurones spinaux (Fig.1 E,F). En revanche, la surface positive au marquage neuronal est significativement augmentée chez les mâles Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> (Fig.1 E,G).

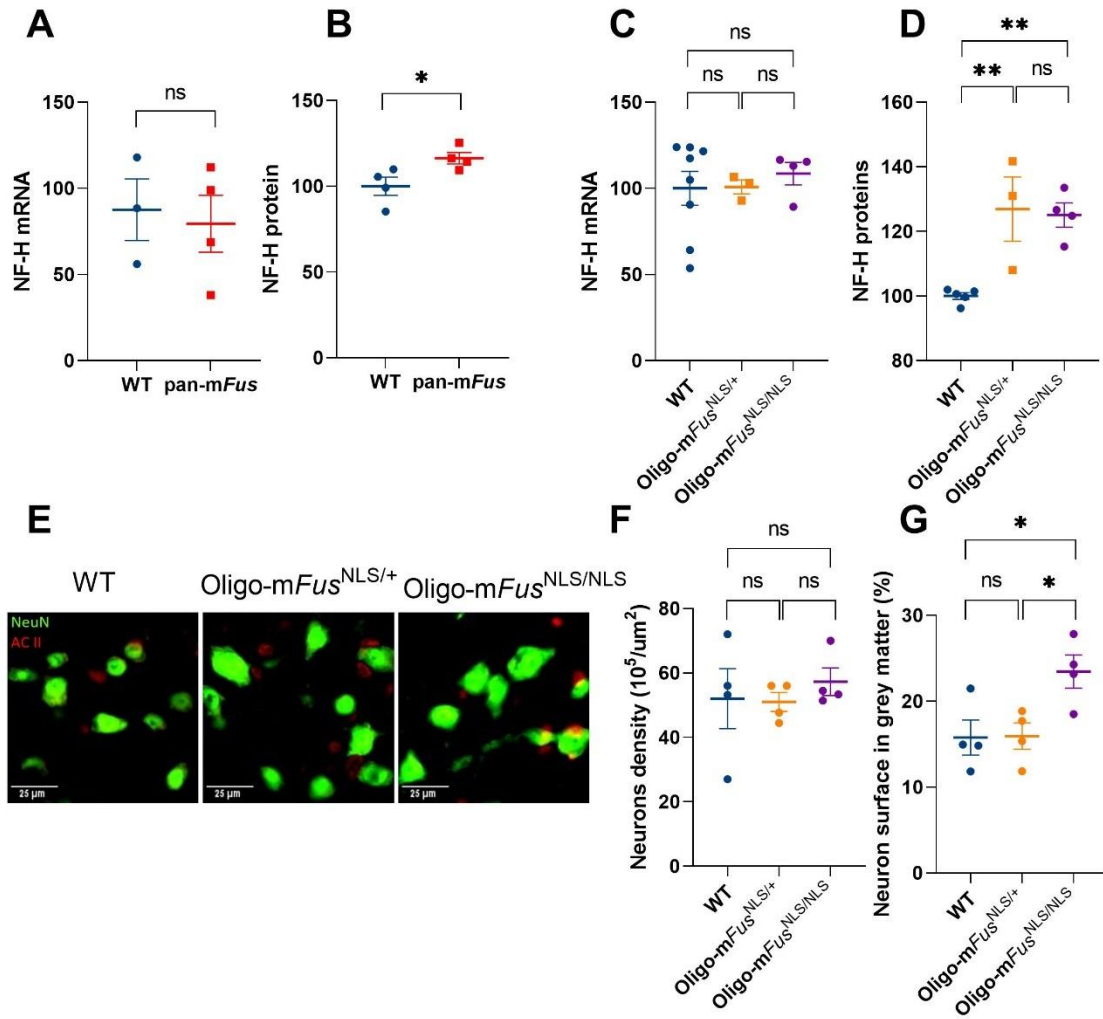
Ainsi, la mutation *Fus* oligodendrocytaire est suffisante pour entraîner dans la moelle épinière des mâles une augmentation des taux de neurofilaments associée à une altération de la taille des neurones.

### **L'augmentation de la quantité des neurofilaments chez les mâles pan-*mFus*, Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> est concomitante avec l'augmentation de la protéine MAG.**

Nous avons évalué par Western blot la quantité de MAG dans la moelle épinière des mâles pan-*mFus*. MAG est significativement augmentée lorsque la mutation *Fus* est ubiquitaire, sans que la quantité d'ARNm de *Mag* soit affectée (Fig.2 A,B) Afin de voir si cette augmentation de MAG chez les mâles pan-*mFus* dépend de la mutation *Fus* oligodendrocytaire, nous avons également quantifié MAG chez les mâles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup>. La mutation *Fus* dans les oligodendrocytes est suffisante pour entraîner une augmentation des niveaux de MAG chez les mâles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et une augmentation encore plus conséquente aussi bien au niveau protéique que de l'ARNm, chez les mâles Oligo-*mFUS*<sup>NLS/NLS</sup> (Fig.2 C,D).

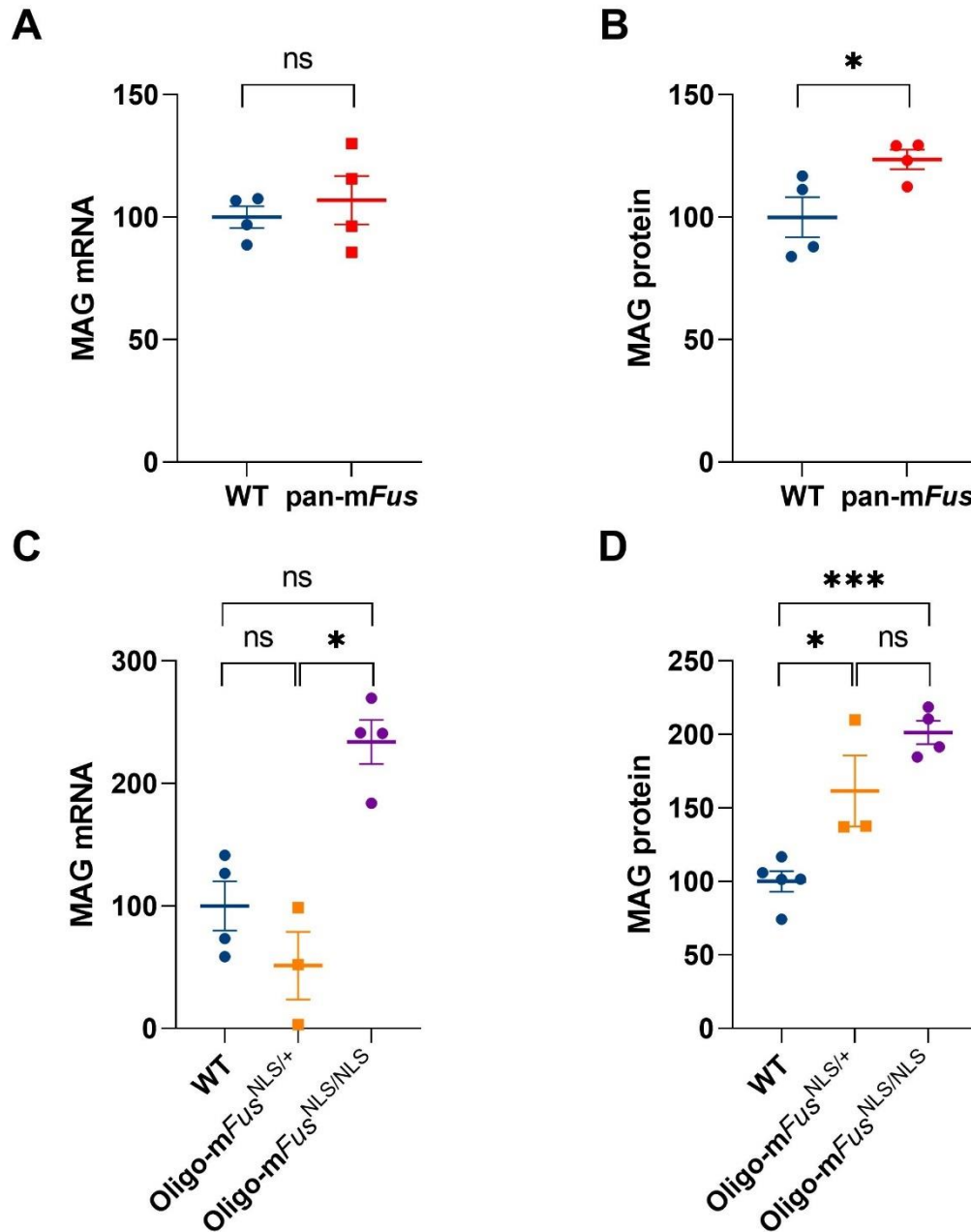
### **Conclusion des expériences**

Cette étude préliminaire montre que les neurofilaments de la moelle épinière sont significativement augmentés chez les mâles pan-*mFus*, et que cette augmentation est provoquée par la mutation *Fus* oligodendrocytaire. Cette altération du cytosquelette est conjointe avec une augmentation de la taille des neurones dans la substance grise. De plus, on observe également une augmentation de l'expression de la protéine de la myéline MAG, qui joue justement un rôle important dans l'organisation du cytosquelette axonal. Aucun lien de causalité n'a encore été mis en évidence entre l'augmentation de MAG et l'augmentation des neurofilaments chez les mâles, et il n'est pas exclu que ces deux observations soient indépendantes.



**Figure 1. NF-H expression and neuronal morphology in pan-*mFus* and oligo-*mFus* mice**

**A-B** Quantification of mRNA (A) and protein (B) levels of neurofilaments in the spinal cord of 10-month-old WT and pan-*mFus* mice. Data are expressed as percentage of WT. \*  $p < 0.05$ , unpaired t-test on log-transformed data,  $n = 3-4$  for WT mice,  $n = 4$  for pan-*mFus* mice. **C-D** Quantification of mRNA (C) and protein (D) levels of neurofilaments in the spinal cord of 10-month-old WT, oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> and oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice. Data are expressed as percentage of WT. \*\* $p < 0.01$ , one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test on log-transformed data,  $n = 5-8$  for WT mice,  $n = 3$  for oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> and  $n = 4$  for oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice. **E** Representative photographs showing areas of the grey matter in the lumbar spinal cord of 10-months-old WT, oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> and oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice, revealed using NeuN (green) and carbonic anhydrase II (red) immunostaining. Scale bar = 25 μm. **F** Quantification of the number of NeuN-positive cells in the grey matter lumbar spinal cord of 10-months-old WT, oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> and oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice. Nested one-way ANOVA on log-transformed data;  $n = 4$  (at least 3 slices per animal). **G** Quantification of the neuronal surface to total surface ratio in the grey matter lumbar spinal cord of 10-months-old WT, oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> and oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice. \* $p < 0.05$ , nested one-way ANOVA on log-transformed data;  $n = 4$  (at least 3 slices per animal).



**Figure 2. Mag expression in the spinal cord of pan-mFus mice and oligo-mFus mice.**

**A-B** Quantification of mRNA (A) and protein (B) levels of MAG in the lumbar spinal cord of 10-month-old WT and pan-mFus mice. Data are expressed as percentage of WT. \* $p < 0.05$ , unpaired t-test on log-transformed data,  $n = 4$ . **C-D** Quantification of mRNA (C) and protein (D) levels of MAG in the lumbar spinal cord of 10-month-old WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. Data are expressed as percentage of WT. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test on log-transformed data,  $n = 4$  for WT mice,  $n = 3$  for oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> and  $n = 4$  for oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice.

# III. Etude chez les femelles : les preuves d'un dimorphisme sexuel au niveau comportemental ?

## III.A. Justification des résultats

Les études scientifiques portant sur des modèles murins sont souvent effectuées uniquement sur des mâles. Pourtant, l'existence d'un dimorphisme sexuel à différentes échelles ne fait plus de doute, et un nombre croissant de publications s'efforce de mener leurs études sur les deux sexes (Shansky and Woolley, 2016; Lee, 2018; Rechlin et al., 2022). Cette nécessité nous semble particulièrement importante dans notre étude pour trois raisons : d'une part, nous nous intéressons aux troubles du comportement chez la souris, et il a été montré que les mâles et les femelles n'exhibent pas les mêmes types de comportement (Nomura et al., 2002; Allen et al., 2010; An et al., 2011; Hodes and Epperson, 2019; Aubry et al., 2022; Baumgartner et al., 2023). D'autre part, nous nous intéressons à la myéline et aux oligodendrocytes, une structure et des cellules connues pour avoir des propriétés différentes entre les mâles et les femelles (Swamydas et al., 2009; Yasuda et al., 2020). Enfin, de nombreuses maladies neurodégénératives ou troubles cognitifs associés à des altérations de la myéline se manifestent différemment chez les hommes et chez les femmes, comme la schizophrénie, les troubles bipolaires ou l'autisme (Leger and Neill, 2016; Napolitano et al., 2022; Yang et al., 2022). Ces observations suggèrent qu'une altération des oligodendrocytes ou de la myéline pourrait avoir un impact sex-dépendant sur l'apparition d'un phénotype pathologique. Nous avons donc évalué les altérations ultra-structurales de la myéline dans le corps calleux, ainsi que l'expression de MBP chez les femelles pan-*mFus*, *Oligo-mFus*<sup>NLS/+</sup> et *Oligo-mFus*<sup>NLS/NLS</sup>. Nous avons également étudié les performances motrices, cognitives et sociales grâce aux mêmes tests que ceux présentés chez les mâles. Dans cette mesure, nous nous permettons de référer le lecteur au manuscrit présenté dans le chapitre I.

### III. B. Résultats

#### **Les femelles pan-m*Fus* présentent des altérations de la gaine de myéline similaires à celles observées chez les mâles.**

L'analyse par microscopie électronique nous a montré que l'épaisseur moyenne des gaines de myéline est significativement augmentée chez les femelles pan-m*Fus* de 10 mois par rapport aux souris WT (Fig.3 A,B). De plus, le G-ratio est significativement diminué, ce qui signifie que la taille de la gaine de myéline est plus épaisse pour un même calibre d'axone (Fig.3 C). Chez ces mêmes animaux nous avons constaté que, bien que l'expression de l'ARNm de *Mbp* soit significativement diminuée dans la moelle épinière des femelles pan-m*Fus* par rapport aux souris WT, la quantité de MBP est, elle, significativement augmentée aussi bien dans le cortex que dans la moelle épinière (Fig.3 D,E,F)

#### **Les femelles pan-m*Fus* présentent un phénotype moteur sans altérations cognitives**

Afin d'identifier si les altérations de la myéline sont associées à un phénotype moteur ou cognitif, nous avons caractérisé le comportement des femelles pan-m*Fus* de 4 et 10 mois. La présence de la mutation *Fus* ubiquitaire n'entraîne pas de perte de poids significative chez ces femelles (Fig.4 A). Cependant, elles manifestent un déficit moteur au test de la grille inversée, avec une diminution de l'impulsion de maintien déjà apparente à 4 mois et significativement diminuée à 10 mois (Fig.4 B,E). La mutation *Fus* ubiquitaire n'affecte cependant ni l'activité (distance parcourue) ni la vitesse des animaux au test du champ ouvert (Fig.4 C,D,F,G).

Afin d'évaluer le comportement social des femelles pan-m*Fus*, nous avons effectué le test de l'intrus résident. Les résultats de ce test ont montré que ces femelles ne manifestent pas d'altérations sociales ni à 4 ni à 10 mois. (Fig.5 A,B) L'anxiété des animaux a été évaluée à 10 mois avec le test lumière/obscurité, et les femelles pan-m*Fus* ne font pas non plus preuve d'une anxiété ou d'une désinhibition significatives (Fig.5 C).

#### **La mutation *Fus* oligodendrocytaire est suffisante pour entraîner une augmentation de la quantité de MBP chez les femelles**

Afin de déterminer si la mutation *Fus* uniquement dans les oligodendrocytes matures est suffisante pour entraîner l'augmentation des niveaux de MBP observée lorsque la mutation est ubiquitaire, nous avons étudié des femelles Oligo-m*Fus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-m*Fus*<sup>NLS/NLS</sup>.

Au niveau d'ARNm, l'expression de *Mbp* est similaire entre les groupes expérimentaux, à la fois dans le cortex et la moelle épinière (Fig.6 A). En revanche au niveau protéique, la quantité de MBP est significativement augmentée dans le cortex des femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> (Fig.6 B,C).

### **La mutation *Fus* oligodendrocytaire est suffisante pour provoquer un phénotype moteur tardif chez les femelles**

Afin d'étudier si la mutation *Fus* uniquement oligodendrocytaire est suffisante pour entraîner l'apparition d'un phénotype moteur chez les femelles, nous avons, comme précédemment, appliqué les tests de la grille inversée et du champ ouvert à des animaux de 4 et 10 mois. La mutation *Fus* oligodendrocytaire n'entraîne pas de perte de poids chez les souris Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> (Fig.7 A). Les femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> ne manifestent pas d'altération motrice au test de la grille inversée à 4 mois, mais présentent en revanche une diminution significative de leur impulsion de maintien à l'âge de 10 mois, bien que moins important chez les femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> (Fig.7 B,E). A 4 mois, la distance parcourue au test du champ ouvert par les femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup>, de même que leur vitesse, est significativement diminuée par rapport aux WT. Une diminution similaire mais non-significative est visible chez les femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> (Fig.7 C,D). Cependant, cette diminution disparaît à 10 mois dans les deux groupes d'animaux, malgré une tendance à la diminution chez les femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> (Fig.7 F, G).

Ainsi, contrairement aux mâles, l'induction de la mutation *Fus* dans les oligodendrocytes matures entraîne chez les femelles l'apparition d'un phénotype moteur, plus tardivement cependant que lorsque la mutation est ubiquitaire, ainsi que des troubles de l'activité présents à 4 mois et qui disparaissent à 10 mois.

### **La mutation *Fus* oligodendrocytaire est suffisante pour entraîner un phénotype cognitif chez les femelles**

Afin d'évaluer l'apparition des troubles du comportement social, nous avons effectué le test de l'intrus résident à 4 et 10 mois chez les femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup>. Le temps total d'interaction initiée par la souris testée est réduit, mais de manière non-significative, à 4 mois entre les femelles et Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et WT. Cette diminution devient significative chez les femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> (Fig.8 A). Cependant, tout comme pour les altérations observées sur le test du champ ouvert, ces différences de comportement social entre les femelles



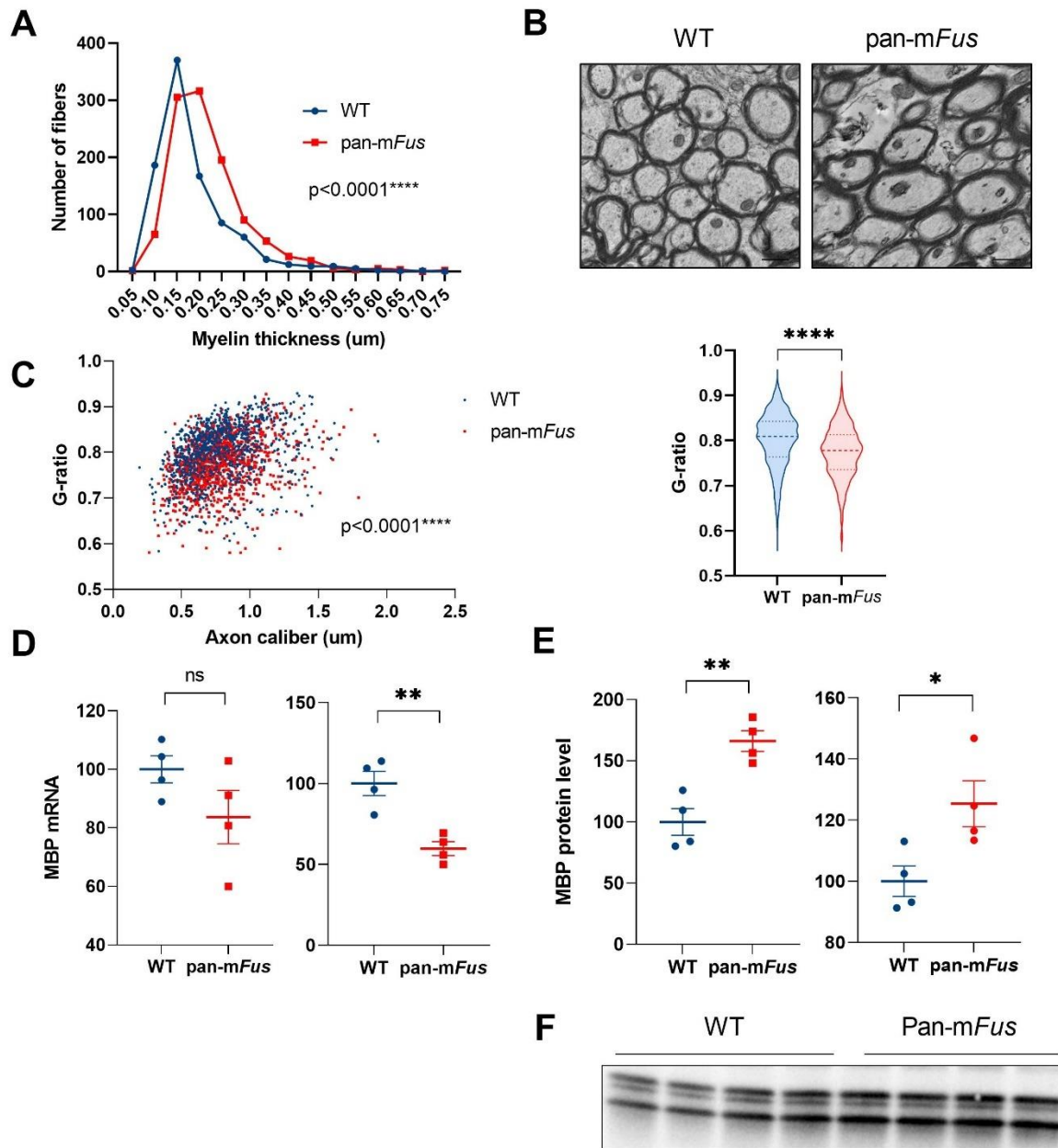
WT, Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> s'estompent à l'âge de 10 mois). Il faut noter, néanmoins, que ce phénotype disparaîtrait, au moins en partie, du fait de la perte d'intérêt social des femelles WT entre 4 et 10 mois, sans modification importante de l'intérêt social des animaux Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> (Fig.8 C).

Afin d'étudier le désintérêt ou le comportement obsessionnel de nos animaux, nous avons procédé au test des billes enterrées. A 4 mois, les femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> manifestent un manque d'intérêt non significatif pour les billes en comparaison aux WT, et cette tendance se confirme et devient significative à 10 mois. Nous observons également des tendances similaires, sans atteindre la significativité, chez les femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> (Fig.8 B-D). Cette perte d'intérêt n'est pas liée à l'anxiété, dans la mesure où les femelles Oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> et Oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> se comportent comme les souris WT au test de lumière/obscurité (Fig.8 E).

Ainsi, la mutation *Fus* dans les oligodendrocytes matures entraîne chez les femelles une perte d'intérêt et de motivation qui peut s'identifier au comportement apathique décrit chez des patients DFT. Ces altérations comportementales ne sont pas dues à de l'anxiété, et pourraient expliquer la perte de déplacement et de vitesse observées au test du champ ouvert. Ces altérations cognitives vont à l'inverse de ce qui a précédemment été observé chez les mâles.

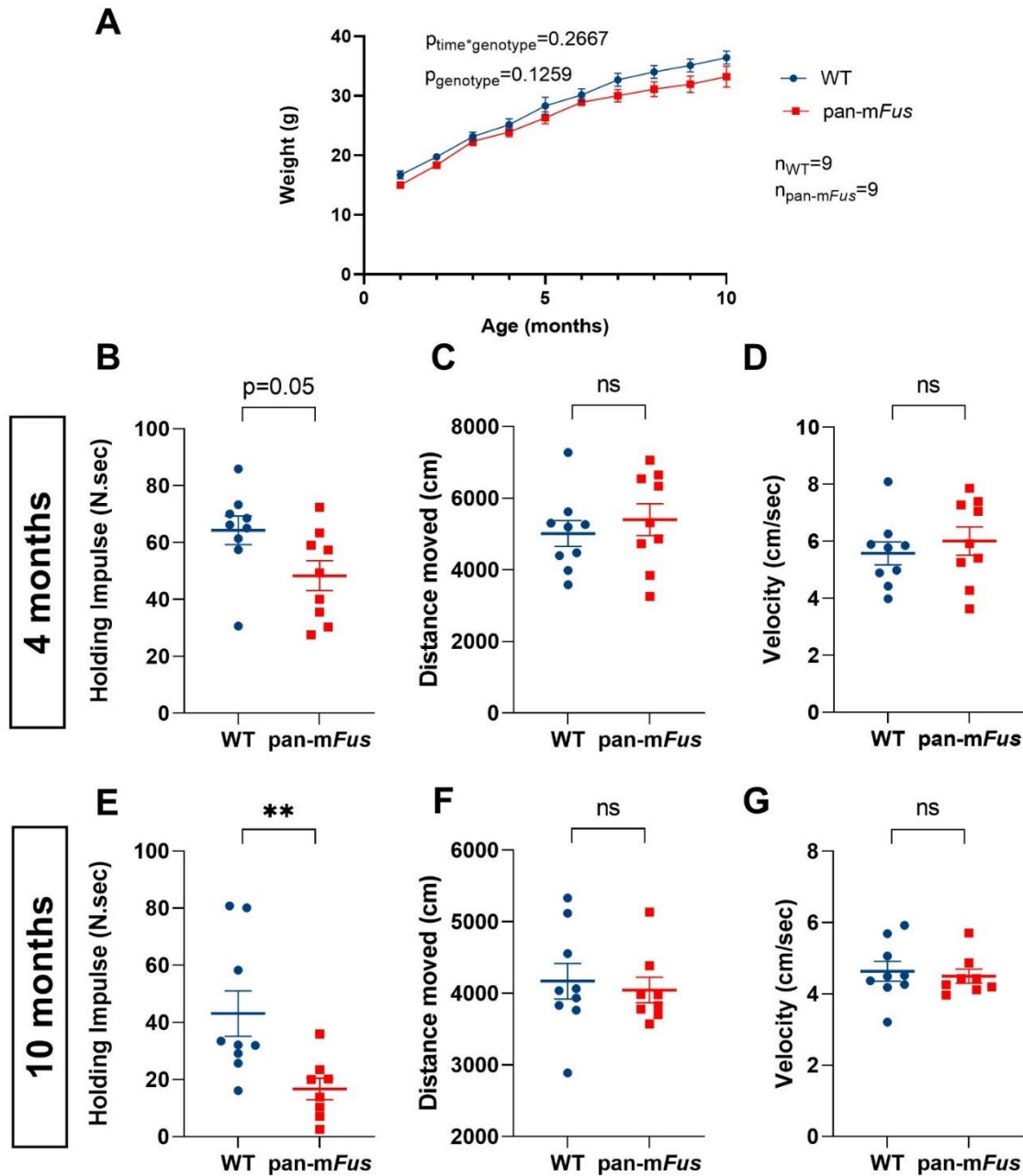
## Conclusion des expériences

Au niveau biochimique, comme chez les mâles, nous observons à 10 mois une augmentation significative de la quantité de MBP dans la moelle épinière et le cortex des femelles pan-*mFus*, et on retrouve cette augmentation dans le cortex des femelles n'exprimant la mutation *Fus* que dans les oligodendrocytes matures. Bien que les altérations d'origine oligodendrocytaire de la myéline soient similaires entre mâles et femelles, on observe un dimorphisme sexuel dans l'apparition des phénotypes. Alors que la mutation *Fus* oligodendrocytaire entraîne chez les mâles une hypersociabilité et un comportement compulsif, on observe chez les femelles un désintérêt et une apathie, visibles sur plusieurs tests distincts (champ ouvert, intrus résident et enfouissement des billes). Nous avons également montré que la mutation *Fus* oligodendrocytaire chez les femelles entraîne l'apparition tardive d'un phénotype moteur au test de la grille inversée, qui n'est pas visible chez les mâles.



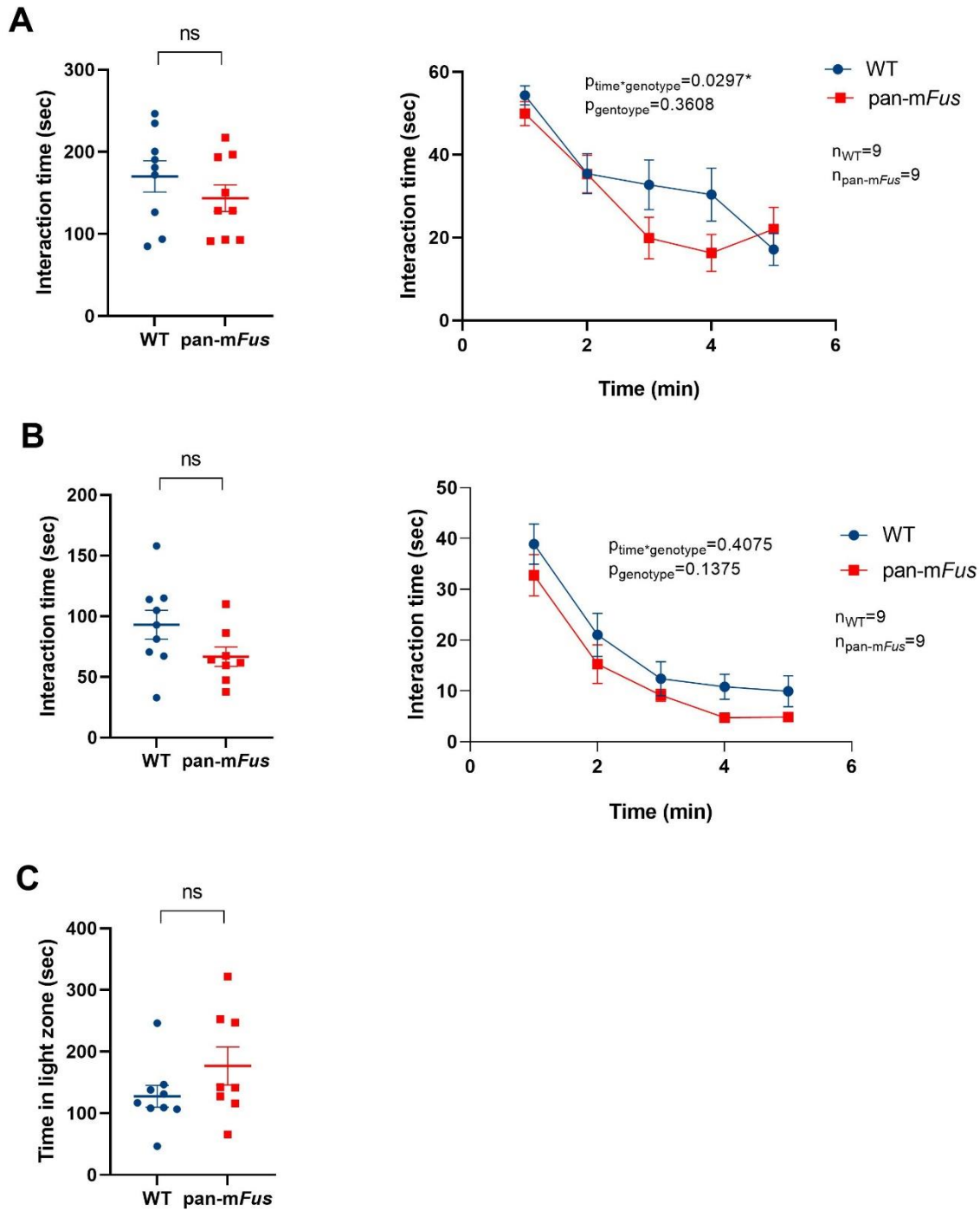
**Figure 3. Myelin ultrastructure and *Mbp* expression in pan-*mFus* female mice.**

**A** Frequency distribution of myelinated fibers according to myelin thickness in the corpus callosum of 10-month-old WT (blue) and pan-*mFus* (red) female mice.  $**** p < 0.0001$ , Kolmogorov-Smirnov test,  $n = 930$  for WT mice and  $n = 1089$  for pan-*mFus* mice from 4 animals per group. **B** Representative electron microscopy photographs showing the aspect of myelinated fibers in the corpus callosum of 10-month-old WT and pan-*mFus* mice. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ . **C** Scatter plots showing the correlation between g-ratio and axon caliber (left), and violin plots representing the g-ratio (right) of myelinated fibers in the corpus callosum of 10-month-old WT (blue) and pan-*mFus* (red) mice.  $**** p < 0.0001$ , extra sum-of-squares F test for comparison of correlations and unpaired t-test on log-transformed data for mean g-ratio as in A. **D, E** Quantification of mRNA (D) and protein (E) levels of MBP in cortex (left) and spinal cord (right) of 10-month-old WT and pan-*mFus* mice. Data are expressed as percentage of WT. \*  $p < 0.05$ , unpaired t-test on log-transformed data,  $n = 4$ . **F** Representative immunoblot showing MBP in protein extracts from mice as in E.



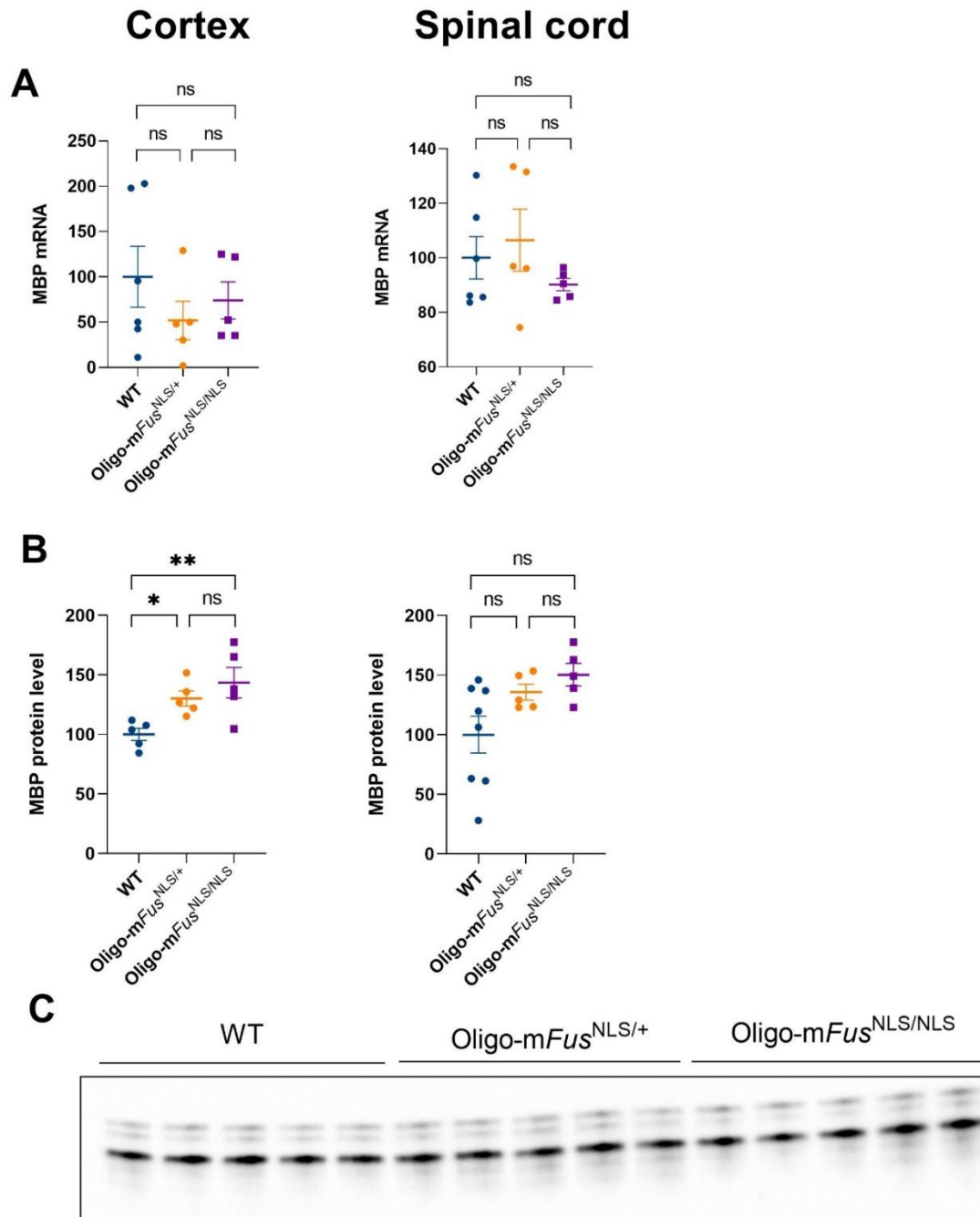
**Figure 4. Motor phenotype in pan-*mFus* female mice.**

**A** Body mass of WT (blue) and pan-*mFus* (red) mice. Repeated measures two-way ANOVA on log-transformed data;  $n = 9$  for WT mice and  $n = 9$  for pan-*mFus* mice. **B, E** Holding impulse in the inverted grid test of 4- (**B**) and 10-month-old (**E**) WT and pan-*mFus* mice. \*\*  $p < 0.01$ , unpaired t-test on log-transformed data;  $n$  as in **A**. **C, D, F, G** Motor activity in the open field test showing distance moved (**C, F**) and velocity (**D, G**) of 4- (**C, D**) and 10-month-old (**F, G**) WT and pan-*mFus* mice. Data are analyzed as in **B**. ns, non-significant.



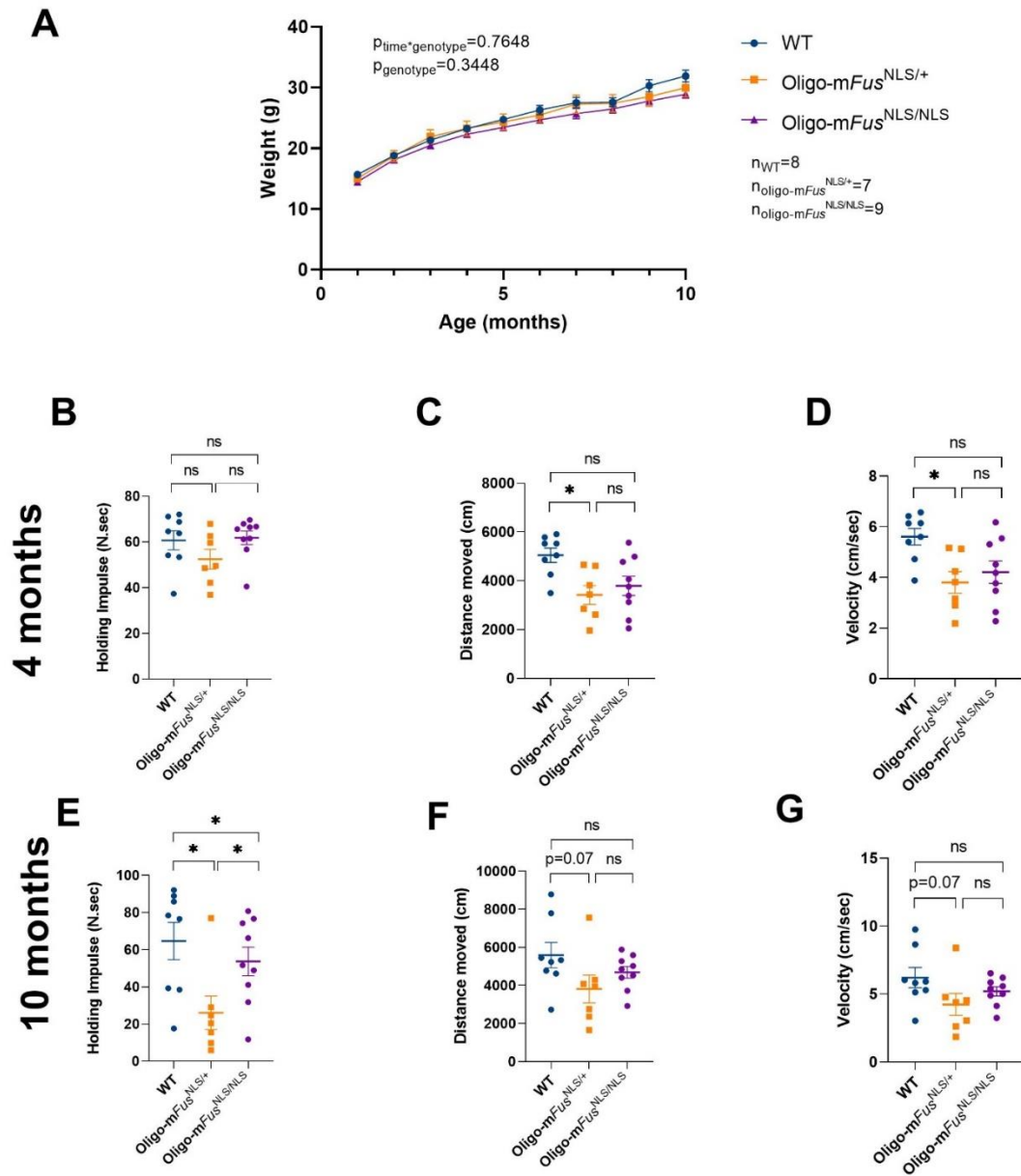
**Figure 5. Social phenotype in pan-mFus mice.**

**A, B** Total (left) and 1-min intervals (right) interaction time in the resident intruder test of 4- (A) and 10-month-old (B) WT and pan-mFus mice.  $F(4,64)=2.875$ ,  $p=0.0297$  for time/genotype interaction effect at 4-month-old, repeated measures two-way ANOVA for 1-min intervals interaction time and unpaired t-test for total interaction time on log-transformed data ;  $n=9$  for WT mice and  $n=9$  for pan-mFus mice. **C** Time spent in the light compartment in the light/dark test of 10-month-old WT and pan-mFus mice. Data are analyzed as in A. ns, non-significant.



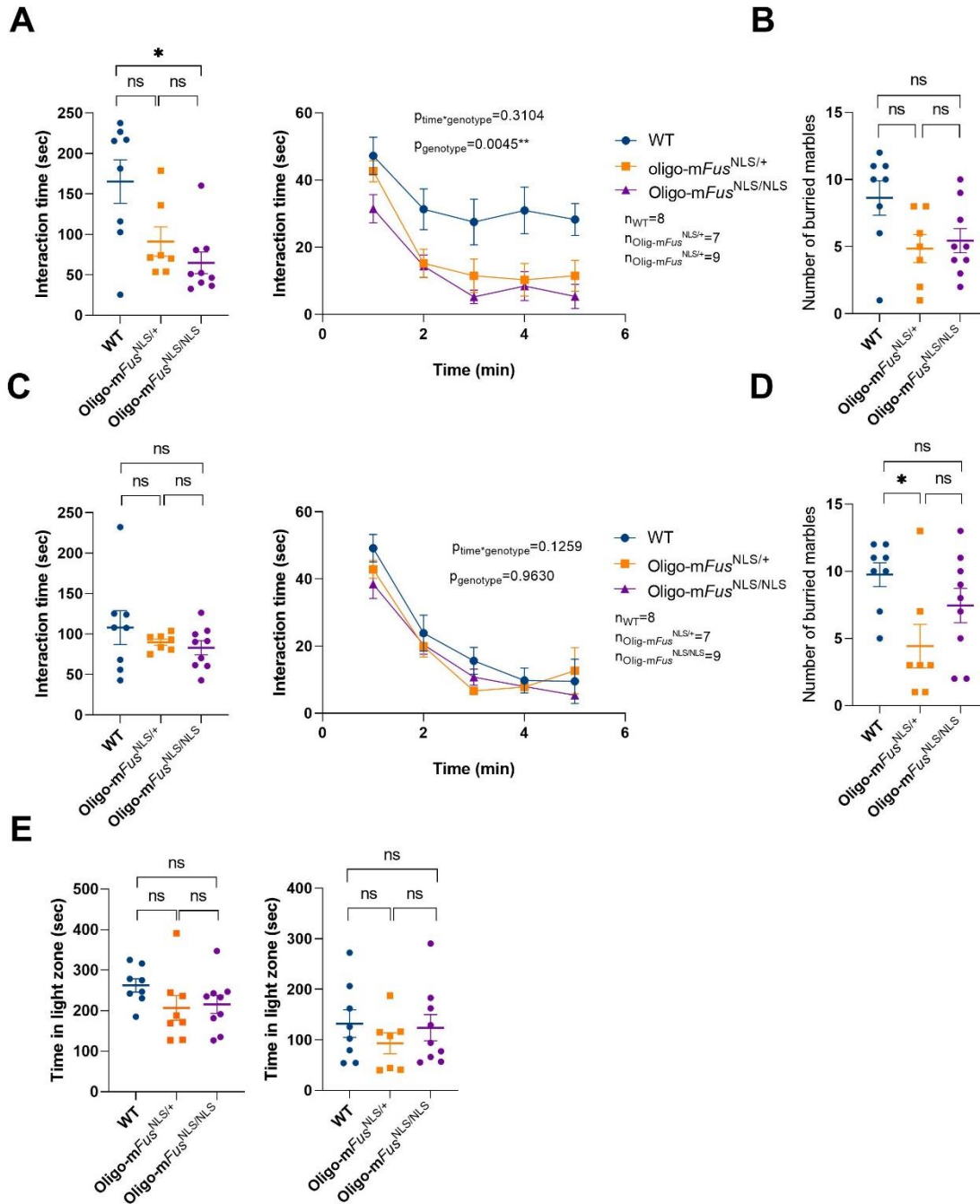
**Figure 6. *Mbp* expression in oligo-*mFus* mice.**

**A, B** Quantification of mRNA (A) and protein (B) levels of MBP in cortex (left) and spinal cord (right) of 10-month-old WT, oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> and oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice. Data are expressed as percentage of WT. \* p<0.05, \*\* p<0.01 ; one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test on log-transformed data ; n>5 for WT mice, n=5 for oligo-*mFus*<sup>NLS/+</sup> mice and n=5 for oligo-*mFus*<sup>NLS/NLS</sup> mice. **C** Representative immunoblot showing MBP in protein extracts of spinal cord from mice as in B.



**Figure 7. Motor phenotype in oligo-mFus mice.**

**A** Body mass of WT (blue), oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> (orange) and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> (purple) mice. Repeated measures two-way ANOVA on log-transformed data ; n=8 for WT mice, n=7 for oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> mice and n=9 for oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. **B, E** Holding impulse in the inverted grid test of 4- (**B**) and 10-month-old (**E**) WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup>, and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. \* $p < 0.05$  at 4-month-old, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test on log-transformed data ; n as in **A**. **C, D, F, G** Motor activity in the open field test showing distance moved (**C, F**) and velocity (**D, G**) of 4- (**C, D**) and 10-month-old (**F, G**) WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup>, and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. \* $p < 0.05$  at 4-month-old, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test on log-transformed data ; n as in **A**. ns, non-significant.



**Figure 8. Social phenotype in oligo-mFus mice.**

**A, C** Total (left) and 1-min intervals (right) interaction time in the resident intruder test of 4- (A) and 10-month-old (C) WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup>, and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. \*  $p < 0.05$ ,  $F(2,21) = 7.069$ ,  $p = 0.0045$  for genotype factor at 4-month-old, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test for total interaction time and repeated measures two-way ANOVA for 1-min intervals interaction time on log-transformed data;  $n = 8$  for WT mice,  $n = 7$  for oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> mice and  $n = 9$  for oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. **B, D** Number of marbles buried in the marble burying test by 4- (B) and 10-month-old (D) WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup>, and oligo-mFus<sup>NLS/NLS</sup> mice. \*  $p < 0.05$  at 10 months, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test on log-transformed data,  $n$  as in A. **E** Time spent in the light compartment in the light/dark test of 4- and 10-month-old WT, oligo-mFus<sup>NLS/+</sup>, and oligo-mFus<sup>NLS/+</sup> mice. Data are analyzed as in B. ns, non-significant.

## Discussion



L'objectif de cette thèse était de caractériser les altérations oligodendrocytaires du modèle murin pan-*mFus* de SLA-DFT, ainsi que d'identifier la contribution des oligodendrocytes dans le développement des phénotypes moteurs et cognitifs de ce modèle. Pour cela, nous avons développé une nouvelle lignée murine, qui exprime la mutation *Fus* uniquement dans les oligodendrocytes matures (Oligo-*mFus*). Cette lignée exploite le système de recombinaison Cre, et est issue d'un croisement avec les animaux CNP-Cre exprimant la CRE sous le contrôle du promoteur du gène *Cnp*.

Grace à cette étude, nous avons pu mettre en évidence que la mutation *Fus* dans les oligodendrocytes entraîne des altérations de la gaine de myéline à la fois au niveau structurel (augmentation pathologique de la taille des gaines) et au niveau de la composition (augmentation de l'expression de la protéine MBP). Ces altérations sont associées au développement d'altérations cognitives et comportementales de type DFT, dont la forme dépend du sexe des animaux. En revanche, les oligodendrocytes n'entraînent pas de phénotype moteur lorsqu'ils sont porteurs de la mutation *Fus*, du moins avant l'âge de 10 mois.

Nous discuterons ici les mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer les altérations que nous observons au niveau de la gaine de myéline. Puis, en nous appuyant sur l'exemple d'autres pathologies comme la schizophrénie ou l'autisme, nous extrapolerons les mécanismes par lesquels ces altérations de la myéline pourraient provoquer des troubles cognitifs. Enfin, nous discuterons du dimorphisme sexuel observé au niveau comportemental lorsque la mutation *Fus* est induite dans les oligodendrocytes, et dans quelle mesure les oligodendrocytes sont impliqués dans l'apparition de ce dimorphisme. Nous ferons ensuite un état des lieux des limites auxquelles cette étude se heurte, avant de conclure sur les bénéfices que nos observations auront pour la compréhension globale du syndrome SLA-DFT, et sur les conséquences pour la recherche de traitements.

# I. FUS affecte la gaine de myéline – hypothèses sur les mécanismes en jeu

## I.A. Perte de fonction de FUS et augmentation de la taille des gaines

L'étude de Guzman a montré qu'une perte totale de FUS dans les oligodendrocytes matures entraînait une augmentation significative de l'épaisseur des gaines de myéline suite à une augmentation du métabolisme lipidique, et notamment de l'expression d'HMGCR, une enzyme essentielle à la synthèse du cholestérol (Guzman et al., 2020). Nous faisons donc l'hypothèse que l'augmentation de la taille des gaines observée dans notre modèle est due à une perte de fonction de FUS qui altère le métabolisme lipidique des oligodendrocytes. Cette hypothèse est corroborée par une étude récente montrant que parmi les 429 gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, 130 sont des cibles directes de FUS, et que des OPC dérivés d'IPSC de patients FUS-SLA présentent un chamboulement de leurs ratios de glycérophospholipides (Zhu et al., 2024). De plus, cette même étude montre une augmentation de l'expression de PLP1 au niveau transcriptomique dans les OPC dérivés d'IPSC de patients FUS. Or PLP1 joue un rôle essentiel dans l'enrichissement de la gaine de myéline en cholestérol. La surexpression de PLP1 liée à la mutation FUS pourrait donc également avoir un impact sur le contenu lipidique des gaines de myéline et sur leur G-ratio. Les modèles pan-*mFus* et oligo-*mFus* que nous avons exploités ne présentant pas d'agrégats ni de perte nucléaire de FUS, la perte de fonction de FUS résulte probablement d'une altération de la fixation de FUS avec ses partenaires du fait de la suppression du domaine NLS. En effet, les propriétés de fixation de FUS dépendent entre autres de sa conformation, possiblement altérée par la troncation.

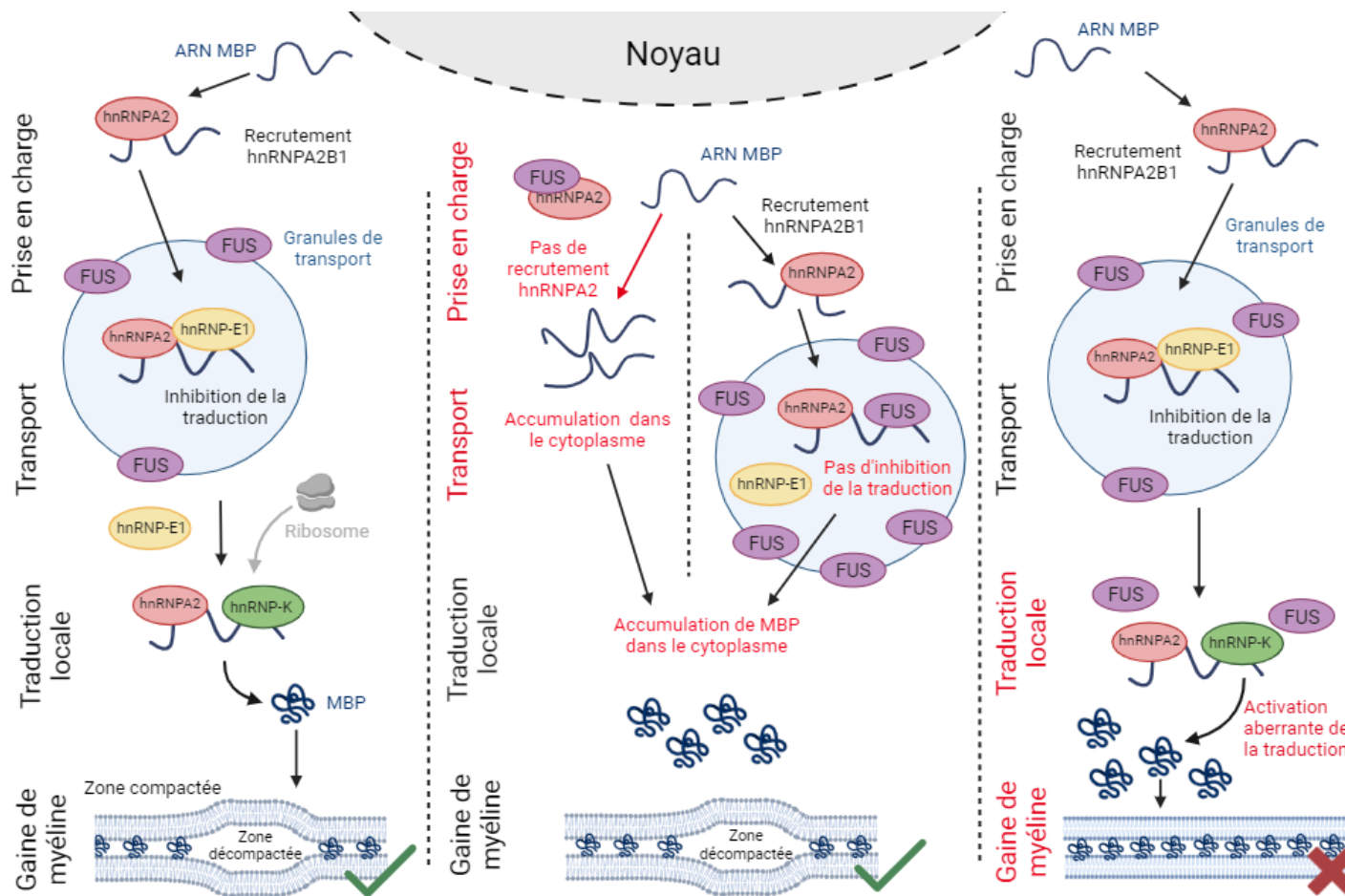
## I.B. Gain de fonction de FUS et augmentation de l'expression de MBP

A l'inverse, la perte oligodendrocytaire de FUS n'affecte pas l'expression de MBP (Guzman et al., 2020), ce qui suggère que l'augmentation de MBP chez les pan-*mFus* est indépendante de l'augmentation de la taille des gaines, et qu'elle résulte d'un gain de fonction de FUS. Or l'augmentation de MBP n'a pas lieu au niveau transcriptionnel, ce qui signifie que FUS affecte le traitement post-transcriptionnel de l'ARN de MBP, probablement suite à sa délocalisation

cytoplasmique. La troncation de FUS au niveau du NLS entraîne une augmentation pathologique de FUS dans le cytoplasme, qui peut avoir deux conséquences délétères en particulier dans les oligodendrocytes où la quantité cytoplasmique de FUS est négligeable en conditions physiologiques : non seulement FUS en excès risque de se fixer trop fortement ou trop fréquemment sur ses cibles habituelles, mais sa délocalisation peut la mettre en contact dans le cytoplasme avec de nouveaux partenaires inédits, et notamment les acteurs du transport et de la traduction de l'ARN de MBP. En tant que hnRNP elle-même, FUS présente naturellement une certaine affinité pour les autres hnRNP et sa présence en excès dans le cytoplasme risque ainsi d'affecter les fonctions des grandes actrices du transport et de la traduction locale de l'ARN de MBP : hnRNPA2, E1 et K. Nos résultats préliminaires de retard sur gel suggèrent que la protéine FUS pourrait notamment entrer en compétition avec hnRNPE1 pour se fixer à l'ARN de MBP, et ainsi potentiellement empêcher l'inhibition de la traduction au cours du transport. De même, nous explorons la possibilité que FUS interagisse avec la fixation de hnRNPA2B1 ou hnRNP-K avec l'ARN de MBP, et affecte aussi son transport ou sa traduction locale (Fig.16).

Si FUS affecte l'inhibition de la traduction au cours du transport, cela signifie que l'augmentation de l'expression de MBP n'a pas lieu au niveau de la gaine, mais bien dans le cytoplasme, où elle risque d'entraîner la compaction aléatoire et dramatique de membranes d'organites, comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique. Ce risque fait écho au fait que les OPC dérivés d'IPSC de patients FUS présentent une altération des membranes associées aux mitochondries et une dégradation de la respiration mitochondriale (Fig.16) (Zhu et al., 2024).

Si FUS affecte le transport de l'ARN, alors la traduction de MBP ne peut pas avoir lieu localement au niveau de la gaine, ce qui risque d'entraîner une altération de la compaction, avec des conséquences fâcheuses sur la propagation du signal axonal (Fig.16).



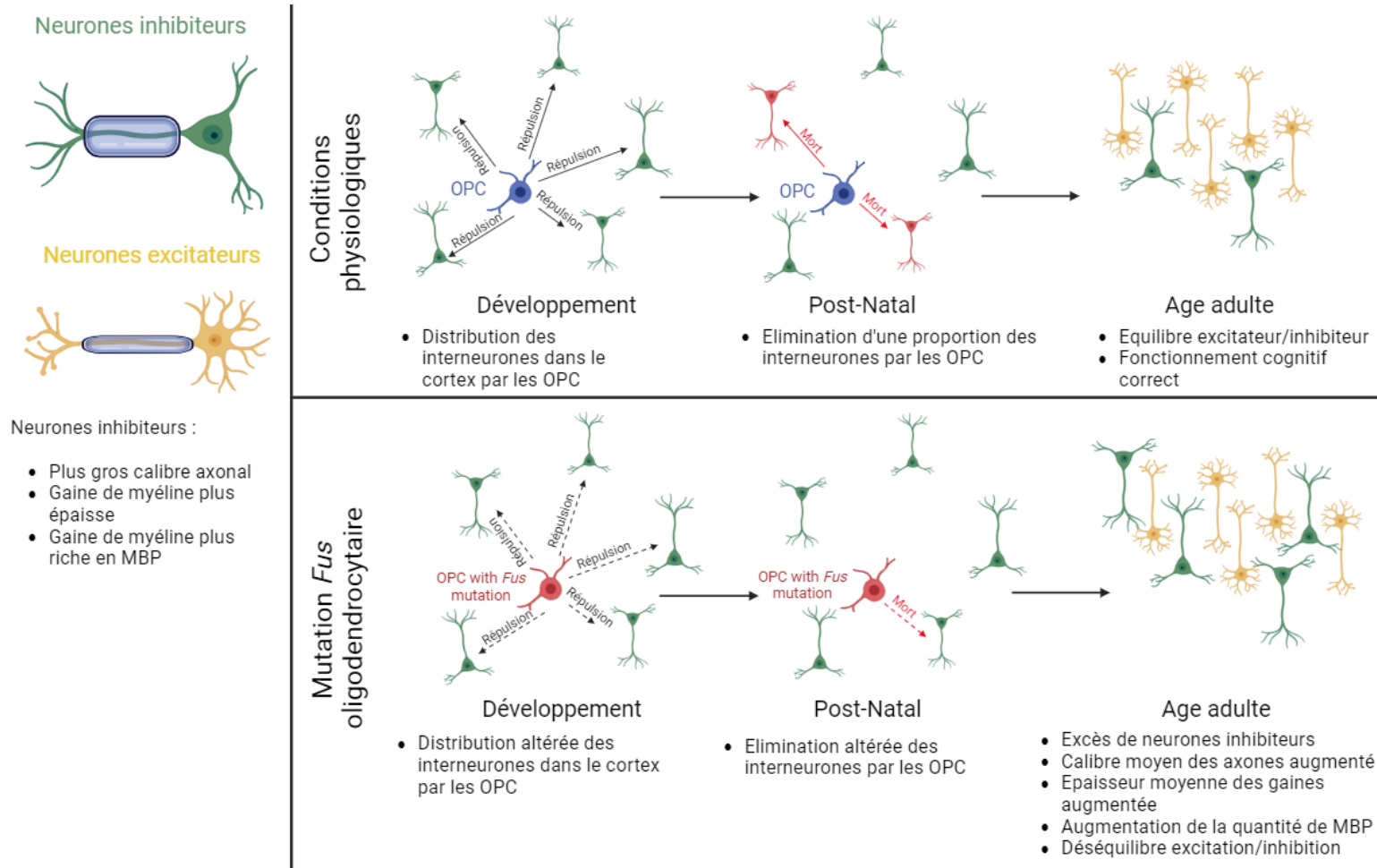
**Figure 16 Premières hypothèses sur les causes et conséquences possibles de l'augmentation de la protéine MBP suite à la mutation *Fus*.**

En conditions physiologiques (panneau de gauche), la gestion de l'ARN de MBP dans le cytoplasme de l'oligodendrocyte comporte sa prise en charge par hnRNP-A2B1, son transport et sa traduction locale au niveau de la gaine. En présence de la mutation *Fus* oligodendrocytaire, deux hypothèses peuvent expliquer l'augmentation de MBP. 1- L'accumulation cytoplasmique de FUS affecte le transport ou l'inhibition de la traduction au cours du transport en impactant les interactions de hnRNP-A2B1 et/ou hnRNP-E1 avec l'ARN de MBP. *Mbp* est alors traduit dans le cytoplasme, sans impact au niveau de la gaine de myéline (panneau du milieu). 2- L'accumulation cytoplasmique de FUS active de manière aberrante la traduction de MBP au niveau de la gaine en affectant hnRNP-K ou la stabilité de l'ARN. L'augmentation de MBP est alors correctement localisée, mais il en résulte une compaction pathologique des gaines, avec des conséquences pour le maintien fonctionnel de la gaine et de l'axone. Fait avec Biorender.

Si FUS n'affecte ni le transport, ni l'inhibition de la traduction au cours du transport, cela signifie que l'augmentation de l'expression de MBP que nous observons a bien lieu au niveau de la gaine de myéline. Cela pourrait s'expliquer par exemple si l'excès de FUS dans le cytoplasme augmente la stabilité de l'ARN de MBP. Même correctement localisée, une quantité excessive de MBP serait délétère pour le maintien de la gaine comme pour le fonctionnement et la survie de l'axone. En effet, en conditions physiologiques, des zones décompactées sont préservées au sein de la gaine de myéline, permettant l'acheminement ou le rapatriement par endocytose de ses composants ainsi que la livraison des substrats nécessaires au support métabolique de l'axone. Ces zones décompactées permettent également d'évacuer le potassium de l'espace périaxonal (Snaidero et al., 2017). La perte de ces zones entraîne une importante pathologie axonale, l'apparition progressive de déficits moteurs et un décès précoce (Lappe-Siefke et al., 2003; Snaidero et al., 2017).

### **I.C. Altération de la myélinisation ou déséquilibre neuronal ?**

Cependant, ces altérations de la myéline pourraient résulter non pas d'un défaut de myélinisation mais d'une modification de l'équilibre entre le nombre de neurones excitateurs et de neurones inhibiteurs. En effet les neurones inhibiteurs sont caractérisés par une myéline légèrement différente de celle des neurones excitateurs, plus riche en protéine MBP de 20%. De plus les neurones inhibiteurs ont un plus gros diamètre d'axone et contiennent davantage de neurofilaments (Micheva et al., 2016). Or, nous observons dans notre modèle pan-*mFus* une augmentation de l'expression de MBP, mais aussi une augmentation du calibre des axones (données non montrées) et une augmentation de l'expression des neurofilaments. Ces observations pourraient donc s'expliquer par une augmentation du ratio neurones inhibiteurs/neurones excitateurs dans le modèle pan-*mFus*. De plus, nous avons vu dans notre modèle Oligo-*mFus* que la mutation *Fus* oligodendrocytaire est suffisante pour entraîner l'augmentation de MBP et des neurofilaments. D'après notre hypothèse, cela signifie donc que les oligodendrocytes affectés par *Fus* pourraient moduler le nombre de neurones inhibiteurs. Or les oligodendrocytes jouent un rôle essentiel dans le nombre et la répartition des interneurones, dont ils orchestrent l'hécatombe juste après la naissance. Cette élimination est indispensable à l'équilibre excitation/inhibition et au bon fonctionnement cortical à l'âge adulte, et lorsqu'elle n'a pas lieu il en résulte une densité trop importante d'interneurones et une altération des performances cognitives et sociales (Fig.17) (Fang and Bai, 2023).



**Figure 17 Deuxième hypothèse sur les causes possibles de l'augmentation de la protéine MBP suite à la mutation *Fus*.**

En conditions physiologiques (panneau supérieur), les OPC jouent un rôle dans la distribution corticale et la mort programmée des neurones inhibiteurs, essentielles pour un ratio correct neurones inhibiteurs-neurones excitateurs, et un bon équilibre de l'excitation corticale à l'âge adulte. L'altération par la mutation *Fus* de l'une de ces fonctions oligodendrocytaires pourrait entraîner une augmentation pathologique du nombre de neurones inhibiteurs, et il en résulterait une augmentation globale des neurofilaments, de MBP et de la taille des gaines.

Ainsi, deux hypothèses pourraient expliquer les altérations observées dans notre modèle pan-*mFus*. 1- La mutation *Fus* oligodendrocytaire affecte le métabolisme lipidique et la gestion de l'ARN de MBP, ce qui entraîne respectivement une augmentation de la taille des gaines de myéline et une augmentation de l'expression de MBP. 2- La mutation *Fus* oligodendrocytaire altère les fonctions post-natales des oligodendrocytes, ce qui affecte le nombre et la localisation des interneurones dans le système nerveux central. Les interneurones étant plus gros et plus myélinisés que les neurones excitateurs, il en résulte une augmentation globale de l'expression de MBP et des neurofilaments dans le modèle pan-*mFus*.

## II. Altérations de la myéline et troubles cognitifs

### II.A. Des altérations de la myéline à l'origine du déséquilibre excitation/inhibition dans la schizophrénie et l'autisme

D'autres maladies que la DFT peuvent affecter le comportement cognitif et social des patients, sans être associées à la mort des neurones. C'est notamment le cas de la schizophrénie ou de l'autisme, deux troubles caractérisés par des altérations du comportement social, des difficultés de communication et des comportements répétitifs et obsessionnels. Dans ces deux pathologies, les oligodendrocytes et la gaine de myéline sont affectés, et connus pour jouer un rôle important dans le développement des symptômes (Graciarena et al., 2019; Galvez-Contreras et al., 2020; Maas et al., 2020; Fessel, 2022). Dans la schizophrénie, un défaut de maturation des oligodendrocytes entraîne une hypomyélinisation des interneurones du cortex préfrontal, ce qui affecte leur excitabilité (Maas et al., 2020). De même, plusieurs altérations de la myéline ont été décrites chez les patients autistiques ainsi que dans les modèles murins portant la mutation *pten* associée à l'autisme. Ces animaux exhibent notamment une augmentation de l'expression de la protéine MBP, une altération du transport de PLP1, et une myélinisation aberrante, associées à une maturation précoce des OPC. Ces anomalies touchent essentiellement la substance blanche (Lee et al., 2019). Ces altérations de la myéline et des oligodendrocytes, en particulier lorsqu'ils affectent les neurones inhibiteurs, sont impliquées dans la mise en place d'un déséquilibre excitation/inhibition (Benamer et al., 2020; Mazuir et al., 2021). En effet, la myéline affecte la vitesse de la propagation des potentiels d'action et donc la synchronicité des signaux (Mazuir et al., 2021). De plus, l'excitabilité axonale dépend de l'efficacité d'enlèvement du potassium de l'espace périaxonal : une fonction spécifiquement oligodendrocytaire. L'altération de l'équilibre excitation/inhibition dans la schizophrénie et l'autisme pourrait être à l'origine des troubles du comportement observés chez les patients (Liu et al., 2021; Hollestein et al., 2023).

Ainsi, en affectant la vitesse de propagation du signal, la gaine de myéline et les oligodendrocytes jouent un rôle dans la mise en place d'un équilibre excitation/inhibition correct, indispensable à un bon fonctionnement cognitif. Une altération de la myéline peut donc entraîner des déficits cognitifs et des phénotypes comportementaux.



## II.B. Qu'en est-il dans notre modèle de DFT associée à FUS ?

Le modèle pan-*mFus* manifeste des altérations comportementales ainsi qu'une altération de l'excitabilité corticale (Scekic-Zahirovic et al., 2021b). La question se pose donc de savoir si des mécanismes similaires à ceux observés dans l'autisme et la schizophrénie pourraient être en jeu. Dans l'étude de Guzman, la perte de fonction totale de FUS dans les oligodendrocytes matures entraîne une augmentation significative de la taille de la gaine de myéline, associée à une hyperactivité et un comportement exploratoire augmenté, qui pourraient s'apparenter à un phénotype de désinhibition. Bien que la sociabilité et compulsivité des animaux n'aient pas été testées, ce résultat suggère que l'augmentation de la taille de la gaine de myéline pourrait être responsable de certaines altérations cognitives, indépendamment de la surexpression de MBP. L'hypothèse la plus plausible est que la taille de la gaine, en modulant subtilement la vitesse de propagation du signal le long de l'axone, affecte la synchronicité des signaux comme précédemment décrit dans la schizophrénie, et entraîne ainsi l'apparition de troubles comportementaux (Kimura and Itami, 2009; Pajevic et al., 2014). Cependant, les déficiences cognitives pourraient aussi être liées à l'altération du métabolisme de l'ARN de MBP. En effet, l'augmentation de la protéine MBP que nous observons dans notre modèle est également présente dans le modèle murin autistique portant la mutation *pten*, associée à des altérations du comportement social et cognitif (Lee et al., 2019). Il est également intéressant de noter que la protéine tau, lourdement impliquée dans l'apparition des démences, joue un rôle important dans le transport de l'ARN de MBP (Seiberlich et al., 2015). Ainsi les altérations de la myéline que nous observons pourraient être directement liées à l'apparition de phénotypes cognitifs en affectant l'équilibre excitation/inhibition, ou la synchronicité des signaux.

De plus, bien que nous nous soyons essentiellement intéressés aux altérations de la gaine de myéline, d'autres fonctions oligodendrocytaires pourraient être affectées par la mutation *Fus* et impacter le bon fonctionnement neuronal. Dans cette optique, il serait intéressant d'étudier dans quelle mesure le support métabolique de l'axone par l'oligodendrocyte ou le siphonnage du potassium hors de l'espace périaxonale sont altérés en présence de la mutation *Fus*.

## III. Le dimorphisme sexuel

### III.A. Un dimorphisme sexuel exacerbé en conditions pathologiques

En conditions physiologiques, le sexe impacte le comportement social et cognitif des animaux : les mâles manifestent une agressivité exacerbée par rapport aux femelles qui, elles présentent un comportement plus exploratoire et une plus grande résistance au stress (Nomura et al., 2002; Allen et al., 2010; Hodes and Epperson, 2019; Aubry et al., 2022). D'autres paramètres comme le sommeil ou le comportement parental sont également influencés par le sexe (Chen et al., 2019). Le comportement social varie aussi, bien que certaines études montrent un intérêt social exacerbé chez les mâles par rapport aux femelles (Baumgartner et al., 2023) et d'autres l'inverse (An et al., 2011). De nombreuses études ont montré que les conditions pathologiques ont tendance à exacerber les manifestations de ce dimorphisme sexuel comportemental. L'obésité provoquée par un régime riche en graisse, ou le stress chronique entraînent notamment un déficit cognitif de l'apprentissage et de la mémoire spatiale plus marqué chez les mâles que chez les femelles, voire inexistant chez les femelles (Prochnik et al., 2022). Le stress chronique a même tendance à améliorer les performances de la mémoire des femelles alors qu'il l'altère chez les mâles et a un effet opposé sur les manifestations d'anxiété entre les mâles et les femelles (Luine et al., 2007). La douleur exacerbe le dimorphisme sexuel et entraîne des déficits cognitifs d'apprentissage et mémoire spatiale ainsi que de reconnaissance d'objet chez les mâles seulement (Won et al., 2020). De même, suite à une démyélinisation chimique à la cuprizone, les mâles présentent des altérations motrices sur les tests de la barre horizontale ou le test de suspension, tandis que les femelles ont une performance diminuée au test séquentiel des compétences motrices. Au niveau comportemental, la cuprizone a un effet fortement anxiogène chez les mâles mais pas chez les femelles (Paton et al., 2022). Cette hypothèse d'augmentation du dimorphisme sexuel comportemental en conditions pathologiques se vérifie également chez les patients atteints de maladies neurodégénératives, ou dans des cas de troubles cognitifs, comme la schizophrénie (Leger and Neill, 2016; Yang et al., 2022), l'autisme (Napolitano et al., 2022), les maladies d'Alzheimer (Ferretti et al., 2018) et de parkinson (Farhadi et al., 2017; Russillo et al., 2022) ou de Huntington (Hentosh et al., 2021; Yang et al., 2022; Zalewska et al., 2022).

### **III.B. Importance des oligodendrocytes dans l'apparition de ces dimorphismes sexuels.**

Dans notre étude, nous avons observé que la mutation *Fus* dans les oligodendrocytes matures entraîne des phénotypes sociaux et cognitifs opposés chez les mâles et les femelles. Ces résultats font écho à une étude menée sur les altérations comportementales des patients DFT en fonction de leur sexe, qui suggère la surreprésentation chez les hommes DFT de variants comportementaux de type agressifs ou compulsifs, alors que les femmes présentent préférentiellement des altérations du langage et de la communication (Pengo et al., 2022). Ces observations suggèrent un rôle des oligodendrocytes et de la myéline dans l'apparition d'un dimorphisme sexuel comportemental en conditions pathologiques, et pose la question des mécanismes sous-jacents.

Les oligodendrocytes, tout comme les OPC, expriment des récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Nomura et al., 2002; Zhang et al., 2004; Khalaj et al., 2013). Ces récepteurs sont notamment essentiels dans les processus de prolifération, différenciation et myélinisation des oligodendrocytes (Crawford et al., 2010; Okada et al., 2010), ce qui pourrait expliquer certaines différences observées dans le nombre et le renouvellement des oligodendrocytes entre mâles et femelles. Or la suppression des récepteurs à œstrogènes alpha (ER $\alpha$ ) et beta (ER $\beta$ ) a des effets opposés sur le comportement social des souris en fonction du sexe : chez les mâles le KO de ER $\alpha$  réduit l'agressivité et le KO de ER $\beta$  l'augmente, alors que c'est l'inverse chez les femelles (Ogawa et al., 1998; Allen et al., 2010). De plus, l'oestradiol et la corticostérone sont lourdement incriminées dans l'apparition des dimorphismes sexuels comportementaux (Luine et al., 2007). Ainsi en conditions pathologiques, les oligodendrocytes pourraient réagir différemment du fait de l'environnement hormonal, et entraîner ainsi l'apparition d'un phénotype comportemental dépendant du sexe.

Cependant, les hormones sexuelles n'expliquent pas seules les dimorphismes comportementaux observés. En effet, la cuprizone affecte différemment le comportement des mâles et des femelles alors que ce traitement interrompt le cycle œstral des femelles (Taylor et al., 2010; Paton et al., 2022). Une autre hypothèse pourrait impliquer le facteur neurotrophique BDNF

(Brain-derived neurotrophic factor), qui est différenciellement exprimé entre les mâles et les femelles et impliqué dans les dimorphismes comportementaux des souris. Il a en effet été montré que le KO de BDNF dans le cortex frontal entraîne un comportement dépressif et anxieux chez les femelles et une hyperactivité chez les mâles (Monteggia et al., 2007; Sardar et al., 2021; Prochnik et al., 2022). Or le taux de BDNF affecte la remyélinisation du système nerveux central suite à un traitement démyélinisant à la cuprizone, en agissant directement sur la prolifération et la différenciation des oligodendrocytes (VonDran et al., 2011). Ainsi, du fait de leur sensibilité à des facteurs non hormonaux différenciellement exprimés entre les mâles et les femelles, les oligodendrocytes pourraient jouer un rôle dans l'apparition d'un dimorphisme sexuel comportemental.

Il est cependant important de noter que, dans notre étude, la myéline ne semble pas différemment altérée en fonction du sexe. En effet, nous observons la même augmentation de l'expression de MBP chez les mâles et les femelles, et la même diminution du G-ratio. De même, d'après la littérature, les traitements cuprizone entraînent une mort des oligodendrocytes matures et une démyélinisation similaire entre mâles et femelles (Taylor et al., 2010; Paton et al., 2022). Ces résultats suggèrent donc qu'une même altération de la myéline peut affecter différemment les cellules environnantes et le comportement des animaux en fonction du sexe. Une étude de single-cell RNA-seq actuellement en cours sur les animaux pan-*mFus* permettra bientôt de déterminer les implications moléculaires de la mutation en fonction du type cellulaire, et d'identifier plus précisément les responsables possibles d'un dimorphisme sexuel comportemental.

## IV. Les limites de l'étude

### IV.A. Le modèle pan-*mFus* comme modèle de DFT

Dans cette étude, nous avons travaillé sur le modèle pan-*mFus* comme modèle de SLA-DFT lié à la protéine FUS. En effet, ce modèle exprime une mutation qui affecte le signal de localisation nucléaire du gène *Fus*, comme observé dans la majorité des patients FUS-SLA. De plus, du fait de cette mutation, ce modèle présente une délocalisation cytoplasmique de FUS, comme observé chez les patients DFT-FUS. Les altérations cognitives de ce modèle, décrites par Scekic-Zahirovic et al. et Tzeplaëff et al. (Scekic-Zahirovic et al., 2021b; Tzeplaëff et al., 2023) ont encouragé son utilisation comme modèle de DFT. Cependant, le fait que nous n'ayons pas reproduit l'hypersociabilité préalablement mise en évidence nous force à interroger la solidité de ce phénotype, ainsi que les paramètres qui l'influencent. La cohorte d'animaux pan-*mFus* que nous avons générée pour cette étude présente un fond génétique mixe C57B16-J/N, contrairement au fond génétique préalablement utilisé (C57B16-J pure). Or un changement de fond génétique peut affecter les comportements sociaux et cognitifs des animaux (Lipp and Wolfer, 2003; Lassalle et al., 2008; An et al., 2011). Ainsi, cette différence de fond génétique dans nos cohortes pourrait expliquer la perte du phénotype. A l'inverse, les animaux Oligo-*mFus* qui expriment un phénotype cognitif marqué ont été produits sur un fond génétique pur C57B16-N. D'autres facteurs confondants pourraient intervenir, cependant nous avons reproduit la tendance à l'hypersociabilité chez les mâles de 4 mois sur fond génétique pur lors de l'expérience cuprizonne, ce qui nous incite à penser que le facteur confondant ne provient ni de l'animalerie, ni de l'utilisateur. Ainsi, malgré la pertinence de ce modèle au niveau histologique, la fragilité du phénotype cognitif pose la question de son utilisation pour étudier les altérations comportementales de type DFT-FUS.

De plus, une étude récente a suggéré que dans les cas de DFT-FUS, FUS n'est possiblement pas le composant essentiel des agrégats, ni même leur instigateur contrairement à ce que cette appellation suggère. Il s'agirait de la protéine TAF15, homologue de FUS et lourdement agrégée et délocalisée chez les patients DFT-FUS du fait de sa capacité à former des fibrilles amyloïdes et à entraîner une séparation de phase liquide-solide (Tetter et al., 2023). Il est possible que, du fait de leurs structures hautement similaires, la délocalisation pathologique de TAF15 ait les mêmes impacts qu'une délocalisation de FUS sur les cellules en général, et sur

les oligodendrocytes en particulier. Cependant, cette observation récente soulève la question de la pertinence du modèle pan-*mFus* comme modèle de DFT. Un nouveau modèle qui nucléerait l'agrégation de FUS avec TAF15 permettrait peut-être d'obtenir un phénotype cognitif plus sévère et plus robuste, et un modèle plus juste pour étudier cette pathologie.

## **IV.B. La fragilité des « Time points »**

Comme discuté dans l'introduction, la SLA et la DFT présentent les caractéristiques de syndromes, plus que d'une maladie unique. Chez les patients, on observe notamment une grande variabilité dans l'âge de survenue des premiers symptômes, ainsi que dans la vitesse d'évolution de la maladie, même lorsque les patients sont affectés par les mêmes mutations.

On peut supposer que cette variabilité existe aussi chez la souris. Dans cette mesure, étudier les performances motrices et cognitives des animaux à des âges fixes n'est pas idéal. En effet, il serait essentiel d'identifier un biomarqueur qui permettrait d'évaluer régulièrement le stade d'avancement de la maladie pour pouvoir comparer les animaux aux mêmes stades plutôt qu'aux mêmes âges. Le dosage des neurofilaments circulants comme pratiqué chez les patients mérite d'être testé dans ces modèles, afin de voir si une corrélation peut être établie avec les altérations motrices et comportementales. Dans le cadre du modèle DFT, de l'imagerie à résonance magnétique (IRM) permettrait aussi éventuellement de mesurer l'atrophie des lobes fronto et temporaux. Cette perspective est d'autant plus importante dans un modèle comme celui des pan-*mFus* qui développent un phénotype moteur et cognitif très léger et très lent. En effet, les décalages dans la survenue de la maladie entraînent une variabilité importante lors des expériences de comportement (qui s'ajoute à la variabilité inhérente aux tests de comportements), et l'augmentation de cette variabilité efface statistiquement tout effet.

## **IV.C. Les animaux CNP<sup>Cre</sup>**

Afin d'étudier le rôle spécifique des oligodendrocytes matures dans le développement des phénotypes de type SLA ou DFT, nous avons utilisé des modèles de recombinaison inductibles par la Cre, que nous avons croisés avec la souris CNP<sup>Cre</sup> généreusement donnée par le Pr. Nave, et qui exprime la Cre sous le contrôle du promoteur oligodendrocytaire du gène *cnp*.

Bien que nous n'ayons pas observé de délocalisation significative de FUS dans les neurones corticaux suite à la recombinaison, une étude a observé que certains précurseurs des neurones pyramidaux et dorsaux expriment brièvement la CNP, suffisamment pour entraîner parfois une recombinaison des séquences loxP (Tognatta et al., 2017). Ainsi il est possible que la souris  $CNP^{Cre}$  n'entraîne pas une recombinaison absolument spécifique des oligodendrocytes matures, mais également dans quelques neurones.

De plus, suite à des contraintes de croisement génétique, nous avons fait le choix de produire dans les mêmes portées les animaux WT,  $Oligo-mFus^{NLS/+}$  et  $Oligo-mFus^{NLS/NLS}$ , et de renoncer ainsi au contrôle  $CNP^{Cre}$ . L'étude de Lappe-Siefke décrit un impact négligeable de l'haploinsuffisance en CNP sur le phénotype des animaux et sur l'expression de MBP (Lappe-Siefke et al., 2003). Nous avons néanmoins mené une étude en parallèle, dans laquelle nous observons une augmentation de l'expression de la protéine MBP chez les animaux  $CNP^{Cre}$  (significative chez les femelles seulement, dans le cortex et la moelle épinière, données non présentées). Cette observation est un facteur confondant pour l'interprétation de l'augmentation de MBP observée chez les animaux  $Oligo-mFus^{NLS/+}$  et  $Oligo-mFus^{NLS/NLS}$ , qui pourrait n'être due qu'à l'haploinsuffisance en CNP. L'étude de Gravel montre qu'une surexpression de CNP entraîne une diminution de l'expression de MBP (Gravel et al., 1996), ce qui suggère que l'expression de ces deux protéines seraient en effet liées. Cependant, dans cette étude l'impact a lieu au niveau transcriptionnel : Gravel observe en effet une diminution de l'ARN de *mbp*, associée à une diminution de la protéine MBP. A l'inverse, dans notre étude, l'augmentation de la protéine MBP chez les *oligo-mFus* n'est pas associée à une augmentation de l'ARNm de *mbp*. Ainsi, il n'est pas clair dans quelle mesure, ni à quel niveau l'haploinsuffisance de CNP pourrait affecter l'expression de MBP, et il est nécessaire de clarifier les causes moléculaires de l'augmentation que nous observons chez les animaux *Oligo-mFus*. Néanmoins, dans cette étude parallèle, l'haploinsuffisance en CNP n'affecte le comportement des animaux sur aucun des tests que nous avons mis en place (données non montrées).

## V. Pour aller plus loin

Ainsi, sans entrainer leur mort ni une altération drastique de leurs fonctions, la mutation *Fus* dans les oligodendrocytes affecte la gaine de myéline. En nous appuyant sur les exemples de la schizophrénie ou de l'autisme, nous avons discuté que ces modifications pourraient être suffisantes pour altérer la transmission du message nerveux, sans affecter la survie des neurones, et provoquer ainsi des altérations cognitives de type DFT. Cette piste suggère un nouvel angle de recherche pour atténuer les symptômes cognitifs des patients DFT, ainsi que des patients SLA développant des démences.

Dans notre modèle associé à la mutation *Fus*, nous observons que les altérations de la myéline et des oligodendrocytes ne sont pas similaires à celles observées dans le modèle SOD1<sup>G93A</sup>, plus communément utilisé pour étudier la SLA. En effet, ce dernier modèle présente plutôt une démyélinisation associée à une diminution de la protéine MBP. De plus, dans les modèles SOD1<sup>G93A</sup>, plusieurs études ont montré l'implication des oligodendrocytes dans le développement du phénotype moteur (Jamet et al., 2024), ce qui n'est pas le cas dans notre modèle pan-*mFus*. Ces observations posent la question de la spécificité des mécanismes pathologiques impliqués dans les SLA-FUS par rapport aux SLA-SOD1 et de la nécessité de distinguer les patients FUS des autres patients lors d'études sur des cohortes.



# Conclusion

Ainsi, nous avons mis en évidence que la délocalisation de la protéine FUS dans les oligodendrocytes affecte la quantité de MBP et est suffisante pour entraîner l'apparition d'un phénotype cognitif de type DFT, tandis qu'elle n'est pas suffisante pour provoquer un phénotype moteur de type SLA, du moins avant 10 mois. Bien que cette étude présente quelques limites, elle jette la lumière sur l'importance d'utiliser les deux sexes dans les modèles de maladies neurodégénératives et cognitives et invite à s'intéresser aux mécanismes par lesquels des altérations oligodendrocytaires peuvent affecter les neurones et provoquer des démences, et dans quelle mesure ces mécanismes sont communs à d'autres troubles du comportement.

# Liste des publications et communications scientifiques

## Articles publiés (Annexe)

Scekic-Zahirovic, J., Sanjuan-Ruiz, I., Kan, V., Megat, S., De Rossi, P., Dieterlé, S., Cassel, R., Jamet, M., Kessler, P., Wiesner, D., Tzeplaeff, L., Demais, V., Sahadevan, S., Hembach, K.M., Muller, H.-P., Picchiarelli, G., Mishra, N., Antonucci, S., Dirrig-Grosch, S., Kassubek, J., Rasche, V., Ludolph, A., Boutillier, A.-L., Roselli, F., Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Liebscher, S., Dupuis, L., 2021. Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects. *Nat Commun* 12, 3028. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23187-9>

## Articles soumis

Jamet, M., Dupuis, L., Gonzalez De Aguilar, J-L., Oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: the new players on stage, *Frontiers in neurosciences*

## Articles en préparation à la soumission

Jamet, M et collaborateurs  
Specific delocalisation of ALS/FTD-linked FUS in mouse oligodendrocytes affects myelin and social behavior

## Liste des communications orales et par affiches

**10/2020 : 6ème édition des journées de recherche FILSLAN - ARSLA (JR6) – présentation poster en ligne** Jamet M, Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, *Toward elucidating the role of oligodendrocytes in FUS-ALS.*

**10/2021 : 7ème édition des journées de recherche FILSLAN - ARSLA (JR7) – présentation poster – ICM, Paris** Jamet M, Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, *Toward elucidating the role of oligodendrocytes in FUS-ALS.*

**06/2022 congrès ENCALs – présentation poster – Euan MacDonald Centre and University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland** Jamet M, Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, *Involvement of oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis linked to fused in sarcoma protein*

**07/2022 congrès FENS – Présentation poster – Paris Expo, Porte de Versailles ; Paris, France** Jamet M, Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, *Involvement of oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis linked to fused in sarcoma protein*

**10/2022 : 8ème édition des journées de recherche FILSLAN - ARSLA (JR8) – Présentation poster – ICM, Paris** Jamet M, Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, *Involvement of oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia linked to fused in sarcoma protein*

Prix du meilleur poster scientifique

**05/2023 congrès Neurofrance - présentation poster – centre de congrès de Lyon, Lyon** Jamet M, Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, *Involvement of oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia linked to fused in sarcoma protein*

**07/2023 congrès ENCALS - présentation orale – Barcelona, Spain** Jamet M, Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, *Involvement of oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia linked to fused in sarcoma protein*

## Bibliographie

- Abramzon, Y. A., Fratta, P., Traynor, B. J., and Chia, R. (2020). The Overlapping Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Front. Neurosci.* 14, 42. doi: 10.3389/fnins.2020.00042
- Aggarwal, S., Yurlova, L., Snaidero, N., Reetz, C., Frey, S., Zimmermann, J., et al. (2011). A size barrier limits protein diffusion at the cell surface to generate lipid-rich myelin-membrane sheets. *Dev. Cell* 21, 445–456. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.001
- Allen, A. E. C., Cragg, C. L., Wood, A. J., Pfaff, D. W., and Choleris, E. (2010). Agonistic behavior in males and females: effects of an estrogen receptor beta agonist in gonadectomized and gonadally intact mice. *Psychoneuroendocrinology* 35, 1008–1022. doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.01.002
- An, X.-L., Zou, J.-X., Wu, R.-Y., Yang, Y., Tai, F.-D., Zeng, S.-Y., et al. (2011). Strain and sex differences in anxiety-like and social behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Exp. Anim.* 60, 111–123. doi: 10.1538/expanim.60.111
- Andersson, M. K., Ståhlberg, A., Arvidsson, Y., Olofsson, A., Semb, H., Stenman, G., et al. (2008). The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol.* 9, 37. doi: 10.1186/1471-2121-9-37
- Arai, K., and Lo, E. H. (2009). An Oligovascular Niche: Cerebral Endothelial Cells Promote the Survival and Proliferation of Oligodendrocyte Precursor Cells. *J. Neurosci.* 29, 4351–4355. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0035-09.2009
- Aubry, A., Burnett, C. J., Goodwin, N. L., Li, L., Navarrete, J., Zhang, Y., et al. (2022). Dynamic Sex Differences in Appetitive and Reactive Aggression. 2022.02.22.481480. doi: 10.1101/2022.02.22.481480
- Baade, I., Hutten, S., Sternburg, E. L., Pörschke, M., Hofweber, M., Dormann, D., et al. (2021). The RNA-binding protein FUS is chaperoned and imported into the nucleus by a network of import receptors. *J. Biol. Chem.* 296, 100659. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100659
- Bang, J., Spina, S., and Miller, B. L. (2015). Non-Alzheimer's dementia 1. *Lancet Lond. Engl.* 386, 1672–1682. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00461-4
- Barbara, J.-G., and Boullerne, A. (2020). Une histoire de myéline, cellules de Schwann et oligodendrocytes. *Lettre des neurosciences.* halshs-03090459
- Baron, W., and Hoekstra, D. (2010). On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity. *FEBS Lett.* 584, 1760–1770. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.085
- Baron, W., Shattil, S. J., and French-Constant, C. (2002). The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of alpha(v)beta3 integrins. *EMBO J.* 21, 1957–1966. doi: 10.1093/emboj/21.8.1957
- Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S. R., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., et al. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70, 31–46. doi: 10.1016/0092-8674(92)90531-G
- Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 81, 871–927. doi: 10.1152/physrev.2001.81.2.871
- Baumgartner, N. E., Biraud, M. C., and Lucas, E. K. (2023). Sex differences in socioemotional behavior and changes in ventral hippocampal transcription across aging in C57Bl/6J mice. *Neurobiol. Aging* 130, 141–153. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2023.05.015

- Bede, P., Elamin, M., Byrne, S., and Hardiman, O. (2014). Sexual dimorphism in ALS: exploring gender-specific neuroimaging signatures. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 15, 235–243. doi: 10.3109/21678421.2013.865749
- Benamer, N., Vidal, M., Balia, M., and Angulo, M. C. (2020). Myelination of parvalbumin interneurons shapes the function of cortical sensory inhibitory circuits. *Nat. Commun.* 11, 5151. doi: 10.1038/s41467-020-18984-7
- Bengtsson, S. L., Nagy, Z., Skare, S., Forsman, L., Forssberg, H., and Ullén, F. (2005). Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nat. Neurosci.* 8, 1148–1150. doi: 10.1038/nn1516
- Berdyński, M., Misztka, P., Safranow, K., Andersen, P. M., Morita, M., Filipek, S., et al. (2022). SOD1 mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis analysis of variant severity. *Sci. Rep.* 12, 103. doi: 10.1038/s41598-021-03891-8
- Bergles, D. E., and Richardson, W. D. (2016). Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a020453. doi: 10.1101/cshperspect.a020453
- Bernstein, H.-G., Keilhoff, G., Dobrowolny, H., Guest, P. C., and Steiner, J. (2019). Perineuronal oligodendrocytes in health and disease: the journey so far. *Rev. Neurosci.* 31, 89–99. doi: 10.1515/revneuro-2019-0020
- Binamé, F., Sakry, D., Dimou, L., Jolivel, V., and Trotter, J. (2013). NG2 Regulates Directional Migration of Oligodendrocyte Precursor Cells via Rho GTPases and Polarity Complex Proteins. *J. Neurosci.* 33, 10858–10874. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5010-12.2013
- Blakemore, W. F., and Franklin, R. J. M. (2008). Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 318, 193–212. doi: 10.1007/978-3-540-73677-6\_8
- Boggs, J. M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 1945–1961. doi: 10.1007/s00018-006-6094-7
- Bonifacino, T., Zerbo, R. A., Balbi, M., Torazza, C., Frumento, G., Fedele, E., et al. (2021). Nearly 30 Years of Animal Models to Study Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Overview and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12236. doi: 10.3390/ijms222212236
- Boros, B. D., Schoch, K. M., Kreple, C. J., and Miller, T. M. (2022). Antisense Oligonucleotides for the Study and Treatment of ALS. *Neurotherapeutics* 19, 1145–1158. doi: 10.1007/s13311-022-01247-2
- Borroni B, Bonvicini C, Alberici A, Buratti E, Agosti C, Archetti S, Papetti A, Stuardi C, Di Luca M, Gennarelli M, Padovani A. (2009) Mutation within TARDBP leads to frontotemporal dementia without motor neuron disease. *Hum Mutat.* 30, 974-83. doi: 10.1002/humu.21100.
- Bott, N. T., Radke, A., Stephens, M. L., and Kramer, J. H. (2014). Frontotemporal dementia: diagnosis, deficits and management. *Neurodegener. Dis. Manag.* 4, 439–454. doi: 10.2217/nmt.14.34
- Bourre, J. M., and Baumann, N. (1980). Élongation Des Acides Gras Dans Le Système Nerveux. *Ann. Nutr. Aliment.* 34, 401–413.
- Brady, S. T., Witt, A. S., Kirkpatrick, L. L., de Waegh, S. M., Readhead, C., Tu, P. H., et al. (1999). Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 7278–7288. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-17-07278.1999

- Broustal, O., Camuzat, A., Guillot-Noël, L., Guy, N., Millecamps, S., Deffond, D., et al. (2010). FUS mutations in frontotemporal lobar degeneration with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Alzheimers Dis. JAD* 22, 765–769.
- Burrell, J. R., Kiernan, M. C., Vucic, S., and Hodges, J. R. (2011). Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain J. Neurol.* 134, 2582–2594. doi: 10.1093/brain/awr195
- Camargo, N., Goudriaan, A., van Deijk, A.-L. F., Otte, W. M., Brouwers, J. F., Lodder, H., et al. (2017). Oligodendroglial myelination requires astrocyte-derived lipids. *PLoS Biol.* 15, e1002605. doi: 10.1371/journal.pbio.1002605
- Caputo, D., Colantoni, A., Lu, L., Santini, T., Peruzzi, G., Biscarini, S., et al. (2018). A Regulatory Circuitry Between Gria2, miR-409, and miR-495 Is Affected by ALS FUS Mutation in ESC-Derived Motor Neurons. *Mol. Neurobiol.* 55, 7635–7651. doi: 10.1007/s12035-018-0884-4
- Caruso, A., Di Giorgi Gerevini, V., Castiglione, M., Marinelli, F., Tomassini, V., Pozzilli, C., et al. (2004). Testosterone amplifies excitotoxic damage of cultured oligodendrocytes. *J. Neurochem.* 88, 1179–1185. doi: 10.1046/j.1471-4159.2004.02284.x
- Cerghet, M., Skoff, R. P., Bessert, D., Zhang, Z., Mullins, C., and Ghandour, M. S. (2006). Proliferation and Death of Oligodendrocytes and Myelin Proteins Are Differentially Regulated in Male and Female Rodents. *J. Neurosci.* 26, 1439–1447. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2219-05.2006
- Chamberlain, K. A., Huang, N., Xie, Y., LiCausi, F., Li, S., Li, Y., et al. (2021). Oligodendrocytes enhance axonal energy metabolism by deacetylation of mitochondrial proteins through transcellular delivery of SIRT2. *Neuron* 109, 3456-3472.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2021.08.011
- Chang, K.-J., Redmond, S. A., and Chan, J. R. (2016). Remodeling myelination: implications for mechanisms of neural plasticity. *Nat. Neurosci.* 19, 190–197. doi: 10.1038/nn.4200
- Chen, P. B., Hu, R. K., Wu, Y. E., Pan, L., Huang, S., Micevych, P. E., et al. (2019). Sexually Dimorphic Control of Parenting Behavior by the Medial Amygdala. *Cell* 176, 1206-1221.e18. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.024
- Chiò, A., Logroscino, G., Hardiman, O., Swingler, R., Mitchell, D., Beghi, E., et al. (2009). Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 10, 310–323. doi: 10.3109/17482960802566824
- Colombrita, C., Onesto, E., Megiorni, F., Pizzuti, A., Baralle, F. E., Buratti, E., et al. (2012). TDP-43 and FUS RNA-binding Proteins Bind Distinct Sets of Cytoplasmic Messenger RNAs and Differently Regulate Their Post-transcriptional Fate in Motoneuron-like Cells\*. *J. Biol. Chem.* 287, 15635–15647. doi: 10.1074/jbc.M111.333450
- Crawford, A. H., Tripathi, R. B., Richardson, W. D., and Franklin, R. J. M. (2016). Developmental Origin of Oligodendrocyte Lineage Cells Determines Response to Demyelination and Susceptibility to Age-Associated Functional Decline. *Cell Rep.* 15, 761–773. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.069
- Crawford, D. K., Mangiardi, M., Song, B., Patel, R., Du, S., Sofroniew, M. V., et al. (2010). Oestrogen receptor beta ligand: a novel treatment to enhance endogenous functional remyelination. *Brain J. Neurol.* 133, 2999–3016. doi: 10.1093/brain/awq237
- Cui, W., Yoneda, R., Ueda, N., and Kurokawa, R. (2018). Arginine methylation of translocated in liposarcoma (TLS) inhibits its binding to long noncoding RNA, abrogating TLS-mediated repression of CBP/p300 activity. *J. Biol. Chem.* 293, 10937–10948. doi: 10.1074/jbc.RA117.000598

- Cullen, C. L., Pepper, R. E., Clutterbuck, M. T., Pitman, K. A., Oorschot, V., Auderset, L., et al. (2021). Periaxonal and nodal plasticities modulate action potential conduction in the adult mouse brain. *Cell Rep.* 34, 108641. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108641
- Daigle, J. G., Lanson, N. A., Smith, R. B., Casci, I., Maltare, A., Monaghan, J., et al. (2013). RNA-binding ability of FUS regulates neurodegeneration, cytoplasmic mislocalization and incorporation into stress granules associated with FUS carrying ALS-linked mutations. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1193–1205. doi: 10.1093/hmg/dds526
- Darling, J. S., and Daniel, J. M. (2019). Pubertal hormones mediate sex differences in levels of myelin basic protein in the orbitofrontal cortex of adult rats. *Neuroscience* 406, 487–495. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.03.041
- Dashiell, S. M., Tanner, S. L., Pant, H. C., and Quarles, R. H. (2002). Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases. *J. Neurochem.* 81, 1263–1272. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00927.x
- Davidson, J. M., Chung, R. S., and Lee, A. (2022). The converging roles of sequestosome-1/p62 in the molecular pathways of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). *Neurobiol. Dis.* 166, 105653. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105653
- de Boer, S. C. M., Riedl, L., van der Lee, S. J., Otto, M., Anderl-Straub, S., Landin-Romero, R., et al. (n.d.). Differences in Sex Distribution Between Genetic and Sporadic Frontotemporal Dementia. *J. Alzheimers Dis.* 84, 1153–1161. doi: 10.3233/JAD-210688
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., et al. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011
- del Aguila, M. A., Longstreth, W. T., McGuire, V., Koepsell, T. D., and van Belle, G. (2003). Prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Neurology* 60, 813–819. doi: 10.1212/01.wnl.0000049472.47709.3b
- Deng, H., Gao, K., and Jankovic, J. (2014). The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 337–348. doi: 10.1038/nrneurol.2014.78
- Dormann, D., Madl, T., Valori, C. F., Bentmann, E., Tahirovic, S., Abou-Ajram, C., et al. (2012). Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS. *EMBO J.* 31, 4258–4275. doi: 10.1038/emboj.2012.261
- Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., et al. (2010). ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J.* 29, 2841–2857. doi: 10.1038/emboj.2010.143
- Dugas, J. C., Cuellar, T. L., Scholze, A., Ason, B., Ibrahim, A., Emery, B., et al. (2010). Dicer1 and miR-219 Are Required for Normal Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Neuron* 65, 597–611. doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.027
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J.-L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., et al. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70, 1004–1009. doi: 10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27
- Edgar, J. M., McLaughlin, M., Yool, D., Zhang, S.-C., Fowler, J. H., Montague, P., et al. (2004). Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J. Cell Biol.* 166, 121–131. doi: 10.1083/jcb.200312012



- Eriksen, J. L., and Mackenzie, I. R. A. (2008). Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J. Neurochem.* 104, 287–297. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04968.x
- Etxeberria, A., Hokanson, K. C., Dao, D. Q., Mayoral, S. R., Mei, F., Redmond, S. A., et al. (2016). Dynamic Modulation of Myelination in Response to Visual Stimuli Alters Optic Nerve Conduction Velocity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 6937–6948. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0908-16.2016
- Fang, L.-P., and Bai, X. (2023). Oligodendrocyte precursor cells: the multitaskers in the brain. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 475, 1035–1044. doi: 10.1007/s00424-023-02837-5
- Farhadi, F., Vosoughi, K., Shahidi, G. A., Delbari, A., Lökk, J., and Fereshtehnejad, S.-M. (2017). Sexual dimorphism in Parkinson's disease: differences in clinical manifestations, quality of life and psychosocial functioning between males and females. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 13, 329–338. doi: 10.2147/NDT.S124984
- Farrawell, N. E., McAlary, L., Lum, J. S., Chisholm, C. G., Warraich, S. T., Blair, I. P., et al. (2020). Ubiquitin Homeostasis Is Disrupted in TDP-43 and FUS Cell Models of ALS. *iScience* 23, 101700. doi: 10.1016/j.isci.2020.101700
- Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Cavado, E., Chiesa, P. A., Schumacher Dimech, A., Santucciono Chadha, A., et al. (2018). Sex differences in Alzheimer disease - the gateway to precision medicine. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 457–469. doi: 10.1038/s41582-018-0032-9
- Fessel, J. (2022). Abnormal oligodendrocyte function in schizophrenia explains the long latent interval in some patients. *Transl. Psychiatry* 12, 1–8. doi: 10.1038/s41398-022-01879-0
- Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., et al. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell Sci.* 124, 447–458. doi: 10.1242/jcs.074088
- Foster, A. D., and Rea, S. L. (2020). The role of sequestosome 1/p62 protein in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia pathogenesis. *Neural Regen. Res.* 15, 2186–2194. doi: 10.4103/1673-5374.284977
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., et al. (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* 11, e1001604. doi: 10.1371/journal.pbio.1001604
- Frühbeis, C., Kuo-Elsner, W. P., Müller, C., Barth, K., Peris, L., Tenzer, S., et al. (2020). Oligodendrocytes support axonal transport and maintenance via exosome secretion. *PLoS Biol.* 18, e3000621. doi: 10.1371/journal.pbio.3000621
- Fujii, R., Okabe, S., Urushido, T., Inoue, K., Yoshimura, A., Tachibana, T., et al. (2005). The RNA Binding Protein TLS Is Translocated to Dendritic Spines by mGluR5 Activation and Regulates Spine Morphology. *Curr. Biol.* 15, 587–593. doi: 10.1016/j.cub.2005.01.058
- Fujii, R., and Takumi, T. (2005). TLS facilitates transport of mRNA encoding an actin-stabilizing protein to dendritic spines. *J. Cell Sci.* 118, 5755–5765. doi: 10.1242/jcs.02692
- Fujino, Y., Ueyama, M., Ishiguro, T., Ozawa, D., Ito, H., Sugiki, T., et al. (2023). FUS regulates RAN translation through modulating the G-quadruplex structure of GGGGCC repeat RNA in C9orf72-linked ALS/FTD. *eLife* 12, RP84338. doi: 10.7554/eLife.84338
- Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., et al. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485, 517–521. doi: 10.1038/nature11007

- Galvez-Contreras, A. Y., Zarate-Lopez, D., Torres-Chavez, A. L., and Gonzalez-Perez, O. (2020). Role of Oligodendrocytes and Myelin in the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder. *Brain Sci.* 10, 951. doi: 10.3390/brainsci10120951
- Garone, M. G., Birsa, N., Rosito, M., Salaris, F., Mochi, M., de Turrís, V., et al. (2021). ALS-related FUS mutations alter axon growth in motoneurons and affect HuD/ELAVL4 and FMRP activity. *Commun. Biol.* 4, 1025. doi: 10.1038/s42003-021-02538-8
- Geoffroy, C. G., and Zheng, B. (2014). Myelin-Associated Inhibitors in Axonal Growth After CNS Injury. *Curr. Opin. Neurobiol.* 0, 31–38. doi: 10.1016/j.conb.2014.02.012
- Gibson, E. M., Purger, D., Mount, C. W., Goldstein, A. K., Lin, G. L., Wood, L. S., et al. (2014). Neuronal Activity Promotes Oligodendrogenesis and Adaptive Myelination in the Mammalian Brain. *Science* 344, 1252304. doi: 10.1126/science.1252304
- Gijssels, I., Van Mossevelde, S., van der Zee, J., Sieben, A., Philtjens, S., Heeman, B., et al. (2015). Loss of TBK1 is a frequent cause of frontotemporal dementia in a Belgian cohort. *Neurology* 85, 2116–2125. doi: 10.1212/WNL.0000000000002220
- Godoy-Corchuelo, J. M., Fernández-Beltrán, L. C., Ali, Z., Gil-Moreno, M. J., López-Carbonero, J. I., Guerrero-Sola, A., et al. (2022). Lipid Metabolic Alterations in the ALS–FTD Spectrum of Disorders. *Biomedicines* 10, 1105. doi: 10.3390/biomedicines10051105
- Goebbels, S., Oltrogge, J. H., Kemper, R., Heilmann, I., Bormuth, I., Wolfer, S., et al. (2010). Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 8953–8964. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0219-10.2010
- Gonzalez, A., Mannen, T., Çağatay, T., Fujiwara, A., Matsumura, H., Niesman, A. B., et al. (2021). Mechanism of karyopherin-β2 binding and nuclear import of ALS variants FUS(P525L) and FUS(R495X). *Sci. Rep.* 11, 3754. doi: 10.1038/s41598-021-83196-y
- Graciarena, M., Seiffe, A., Nait-Oumesmar, B., and Depino, A. M. (2019). Hypomyelination and Oligodendroglial Alterations in a Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 517 doi: 10.3389/fncel.2018.00517
- Gravel, M., Peterson, J., Yong, V. W., Kottis, V., Trapp, B., and Braun, P. E. (1996). Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 453–466. doi: 10.1006/mcne.1996.0033
- Guo, W., Naujock, M., Fumagalli, L., Vandoorne, T., Baatsen, P., Boon, R., et al. (2017). HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients. *Nat. Commun.* 8, 861. doi: 10.1038/s41467-017-00911-y
- Guzman, K., Brink, L., Rodriguez-Bey, G., Bodnar, R., Kuang, L., Xing, B., et al. (2020). Conditional depletion of Fus in oligodendrocytes leads to motor hyperactivity and increased myelin deposition associated with Akt and cholesterol activation. *Glia* 68, 2040–2056. doi: 10.1002/glia.23825
- Halim, D., and Gao, F.-B. (2022). RNA targets of TDP-43: Which one is more important in neurodegeneration? *Transl. Neurodegener.* 11, 12. doi: 10.1186/s40035-021-00268-9
- Han, S., Gim, Y., Jang, E.-H., and Hur, E.-M. (2022). Functions and dysfunctions of oligodendrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 16, 1083159. doi: 10.3389/fncel.2022.1083159
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., et al. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17071. doi: 10.1038/nrdp.2017.71

- Harding, O., Evans, C. S., Ye, J., Cheung, J., Maniatis, T., and Holzbaur, E. L. F. (2021). ALS- and FTD-associated missense mutations in TBK1 differentially disrupt mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, e2025053118. doi: 10.1073/pnas.2025053118
- Harris, J. J., and Attwell, D. (2012). The energetics of CNS white matter. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 356–371. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3430-11.2012
- Hentosh, S., Zhu, L., Patino, J., Furr, J. W., Rocha, N. P., and Furr Stimming, E. (2021). Sex Differences in Huntington’s Disease: Evaluating the Enroll-HD Database. *Mov. Disord. Clin. Pract.* 8, 420–426. doi: 10.1002/mdc3.13178
- Hernandez, M., Patzig, J., Mayoral, S. R., Costa, K. D., Chan, J. R., and Casaccia, P. (2016). Mechanostimulation Promotes Nuclear and Epigenetic Changes in Oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 36, 806–813. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2873-15.2016
- Hill, R. A., Patel, K. D., Medved, J., Reiss, A. M., and Nishiyama, A. (2013). NG2 cells in white matter but not gray matter proliferate in response to PDGF. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 14558–14566. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2001-12.2013
- Hines, J. H., Ravanelli, A. M., Schwindt, R., Scott, E. K., and Appel, B. (2015). Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo. *Nat. Neurosci.* 18, 683–689. doi: 10.1038/nn.3992
- Hock, E.-M., Maniecka, Z., Hruska-Plochan, M., Reber, S., Laferrière, F., Sahadevan M K, S., et al. (2018). Hypertonic Stress Causes Cytoplasmic Translocation of Neuronal, but Not Astrocytic, FUS due to Impaired Transportin Function. *Cell Rep.* 24, 987-1000.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.094
- Hodes, G. E., and Epperson, C. N. (2019). Sex Differences in Vulnerability and Resilience to Stress Across the Life Span. *Biol. Psychiatry* 86, 421–432. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.04.028
- Hoell, J. I., Larsson, E., Runge, S., Nusbaum, J. D., Duggimpudi, S., Farazi, T. A., et al. (2011). RNA targets of wild-type and mutant FET family proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1428–1431. doi: 10.1038/nsmb.2163
- Hofweber, M., Hutten, S., Bourgeois, B., Spreitzer, E., Niedner-Boblenz, A., Schifferer, M., et al. (2018). Phase Separation of FUS Is Suppressed by Its Nuclear Import Receptor and Arginine Methylation. *Cell* 173, 706-719.e13. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.004
- Hollestein, V., Poelmans, G., Forde, N. J., Beckmann, C. F., Ecker, C., Mann, C., et al. (2023). Excitatory/inhibitory imbalance in autism: the role of glutamate and GABA gene-sets in symptoms and cortical brain structure. *Transl. Psychiatry* 13, 1–9. doi: 10.1038/s41398-023-02317-5
- Hsieh, S., Kidd, G., Crawford, T., Xu, Z., Lin, W., Trapp, B., et al. (1994). Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J. Neurosci.* 14, 6392–6401. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-11-06392.1994
- Hughes, A. N., and Appel, B. (2020). Microglia phagocytose myelin sheaths to modify developmental myelination. *Nat. Neurosci.* 23, 1055–1066. doi: 10.1038/s41593-020-0654-2
- Hughes, E. G., Kang, S. H., Fukaya, M., and Bergles, D. E. (2013). Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat. Neurosci.* 16, 668–676. doi: 10.1038/nn.3390
- Humphrey, J., Birsa, N., Milioto, C., Robaldo, D., Eberle, A. B., Kräuchi, R., et al. (2019). FUS ALS-causative mutations impact FUS autoregulation and the processing of RNA-binding proteins through intron retention. *567735*. doi: 10.1101/567735

- Ishigaki, S., Fujioka, Y., Okada, Y., Riku, Y., Udagawa, T., Honda, D., et al. (2017). Altered Tau Isoform Ratio Caused by Loss of FUS and SFPQ Function Leads to FTL-like Phenotypes. *Cell Rep.* 18, 1118–1131. doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.013
- Ishigaki, S., Masuda, A., Fujioka, Y., Iguchi, Y., Katsuno, M., Shibata, A., et al. (2012). Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions. *Sci. Rep.* 2, 529. doi: 10.1038/srep00529
- Jahn, O., Tenzer, S., and Werner, H. B. (2009). Myelin Proteomics: Molecular Anatomy of an Insulating Sheath. *Mol. Neurobiol.* 40, 55–72. doi: 10.1007/s12035-009-8071-2
- Ju, J., Yang, X., Jiang, J., Wang, D., Zhang, Y., Zhao, X., et al. (2021). Structural and Lipidomic Alterations of Striatal Myelin in 16p11.2 Deletion Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Front. Cell. Neurosci.* 15, 718720. doi: 10.3389/fncel.2021.718720
- Kamelgarn, M., Chen, J., Kuang, L., Jin, H., Kasarskis, E. J., and Zhu, H. (2018). ALS mutations of FUS suppress protein translation and disrupt the regulation of nonsense-mediated decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E11904–E11913. doi: 10.1073/pnas.1810413115
- Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004). Kinesin Transports RNA: Isolation and Characterization of an RNA-Transporting Granule. *Neuron* 43, 513–525. doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.022
- Kaneb, H. M., Dion, P. A., and Rouleau, G. A. (2012). The FUS about arginine methylation in ALS and FTL. *EMBO J.* 31, 4249–4251. doi: 10.1038/emboj.2012.291
- Kaplan, M. R., Cho, M.-H., Ullian, E. M., Isom, L. L., Levinson, S. R., and Barres, B. A. (2001). Differential Control of Clustering of the Sodium Channels Nav1.2 and Nav1.6 at Developing CNS Nodes of Ranvier. *Neuron* 30, 105–119. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00266-5
- Kaplan, M. R., Meyer-Franke, A., Lambert, S., Bennett, V., Duncan, I. D., Levinson, S. R., et al. (1997). Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes. *Nature* 386, 724–728. doi: 10.1038/386724a0
- Káradóttir, R., Cavelier, P., Bergersen, L. H., and Attwell, D. (2005). NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438, 1162–1166. doi: 10.1038/nature04302
- Káradóttir, R., Hamilton, N. B., Bakiri, Y., and Attwell, D. (2008). Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter. *Nat. Neurosci.* 11, 450–456. doi: 10.1038/nn2060
- Keating, S. S., Bademosi, A. T., San Gil, R., and Walker, A. K. (2023). Aggregation-prone TDP-43 sequesters and drives pathological transitions of free nuclear TDP-43. *Cell. Mol. Life Sci.* 80, 95. doi: 10.1007/s00018-023-04739-2
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., and Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci.* 9, 173–179. doi: 10.1038/nn1620
- Khalaj, A. J., Yoon, J., Nakai, J., Winchester, Z., Moore, S. M., Yoo, T., et al. (2013). Estrogen receptor (ER)  $\beta$  expression in oligodendrocytes is required for attenuation of clinical disease by an ER $\beta$  ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 19125–19130. doi: 10.1073/pnas.1311763110
- Khan, I., and De Jesus, O. (2023). “Frontotemporal Lobe Dementia,” in *StatPearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing).

- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., et al. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 377, 942–955. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61156-7
- Kim, H. J., Kim, N. C., Wang, Y.-D., Scarborough, E. A., Moore, J., Diaz, Z., et al. (2013). Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495, 467–473. doi: 10.1038/nature11922
- Kimura, F., and Itami, C. (2009). Myelination and isochronicity in neural networks. *Front. Neuroanat.* 3, 12. doi: 10.3389/neuro.05.012.2009
- Kirby, L., Jin, J., Cardona, J. G., Smith, M. D., Martin, K. A., Wang, J., et al. (2019). Oligodendrocyte precursor cells present antigen and are cytotoxic targets in inflammatory demyelination. *Nat. Commun.* 10, 3887. doi: 10.1038/s41467-019-11638-3
- Klein, C., Krämer, E.-M., Cardine, A.-M., Schraven, B., Brandt, R., and Trotter, J. (2002). Process Outgrowth of Oligodendrocytes Is Promoted by Interaction of Fyn Kinase with the Cytoskeletal Protein Tau. *J. Neurosci.* 22, 698–707. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00698.2002
- Korobeynikov, V. A., Lyashchenko, A. K., Blanco-Redondo, B., Jafar-Nejad, P., and Shneider, N. A. (2022). Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.* 28, 104–116. doi: 10.1038/s41591-021-01615-z
- Krämer-Albers, E.-M., and White, R. (2011). From axon–glial signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2003–2012. doi: 10.1007/s00018-010-0616-z
- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., and Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 8, 1424. doi: 10.3390/cells8111424
- Kukley, M. (2023). Recent Insights into the Functional Role of AMPA Receptors in the Oligodendrocyte Lineage Cells In Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 4138. doi: 10.3390/ijms24044138
- Kukley, M., Capetillo-Zarate, E., and Dietrich, D. (2007). Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat. Neurosci.* 10, 311–320. doi: 10.1038/nn1850
- Kwiatkowski, T. J., Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., et al. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205–1208. doi: 10.1126/science.1166066
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K. R., Vu, A. Q., Baughn, M., Huelga, S. C., et al. (2012). Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat. Neurosci.* 15, 1488–1497. doi: 10.1038/nn.3230
- Lai, M.-C., Lombardo, M. V., Suckling, J., Ruigrok, A. N. V., Chakrabarti, B., Ecker, C., et al. (2013). Biological sex affects the neurobiology of autism. *Brain* 136, 2799–2815. doi: 10.1093/brain/awt216
- Lamb, R., Rohrer, J. D., Real, R., Lubbe, S. J., Waite, A. J., Blake, D. J., et al. (2019). A novel TBK1 mutation in a family with diverse frontotemporal dementia spectrum disorders. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* 5, a003913. doi: 10.1101/mcs.a003913
- Van Langenhove T, van der Zee J, Sleegers K, Engelborghs S, Vandenberghe R, Gijssels I, Van den Broeck M, Mattheijssens M, Peeters K, De Deyn PP, Cruts M, Van Broeckhoven C. (2010) Genetic contribution of FUS to frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 74, 366-71. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181ccc732.

- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., et al. (2003). Disruption of *Cnpl* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat. Genet.* 33, 366–374. doi: 10.1038/ng1095
- Lassalle, J. M., Halley, H., Daumas, S., Verret, L., and Francés, B. (2008). Effects of the genetic background on cognitive performances of TG2576 mice. *Behav. Brain Res.* 191, 104–110. doi: 10.1016/j.bbr.2008.03.017
- Lee, A. G. (2001). Myelin: Delivery by raft. *Curr. Biol.* 11, R60–R62. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00008-2
- Lee, H., Thacker, S., Sarn, N., Dutta, R., and Eng, C. (2019). Constitutional mislocalization of *Pten* drives precocious maturation in oligodendrocytes and aberrant myelination in model of autism spectrum disorder. *Transl. Psychiatry* 9, 13. doi: 10.1038/s41398-018-0364-7
- Lee, S. K. (2018). Sex as an important biological variable in biomedical research. *BMB Rep.* 51, 167–173. doi: 10.5483/BMBRep.2018.51.4.034
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., et al. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487, 443–448. doi: 10.1038/nature11314
- Lee, Y.-B., Baskaran, P., Gomez-Deza, J., Chen, H.-J., Nishimura, A. L., Smith, B. N., et al. (2017). *C9orf72* poly GA RAN-translated protein plays a key role in amyotrophic lateral sclerosis via aggregation and toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 26, 4765–4777. doi: 10.1093/hmg/ddx350
- Leger, M., and Neill, J. C. (2016). A systematic review comparing sex differences in cognitive function in schizophrenia and in rodent models for schizophrenia, implications for improved therapeutic strategies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 68, 979–1000. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.029
- Leonard, C. M., Towler, S., Welcome, S., Halderman, L. K., Otto, R., Eckert, M. A., et al. (2008). Size Matters: Cerebral Volume Influences Sex Differences in Neuroanatomy. *Cereb. Cortex* 18, 2920–2931. doi: 10.1093/cercor/bhn052
- Lepiemme, F., Stoufflet, J., Javier-Torrent, M., Mazzucchelli, G., Silva, C. G., and Nguyen, L. (2022). Oligodendrocyte precursors guide interneuron migration by unidirectional contact repulsion. *Science* 376, eabn6204. doi: 10.1126/science.abn6204
- Levone, B. R., Lenzken, S. C., Antonaci, M., Maiser, A., Rapp, A., Conte, F., et al. (2021). FUS-dependent liquid–liquid phase separation is important for DNA repair initiation. *J. Cell Biol.* 220, e202008030. doi: 10.1083/jcb.202008030
- Lévy, E., El Banna, N., Baille, D., Heneman-Masurel, A., Truchet, S., Rezaei, H., et al. (2019). Causative Links between Protein Aggregation and Oxidative Stress: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3896. doi: 10.3390/ijms20163896
- Lewine, R. R. J., Gulley, L. R., Risch, S. C., Jewart, R., and Houpt, J. L. (1990). Sexual Dimorphism, Brain Morphology, and Schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 16, 195–203. doi: 10.1093/schbul/16.2.195
- Li, M., Shibata, A., Li, C., Braun, P. E., McKerracher, L., Roder, J., et al. (1996). Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *J. Neurosci. Res.* 46, 404–414. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19961115)46:4<404::AID-JNR2>3.0.CO;2-K
- Lipp, H.-P., and Wolfer, D. P. (2003). Genetic background problems in the analysis of cognitive and neuronal changes in genetically modified mice. *Clin. Neurosci. Res.* 3, 223–231. doi: 10.1016/S1566-2772(03)00096-3

- Liu, J., Dietz, K., DeLoyht, J. M., Pedre, X., Kelkar, D., Kaur, J., et al. (2012). Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat. Neurosci.* 15, 1621–1623. doi: 10.1038/nn.3263
- Liu, Y., Andreucci, A., Iwamoto, N., Yin, Y., Yang, H., Liu, F., et al. (2022). Preclinical evaluation of WVE-004, an investigational stereopure oligonucleotide for the treatment of C9orf72-associated ALS or FTD. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 28, 558–570. doi: 10.1016/j.omtn.2022.04.007
- Liu, Y., Ouyang, P., Zheng, Y., Mi, L., Zhao, J., Ning, Y., et al. (2021). A Selective Review of the Excitatory-Inhibitory Imbalance in Schizophrenia: Underlying Biology, Genetics, Microcircuits, and Symptoms. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 664535. doi: 10.3389/fcell.2021.664535
- Lombardi, M., Parolisi, R., Scaroni, F., Bonfanti, E., Gualerzi, A., Gabrielli, M., et al. (2019). Detrimental and protective action of microglial extracellular vesicles on myelin lesions: astrocyte involvement in remyelination failure. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 138, 987–1012. doi: 10.1007/s00401-019-02049-1
- López-Erauskin, J., Tadokoro, T., Baughn, M. W., Myers, B., McAlonis-Downes, M., Chillon-Marinás, C., et al. (2018). ALS/FTD-Linked Mutation in FUS Suppresses Intra-axonal Protein Synthesis and Drives Disease Without Nuclear Loss-of-Function of FUS. *Neuron* 100, 816–830.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.044
- Loughlin, F. E., Lukavsky, P. J., Kazeeva, T., Reber, S., Hock, E.-M., Colombo, M., et al. (2019). The Solution Structure of FUS Bound to RNA Reveals a Bipartite Mode of RNA Recognition with Both Sequence and Shape Specificity. *Mol. Cell* 73, 490–504.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2018.11.012
- Ludolph, A., Dupuis, L., Kasarskis, E., Steyn, F., Ngo, S., and McDermott, C. (2023). Nutritional and metabolic factors in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 19, 511–524. doi: 10.1038/s41582-023-00845-8
- Luine, V. N., Beck, K. D., Bowman, R. E., Frankfurt, M., and Maclusky, N. J. (2007). Chronic stress and neural function: accounting for sex and age. *J. Neuroendocrinol.* 19, 743–751. doi: 10.1111/j.1365-2826.2007.01594.x
- Lundgaard, I., Luzhynskaya, A., Stockley, J. H., Wang, Z., Evans, K. A., Swire, M., et al. (2013). Neuregulin and BDNF Induce a Switch to NMDA Receptor-Dependent Myelination by Oligodendrocytes. *PLoS Biol.* 11, e1001743. doi: 10.1371/journal.pbio.1001743
- Maas, D. A., Eijssink, V. D., Spoelder, M., van Hulst, J. A., De Weerd, P., Homberg, J. R., et al. (2020). Interneuron hypomyelination is associated with cognitive inflexibility in a rat model of schizophrenia. *Nat. Commun.* 11, 2329. doi: 10.1038/s41467-020-16218-4
- Maharana, S., Wang, J., Papadopoulos, D. K., Richter, D., Pozniakovskiy, A., Poser, I., et al. (2018). RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science* 360, 918–921. doi: 10.1126/science.aar7366
- Maier, A., Boentert, M., Reilich, P., Witzel, S., Petri, S., Großkreutz, J., et al. (2022). ALSFRS-R-SE: an adapted, annotated, and self-explanatory version of the revised amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale. *Neurol. Res. Pract.* 4, 60. doi: 10.1186/s42466-022-00224-6
- Maki, T., Maeda, M., Uemura, M., Lo, E. K., Terasaki, Y., Liang, A. C., et al. (2015). Potential interactions between pericytes and oligodendrocyte precursor cells in perivascular regions of cerebral white matter. *Neurosci. Lett.* 597, 164–169. doi: 10.1016/j.neulet.2015.04.047
- Maldonado, P. P., Vélez-Fort, M., Levavasseur, F., and Angulo, M. C. (2013). Oligodendrocyte precursor cells are accurate sensors of local K<sup>+</sup> in mature gray matter. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 2432–2442. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1961-12.2013

- Mandrioli, J., Mediani, L., Alberti, S., and Carra, S. (2020). ALS and FTD: Where RNA metabolism meets protein quality control. *Semin. Cell Dev. Biol.* 99, 183–192. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.06.003
- Marin-Husstege, M., Muggironi, M., Raban, D., Skoff, R. P., and Casaccia-Bonnet, P. (2004). Oligodendrocyte progenitor proliferation and maturation is differentially regulated by male and female sex steroid hormones. *Dev. Neurosci.* 26, 245–254. doi: 10.1159/000082141
- Marques, S., van Bruggen, D., Vanichkina, D. P., Floriddia, E. M., Munguba, H., Våremo, L., et al. (2018). Transcriptional Convergence of Oligodendrocyte Lineage Progenitors during Development. *Dev. Cell* 46, 504–517.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2018.07.005
- Masrori, P., and Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* 27, 1918–1929. doi: 10.1111/ene.14393
- Mayoral, S. R., and Chan, J. R. (2016). The environment rules: spatiotemporal regulation of oligodendrocyte differentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 39, 47–52. doi: 10.1016/j.conb.2016.04.002
- Mazuir, E., Fricker, D., and Sol-Foulon, N. (2021). Neuron–Oligodendrocyte Communication in Myelination of Cortical GABAergic Cells. *Life* 11, 216. doi: 10.3390/life11030216
- McAlary, L., Plotkin, S. S., Yerbury, J. J., and Cashman, N. R. (2019). Prion-Like Propagation of Protein Misfolding and Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 262. doi: 10.3389/fnmol.2019.00262
- Mejzini, R., Flynn, L. L., Pitout, I. L., Fletcher, S., Wilton, S. D., and Akkari, P. A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front. Neurosci.* 13, 1310. doi: 10.3389/fnins.2019.01310
- Mendrek, A. (2007). Reversal of normal cerebral sexual dimorphism in schizophrenia: Evidence and speculations. *Med. Hypotheses* 69, 896–902. doi: 10.1016/j.mehy.2007.01.064
- Mendrek, A., and Mancini-Marie, A. (2016). Sex/gender differences in the brain and cognition in schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 67, 57–78. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.10.013
- Mensch, S., Baraban, M., Almeida, R., Czopka, T., Ausborn, J., El Manira, A., et al. (2015). Synaptic vesicle release regulates myelin sheath number of individual oligodendrocytes in vivo. *Nat. Neurosci.* 18, 628–630. doi: 10.1038/nn.3991
- Meyer, N., Richter, N., Fan, Z., Siemonsmeier, G., Pivneva, T., Jordan, P., et al. (2018). Oligodendrocytes in the Mouse Corpus Callosum Maintain Axonal Function by Delivery of Glucose. *Cell Rep.* 22, 2383–2394. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.022
- Micheva, K. D., Wolman, D., Mensh, B. D., Pax, E., Buchanan, J., Smith, S. J., et al. (2016). A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons. *eLife* 5, e15784. doi: 10.7554/eLife.15784
- Micu, I., Jiang, Q., Coderre, E., Ridsdale, A., Zhang, L., Woulfe, J., et al. (2006). NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature* 439, 988–992. doi: 10.1038/nature04474
- Micu, I., Plemel, J. R., Caprariello, A. V., Nave, K.-A., and Stys, P. K. (2018). Axo-myelinic neurotransmission: a novel mode of cell signalling in the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 49–58. doi: 10.1038/nrn.2017.128



- Micu, I., Plemel, J. R., Lachance, C., Proft, J., Jansen, A. J., Cummins, K., et al. (2016). The molecular physiology of the axo-myelinic synapse. *Exp. Neurol.* 276, 41–50. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.10.006
- Micu, I., Ridsdale, A., Zhang, L., Woulfe, J., McClintock, J., Brantner, C. A., et al. (2007). Real-time measurement of free Ca<sup>2+</sup> changes in CNS myelin by two-photon microscopy. *Nat. Med.* 13, 874–879. doi: 10.1038/nm1568
- Miller, T. M., Cudkowicz, M. E., Genge, A., Shaw, P. J., Sobue, G., Bucelli, R. C., et al. (2022). Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N. Engl. J. Med.* 387, 1099–1110. doi: 10.1056/NEJMoa2204705
- Mitjans, M., Begemann, M., Ju, A., Dere, E., Wüstefeld, L., Hofer, S., et al. (2017). Sexual dimorphism of AMBRA1-related autistic features in human and mouse. *Transl. Psychiatry* 7, e1247–e1247. doi: 10.1038/tp.2017.213
- Mohandas, E., and Rajmohan, V. (2009). Frontotemporal dementia: An updated overview. *Indian J. Psychiatry* 51 Suppl 1, S65-69.
- Monteggia, L. M., Luikart, B., Barrot, M., Theobald, D., Malkovska, I., Nef, S., et al. (2007). Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biol. Psychiatry* 61, 187–197. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.03.021
- Morlando, M., Dini Modigliani, S., Torrelli, G., Rosa, A., Di Carlo, V., Caffarelli, E., et al. (2012). FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. *EMBO J.* 31, 4502–4510. doi: 10.1038/emboj.2012.319
- Müller, C., Bauer, N. M., Schäfer, I., and White, R. (2013). Making myelin basic protein -from mRNA transport to localized translation. *Front. Cell. Neurosci.* 7. doi: 10.3389/fncel.2013.00169
- Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., and Van Evercooren, A. B.-. (1999). Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur. J. Neurosci.* 11, 4357–4366. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00873.x
- Napolitano, A., Schiavi, S., La Rosa, P., Rossi-Espagnet, M. C., Petrillo, S., Bottino, F., et al. (2022). Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: Diagnostic, Neurobiological, and Behavioral Features. *Front. Psychiatry* 13, 889636. doi: 10.3389/fpsy.2022.889636
- Naruse, M., Ishizaki, Y., Ikenaka, K., Tanaka, A., and Hitoshi, S. (2017). Origin of oligodendrocytes in mammalian forebrains: a revised perspective. *J. Physiol. Sci. JPS* 67, 63–70. doi: 10.1007/s12576-016-0479-7
- Nave, K.-A., and Werner, H. B. (2014). Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 503–533. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013101
- Nawaz, S., Sánchez, P., Schmitt, S., Snaidero, N., Mitkovski, M., Velte, C., et al. (2015). Actin filament turnover drives leading edge growth during myelin sheath formation in the central nervous system. *Dev. Cell* 34, 139–151. doi: 10.1016/j.devcel.2015.05.013
- Nemes-Baran, A. D., White, D. R., and DeSilva, T. M. (2020). Fractalkine-Dependent Microglial Pruning of Viable Oligodendrocyte Progenitor Cells Regulates Myelination. *Cell Rep.* 32, 108047. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108047

- Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretschmar, H. A., and Mackenzie, I. R. A. (2009). A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* 132, 2922–2931. doi: 10.1093/brain/awp214
- Neylan, K. D., and Miller, B. L. (2023). New Approaches to the Treatment of Frontotemporal Dementia. *Neurotherapeutics* 20, 1055–1065. doi: 10.1007/s13311-023-01380-6
- Niaki, A. G., Sarkar, J., Cai, X., Rhine, K., Vidaurre, V., Guy, B., et al. (2020). Loss of Dynamic RNA Interaction and Aberrant Phase Separation Induced by Two Distinct Types of ALS/FTD-Linked FUS Mutations. *Mol. Cell* 77, 82–94.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.022
- Nishiyama, A., Shimizu, T., Sherafat, A., and Richardson, W. D. (2021). Life-long oligodendrocyte development and plasticity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 116, 25–37. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.02.004
- Niu, J., Li, T., Yi, C., Huang, N., Koulakoff, A., Weng, C., et al. (2016). Connexin-based channels contribute to metabolic pathways in the oligodendroglial lineage. *J. Cell Sci.* 129, 1902–1914. doi: 10.1242/jcs.178731
- Nomura, M., Durbak, L., Chan, J., Smithies, O., Gustafsson, J.-A., Korach, K. S., et al. (2002). Genotype/age interactions on aggressive behavior in gonadally intact estrogen receptor beta knockout (betaERKO) male mice. *Horm. Behav.* 41, 288–296. doi: 10.1006/hbeh.2002.1773
- Nomura, T., Watanabe, S., Kaneko, K., Yamanaka, K., Nukina, N., and Furukawa, Y. (2014). Intranuclear Aggregation of Mutant FUS/TLS as a Molecular Pathomechanism of Amyotrophic Lateral Sclerosis\*. *J. Biol. Chem.* 289, 1192–1202. doi: 10.1074/jbc.M113.516492
- Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D. B., Korach, K. S., and Pfaff, D. W. (1998). Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology* 139, 5070–5081. doi: 10.1210/endo.139.12.6357
- Okada, M., Makino, A., Nakajima, M., Okuyama, S., Furukawa, S., and Furukawa, Y. (2010). Estrogen stimulates proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells through different signal transduction pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 4114–4123. doi: 10.3390/ijms11104114
- Orduz, D., Benamer, N., Ortolani, D., Coppola, E., Vigier, L., Pierani, A., et al. (2019). Developmental cell death regulates lineage-related interneuron-oligodendroglia functional clusters and oligodendrocyte homeostasis. *Nat. Commun.* 10, 4249. doi: 10.1038/s41467-019-11904-4
- Owen, I., Rhoads, S., Yee, D., Wyne, H., Gery, K., Hannula, I., et al. (2020). The prion-like domain of Fused in Sarcoma is phosphorylated by multiple kinases affecting liquid- and solid-phase transitions. *Mol. Biol. Cell* 31, 2522–2536. doi: 10.1091/mbc.E20-05-0290
- Ozdilek, B. A., Thompson, V. F., Ahmed, N. S., White, C. I., Batey, R. T., and Schwartz, J. C. (2017). Intrinsically disordered RGG/RG domains mediate degenerate specificity in RNA binding. *Nucleic Acids Res.* 45, 7984–7996. doi: 10.1093/nar/gkx460
- Pajevic, S., Bassar, P. J., and Fields, R. D. (2014). Role of Myelin Plasticity in Oscillations and Synchrony of Neuronal Activity. *Neuroscience* 276, 135–147. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.007
- Paton, K. F., Hong, S., Biggerstaff, A., and Kivell, B. M. (2022). Sex Differences in the Behavioural Aspects of the Cuprizone-Induced Demyelination Model in Mice. *Brain Sci.* 12, 1687. doi: 10.3390/brainsci12121687
- Pengo, M., Alberici, A., Libri, I., Benussi, A., Gadola, Y., Ashton, N. J., et al. (2022). Sex influences clinical phenotype in frontotemporal dementia. *Neurol. Sci.* 43, 5281–5287. doi: 10.1007/s10072-022-06185-7

- Pfeiffer, S. E., Warrington, A. E., and Bansal, R. (1993). The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol.* 3, 191–197. doi: 10.1016/0962-8924(93)90213-K
- Philips, T., and Rothstein, J. D. (2017). Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *J. Clin. Invest.* 127, 3271–3280. doi: 10.1172/JCI90610
- Picchiarelli, G., Demestre, M., Zuko, A., Been, M., Higelin, J., Dieterlé, S., et al. (2019). FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* 22, 1793–1805. doi: 10.1038/s41593-019-0498-9
- Piller, M., Werkman, I. L., Brown, E. A., Latimer, A. J., and Kucenas, S. (2021). Glutamate Signaling via the AMPAR Subunit GluR4 Regulates Oligodendrocyte Progenitor Cell Migration in the Developing Spinal Cord. *J. Neurosci.* 41, 5353–5371. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2562-20.2021
- Portet, F., Cadilhac, C., Touchon, J., and Camu, W. (2001). Cognitive impairment in motor neuron disease with bulbar onset. *Amyotroph. Lateral Scler. Mot. Neuron Disord. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 2, 23–29. doi: 10.1080/146608201300079382
- Powers, B. E., Sellers, D. L., Lovelett, E. A., Cheung, W., Aalami, S. P., Zapertov, N., et al. (2013). Remyelination reporter reveals prolonged refinement of spontaneously regenerated myelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4075–4080. doi: 10.1073/pnas.1210293110
- Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., and Patel, B. K. (2019). Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 25. doi: 10.3389/fnmol.2019.00025
- Prochnik, A., Burgueño, A. L., Rubinstein, M. R., Marcone, M. P., Bianchi, M. S., Gonzalez Murano, M. R., et al. (2022). Sexual dimorphism modulates metabolic and cognitive alterations under HFD nutrition and chronic stress exposure in mice. Correlation between spatial memory impairment and BDNF mRNA expression in hippocampus and spleen. *Neurochem. Int.* 160, 105416. doi: 10.1016/j.neuint.2022.105416
- Purice, M. D., and Taylor, J. P. (2018). Linking hnRNP Function to ALS and FTD Pathology. *Front. Neurosci.* 12, 326. doi: 10.3389/fnins.2018.00326
- Quarles, R. H. (2007). Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J. Neurochem.* 100, 1431–1448. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04319.x
- Ramos-Campoy, O., Ávila-Polo, R., Grau-Rivera, O., Antonell, A., Clarimón, J., Rojas-García, R., et al. (2018). Systematic Screening of Ubiquitin/p62 Aggregates in Cerebellar Cortex Expands the Neuropathological Phenotype of the C9orf72 Expansion Mutation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 77, 703–709. doi: 10.1093/jnen/nly047
- Rasband, M. N., and Peles, E. (2016). The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a020495. doi: 10.1101/cshperspect.a020495
- Rasband, M. N., Peles, E., Trimmer, J. S., Levinson, S. R., Lux, S. E., and Shrager, P. (1999). Dependence of Nodal Sodium Channel Clustering on Paranodal Axoglial Contact in the Developing CNS. *J. Neurosci.* 19, 7516–7528. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-17-07516.1999
- Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K., and Hodges, J. R. (2002). The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 58, 1615–1621. doi: 10.1212/WNL.58.11.1615
- Reber, S., Stettler, J., Filosa, G., Colombo, M., Jutzi, D., Lenzken, S. C., et al. (2016). Minor intron splicing is regulated by FUS and affected by ALS-associated FUS mutants. *EMBO J.* 35, 1504–1521. doi: 10.15252/embj.201593791

- Rechlin, R. K., Splinter, T. F. L., Hodges, T. E., Albert, A. Y., and Galea, L. A. M. (2022). An analysis of neuroscience and psychiatry papers published from 2009 and 2019 outlines opportunities for increasing discovery of sex differences. *Nat. Commun.* 13, 2137. doi: 10.1038/s41467-022-29903-3
- Rushton, W. A. H. (1951). A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J. Physiol.* 115, 101–122.
- Rusina, R., Vandenberghe, R., and Bruffaerts, R. (2021). Cognitive and Behavioral Manifestations in ALS: Beyond Motor System Involvement. *Diagnostics* 11, 624. doi: 10.3390/diagnostics11040624
- Russillo, M. C., Andreozzi, V., Erro, R., Picillo, M., Amboni, M., Cuoco, S., et al. (2022). Sex Differences in Parkinson's Disease: From Bench to Bedside. *Brain Sci.* 12, 917. doi: 10.3390/brainsci12070917
- Saab, A. S., Tzvetavona, I. D., Trevisiol, A., Baltan, S., Dibaj, P., Kusch, K., et al. (2016). Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron* 91, 119–132. doi: 10.1016/j.neuron.2016.05.016
- Sahadevan, S., Hembach, K. M., Tantardini, E., Pérez-Berlanga, M., Hruska-Plochan, M., Megat, S., et al. (2021). Synaptic FUS accumulation triggers early misregulation of synaptic RNAs in a mouse model of ALS. *Nat. Commun.* 12, 3027. doi: 10.1038/s41467-021-23188-8
- Saher, G., and Stumpf, S. K. (2015). Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 1083–1094. doi: 10.1016/j.bbalip.2015.02.010
- Sardar, R., Zandieh, Z., Namjoo, Z., Soleimani, M., Shirazi, R., and Hami, J. (2021). Laterality and sex differences in the expression of brain-derived neurotrophic factor in developing rat hippocampus. *Metab. Brain Dis.* 36, 133–144. doi: 10.1007/s11011-020-00620-4
- Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H. E., Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., et al. (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 887–906. doi: 10.1007/s00401-017-1687-9
- Scekic-Zahirovic, J., Sanjuan-Ruiz, I., Kan, V., Megat, S., De Rossi, P., Dieterlé, S., et al. (2021a). Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects. *Nat. Commun.* 12, 3028. doi: 10.1038/s41467-021-23187-9
- Scekic-Zahirovic, J., Sanjuan-Ruiz, I., Kan, V., Megat, S., De Rossi, P., Dieterlé, S., et al. (2021b). Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects. *Nat. Commun.* 12, 3028. doi: 10.1038/s41467-021-23187-9
- Scekic-Zahirovic, J., Sendscheid, O., El Oussini, H., Jambeau, M., Sun, Y., Mersmann, S., et al. (2016). Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J.* 35, 1077–1097. doi: 10.15252/embj.201592559
- Schirmer, L., Möbius, W., Zhao, C., Cruz-Herranz, A., Ben Haim, L., Cordano, C., et al. (2018). Oligodendrocyte-encoded Kir4.1 function is required for axonal integrity. *eLife* 7, e36428. doi: 10.7554/eLife.36428
- Scholz, J., Klein, M. C., Behrens, T. E. J., and Johansen-Berg, H. (2009). Training induces changes in white-matter architecture. *Nat. Neurosci.* 12, 1370–1371. doi: 10.1038/nn.2412
- Schumann, C. M., Sharp, F. R., Ander, B. P., and Stamova, B. (2017). Possible sexually dimorphic role of miRNA and other sncRNA in ASD brain. *Mol. Autism* 8, 4. doi: 10.1186/s13229-017-0117-0

- Schwartz, J. C., Podell, E. R., Han, S. S. W., Berry, J. D., Eggan, K. C., and Cech, T. R. (2014). FUS is sequestered in nuclear aggregates in ALS patient fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 25, 2571–2578. doi: 10.1091/mbc.E14-05-1007
- Seiberlich, V., Bauer, N. G., Schwarz, L., Ffrench-Constant, C., Goldbaum, O., and Richter-Landsberg, C. (2015). Downregulation of the microtubule associated protein tau impairs process outgrowth and myelin basic protein mRNA transport in oligodendrocytes. *Glia* 63, 1621–1635. doi: 10.1002/glia.22832
- Sellier, C., Campanari, M., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynel, I., Oulad-Abdelghani, M., et al. (2016). Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *EMBO J.* 35, 1276–1297. doi: 10.15252/embj.201593350
- Seo, J. H., Maki, T., Maeda, M., Miyamoto, N., Liang, A. C., Hayakawa, K., et al. (2014). Oligodendrocyte precursor cells support blood-brain barrier integrity via TGF- $\beta$  signaling. *PLoS One* 9, e103174. doi: 10.1371/journal.pone.0103174
- Sévigny, M., Bourdeau Julien, I., Venkatasubramani, J. P., Hui, J. B., Dutchak, P. A., and Sephton, C. F. (2020). FUS contributes to mTOR-dependent inhibition of translation. *J. Biol. Chem.* 295, 18459–18473. doi: 10.1074/jbc.RA120.013801
- Shansky, R. M., and Woolley, C. S. (2016). Considering Sex as a Biological Variable Will Be Valuable for Neuroscience Research. *J. Neurosci.* 36, 11817–11822. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1390-16.2016
- Sharma, A., Lyashchenko, A. K., Lu, L., Nasrabady, S. E., Elmaleh, M., Mendelsohn, M., et al. (2016). ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nat. Commun.* 7, 10465. doi: 10.1038/ncomms10465
- Shiino, A., Chen, Y., Tanigaki, K., Yamada, A., Vigers, P., Watanabe, T., et al. (2017). Sex-related difference in human white matter volumes studied: Inspection of the corpus callosum and other white matter by VBM. *Sci. Rep.* 7, 39818. doi: 10.1038/srep39818
- Shpilyukova, Yu. A., Fedotova, E. Yu., and Illarioshkin, S. N. (2020). Genetic Diversity in Frontotemporal Dementia. *Mol. Biol.* 54, 13–23. doi: 10.1134/S0026893320010136
- Smeyers, J., Banchi, E.-G., and Latouche, M. (2021). C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters. *Front. Cell. Neurosci.* 15, 661447. doi: 10.3389/fncel.2021.661447
- Snaidero, N., Möbius, W., Czopka, T., Hekking, L. H. P., Mathisen, C., Verkleij, D., et al. (2014). Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* 156, 277–290. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.044
- Snaidero, N., Velte, C., Myllykoski, M., Raasakka, A., Ignatev, A., Werner, H. B., et al. (2017). Antagonistic Functions of MBP and CNP Establish Cytosolic Channels in CNS Myelin. *Cell Rep.* 18, 314–323. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.053
- Snowden, J. S., Hu, Q., Rollinson, S., Halliwell, N., Robinson, A., Davidson, Y. S., et al. (2011). The most common type of FTLN-FUS (aFTLN-U) is associated with a distinct clinical form of frontotemporal dementia but is not related to mutations in the FUS gene. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 122, 99–110. doi: 10.1007/s00401-011-0816-0
- Starikov, L., and Kottmann, A. H. (2020). Diminished Ventral Oligodendrocyte Precursor Generation Results in the Subsequent Over-production of Dorsal Oligodendrocyte Precursors of Aberrant Morphology and Function. *Neuroscience* 450, 15–28. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.05.027

- Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V., and Fields, R. D. (2002). Adenosine: A Neuron-Glial Transmitter Promoting Myelination in the CNS in Response to Action Potentials. *Neuron* 36, 855–868.
- Strang, K. H., Golde, T. E., and Giasson, B. I. (2019). MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 99, 912–928. doi: 10.1038/s41374-019-0197-x
- Su, W.-M., Cheng, Y.-F., Jiang, Z., Duan, Q.-Q., Yang, T.-M., Shang, H.-F., et al. (2021). Predictors of survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A large meta-analysis. *eBioMedicine* 74. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103732
- Sun, J., Zhou, H., Bai, F., Ren, Q., and Zhang, Z. (2016). Myelin injury induces axonal transport impairment but not AD-like pathology in the hippocampus of cuprizone-fed mice. *Oncotarget* 7, 30003–30017. doi: 10.18632/oncotarget.8981
- Swamydas, M., Bessert, D., and Skoff, R. (2009). Sexual Dimorphism of Oligodendrocytes is Mediated by Differential Regulation of Signaling Pathways. *J. Neurosci. Res.* 87, 3306–3319. doi: 10.1002/jnr.21943
- Szuchet, S., Nielsen, J. A., Lovas, G., Domowicz, M. S., de Velasco, J. M., Maric, D., et al. (2011). The genetic signature of perineuronal oligodendrocytes reveals their unique phenotype. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1906–1922. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07922.x
- Takahashi, N., Sakurai, T., Davis, K. L., and Buxbaum, J. D. (2011). Linking oligodendrocyte and myelin dysfunction to neurocircuitry abnormalities in schizophrenia. *Prog. Neurobiol.* 93, 13–24. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.09.004
- Takao, T., Flint, N., Lee, L., Ying, X., Merrill, J., and Chandross, K. J. (2004). 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. *J. Neurochem.* 89, 660–673. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02370.x
- Takeda, J., Masuda, A., and Ohno, K. (2017). Six GU-rich (6GUR) FUS-binding motifs detected by normalization of CLIP-seq by Nascent-seq. *Gene* 618, 57–64. doi: 10.1016/j.gene.2017.04.008
- Talbott, E. O., Malek, A. M., and Lacomis, D. (2016). “Chapter 13 - The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis,” in *Handbook of Clinical Neurology Neuroepidemiology.*, eds. M. J. Aminoff, F. Boller, and D. F. Swaab (Elsevier), 225–238. doi: 10.1016/B978-0-12-802973-2.00013-6
- Tan, R. H., Ke, Y. D., Ittner, L. M., and Halliday, G. M. (2017). ALS/FTLD: experimental models and reality. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 177–196. doi: 10.1007/s00401-016-1666-6
- Tartwijk, F. W. van, Wunderlich, L. C. S., Mela, I., Makarchuk, S., Jakobs, M. A. H., Qamar, S., et al. (2022). Mutation of the ALS/FTD-associated RNA-binding protein FUS alters axonal cytoskeletal organisation. 2022.10.04.510780. doi: 10.1101/2022.10.04.510780
- Taylor, L., Gilmore, W., Ting, J., and Matsushima, G. (2010). Cuprizone induces similar demyelination in male and female C57BL/6 mice and results in disruption of the estrous cycle. *J. Neurosci. Res.* 88, 391–402. doi: 10.1002/jnr.22215
- Temple, S., and Raff, M. C. (1986). Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell* 44, 773–779. doi: 10.1016/0092-8674(86)90843-3
- Tetter, S., Arseni, D., Murzin, A. G., Buhidma, Y., Peak-Chew, S. Y., Garringer, H. J., et al. (2023). TAF15 amyloid filaments in frontotemporal lobar degeneration. *Nature*, 1–7. doi: 10.1038/s41586-023-06801-2

- Tischbein, M., Baron, D. M., Lin, Y.-C., Gall, K. V., Landers, J. E., Fallini, C., et al. (2019). The RNA-binding protein FUS/TLS undergoes calcium-mediated nuclear egress during excitotoxic stress and is required for GRIA2 mRNA processing. *J. Biol. Chem.* 294, 10194–10210. doi: 10.1074/jbc.RA118.005933
- Tognatta, R., Sun, W., Goebbels, S., Nave, K.-A., Nishiyama, A., Schoch, S., et al. (2017). Transient Cnp Expression by Early Progenitors Causes Cre-Lox-based Reporter Lines to Map Profoundly Different Fates. *Glia* 65, 342–359. doi: 10.1002/glia.23095
- Torvund-Jensen, J., Steengaard, J., Askebjerg, L. B., Kjaer-Sorensen, K., and Laursen, L. S. (2018). The 3'UTRs of Myelin Basic Protein mRNAs Regulate Transport, Local Translation and Sensitivity to Neuronal Activity in Zebrafish. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 185. doi: 10.3389/fnmol.2018.00185
- Torvund-Jensen, J., Steengaard, J., Reimer, L., Fihl, L. B., and Laursen, L. S. (2014). Transport and translation of MBP mRNA is regulated differently by distinct hnRNP proteins. *J. Cell Sci.* 127, 1550–1564. doi: 10.1242/jcs.140855
- Trajkovic, K., Dhaunchak, A. S., Goncalves, J. T., Wenzel, D., Schneider, A., Bunt, G., et al. (2006). Neuron to glia signaling triggers myelin membrane exocytosis from endosomal storage sites. *J. Cell Biol.* 172, 937–948. doi: 10.1083/jcb.200509022
- Tsai, H.-H., Niu, J., Munji, R., Davalos, D., Chang, J., Zhang, H., et al. (2016). Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 351, 379–384. doi: 10.1126/science.aad3839
- Tsai, H.-H., Tessier-Lavigne, M., and Miller, R. H. (2003). Netrin 1 mediates spinal cord oligodendrocyte precursor dispersal. *Dev. Camb. Engl.* 130, 2095–2105. doi: 10.1242/dev.00424
- Tsai, Y.-L., Mu, Y. C., and Manley, J. L. (2022). Nuclear RNA transcript levels modulate nucleocytoplasmic distribution of ALS/FTD-associated protein FUS. *Sci. Rep.* 12, 8180. doi: 10.1038/s41598-022-12098-4
- Tzeplaeff, L., Seguin, J., Le Gras, S., Megat, S., Cosquer, B., Plassard, D., et al. (2023). Mutant FUS induces chromatin reorganization in the hippocampus and alters memory processes. *Prog. Neurobiol.* 227, 102483. doi: 10.1016/j.pneurobio.2023.102483
- Udagawa, T., Fujioka, Y., Tanaka, M., Honda, D., Yokoi, S., Riku, Y., et al. (2015). FUS regulates AMPA receptor function and FTLD/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat. Commun.* 6, 7098. doi: 10.1038/ncomms8098
- Valdés-Tovar, M., Rodríguez-Ramírez, A. M., Rodríguez-Cárdenas, L., Sotelo-Ramírez, C. E., Camarena, B., Sanabrais-Jiménez, M. A., et al. (2022). Insights into myelin dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *World J. Psychiatry* 12, 264–285. doi: 10.5498/wjp.v12.i2.264
- Van Langenhove, T., van der Zee, J., Slegers, K., Engelborghs, S., Vandenberghe, R., Gijssels, I., et al. (2010). Genetic contribution of FUS to frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 74, 366–371. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181ccc732
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., et al. (2009). Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science* 323, 1208–1211. doi: 10.1126/science.1165942
- Vieira, R. T., Caixeta, L., Machado, S., Silva, A. C., Nardi, A. E., Arias-Carrión, O., et al. (2013). Epidemiology of early-onset dementia: a review of the literature. *Clin. Pract. Epidemiol. Ment. Health CP EMH* 9, 88–95. doi: 10.2174/1745017901309010088

- VonDrän, M. W., Singh, H., Honeywell, J. Z., and Dreyfus, C. F. (2011). Levels of BDNF Impact Oligodendrocyte Lineage Cells following a Cuprizone Lesion. *J. Neurosci.* 31, 14182–14190. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6595-10.2011
- Wake, H., Lee, P. R., and Fields, R. D. (2011). Control of Local Protein Synthesis and Initial Events in Myelination by Action Potentials. *Science* 333, 1647–1651. doi: 10.1126/science.1206998
- Wang, W.-Y., Pan, L., Su, S. C., Quinn, E. J., Sasaki, M., Jimenez, J. C., et al. (2013). Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1383–1391. doi: 10.1038/nn.3514
- Waxman, S. G., and Bennett, M. V. L. (1972). Relative Conduction Velocities of Small Myelinated and Non-myelinated Fibres in the Central Nervous System. *Nature. New Biol.* 238, 217–219. doi: 10.1038/newbio238217a0
- Wijesekera, L. C., Mathers, S., Talman, P., Galtrey, C., Parkinson, M. H., Ganesalingam, J., et al. (2009). Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology* 72, 1087–1094. doi: 10.1212/01.wnl.0000345041.83406.a2
- Won, S., Park, K., Lim, H., and Lee, S. J. (2020). Sexual dimorphism in cognitive disorders in a murine model of neuropathic pain. *Behav. Brain Funct.* 16, 1. doi: 10.1186/s12993-019-0164-0
- Yamazaki, Y., Hozumi, Y., Kaneko, K., and Fujii, S. (2018). Modulatory Effects of Perineuronal Oligodendrocytes on Neuronal Activity in the Rat Hippocampus. *Neurochem. Res.* 43, 27–40. doi: 10.1007/s11064-017-2278-9
- Yang, M., Cui, Y., Xue, M., Forster, M. T., Lang, X., Xiu, M., et al. (2022). Sexual dimorphism in the relationship between Forkhead-Box P2 and BMI with cognitive deficits in schizophrenia. *Front. Aging Neurosci.* 14, 920352. doi: 10.3389/fnagi.2022.920352
- Yasuda, K., Clatterbuck-Soper, S. F., Jackrel, M. E., Shorter, J., and Mili, S. (2017). FUS inclusions disrupt RNA localization by sequestering kinesin-1 and inhibiting microtubule detyrosination. *J. Cell Biol.* 216, 1015–1034. doi: 10.1083/jcb.201608022
- Yasuda, K., Maki, T., Kinoshita, H., Kaji, S., Toyokawa, M., Nishigori, R., et al. (2020). Sex-specific differences in transcriptomic profiles and cellular characteristics of oligodendrocyte precursor cells. *Stem Cell Res.* 46, 101866. doi: 10.1016/j.scr.2020.101866
- Yasuda, K., Zhang, H., Loisel, D., Haystead, T., Macara, I. G., and Mili, S. (2013). The RNA-binding protein Fus directs translation of localized mRNAs in APC-RNP granules. *J. Cell Biol.* 203, 737–746. doi: 10.1083/jcb.201306058
- Young, J. J., Lavakumar, M., Tampi, D., Balachandran, S., and Tampi, R. R. (2018). Frontotemporal dementia: latest evidence and clinical implications. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 8, 33–48. doi: 10.1177/2045125317739818
- Young, K. M., Psachoulia, K., Tripathi, R. B., Dunn, S.-J., Cossell, L., Attwell, D., et al. (2013). Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* 77, 873–885. doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.006
- Yu, G., Su, Y., Guo, C., Yi, C., Yu, B., Chen, H., et al. (2022). Pathological oligodendrocyte precursor cells revealed in human schizophrenic brains and trigger schizophrenia-like behaviors and synaptic defects in genetic animal model. *Mol. Psychiatry* 27, 5154–5166. doi: 10.1038/s41380-022-01777-3



- Yuen, T. J., Silbereis, J. C., Griveau, A., Chang, S. M., Daneman, R., Fancy, S. P. J., et al. (2014). Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis. *Cell* 158, 383–396. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.052
- Zalewska, T., Pawelec, P., Ziabska, K., and Ziemka-Nalecz, M. (2022). Sexual Dimorphism in Neurodegenerative Diseases and in Brain Ischemia. *Biomolecules* 13, 26. doi: 10.3390/biom13010026
- Zawadzka, M., Rivers, L. E., Fancy, S. P. J., Zhao, C., Tripathi, R., Jamen, F., et al. (2010). CNS-Resident Glial Progenitor/Stem Cells Produce Schwann Cells as well as Oligodendrocytes during Repair of CNS Demyelination. *Cell Stem Cell* 6, 578–590. doi: 10.1016/j.stem.2010.04.002
- Zeis, T., Enz, L., and Schaeren-Wiemers, N. (2016). The immunomodulatory oligodendrocyte. *Brain Res.* 1641, 139–148. doi: 10.1016/j.brainres.2015.09.021
- Zhang, Z., Cerghet, M., Mullins, C., Williamson, M., Bessert, D., and Skoff, R. (2004). Comparison of in vivo and in vitro subcellular localization of estrogen receptors alpha and beta in oligodendrocytes. *J. Neurochem.* 89, 674–684. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02388.x
- Zhou, Y., Liu, S., Liu, G., Oztürk, A., and Hicks, G. G. (2013). ALS-associated FUS mutations result in compromised FUS alternative splicing and autoregulation. *PLoS Genet.* 9, e1003895. doi: 10.1371/journal.pgen.1003895
- Zhu, Q., Zhao, X., Zheng, K., Li, H., Huang, H., Zhang, Z., et al. (2014). Genetic evidence that Nkx2.2 and Pdgfra are major determinants of the timing of oligodendrocyte differentiation in the developing CNS. *Dev. Camb. Engl.* 141, 548–555. doi: 10.1242/dev.095323
- Zhu, X., Hill, R. A., Dietrich, D., Komitova, M., Suzuki, R., and Nishiyama, A. (2011). Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells. *Dev. Camb. Engl.* 138, 745–753. doi: 10.1242/dev.047951
- Zhu, Y., Burg, T., Neyrinck, K., Vervliet, T., Nami, F., Vervoort, E., et al. (2024). Disruption of MAM integrity in mutant FUS oligodendroglial progenitors from hiPSCs. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 147, 6. doi: 10.1007/s00401-023-02666-x
- Zuchero, J. B., Fu, M.-M., Sloan, S. A., Ibrahim, A., Olson, A., Zaremba, A., et al. (2015). CNS myelin wrapping is driven by actin disassembly. *Dev. Cell* 34, 152–167. doi: 10.1016/j.devcel.2015.06.011

## Annexes













## Annexe 1 Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects

J'ai également eu la chance de pouvoir participer à la publication de l'article « Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects » dans le journal Nature Communications.

Cet article caractérise pour la première fois le modèle murin pan-mFUS au niveau du comportement cognitif, et met en évidence que les mâles pan-mFUS manifestent une hyperactivité et une désinhibition sociale qui font échos à certaines anomalies comportementales observées chez les patients DFT. Ces altérations comportementales sont associées à une augmentation de l'activité neuronale dans le cortex frontal, ainsi qu'à des altérations des synapses excitatrices et inhibitrices au niveau de leur structure, mais aussi de l'expression de certains gènes synaptiques.

Dans cette étude, j'ai fait l'analyse en microscopie électronique des synapses inhibitrices, en caractérisant la taille des boutons et des fentes synaptiques, ainsi que la densité des vésicules présynaptiques.

# Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects

Jelena Scekic-Zahirovic<sup>1,14</sup>, Inmaculada Sanjuan-Ruiz <sup>1,14</sup>, Vanessa Kan<sup>2,3</sup>, Salim Megat<sup>1</sup>, Pierre De Rossi <sup>4</sup>, Stéphane Dieterlé<sup>1</sup>, Raphaëlle Cassel<sup>1,5</sup>, Marguerite Jamet<sup>1</sup>, Pascal Kessler <sup>6</sup>, Diana Wiesner<sup>7,8</sup>, Laura Tzeplaeff<sup>5</sup>, Valérie Demais<sup>9</sup>, Sonu Sahadevan<sup>4</sup>, Katharina M. Hembach <sup>4</sup>, Hans-Peter Muller<sup>7</sup>, Gina Picchiarelli<sup>1</sup>, Nibha Mishra<sup>10,11</sup>, Stefano Antonucci <sup>7,8</sup>, Sylvie Dirrig-Grosch<sup>1</sup>, Jan Kassubek <sup>7</sup>, Volker Rasche <sup>12</sup>, Albert Ludolph<sup>7,8</sup>, Anne-Laurence Boutillier <sup>5</sup>, Francesco Roselli <sup>7,8</sup>, Magdalini Polymenidou <sup>4</sup>, Clotilde Lagier-Tourenne <sup>10,11</sup>, Sabine Liebscher <sup>2,3,13,15</sup> ✉ & Luc Dupuis <sup>1,15</sup> ✉

Gene mutations causing cytoplasmic mislocalization of the RNA-binding protein FUS lead to severe forms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Cytoplasmic accumulation of FUS is also observed in other diseases, with unknown consequences. Here, we show that cytoplasmic mislocalization of FUS drives behavioral abnormalities in knock-in mice, including locomotor hyperactivity and alterations in social interactions, in the absence of widespread neuronal loss. Mechanistically, we identified a progressive increase in neuronal activity in the frontal cortex of *Fus* knock-in mice in vivo, associated with altered synaptic gene expression. Synaptic ultrastructural and morphological defects were more pronounced in inhibitory than excitatory synapses and associated with increased synaptosomal levels of FUS and its RNA targets. Thus, cytoplasmic FUS triggers synaptic deficits, which is leading to increased neuronal activity in frontal cortex and causing related behavioral phenotypes. These results indicate that FUS mislocalization may trigger deleterious phenotypes beyond motor neuron impairment in ALS, likely relevant also for other neurodegenerative diseases characterized by FUS mislocalization.

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, Inserm, Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence, Strasbourg, France. <sup>2</sup> Institute of Clinical Neuroimmunology, Klinikum der Universität München, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany. <sup>3</sup> BioMedical Center, Medical Faculty, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany. <sup>4</sup> Department of Quantitative Biomedicine, University of Zurich, Zürich, Switzerland. <sup>5</sup> Université de Strasbourg, UMR 7364 CNRS, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), Strasbourg, France. <sup>6</sup> Université de Strasbourg, Inserm, Unité mixte de service du CRBS, UMS 038, Strasbourg, France. <sup>7</sup> Department of Neurology, Ulm University, Ulm, Germany. <sup>8</sup> Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Ulm, Germany. <sup>9</sup> Plateforme Imagerie In Vitro, CNRS UPS-3156, NeuroPôle, Strasbourg, France. <sup>10</sup> Department of Neurology, The Sean M. Healey and AMG Center for ALS at Mass General, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. <sup>11</sup> Broad Institute of Harvard University and MIT, Cambridge, MA, USA. <sup>12</sup> Ulm University Medical Center, Department of Internal Medicine II, Ulm, Germany. <sup>13</sup> Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy), Munich, Germany. <sup>14</sup> These authors contributed equally: Jelena Scekic-Zahirovic, Inmaculada Sanjuan-Ruiz. <sup>15</sup> These authors jointly supervised this work: Sabine Liebscher, Luc Dupuis. ✉email: [sabine.liebscher@med.uni-muenchen.de](mailto:sabine.liebscher@med.uni-muenchen.de); [ldupuis@unistra.fr](mailto:ldupuis@unistra.fr)

**A**myotrophic lateral sclerosis (ALS) is the major adult motor neuron disease, with onset usually in the 6th and 7th decade of life and death due to respiratory insufficiency and progressive paralysis typically occurring 3–5 years after onset of motor symptoms<sup>1–3</sup>. Mutations in the Fused in Sarcoma gene (*FUS*), encoding an RNA-binding protein from the FET family<sup>4,5</sup>, are associated with the most severe forms of ALS<sup>6,7</sup>, clinically presenting with a very early onset and rapid disease progression<sup>8,9</sup>. ALS associated mutations in *FUS* are clustered in the C-terminal region of the FUS protein that includes the atypical PY nuclear localization sequence, and is required for protein entry into the nucleus<sup>6,7,10–12</sup>. The severity of the disease correlates with the degree of impairment of FUS nuclear import<sup>11,12</sup>, and the most severe cases of ALS known to date, are indeed caused by mutations leading to the complete truncation of the PY-NLS<sup>8,9</sup>.

A number of clinical and pathological studies suggest that FUS mislocalization to the cytoplasm and subsequent aggregation could be relevant beyond the few ALS-FUS cases. First, *FUS* mutations, although rare in non-ALS cases, have been found in cases with frontotemporal dementia, either isolated<sup>13,14</sup> or as an initial presentation of ALS-FTD<sup>15,16</sup>, as well as in patients with initial chorea<sup>17</sup>, mental retardation<sup>18</sup>, psychosis or dementia<sup>19</sup>, and essential tremor<sup>20</sup>. In the absence of *FUS* mutations, FUS mislocalization<sup>21</sup>, or aggregation<sup>22,23</sup> were found to be widespread in sporadic ALS. FUS pathology also defines a subset of cases with FTD (FTD-FUS) with prominent atrophy of the caudate putamen<sup>24–26</sup>, concomitant pathology of other FET proteins, such as TAF15 and EWSR1<sup>12,27–30</sup> and frequent psychiatric symptoms<sup>28</sup>. FUS aggregates have also been observed in spinocerebellar ataxia and Huntington's disease<sup>31,32</sup>. While FUS mislocalization appears to be a common feature in neurodegenerative diseases, its pathological consequences have not been thoroughly studied beyond motor neuron degeneration.

Neurons with FUS pathology show decreased levels of FUS in the nucleus, that might compromise a number of processes dependent on proper FUS levels such as transcription and splicing regulation or DNA damage repair<sup>4</sup>. Interestingly, loss of FUS alters the splicing of multiple mRNAs relevant to neuronal function<sup>33,34</sup>, such as *MAPT*, encoding the TAU protein, and alters the stability of mRNAs, encoding relevant synaptic proteins such as GluA1 and SynGAP1<sup>35–39</sup>. However, loss of nuclear FUS levels is very efficiently compensated for by autoregulatory mechanisms as well as by other FET proteins, and loss of nuclear FUS remains limited as opposed to loss of nuclear TDP-43, observed in TDP-43 pathology<sup>40</sup>. Indeed, heterozygous *Fus* knock-in mice, which carry one mutant allele leading to cytoplasmic and not nuclear localization of FUS, only show marginal loss of nuclear FUS due to compensatory overexpression<sup>10,41</sup>. Beyond nuclear loss of function, accumulation of cytoplasmic FUS was found to be a critical event in ALS-FUS in multiple studies in mouse models. For instance, cytoplasmic FUS is necessary to cause motor neuron degeneration in ALS-FUS<sup>10,41–46</sup> as heterozygous *Fus* knock-in mouse models develop mild, late onset muscle weakness and motor neuron degeneration, but not haploinsufficient *Fus* knockout mice<sup>10,41,46</sup>. To date, there are few studies investigating whether the accumulation of cytoplasmic FUS might lead to phenotypes beyond motor neuron degeneration. Interestingly, FUS is also found at synaptic and dendritic sites<sup>38,47–51</sup>, and Sahadevan, Hembach et al.<sup>52</sup> identify synaptic mRNA targets for FUS that are critical for synaptic formation, function and maintenance.

Here, we show that a partial cytoplasmic mislocalization of FUS in heterozygous *Fus* knock-in mice is sufficient to drive a panel of behavioral abnormalities, including locomotor hyperactivity and alterations in social interactions, which preceded

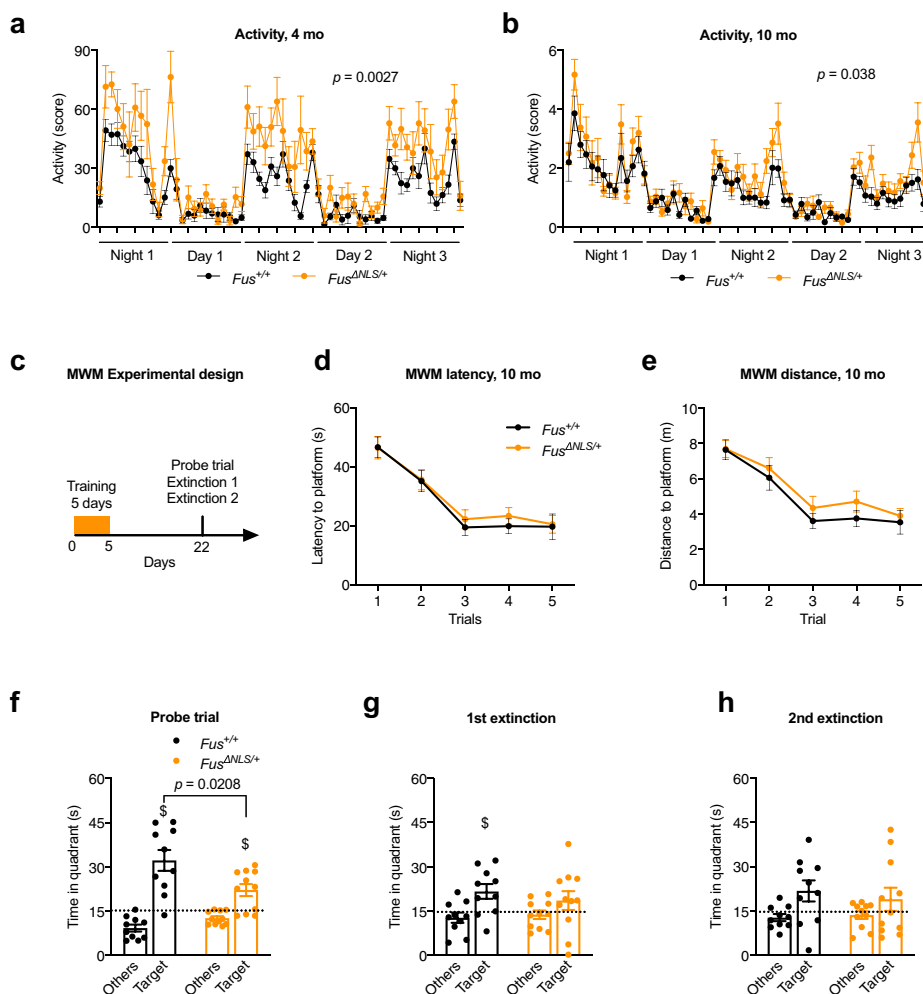
motor neuron degeneration. Behavioral deficits were accompanied by ventricle enlargement and atrophy of several subcortical structures in the absence of widespread neuronal loss in the cortex. Mechanistically, we could identify a progressive increase in neuronal activity in the frontal cortex of *Fus* knock-in mice *in vivo*. Furthermore, we observed a coordinated down-regulation of multiple genes related to synaptic function in the frontal cortex throughout adulthood, which were confirmed by ultrastructural and morphological defects of synapses. These synaptic defects were more profound in inhibitory compared to excitatory synapses and accompanied by increased levels of FUS protein as well as of 3 of its RNA targets (*Fus*, *Nrxn1*, and *Gabra1*) in synaptosomes of heterozygous *Fus* knock-in mice. Thus, FUS cytoplasmic enrichment is sufficient to trigger synaptic deficits, leading to increased neuronal activity and behavioral phenotypes. These findings suggest that FUS mislocalization could trigger deleterious phenotypes beyond impaired motor function that could be relevant for both ALS-FUS but also for other neurodegenerative diseases based on FUS mislocalization.

## Results

**Spontaneous locomotor hyperactivity in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.** Since FUS mislocalization and aggregation are observed in patients with various neurodegenerative diseases, we hypothesized that partial FUS cytoplasmic mislocalization in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice could be sufficient to cause a number of behavioral phenotypes. Two independent cohorts of mice were analyzed at 4 months of age, before the appearance of motor impairment<sup>41</sup> and 10 months of age. Evaluation of basal motor activity in a familiar environment showed significantly increased locomotor activity in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice over the 3 consecutive days of observation (Fig. 1a, b). Interestingly, this hyperactivity was observed throughout the entire night in 4-months-old *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice (Fig. 1a), but only during late night hours in older *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice (Fig. 1b). In the open field, ambulatory distance, duration of ambulation, mean speed and preference for peripheral quadrants over central quadrants were similar in 10-months-old *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice and wild-type littermates, indicating the absence of hyperactivity in a novel environment (Supplementary Fig. 1a, b). To further study potential anxiety-related phenotypes in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, we used the dark/light box test, based on the preference of mice for dark compartments over illuminated places. In this test, 10-months-old *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice and *Fus*<sup>+/+</sup> mice showed a similar latency to enter, similar frequency of transitions and similar duration to explore illuminated compartment (Supplementary Fig. 1c). Thus, *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice are hyperactive, but do not show evidence of anxious behaviors, at least at the ages tested.

## Mildly compromised consolidation of spatial memory in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.

To explore the possibility that behavioral phenotypes of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice included spatial memory defects, we performed the Morris water maze test. This task requires hippocampal function, at least during acquisition and memory formation, but relies on a proper cortico-hippocampal dialog for longer retention times or remote memory retrieval (Fig. 1c)<sup>53</sup>. At 10 months of age, *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice performed similarly well to their *Fus*<sup>+/+</sup> littermates regarding the distance travelled and latency to find the hidden platform over training days (Fig. 1d, e). We then performed a probe trial 18 days after the last training and observed that, although both genotypes searched significantly in the target quadrant compared to nontarget areas, *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice displayed a slightly decreased performance to retrieve memory at this timepoint (Fig. 1f). Furthermore, *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice lost their previous memory significantly faster than wild-type

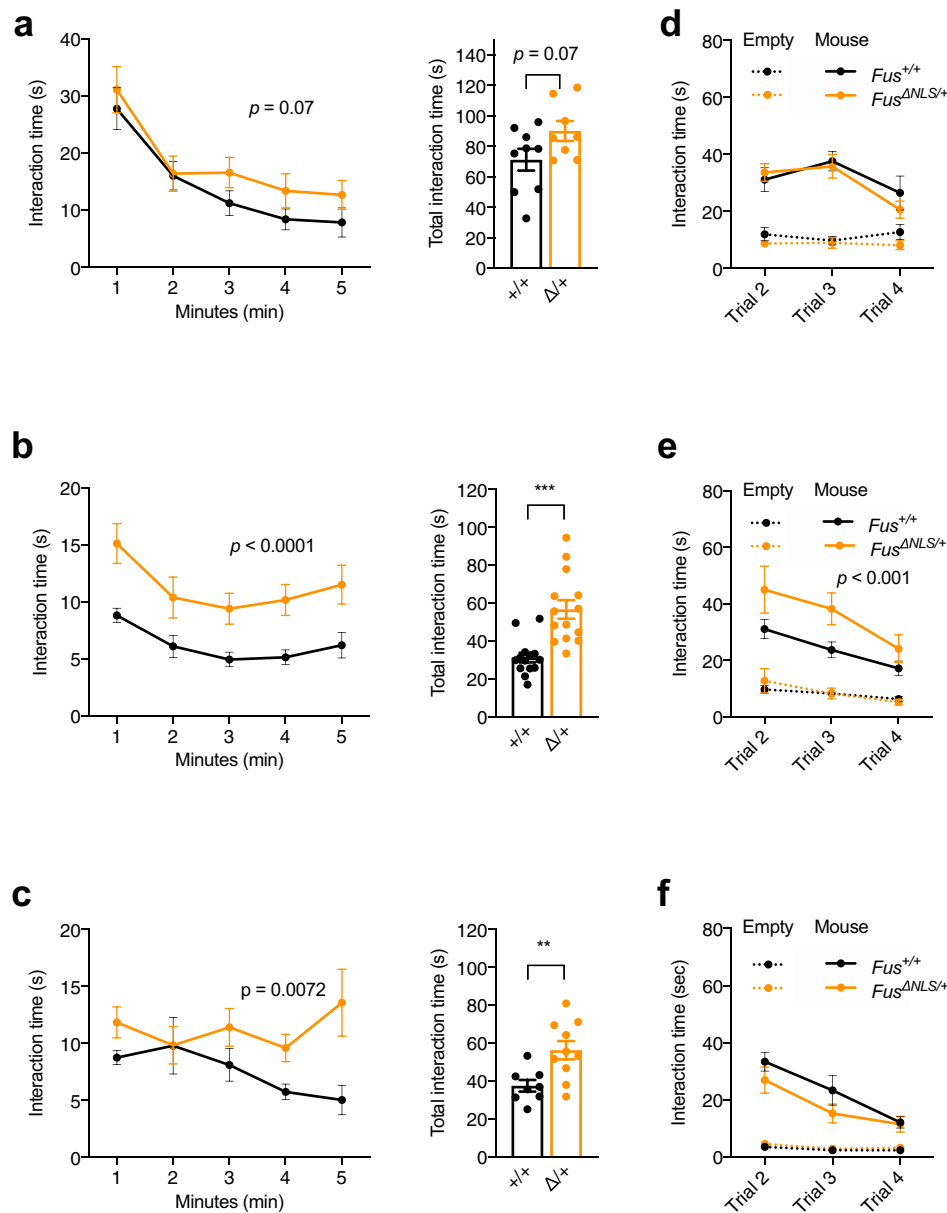


**Fig. 1** *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice display increased nocturnal spontaneous locomotor activity and cognitive defects. **a, b** Line graphs represent mice home cage activity-actimetry over three consecutive days at 4 months (**a**) and 10 months (**b**) of *Fus*<sup>+/+</sup> (black) and *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (orange) male mice  $N = 11$  for *Fus*<sup>+/+</sup> and  $N = 10$  for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice at 4 months and  $N = 15$  for *Fus*<sup>+/+</sup> and  $N = 14$  for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice at 10 months. Repeated measures Two-way ANOVA followed by Sidak for multiple comparisons, with time and genotype as variables.  $P = 0.0027$  at 4 months and  $p = 0.038$  at 10 months for genotype effect. Data are presented as mean  $\pm$  SEM values of activity score per hour. **c** Schematic illustration of the Morris water maze (MWM) experimental strategy (paradigm). Mice were subjected to a five-day training period and tested for spatial memory retention in a probe trial (60 seconds) 18 days after the last acquisition. The probe trial was then followed by two extinction tests, performed at 2 h intervals. **d, e** Line graphs represent latency (in seconds) (**d**) and total distance swam (in meters) (**e**) to find the hidden platform during acquisition of 10-months-old *Fus*<sup>+/+</sup> (black) and *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (orange) male mice. Both genotypes improved similarly their performance between day 1 and 5.  $N = 10$  for *Fus*<sup>+/+</sup> and  $N = 11$  for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Data are presented as mean  $\pm$  SEM values of four trials per day of training. A two-way repeated measure analysis of variance (ANOVA) (genotype  $\times$  days) was conducted to determine the effect of genotype on learning over time. No significant effect of genotype is observed. **f** Bar graphs represent the time spent in the target quadrant (Target) and the average of the time spent in the other three quadrants (Others) during probe trial. Dashed line indicates chance level (15 seconds per quadrant; i.e., 25%).  $N = 10$  for *Fus*<sup>+/+</sup> and  $N = 11$  for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Both genotypes were significantly above random but *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice performed significantly worse than *Fus*<sup>+/+</sup> littermates ( $\$, p < 0.01$ , One sample *t*-test was used to compare to a chance level, Target quadrant:  $p = 0.0008$  for *Fus*<sup>+/+</sup> and  $p = 0.006$  for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup>). Genotype comparison was made using One-way ANOVA;  $F(1,19) = 6.33, p = 0.0208$ . **g, h** Bar graphs represent the time spent in quadrants (Target vs Others) during the first (**g**) and the second (**h**) extinction test ( $\$, p < 0.05$  vs chance levels). One-way ANOVA for genotype effect ( $F(1,19) = 0.56, p = 0.46$ ) (**g**), ( $F(1,19) = 0.27, p = 0.6$ ) (**h**) and One sample *t*-test was used to compare to a chance level, (Target quadrant:  $p = 0.025$  for *Fus*<sup>+/+</sup> and  $p = 0.22$  for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup>) (**g**), (Target quadrant:  $p = 0.08$  for *Fus*<sup>+/+</sup> and  $p = 0.09$  for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup>) (**h**).  $N = 10$  for *Fus*<sup>+/+</sup> and  $N = 11$  for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, with same mice as panel **f**. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Source data are provided as a Source Data file.

mice, as they were searching randomly in a first extinction test performed 2 h after the probe trial, while wild-type mice still showed a significant more directed searching behaviour and preferred the target area over others (Fig. 1g). This suggests that consolidation of long-term memory was mildly compromised in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Lastly, both genotypes did not distinguish the target over the other quadrants in a second extinction test (Fig. 1h). Altogether, these data show that *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were

able to learn but displayed impaired long-term memory in agreement with a dysfunction of cortical regions.

**Social disinhibition in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.** Marked changes in personality and social behavior, such as social withdrawal or social disinhibition, obsessive-compulsive behaviors, euphoria or apathy are common in subjects with behavioral variant (bv)FTD, a disease with pronounced FUS mislocalization<sup>54–56</sup>. Social



**Fig. 2 Social behavior abnormalities in  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice.** **a–c** Line and bar graphs represent interaction time between resident (test) and intruder mice exclusively initiated by resident mouse in one-minute intervals (line graphs, on the left) or over the total time (bar graphs, on the right) during a 5 min resident-intruder test in home cage for 4 (**a**), 10 (**b**), and 22 (**c**) months-old  $Fus^{+/+}$  (black) and  $Fus^{\Delta NLS/+}$  (orange) male mice. Note that, young  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice demonstrated a trend towards an increased social interest for intruder mouse (**a**) while older mice interacted with intruders significantly longer than  $Fus^{+/+}$  (**b**, **c**) showing an age-dependent impairment of social behavior–disinhibition. All values are represented as mean  $\pm$  SEM. At 4 months,  $N = 9$  for  $Fus^{+/+}$  and  $N = 8$  for  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice; At 10 months,  $N = 14$  for  $Fus^{+/+}$  and  $N = 14$  for  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice; At 22 months,  $N = 8$  for  $Fus^{+/+}$  and  $N = 10$  for  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice. Two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak post-hoc test ( $p = 0.07$  (4 months),  $p < 0.001$  (10 months), and  $p = 0.007$  (22 months) for genotype.effect); Two-sided Unpaired Student's  $t$ -test for total time  $p = 0.07$  (4 months),  $p < 0.001$  (10 months), and  $p = 0.007$  (22 months)). **d**, **f** Line graphs represent sociability in the three-chamber test measured as interaction time with novel mice across three trials for  $Fus^{+/+}$  (black) and  $Fus^{\Delta NLS/+}$  (orange) male mice at 4 (**d**), 10 (**e**), and 22 (**f**) months of age. Time exploring an empty cage (object) across trials is represented as dashed lines. At 4 months,  $N = 9$  for  $Fus^{+/+}$  and  $N = 8$  for  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice; At 10 months,  $N = 14$  for  $Fus^{+/+}$  and  $N = 14$  for  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice; At 22 months,  $N = 8$  for  $Fus^{+/+}$  and  $N = 9$  for  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Three-way ANOVA with Newman Keuls post-hoc test for multiple comparisons,  $p = ns$  (4 months),  $p < 0.001$  (10 months) and  $p = ns$  (22 months) for genotype effect. Source data are provided as a Source Data file.

deficits were also reported in progranulin haploinsufficient mice, a mouse model of FTD<sup>57</sup>. To determine whether  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice have social behavioral deficits, we first performed the resident-intruder test specific for evaluating sociability in mice. Interestingly, 4-months-old  $Fus^{\Delta NLS/+}$  mice showed a trend towards

longer interaction with the intruder mouse as compared with  $Fus^{+/+}$  mice ( $p = 0.07$ ) (Fig. 2a), that was significant at 10 months of age (Fig. 2b) and persisted until 22 months of age (Fig. 2c). Aggressive behavior was only observed at 4 months of age, and not affected by the  $Fus$  genotype (attack duration:



13.0 ± 1.4 s in *Fus*<sup>+/+</sup> mice vs 11.6 ± 1.0 s in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice,  $p = 0.88$  two-sided unpaired Student's *t*-test). To further characterize the social behavioral impairment, we used a modified version of the three-chamber social paradigm. After a first trial of habituation using an empty setup, a novel mouse is introduced in a side compartment. The interactions initiated by the test mouse with either the novel mouse or the empty cage was quantified. Of most relevance, across the three consecutive trials (Trial 2, 3, and 4), we observed that 10-months-old *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice consistently interacted more with the novel mouse than *Fus*<sup>+/+</sup> mice, in line with social disinhibition (Fig. 2e). This was not observed at 4 or 22 months of age (Fig. 2d–f). Importantly, mice of both genotypes spent more time interacting with the novel mouse than with the empty cage, indicating that mice could recognize its conspecific. The interaction time gradually decreased in later trials, suggesting progressive loss of social interest in the novel mouse, while it became familiar (Fig. 2d–f). Similar findings of social disinhibition in both resident-intruder test and three-chamber paradigms as a novel environment exclude the possibility that the observed increased social interactions resulted from locomotor hyperactivity in the home cage. Importantly, the olfactory function of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice was preserved, since results showed no differences between genotypes at 22 months of age in the time spent sniffing filter paper, covered with either attractive scent (vanilla) or an aversive scent (2-methyl butyrate) (Supplementary Fig. 2). These findings together with absence of major motor phenotype at that age (Supplementary Fig. 1a, b) indicated that social behavior is specifically affected in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Taken altogether, behavioral analyses of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice uncovered locomotor hyperactivity, cognitive deficits, and altered memory consolidation as well as selective impairment in sociability.

**Increased spontaneous neuronal activity in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice in vivo.** As the behavioral changes observed are highly reminiscent of frontal lobe dysfunction, we next asked whether neuronal activity is altered within that brain area. We thus examined spontaneous neuronal activity using in vivo two-photon calcium imaging (Fig. 3a–c). We studied neurons in cortical layer II/III of the frontal cortex expressing the genetically encoded calcium indicator GCaMP (delivered through an AAV vector) in mice at the age of 4 and 10 months (Fig. 3b). Indeed, we observed a significant increase in spontaneous activity, which worsened with age. While in 4-month-old mice the fraction of active neurons did not differ between *Fus*<sup>+/+</sup> and *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice (Fig. 3d), there was a decrease in transient amplitudes (Fig. 3e) and an increase in transient frequency (Fig. 3f) in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. In 10-month-old animals, this increase in activity was already evident at the level of the fraction of active cells in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (Fig. 3g). Moreover, we observed an increase in the transient amplitudes (Fig. 3h) and also in the transient frequency (Fig. 3i) in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice compared to their *Fus*<sup>+/+</sup> littermates. Taken together, our data demonstrate an age dependent, strong increase in neuronal activity in vivo within the upper layers of frontal cortex of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.

***Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice show ventricle enlargement and atrophy of subcortical structures but preserved cortical neurons.** We next sought to understand the structural basis of behavioral and electrophysiological abnormalities in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice by employing MR imaging. FLASH MRI datasets for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice and *Fus*<sup>+/+</sup> littermates were processed for volumetric quantification using an in-house developed script<sup>58</sup>, aimed at registering the MRI images to a template derived from the Allen Brain Atlas reference and then at parcellating the cerebral structures into hierarchically arranged volumes of interest, which can be

interrogated for the volume of any region or group of regions (Fig. 4a, b). The overall intracranial volume (ICV) was comparable in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> and *Fus*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 4c). However, upon normalization for the ICV, the volume of the brain parenchyma was significantly decreased in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (by ~1.5%; average normalized volume was 98.52% for *Fus*<sup>+/+</sup> and 97.14% for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup>; Fig. 4d). Visual inspection of the MRI images revealed a substantial increase in the volume of lateral ventricles, which was confirmed by the registration algorithm and quantitated as an almost doubling of ventricular volumes (Fig. 4e). The ventriculomegaly was not associated with neocortical atrophy (Fig. 4f), but we identified a significant atrophy of the medial septum (Fig. 4g) and of the structures corresponding to the cortical subplate (including claustrum, endopiriform cortex and lateral, basomedial, basolateral, and posterior amygdalar nuclei; Fig. 4h). Only a nonsignificant trend for reduced volume was detected for hippocampus (9.06% for *Fus*<sup>+/+</sup> vs. 8.62% for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup>;  $p = 0.15$ ; Two-sided Unpaired Student's *t*-test) and striatum (9.76% for *Fus*<sup>+/+</sup> vs. 9.89% for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup>;  $p = 0.56$ , Two-sided Unpaired Student's *t*-test). Interestingly, we also detected a significant degree of atrophy in the non-neocortical olfactory areas of the piriform cortex (2.48% for *Fus*<sup>+/+</sup> vs. 2.18% for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup>;  $p = 0.0006$ , Two-sided Unpaired Student's *t*-test). The lack of a prominent cortical atrophy phenotype was further confirmed by brain histology in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice at both 10 and 22 months of age. Cortical cytoarchitecture appeared preserved in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, with normal lamination and no cortical thinning. The density of NeuN positive neurons in the frontal cortex was similar between *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice and their wild-type littermates at 10 and 22 months of age (Fig. 4i, j).

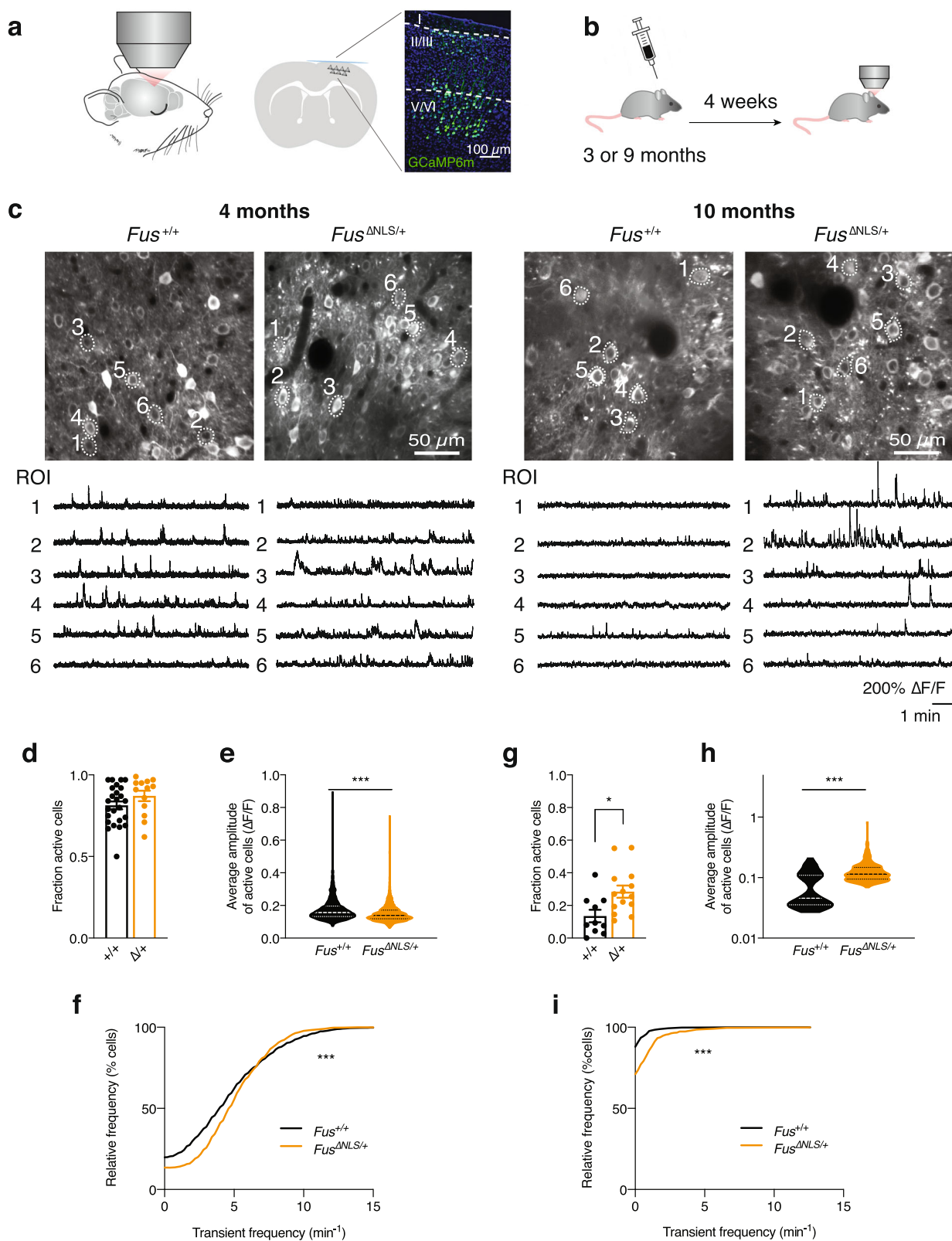
Taken together, these data demonstrate a significant hydrocephalus ex vacuo in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup>, due to the atrophy of subcortical structures, such as the medial septum, several amygdalar nuclei, piriform areas, and tentatively the hippocampus.

**Transcriptome of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> cortex points to defects in inhibitory neurotransmission and synapses.** To understand the molecular basis of altered behavior in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, we performed RNAseq on frontal cortex of 5- and 22-months-old *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice and their wild-type littermates. Principal component analysis showed a clear separation between *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice and their wild-type littermates at 22 months of age, while clustering was imperfect at 5 months of age, suggesting an exacerbation of the transcriptional differences between genotypes with age (Supplementary Fig. 3a).

Using a stringent analytical pipeline (FDR < 0.05), we did not identify differentially expressed genes between *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> and *Fus*<sup>+/+</sup> mice at 5 and 22 months (Supplementary Fig. 3b). To ensure that the absence of differentially expressed genes was not due to the stringent calibration of *p*-values, we compared the 5-months and 22-months-old *Fus*<sup>+/+</sup> mice RNAseq datasets to probe age-related alterations. We were able to detect more than 2000 genes differentially expressed between 5- and 22-months-old wild-type mice, at a 5% false discovery rate, demonstrating that this approach can reliably detect changes in gene expression (Supplementary Fig. 3b).

To place gene expression changes in a systems-level framework, we performed weighted-gene coexpression network analysis (WGCNA) across all available *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> and *Fus*<sup>+/+</sup> datasets, including 5 and 22-months RNAseq, as well as 1 and 6 months RNAseq datasets from Sahadevan et al.<sup>52</sup>. Potential batch effects were removed using a negative binomial regression model to estimate batch effects based on the count matrix<sup>59</sup> (Supplementary Fig. 3c) and allowed clustering between genotypes (Supplementary Fig. 3d). WGCNA analysis allowed us to





identify two mRNA modules significantly correlated with the genotype condition in cortex and labeled as turquoise and yellow modules according to the WGCNA conventions (Bonferroni-corrected  $P < 0.05$ ; Fig. 5a, Supplementary Data 1). Cell-type enrichment analysis demonstrated that the turquoise module, but not the yellow module, was enriched in neuronally expressed

genes (Fig. 5b). Indeed, the Turquoise module, downregulated in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice (Fig. 5c–e), was enriched in genes related to synaptic physiology and development, most notably of GABAergic and glutamatergic synapses (Fig. 5d). Hub genes of the turquoise module included one GABA receptor encoding genes such as *Gabrb1*, one glutamate receptor gene (*Grid2*) and genes

**Fig. 3 Assessment of neuronal activity in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice in vivo.** **a** Neuronal activity was monitored in frontal cortex of anesthetized mice. Scheme of coronal section, indicating the expression of GCaMP6s in cortex assessed through a cranial window. Magnified view of imaged cortical area demonstrates neuronal expression of GCaMP (green) across all cortical layers. **b** Timeline of experiments. Male and female mice were injected with AAV9-syn-jGCaMP7s (at 3 months of age) or AAV2/1-hsyn-GCaMP6m (at 9 months of age) into frontal cortex and implanted with a cranial window. In vivo imaging began 4 weeks after implantation. **c** Representative examples (average projections) of field of views (FOV) imaged in *Fus*<sup>+/+</sup> and *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice at 4 months ( $N = 8$  *Fus*<sup>+/+</sup> mice and  $N = 3$  *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, left) and at 10 months ( $N = 5$  *Fus*<sup>+/+</sup> mice and  $N = 6$  *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, right) are shown together with fluorescence calcium traces of selected regions of interest (ROIs). **d** The fraction of active cells per FOV was not affected in 4-month-old *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.  $N = 13$  FOVs in 3 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> and  $N = 25$  FOVs in 8 *Fus*<sup>+/+</sup> mice. Data are presented as mean  $\pm$  SEM  $p = 0.1627$ , Two-sided Unpaired Student's *t*-test. **e, f** The calcium transient frequencies (**e**) were increased while the average transient amplitudes (**f**) were decreased in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.  $N = 1107$  ROIs in 3 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> and  $N = 2264$  ROIs in 8 *Fus*<sup>+/+</sup>, superimposed by the median (**e**). Kolmogorov-Smirnov test,  $***p < 0.0001$  for both panel **e** and **f**. **g–i** The fraction of active cells per FOV (**g**) as well as (**h**) the frequencies and (**i**) the average amplitudes of calcium transients of each ROI were increased in 10-month-old *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Data are individual FOVs (**g**;  $N = 14$  FOVs in 6 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> and  $N = 10$  FOVs in 5 *Fus*<sup>+/+</sup> mice) or individual ROIs (**h, i**;  $N = 855$  ROIs in 6 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> and  $N = 631$  ROIs in 5 *Fus*<sup>+/+</sup> mice) superimposed by the mean  $\pm$  SEM (**g**) or the median (**h, i**). panel **g**: Two-tailed Unpaired Student's *t*-test,  $*p = 0.0126$ ; panel **h** and **i**: Kolmogorov-Smirnov test,  $***p < 0.0001$  for both panels. Source data are provided as a Source Data file.

tightly associated with synaptic development and autism (*Nrxn1*, *Lrfn5*, *Plcb1*, *Erc2*, *Frrmpd4*, *Tanc2*, *Ctnnd2*, *Dmd*). Consistent with the known molecular function of FUS, the yellow module was enriched for genes related to RNA metabolism and processing and was progressively upregulated with age. Hub genes of this module comprise genes related to mRNA splicing (*Snrnp70*, *Ddx39b*, *Ilf3*), RNA transport (*Hnrnp1*, *Rbm3*, *Ipo4*), or RNA degradation (*Exosc10*) (Fig. 5f–h). Thus, transcriptome analysis points to the existence of synaptic defects in the frontal cortex of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.

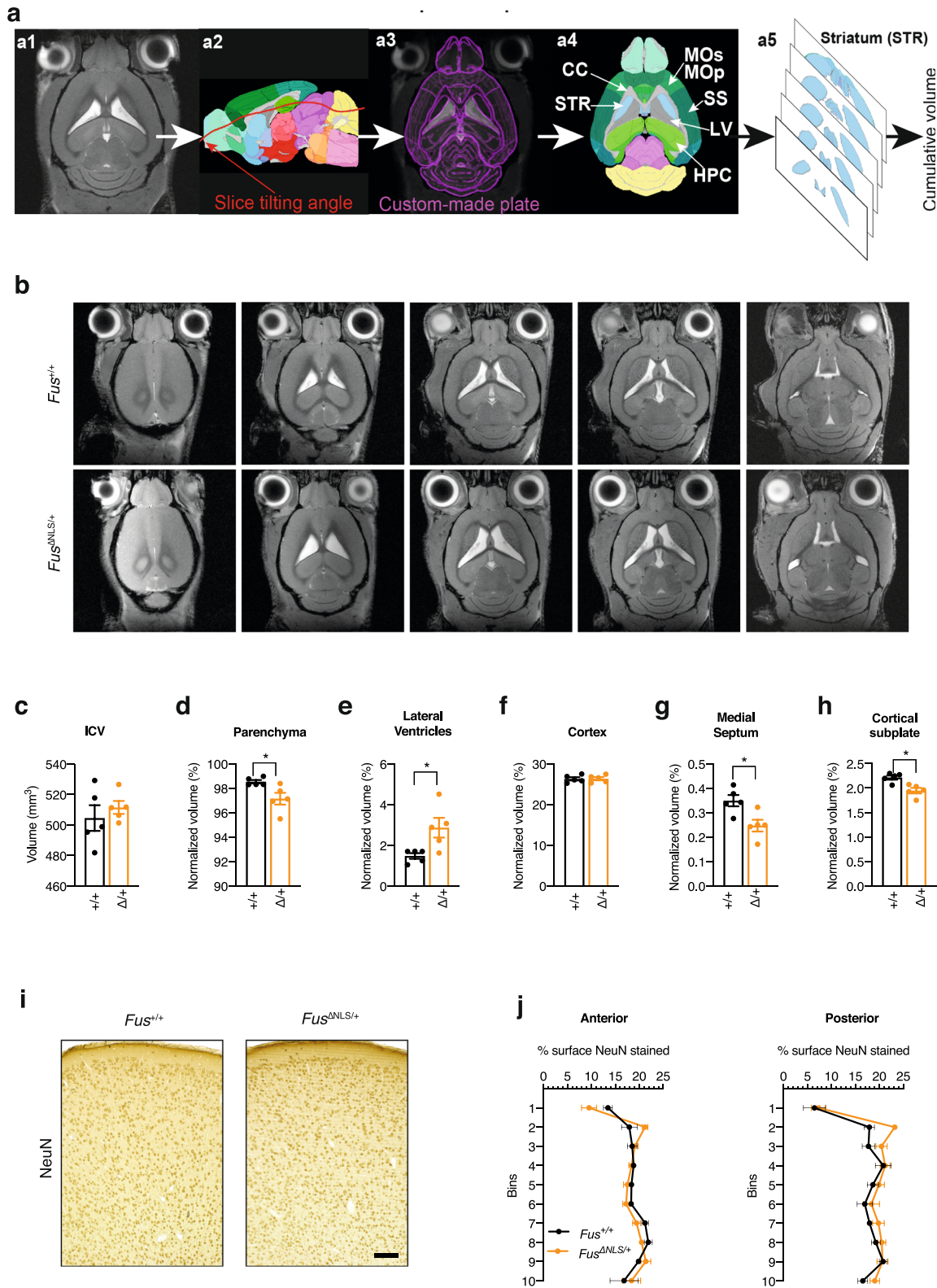
**Synaptic defects in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.** To independently validate potential synaptic defects in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> frontal cortex, we performed quantitative ultrastructural analysis of inhibitory (Fig. 6a) and excitatory (Fig. 6b) synapses in this brain region. Inhibitory synapses in layers II/III of the frontal cortex, identified by the presence of mitochondria on both sides of the synapse, showed major ultrastructural alterations in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, with increased boutons sizes (Fig. 6c), longer active zones (Fig. 6d), prominently increased vesicle numbers (Fig. 6e), and increased distance of vesicles to the active zone as compared to wild-type synapses (Fig. 6f). Excitatory synapses, identified as asymmetrical, with a pronounced postsynaptic density, also showed ultrastructural alterations; however, in the opposite direction: excitatory synapses showed overall decreased bouton size, decreased length of the active zone, and decreased vesicle number in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> cortex (Fig. 6g–i). Importantly, ultrastructural alterations of excitatory synapses were less pronounced than those of inhibitory synapses.

To further explore morphological changes occurring at inhibitory synapses, we quantified the density and the cluster size of three inhibitory synaptic markers: the GABA transporter VGAT localized at the presynaptic site<sup>60</sup> and two receptors specifically expressed at the postsynaptic site of all GABA monoaminergic synapses<sup>61</sup>, the postsynaptic scaffold protein Gephyrin<sup>62</sup> and the GABA<sub>A</sub> receptor containing  $\alpha 3$  subunit (GABA<sub>A</sub>R $\alpha 3$ ). Pictures were acquired in cortical layer 1 to allow imaging of inhibitory synapses located on the apical dendrites of pyramidal neurons<sup>63</sup>. Consistent with the observed ultrastructural abnormalities, a significant decrease in all markers for inhibitory synapses was identified (Fig. 6k, l). This decrease in density was associated with a decrease in the size of the clusters for VGAT, GABA<sub>A</sub>R $\alpha 3$ , and Gephyrin (Fig. 6m), suggesting a functional impairment of the remaining synapses.

We then sought to determine whether these defects in inhibitory synapses were caused or associated with the loss of inhibitory neurons and focused on parvalbumin-positive (PV) interneurons as the largest group of inhibitory interneurons in the

cortex. Using immunohistochemistry, we did not detect differences in the number of PV neurons in the frontal cortex of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice neither at 10 nor at 22 months of age (Supplementary Fig. 4a–c). As a result of the  $\Delta$ NLS mutation, FUS would be expected to accumulate in the cytoplasm of PV neurons as previously shown in other cell types<sup>10,41,49</sup>. We thus performed double immunostaining for FUS and parvalbumin and determined the nuclear/cytoplasmic ratio selectively in PV neurons. As shown in Supplementary Fig. 4d, e, cytoplasmic FUS staining was increased in PV neurons of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> compared to *Fus*<sup>+/+</sup> mice. Intriguingly, FUS cytoplasmic staining increased with age in wild-type PV interneurons, but remained significantly lower than in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> neurons. Altogether, these results demonstrate the existence of defects in cortical *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> synapses, affecting inhibitory synapses more prominently, which could underlie the observed neuronal hyperexcitability (Fig. 3).

**Synaptic accumulation of FUS and its RNA targets in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> cortex.** To determine whether the observed phenotypes could be linked to a disrupted function of FUS at the synapse, we performed synaptosomal fractionation of the frontal cortex from 5-months-old *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Obtained fractions were enriched in the synaptophysin protein (Fig. 7a–c, and Source data for uncropped western blots) and depleted in the nuclear lncRNA *Malat* (Fig. 7d), consistent with synaptic enrichment. In synaptosomes of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, we observed an almost ten-fold increase in FUS content compared to wild-type synaptosomes, while the total or cytoplasmic FUS contents only increased 2–3 times (Fig. 7a–d). This increased FUS content was mostly due to mutant FUS synaptosomal accumulation, since it was not observed when using an antibody targeting the NLS of FUS (and thus not the mutant FUS  $\Delta$ NLS protein) (Fig. 7a–d). FUS is known to bind a number of mRNAs, including *Fus* mRNA itself, as well as mRNAs important for (inhibitory) synaptic function such as *Nrxn1* or *Gabra1*<sup>34</sup>. Consistently, we observed increased levels of these 3 mRNAs in synaptosomal fractions of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice (Fig. 7e). This enrichment was relatively selective as 3 mRNAs encoding genes from the Turquoise module showed distinct patterns of synaptosomal enrichment: *Gabrb1* and *Grid2*, but not *Ctnnd2*, mRNAs showed clear synaptosomal enrichment, but only *Gabrb1* mRNA showed slightly elevated levels in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> synaptosomes. Collectively, our data show that defects in synapses, which are more pronounced in inhibitory synapses, and are related to synaptic FUS accumulation, likely causing the increased spontaneous neuronal activity and subsequent widespread behavioral abnormalities in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.



**Discussion**

In this study, we show that knock-in mice with cytoplasmic accumulation of FUS display widespread behavioral alterations, beyond motor symptoms. We further determine that FUS mislocalization leads to increased spontaneous neuronal activity in

the cortex, indicative of neuronal hyperexcitability, that is associated with structural and ultrastructural alterations of inhibitory synapses. Last, we show that the FUS mutation alters FUS synaptic content and modifies synaptic levels of a subset of its RNA targets, possibly underlying the observed phenotypes. The



**Fig. 4 Structural and histological brain analysis of *Fus*<sup>+/+</sup> and *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.** **a** Representation of the workflow used to determine volumes of corresponding brain structures from MRI slices per each mouse by the custom-made Fiji macro plugin (upper row). **b** Representative MRI slice images of *Fus*<sup>+/+</sup> (upper row) and *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (lower row) male mice. **c–h** Bar graph showing intracranial volume (ICV) (**c**), normalized volume of the brain parenchyma (**d**), of lateral ventricles (**e**), cortex (**f**), medial septum (**g**), and cortical subplate (**h**) in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> vs *Fus*<sup>+/+</sup> mice. For panels **c–h**,  $N = 5$  for *Fus*<sup>+/+</sup> and  $N = 5$  for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Data are presented as mean ± SEM. Two-tailed Unpaired Student's *t*-test, **c**:  $p = 0.4838$ ; **d**:  $p = 0.0249$ ; **e**:  $p = 0.0249$ ; **f**:  $p = 0.9489$ ; **g**:  $p = 0.0151$ ; **h**:  $p = 0.0051$ . **i** Representative image of NeuN immunohistochemistry at 22 months of age in *Fus*<sup>+/+</sup> ( $N = 3$  mice) or *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> ( $N = 5$ ) male mice in the anterior region of the M1/M2 cerebral cortex. Scale bar: 100 μm. **j** Distribution of NeuN+ neurons in *Fus*<sup>+/+</sup> (black) or *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (orange) male mice, in anterior and posterior regions of the M1/M2 cerebral cortex.  $N = 3$  for *Fus*<sup>+/+</sup> and  $N = 5$  for *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Source data are provided as a Source Data file.

timelines of the different experimental studies are summarized in Supplementary Fig. 5.

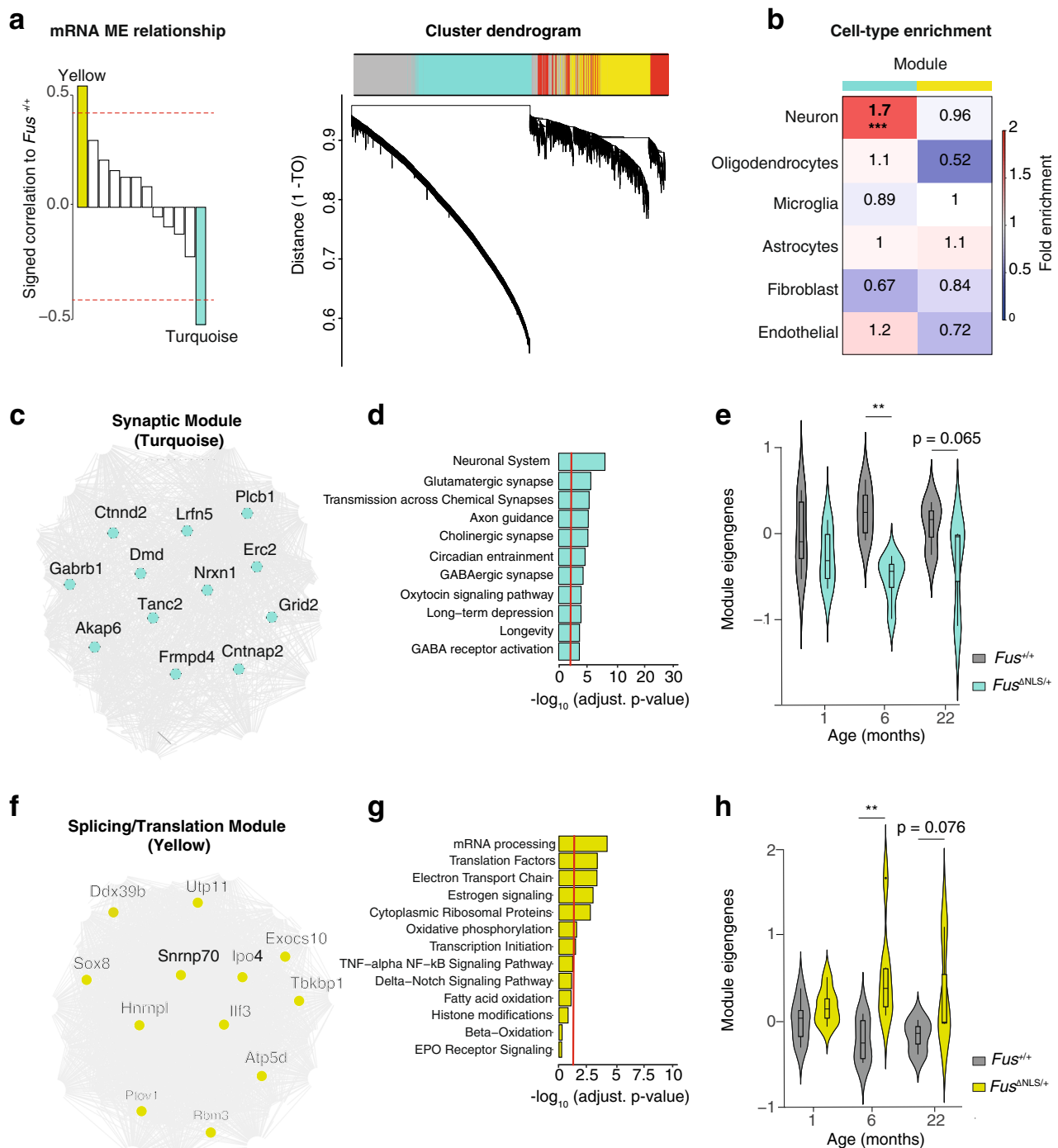
The notion that FUS mislocalization is a widespread pathological event in sporadic ALS, but also in many other neurological diseases, prompted us to investigate the behavioral phenotype of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. While motor defects can be detected as early as 6 months of age and motor neuron degeneration is not detected before 18–22 months of age, we observed an early spontaneous locomotor hyperactivity in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. In addition, we observed various defects in executive functions, including impaired remote long-term memory, and abnormal social interactions. Hyperactivity and social and executive dysfunctions have been previously documented in other mouse models of ALS/FTD. As such the transgenic overexpression of mutant FUS can e.g., cause hyperactivity and cognitive deficits<sup>64</sup>. Similar abnormalities are also observed in TDP-43 knock-in mice<sup>65</sup>, C9ORF72 BAC transgenic mice<sup>66</sup>, or Chmp2b transgenic mice<sup>67</sup>, suggesting that ALS mutations commonly lead to various behavioral alterations in mouse models, that are dominant over motor dysfunction. These phenotypes seen in mouse models nicely recapitulate widespread cognitive and executive dysfunction typical of ALS<sup>68,69</sup> and support the clinical overlap between ALS and FTD<sup>70</sup>.

The deficits in executive functions and social behavior that we observe in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice are particularly relevant for FTD. Increased ventricular volume<sup>71–73</sup> as well as atrophy of subcortical structures<sup>73,74</sup> were found in FTD patients and presymptomatic mutation carriers, strengthening the analogy to *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Pathology of FUS and other FET proteins (TAF15 and EWSR1) is a hallmark of a subset of FTD cases (FTD-FET cases). In FTD-FET cases, FUS pathology is associated with nuclear clearance of the FUS protein in neurons with FUS aggregates, although this nuclear clearance is not as pronounced as in cases with TDP-43 pathology<sup>40</sup>. Importantly, the FUS protein is accompanied by several other proteins in FTD-FET pathological aggregates, including TAF15 and EWSR1, two other FET proteins, as well as Transportin 1<sup>12,27–30</sup>. Thus, the disease in FTD-FET patients could be driven by several non-mutually exclusive mechanisms, including cytoplasmic accumulation and/or aggregation of FUS, nuclear clearance of FUS and/or aggregation of co-deposited pathological proteins. Previous studies indicate that complete loss of FUS could be sufficient to lead to FTD like symptoms in mice, and this was consistent with the role of FUS in controlling the splicing of mRNAs relevant to FTD, such as *MAPT*, encoding the TAU protein, or in the stability of mRNAs encoding relevant synaptic proteins such as GluA1 and SynGAP1<sup>35–39</sup>. In *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, there is, however, a limited loss of nuclear FUS immunoreactivity<sup>10,41</sup> and no obvious FUS aggregates, ruling out that these pathological events might play a major role in the observed behavioral alterations. The quasi-normal levels of FUS in the nucleus are explained by the existence of potent autoregulatory mechanisms, which are able to largely buffer the effect of the mutation on nuclear FUS levels. Mislocalization of either TAF15 or EWSR1 is also unable to account

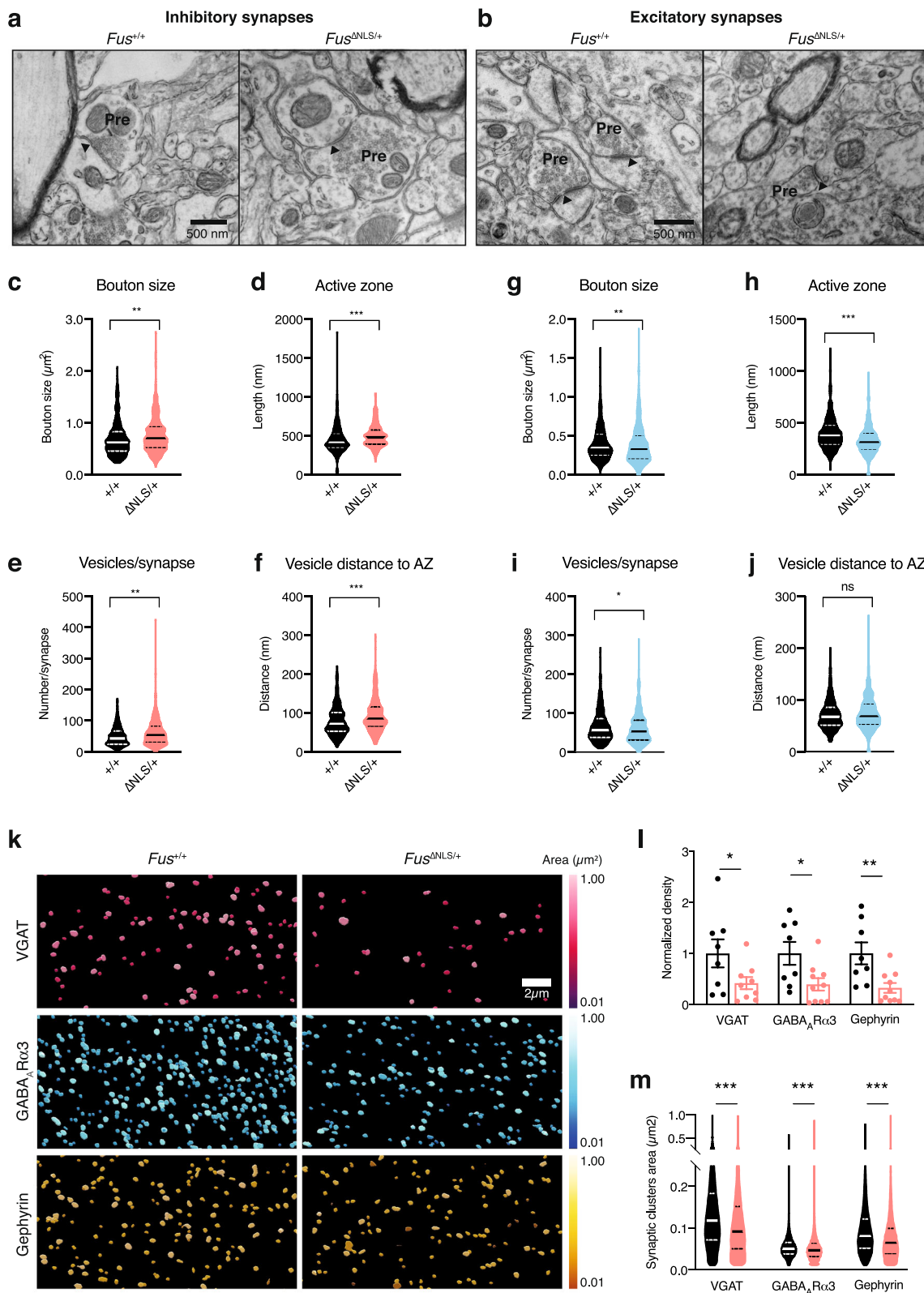
for behavioral abnormalities as both of these proteins show normal localization in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> neurons, as well as ALS-FUS patients<sup>30</sup>. Together, our results show that FUS mislocalization alone is sufficient to trigger behavioral symptoms and suggest that this might be a major driver of disease pathophysiology in FTD-FET patients. Importantly, our findings do not exclude that at later stages of disease progression, loss of nuclear FUS function might occur as a result of collapsed autoregulatory mechanisms, thereby exacerbating neurological symptoms.

A major finding of this study is that *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice develop morphological and ultrastructural synaptic defects. The combination of locomotor hyperactivity with social deficits, as observed in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, is commonly observed in various mouse models with synaptic defects. For instance, mouse models of autism spectrum disorders, such as mice lacking the ProSAP/Shank proteins<sup>75,76</sup>, display similar behavioral alterations. Our results point to a major defect in synapses, primarily affecting inhibitory synapses. This conclusion is supported by at least three main results: First, transcriptome analyses of the cerebral cortex show that genes related to synapses are affected. Second, the density of inhibitory synapses as well as the clusters size of three typical markers of inhibitory synapses (VGAT, GABA<sub>A</sub>Rα3, and Gephyrin) are decreased. Third, inhibitory synapses are ultrastructurally abnormal, with increased size, increased number of vesicles and increased distance between vesicles and the active zone, which could be compensatory to their decreased density. Excitatory synapses were also abnormal, but their defects were minor compared to inhibitory synapses. Our data suggest that both the pre- and postsynaptic compartment of inhibitory synapses are affected by the *Fus* mutation. Indeed, the decrease in the density of Gephyrin positive puncta could reflect a disorganization of the postsynaptic density<sup>77</sup>, potentially caused by decreased GABAR activity<sup>78–80</sup>. Decreased VGAT density, as well as increased bouton size or vesicle disorganization further suggest impairment of presynaptic GABAergic terminals. On its own, decreased VGAT density might reflect an overall reduction of inhibitory synapses throughout the cortical layers<sup>81</sup> and lead to impaired loading of GABA in the presynaptic vesicles<sup>60</sup>. Importantly, Sahadevan, Hembach and collaborators performed studies in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice at earlier ages and observed defects of inhibitory synapses, as early as 1 month of age, worsening at 6 months of age<sup>52</sup>. It is important to note that the disruption of inhibitory synapses can explain most of the detected behavioral and electrophysiological phenotypes observed in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Illustrating this, loss of *Gabra1*<sup>82</sup>, or of *Gabra3*<sup>83</sup> are sufficient to lead to locomotor hyperactivity and the FUS target *Nrxn1* (encoding a key factor in the formation of GABAergic and glutamatergic synapses<sup>84</sup>), is critical in regulating locomotor activity and social behavior in mice<sup>85,86</sup>. Indeed, the deletion of all three neurexins from PV neurons is causing a decrease in the number of synapses of this neuronal type<sup>87</sup>, in a manner similar to what is observed in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.

Our current results do not allow to determine whether a specific subpopulation of inhibitory neurons would be more



**Fig. 5 mRNA coexpression network analysis pinpoints defects in inhibitory and excitatory synapses in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.** **a** Signed association (Pearson correlation) of the mRNA MEs with transgenic condition. Modules with positive values indicate increased expression in transgenic mice; modules with negative values indicate decreased expression in transgenic mice. The red dotted lines indicate Bonferroni-corrected  $P < 0.05$  for multiple comparisons ( $n = 12$  modules,  $n = 16$  mice per group). **b** Cell-type enrichment of modules (average  $n = 200$  genes) using mouse genes in mRNA modules (Fisher's two-tailed exact test, \*\*\*FDR =  $2 \times 10^{-5}$ ). **c** Coexpression network plot of the synaptic (turquoise) module. The top 12 hub genes are indicated by name. **d** Gene ontology term enrichment of the synaptic module using 1791 synaptic module genes. **e** Trajectory of the synaptic module in the cortex of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice across time. Boxplot show median and quartile distributions, the upper and lower lines representing the 75th and 25th percentiles, respectively. Two-way ANOVA,  $F_{(1,24)} = 14.55$ ,  $p = 0.0008$ ;  $n = 4-6$  mice per group. **f** Coexpression network plot of the splicing/translation module. The top 12 hub genes are indicated by gene name. **g** GO term enrichment of the splicing/translation module using 1112 splicing/translation module genes. **h** Trajectory of the splicing/translation module in the cortex of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice across time. Boxplot show median and quartile distributions, the upper and lower lines representing the 75th and 25th percentiles, respectively. Two-way ANOVA,  $F_{(1,24)} = 11.92$ ,  $p = 0.002$ ;  $n = 4-6$  mice per group. The center line represents the median.



selectively affected in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. PV interneurons are, however, a strong candidate according to the results of our studies, but also their involvement in TDP-43 knock-in mice<sup>65</sup>, and in TDP-43 transgenic mice that display degeneration of hippocampal PV positive interneurons<sup>88</sup>. Functional impairment of PV interneurons might represent a unifying theme in ALS pathophysiology, as multiple electrophysiological studies demonstrate

hypoexcitability of PV neurons in SOD1 and TDP-43 transgenic mouse models of ALS<sup>89–92</sup>. Others, however, found PV interneurons to be unaltered presymptotically and to turn hyperexcitable during the symptomatic phase in the same SOD1<sup>G93A</sup> mouse model<sup>93</sup>. In either case, those changes in PV excitability were always accompanied by hyperexcitability of layer V pyramidal neurons<sup>89–91,93</sup>. These findings in mouse models nicely

**Fig. 6 Defects in synapses in 22-months-old *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.** **a, b** Representative image of transmission electron microscopy in *Fus*<sup>+/+</sup> or *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> layer II/III of the motor cortex at 22 months of age showing inhibitory synapses (**a**) (as containing  $\geq 1$  mitochondrion on each side of the synapse) and excitatory synapses (**b**). Pre: presynaptic compartment; active zone is shown with an arrowhead.  $N = 4$  *Fus*<sup>+/+</sup> mice (1 male and 3 females), and  $N = 4$  *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice (1 male and 3 females) have been analyzed. **c–f** Violin plot showing the distribution of bouton sizes (**c**), the length of active zones (**d**), the number of vesicles per synapse (**e**), and the distance of individual vesicles to the active zone (**f**) in inhibitory synapses of *Fus*<sup>+/+</sup> (black) or *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (orange) mice. For panels **c–f**,  $N = 379$  synapses from 1 male and 3 female *Fus*<sup>+/+</sup> mice and  $N = 387$  synapses from 1 male and 3 female *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were analyzed. Kolmogorov–Smirnov test. **c**:  $p = 0.0016$ ; **d**:  $p < 0.0001$ ; **e**:  $p = 0.0010$ ; **f**:  $p < 0.0001$ . **g–j** Violin plot showing the distribution of bouton size (**g**), the length of active zone (**h**), the number of vesicles per synapse (**i**), and the distance of individual vesicles to the active zone (**j**) in excitatory synapses of *Fus*<sup>+/+</sup> (black) or *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (cyan) mice. For panels **g–j**,  $N = 463$  synapses from 1 male and 3 female *Fus*<sup>+/+</sup> mice and  $N = 490$  synapses from 1 male and 3 female *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were analyzed. Kolmogorov–Smirnov test. **g**:  $p = 0.0038$ ; **h**:  $p < 0.0001$ ; **i**:  $p = 0.0362$ ; **j**:  $p = 0.2182$ . **k** Representative images of GABAAR $\alpha 3$ , Gephyrin and VGAT intensity in 22-months male mice, coded by area size (Imaris).  $N = 3$  *Fus*<sup>+/+</sup> mice and  $N = 4$  *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice have been analyzed. **l** Bar graphs representing the density analysis for VGAT, GABAAR $\alpha 3$ , and Gephyrin comparing *Fus*<sup>+/+</sup> vs *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. (*Fus*<sup>+/+</sup> vs *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup>, Mann–Whitney test, VGAT,  $p = 0.0464$ ; GABAAR $\alpha 3$ ,  $p = 0.0217$ ; Gephyrin,  $p = 0.0043$ ).  $N = 8$  FOVs from 3 *Fus*<sup>+/+</sup> mice and  $N = 9$  FOVs from 4 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were analyzed for VGAT;  $N = 8$  FOVs from 3 *Fus*<sup>+/+</sup> mice and  $N = 10$  FOVs from 4 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were analyzed for GABAAR $\alpha 3$  and Gephyrin. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Mann–Whitney, One tailed, VGAT:  $p = 0.0464$ ; GABAAR $\alpha 3$ :  $p = 0.0217$ ; Gephyrin:  $p = 0.0043$ . **m** Violin plot representing the analysis of the clusters size for VGAT, GABAAR $\alpha 3$ , and Gephyrin comparing *Fus*<sup>+/+</sup> vs *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice.  $N = 142,416$  synapses from 3 *Fus*<sup>+/+</sup> mice and  $N = 115,151$  synapses from 4 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were analyzed for VGAT;  $N = 202,302$  synapses from 3 *Fus*<sup>+/+</sup> mice and  $N = 99,464$  synapses from 4 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were analyzed for GABAAR $\alpha 3$ ;  $N = 169,036$  synapses from 3 *Fus*<sup>+/+</sup> mice and  $N = 68,422$  synapses from 4 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were analyzed for Gephyrin. Kolmogorov–Smirnov test. VGAT:  $p < 0.0001$ ; GABAAR $\alpha 3$ :  $p < 0.0001$ ; Gephyrin:  $p < 0.0001$ . Source data are provided as a Source Data file.

recapitulate human ALS pathology, in which cortical hyperexcitability is a frequent and, most importantly, early finding in familial and sporadic cases, including FUS mutation carriers<sup>16,94</sup>. In line with these findings, we also observed a pronounced increase in spontaneous neuronal activity in vivo, which is highly indicative of hyperexcitable pyramidal neurons. While we cannot rule out cell autonomous alterations affecting the intrinsic excitability of pyramidal neurons, our histological, ultrastructural, and transcriptomic data strongly argue for defective inhibitory neurotransmission by PV interneurons. In summary, our results, along with others, support the notion that dysfunction of cortical PV interneurons contribute to neural circuit defects in ALS and FTD. Importantly, while we observe molecular and structural defects in inhibitory neurons, we did not observe a loss of PV cell bodies in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice, suggesting that the major defect resembles a synaptopathy rather than frank neuronal loss, consistent with other studies<sup>51</sup>. Altogether, our results identify a role for FUS in regulating GABAergic synapse structure and function. Since other major classes of inhibitory interneurons<sup>95</sup> were not investigated, we cannot exclude that somatostatin positive (SST) or HTR3A expressing interneurons are also affected, although to a lesser extent than PV neurons. Furthermore, our work also shows that this *Fus* mutation alters glutamatergic synapses, as judged from both WGCNA analysis of RNAseq (Fig. 5) and electron microscopy (Fig. 7). This is consistent with results from Sahadevan, Hembach et al.<sup>52</sup> providing evidence that FUS is also critically involved in glutamatergic synaptogenesis, at least during development, and is in line with previous studies<sup>96</sup>. Further work is required to disentangle the causes and consequences of GABAergic and glutamatergic impairment, and their respective mechanisms.

How can mutant FUS regulate inhibitory synaptic structure? We observe that the loss of the FUS NLS leads to an increased level of the mutant protein in purified synaptosomes. These results are consistent with results from Sahadevan, Hembach et al., where the authors identified a number of FUS synaptic RNA targets, and a subset of these were also increased in synaptosomes of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice. Interestingly, in both studies, several FUS synaptic targets are not modified in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> synaptosomes, including some related to GABAergic neurons. Sahadevan, Hembach and collaborators further demonstrate that at least a subset of these FUS synaptic RNA targets show

increased stability in *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> neurons. It seems thus reasonable to hypothesize that accumulation of synaptic FUS compromises synaptic homeostasis through altered stability of key synaptic RNAs, either through direct binding, or indirectly. This does not exclude additional mechanisms of toxicity for synaptic FUS, in particular effects on local synaptic translation<sup>44,97</sup>, that could affect synaptic protein levels. Further work should focus on determining whether FUS might also regulate synaptic translation of specific proteins involved in inhibitory transmission, and whether rescuing synaptic defects in inhibitory neurons might translate into an efficient therapeutic strategy.

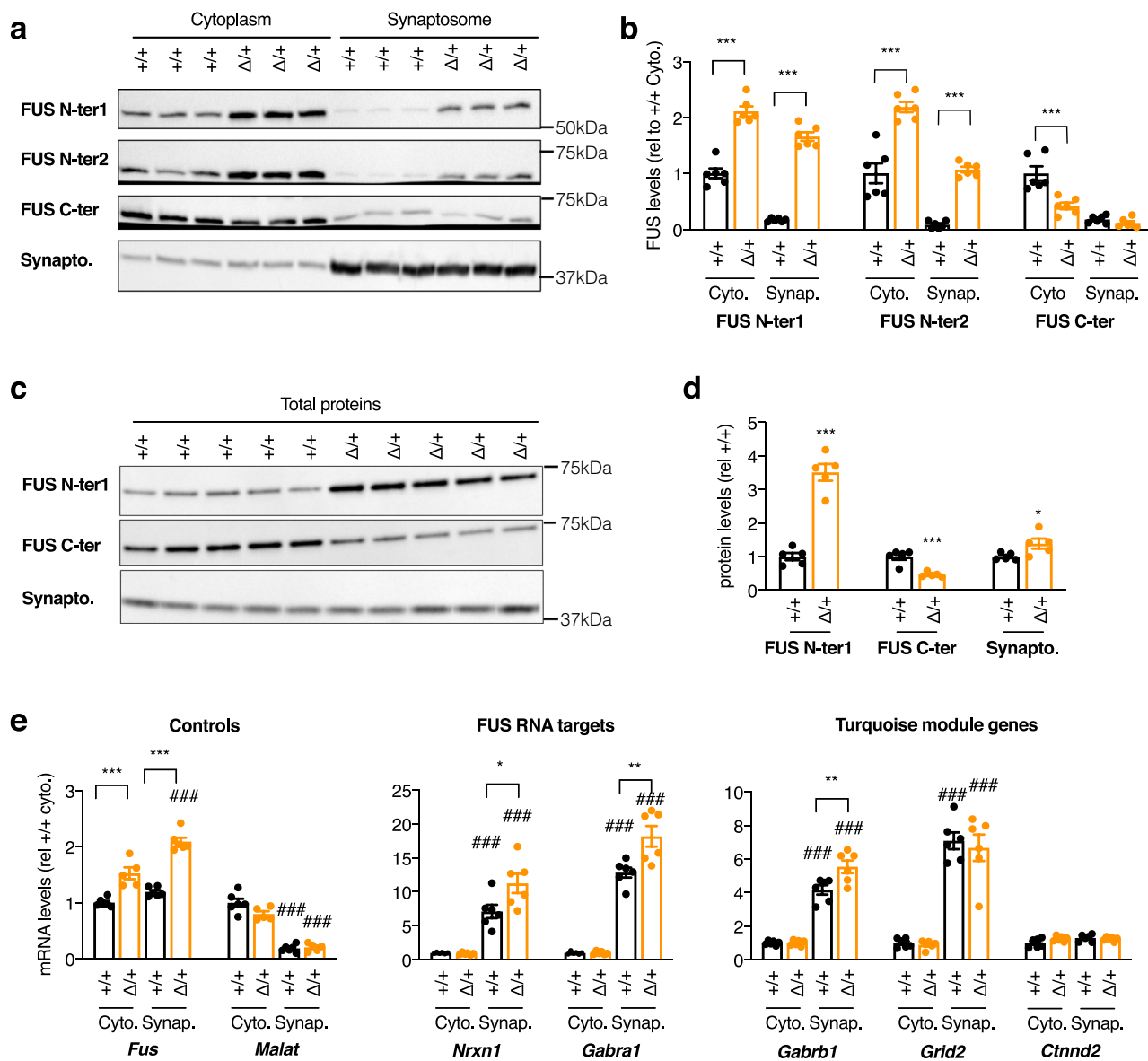
In summary, we show here that cytoplasmic accumulation of FUS leads to a major synaptopathy mainly in inhibitory neurons, that is accompanied by consistent behavioral and electrophysiological phenotypes. The identification of the mechanisms downstream of FUS' synaptic action might lead to efficient therapeutic strategies for FUS related neurodegenerative diseases.

## Methods

**Mouse models and behavioral analyses.** Wild-type (*Fus*<sup>+/+</sup>) and heterozygous (*Fus*<sup>ΔNLS/+</sup>) mice on a pure genetic background (C57BL/6J), have been described previously<sup>10</sup>, were bred and housed in the central animal facility of the Faculty of medicine of Strasbourg, with a regular 12-h light and dark cycle (light on at 7:00 am) under constant conditions (21  $\pm$  1 °C; 60% humidity). Standard laboratory rodent food and water were available ad libitum throughout all experiments. Mice were genotyped by PCR of genomic DNA from tail biopsies using oligonucleotide primers (sequence provided in Supplementary Data 2)<sup>10</sup>. Mouse experiments were performed in compliance with all relevant ethical regulations for animal testing and researcher. All experiments were approved by local ethical committee from Strasbourg University (CREMEAS) under reference number AL/27/34/02/13 (behavior), by the Government of upper Bavaria (license number Az 55.2-1-54-2532-11-2016, two-photon microscopy) and by „Regierungspräsidium Tübingen“ (animal license number 1431, MRI). Behavioral tests were done during the light phase (between 9 am and 5 pm) of their light/dark cycle except for indicated experiments. Until the mice reached the age when the behavioral tests were performed mice were group-housed. Once mice were single housed for the behavioral task they were kept individually for only a period necessary to finalize the set of behavioral experiments and in order to minimize possible negative effects of isolation, afterwards cohorts were sacrificed and processed for downstream analyses. Male mice of 4, 10, and 22 months of age were subjected to behavioral studies and data were analyzed blind to genotypes. The sex of the animals studied is indicated in each figure legend.

**Spontaneous locomotor activity in the home cage–actimetry.** Home cage activity was assessed according to previously published protocols<sup>98</sup>. Mice were placed individually in large transparent Makrolon cages (42  $\times$  26  $\times$  15 cm) adapted to the shelves of the testing device (eight cages/shelf). Two infrared light beams, passing through each cage, were targeted on two photocells, 2.5 cm above the cage floor





**Fig. 7 FUS accumulates in synaptosomes of *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice and alters synaptosomal levels of a subset of its targets.** **a, b** Representative western blot images (**a**) and respective quantifications (**b**) of cytoplasmic (**a**, left) or synaptosome (**a**, right) extracts from *Fus*<sup>+/+</sup> (+/+) or *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (Δ/+) mice (4 months of age,) using two antibodies recognizing the N-terminal part of the FUS protein (FUS N-ter1 and FUS N-ter2), the C-terminal part of FUS (encoding the NLS, FUS C-ter) or synaptophysin protein to show enrichment in synaptic proteins in the synaptosome fraction. *N* = 6 *Fus*<sup>+/+</sup> mice and *N* = 6 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were analyzed. Data are presented as mean ± SEM. One-Way ANOVA with Tukey post-hoc test. \*\*\**p* < 0.0001 Please note that the FUS western blots were run on independent gels, to avoid stripping and reprobing on the same membrane for the same protein. Each of these gels were controlled for equal loading using StainFree markers, that are provided in the source data. **c, d** Representative western blot images (**c**) and respective quantifications (**d**) of total extracts (**c**) from *Fus*<sup>+/+</sup> (+/+) or *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (Δ/+) mice (4 months of age,) using the same antibodies as in panel **a**. *N* = 5 *Fus*<sup>+/+</sup> mice and *N* = 5 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were analyzed. Data are presented as mean ± SEM. Two-tailed Unpaired Student's *t*-test. N-ter1: *p* < 0.0001; C-ter: *p*-value: *p* = 0.0006; Synaptophysin: *p* = 0.0411. **e** mRNA levels of the indicated genes in RNAs extracted from cytoplasmic (Cyto.) or synaptosome (Synap.) extracts from *Fus*<sup>+/+</sup> (+/+) or *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> (Δ/+) frontal cortex from 4-months-old female mice as assessed using RT-qPCR. *N* = 6 *Fus*<sup>+/+</sup> mice and *N* = 5 *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice were analyzed. Data are presented as mean ± SEM. Genes are grouped by categories (controls, established FUS RNA targets, and genes belonging to the Turquoise module). All quantifications are presented relative to the +/+ cytoplasmic RNA levels set to 1. One-way ANOVA with Tukey post-hoc test. *Fus*: \*\*\**p* < 0.0001 vs corresponding wild-type fraction; ###*p* < 0.0001 vs corresponding cytoplasmic fraction of the same genotype. *Malat*: ###*p* = 0.0001 vs corresponding cytoplasmic fraction of the same genotype. *Nrxn1* \**p* = 0.0140 vs corresponding wild-type fraction; ###*p* < 0.0001 vs corresponding cytoplasmic fraction of the same genotype. *Gabra1*: \*\**p* = 0.0012 vs corresponding wild-type fraction; ###*p* < 0.0001 vs corresponding cytoplasmic fraction of the same genotype. *Gabrb1*: \*\**p* = 0.0029 vs corresponding wild-type fraction; ###*p* < 0.0001 vs corresponding cytoplasmic fraction of the same genotype. *Grid2*: ###*p* < 0.0001 vs corresponding cytoplasmic fraction of the same genotype. *Ctnnd2*: no significant differences observed (*p* > 0.05). Source data are provided as a Source Data file.



level and 28 cm apart. The number of cage crossing was recorded automatically and was used to determine or score the spontaneous locomotor activity. The experiment began at 17.00 pm and after 2 h of habituation continued for 3 consecutive days for a complete 24 h nictemeral cycle (12 h dark and 12 h light).

**Open field.** The general exploratory locomotion and anxiety in a novel environment were tested during 15 min long sessions in the open field arena (72 × 72 × 36 cm) located in a test room and lit by a 600 lux for background lighting, according to published protocol<sup>99</sup>. The open maze was divided by lines into sixteen squares (18 × 18 cm). Each mouse was placed in the center of the arena and allowed to freely move while being video recorded. The recorded data were analyzed offline with EthoVision XT software system (Noldus Information Technology). The time spent in the center (four central quadrants) vs. the perimeter (12 peripheral quadrants) was used to measure anxiety, while the total distance traversed in the arena and average moving speed (mean velocity) was used to evaluate locomotor activity. For each mouse a movement heat map and trajectory tracking map that are representing a corresponding locomotor activity were made independently.

**Dark/light box test.** The light/dark box apparatus consisted of two Poly-Vinyl-Chloride (PVC) compartments of equal size (18.5 × 18.5 × 15 cm) one opaque and the other transparent, connected through an opaque tunnel (5 × 5.5 × 5 cm). The illumination of the transparent compartment was set at 400 lux. Each mouse was placed alone in the dark compartment and the mouse's behavior was recorded during 5 min with a video camcorder located ~150 cm above the center of the box. Test was conducted during the morning. The latency before the first transition into the light compartment, the number of transitions between the two compartments and the time spent in each compartment were tested to assess for anxiety level and exploratory behavior, as published previously<sup>99</sup>.

**Olfactory preference test.** This test is designed to identify specific detection deficiencies and/or odor preference, namely the ability to sense attractive or aversive scents. After 30 min of habituation to empty cage with no bedding, each mouse was challenged with a filter paper embedded with two strong scents (vanilla and 2-methyl butyrate) or a neutral scent (water) was video recorded over 3 min. A 1-h pause in between the exposure to different scents was applied to each mouse using a procedure adapted from previously reported protocols<sup>97,100</sup>. The time the mouse spent sniffing the filter paper—the exploration time, is calculated post-hoc by an examiner blind to mouse genotype and condition. Those scents with the exploration time greater than water were designated as “attractive” while those with times less than water were termed “aversive”.

**Social interaction in the home cage (resident-intruder test).** Social interaction was assessed in the home cage by a standard protocol<sup>67,101</sup>. Briefly, both resident and intruder mice were isolated and housed individually for 1 week before the task. After 30 min of habituation to the test room resident mouse was allowed to freely roam in his home cage without the cage top for 1 min. A novel male intruder mouse (nonlittermate of same background, same age, and similar weight) was then introduced in the opposite corner as the resident and allowed to interact for 5 min while videotaped. The total physical interaction, defined as the time during which the resident mouse actively explores the intruder was analyzed post-hoc. Only social activities, such as time spent investigating, grooming, following, sniffing etc. were quantified separately for each minute and for the whole time of the task and were differentiated from nonsocial/aggressive activities such as attacks, bites, and tail rattles.

**Three-chamber social task.** Specific social behaviors such as sociability and social recognition were analyzed by using three-chamber social task. The experimental procedure is adapted from Gascon E et al.<sup>67</sup>. The three-chamber box (59 × 39.5 × 21.5 cm) is made of transparent Plexiglas (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) and is divided into three chambers (one middle and two side chambers) of equal size (18.5 × 39.5 cm) by the walls with a square opening (7 × 7 cm) that could be closed by a slide door. Each of the two side chambers contains a mobile wire cylinder shaped cage (20 × 10 cm diameter) that is made of transparent Plexiglas bars placed 6 mm apart. Cage is closed by the upper and lower lids.

Mice of both genotypes (*Fus*<sup>+/+</sup> and *Fus*<sup>ANLS/+</sup>) that were experimentally tested are referred to as the test mice and adult male unfamiliar mice of same background, age and weight used as the social stimulus are called novel mice. All mice were housed individually for 1 week before the test and were habituated to the testing room for at least 1 h before the start of behavioral tasks. One day prior to the testing, the novel mice were habituated to mobile wire cage for 5 min. The keeping of the novel mouse separated in a wire cage prevents aggressive and sexual activities, and in the same time ensures that any social interaction is initiated by the test mouse. Sessions were videotaped and visually analyzed post-hoc. The experimental procedure was carried out in four trials of 5 min each. After each trial, the mouse was returned to his home cage for 15 min. Trials were grouped into two consecutive parts.

Trial 1 (habituation): the test mouse was placed in the middle chamber and left to freely explore each of the three chambers: the empty middle or two sides' arenas containing the empty wire cages for 5 min.

Trials 2–4 (sociability, social recognition, social learning acquisition): the mouse was placed in the middle chamber, but an unfamiliar mouse (novel mouse) was placed into a wire cage in one of the side chambers (the wire cage in the other side-chamber remains empty). The test mouse had free access to all three chambers. The position of novel mouse and empty wired cage were alternated between trials. We quantified the time spent actively exploring a novel mouse or an empty cage by the test mouse as a social interaction time or an object exploration time, respectively. The longer time that test mouse spends in the close perimeter around the cage containing the novel mouse while actively interacting with it (staring, sniffing) compared to the empty cage—object, indicates social preference or social recognition as a result of the capability to differentiate a conspecific from an object. The motivation of the test mouse to spontaneously interact with novel mouse is considered as sociability which gradually decreased over trials as a result of social learning acquisition.

**Water maze task.** The water maze consisted of a circular pool (diameter 160 cm; height 60 cm) filled with water (21 ± 1 °C) made opaque by addition of a powdered milk (about 1.5 g/L). The habituation day consisted in one 4-trial session using a visible platform (diameter 11 cm, painted black, protruding 1 cm above the water surface and located in the South-East quadrant of the pool), starting randomly from each of the four cardinal points at the edge of the pool. During this habituation trial, a blue curtain surrounded the pool to prevent the use of distal cues and thus incidental encoding of spatial information. For the following days, the curtain was removed. Mice were given a 5-day training period (4 consecutive trials/day, maximum duration of a trial 60 seconds, inter-trial interval = 10–15 seconds) with a hidden platform located at a fixed position in the North-West quadrant. Animals were starting randomly from each of the four cardinal points at the edge of the pool and the sequence of the start points was randomized over days. Mice were tested for retention in a 18-days delay probe trial and two extinction tests: the first 2 h after probe trial and the second 2 h after the first. For the probe trial, the platform was removed; the mice were introduced in the pool from the North-East (a starting point never used during acquisition) and allowed a 60-seconds swimming time to explore the pool. Data were collected and computed by a video-tracking system (SMART; AnyMaze software). For the visible platform and training trials following parameters were used: the distance traveled and the latency time before reaching the platform and the average swimming speed. For the probe trial and extinction tests the time (in seconds) spent in the target quadrant (i.e., where the platform was located during acquisition) was analyzed<sup>102</sup>.

### Assessing neuronal activity by in vivo two-photon imaging

**Cranial window implantation and virus injection.** Mice of both sexes were implanted with a cranial window at 3 and 9 months of age (±10 days), respectively and received a stereotaxic injection of the genetically encoded calcium indicator (AAV2/1.hsyn.GCaMP6m.WPRE.SV40 diluted 1:6 in saline—10-month-old cohort or AAV9.syn.jGCaMP7s.WPRE diluted 1:6 in saline—4-month-old cohort (pGP-AAV-syn-jGCaMP7s-WPRE was a gift from Douglas Kim & GENIE Project, Addgene viral prep # 104487-AAV9; RRID:Addgene\_104487)<sup>103</sup> into the primary motor cortex (M1)<sup>104</sup>. In brief, mice were first anesthetized with Fentanyl (0.05 mg/kg), Midazolam (5.0 mg/kg), and Metomidin (0.5 mg/kg). A circular craniotomy with a 2 mm radius, centered at 1.7 mm lateral and 0.8 mm anterior to bregma, was performed, followed by the slow injection of a total of ~1 µl of the calcium indicator into three sites (~300 nl per site at 600 µm cortical depth). A 4 mm round glass coverslip (Warner Instruments) was placed over the cortex and sealed with UV-curable dental acrylic (Venus Diamond Flow, Heraeus Kulzer GmbH). A metal head bar was attached to the skull using dental acrylic (Paladur, Heraeus Kulzer GmbH), allowing for stable positioning during two-photon imaging.

**Two-photon imaging in anesthetized mice.** Four weeks following the cranial window implantation, in vivo two-photon imaging was performed within cortical layer II/III using a two-photon microscope (Hyperscope, Scientifica, equipped with an 8 kHz resonant scanner) at a frame rate of 30 Hz and a resolution of 512 × 512 pixels. Using a ×16 water-immersion objective (Nikon), stacks consisting of 15,000 frames (equivalent to ~8 min) were acquired, covering a field of view (FOV) of 300 × 300 µm. Light source was a Ti:Sapphire laser with a DeepSee pre-chirp unit (Spectra Physics MaiTai eHP)<sup>104</sup>. GCaMP was excited at 910 nm, with a laser power not exceeding 40 mW (typically 10–40 mW). In each mouse, two to five FOVs at cortical depths of 140–310 µm were imaged, yielding 2264 cells in *Fus*<sup>+/+</sup> (*n* = 25 experiments, 8 mice) and 1107 cells in *Fus*<sup>ANLS/+</sup> (*n* = 13 experiments, 3 mice) at 4 months of age; and 631 cells in *Fus*<sup>+/+</sup> (*n* = 10 experiments, 5 mice) and 855 cells in *Fus*<sup>ANLS/+</sup> (*n* = 14 experiments, 6 mice) at 10 months of age. During imaging, mice were anesthetized with 1.0–1.5 volume % isoflurane in pure O<sub>2</sub> at a flow rate of ~0.5 l/min, to maintain a respiratory rate in the range of 110–130 breaths per minute. Body temperature was maintained at 37 degrees using a physiological monitoring system (Harvard Apparatus).

**Image processing and data analysis.** All image analyses were performed in Matlab (Math Works) using custom-written routines<sup>104</sup>. In brief, full frame images were corrected for potential x and y brain displacement, and regions of interests (ROIs) were semi-automatically selected based on the maximum and mean projections of all frames. Fluorescence signals of all pixels within a selected ROI were averaged,

the intensity traces were low pass filtered at 10 Hz. Contamination from neuropil signals was accounted for using the following Eq. (1)<sup>104</sup>,

$$F_{\text{ROI,comp}} = F_{\text{ROI}} - 0.7 \times F_{\text{neuropil}} + 0.7 \times \text{median}(F_{\text{neuropil}}) \quad (1)$$

$F_{\text{ROI,comp}}$  stands for neuropil-compensated fluorescence of the ROI,  $F_{\text{ROI}}$ , and  $F_{\text{neuropil}}$  represent the initial fluorescence signal of the ROI and the signal from the neuropil, respectively. A neuron was defined as 'active' if it displayed at least one prominent calcium transient over 20 frames (corresponding to ~0.7 seconds). The overall difference in the fraction of active cells between 4- and 10-month-old mice could be due to both age as well as the more sensitive calcium indicator GCaMP7s<sup>105</sup>. To compare the impact of the indicator alone, we also investigated a control 4 m age cohort expressing GCaMP6m, in which case the fraction of active cells was 81% and not different from the average observed in the *Fus*<sup>+/+</sup> control cohort used here (ranksum test,  $p = 0.87$ , 7 experiments in 3 mice).

**Histological techniques.** Male mice were anesthetized with intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine chlorhydrate (Imalgène 1000®, Merial) and 5 mg/kg xylazine (Rompun 2%®, Bayer), and then transcardially perfused with cold PFA 4% in 0.01 M phosphate buffered saline (PBS). After dissection, brains were post-fixed for 24 h and then included in agar 4% and serial cuts of 40 µm thick were made using vibratome (Leica Biosystems, S2000).

**Peroxidase immunohistochemistry.** For peroxidase immunohistochemistry, sections were incubated 10 min with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, rinsed with PBS 1× and incubated with blocking solution (8% Horse serum, 0.3% Bovine Serum Albumin, 0.3% Triton, PBS-0.02% Thimerosal). Sections were rinsed, and then incubated with anti-mouse NeuN or anti-mouse parvalbumin (Millipore, MAB377, 1:100 and Sigma, P3088, 1:1000, respectively) overnight at room temperature. The second day, sections were rinsed and incubated for 2 h at room temperature with biotinylated donkey anti-mouse antibody (Jackson, 715-067-003, 1:500). After sections were rinsed, they were incubated for 1 h in horseradish peroxidase ABC kit (Vectastain ABC kit, PK-6100, Vector Laboratories Inc.), rinsed and incubated with DAB (Sigma, D5905). The enzymatic reaction was stopped by adding PBS 1X, rinsed with water and sections were mounted with DPX mounting medium (Sigma, O6522).

**Quantification.** Images were quantified using a homemade ImageJ plugin. A Region Of Interest (ROI) was first defined by the user as the M1/M2 regions of the cerebral cortex as defined by the Paxinos Atlas<sup>106</sup> using the following coordinates: interaural 4.06 mm; Bregma 0.26 mm. For NeuN immunohistochemistry, a second, more anterior region of M1/M2 cortex was also quantified with the following coordinates: Interaural: 5.74 mm, Bregma: 1.94 mm.

In this region, a semi-automated segmentation led to the identification of the labelled structures (cells or nuclei). Finally, the plugin subdivided the previous ROI into 10 subregions and measured either the number of objects per subregion or the proportion of each subregion that is covered by labelled structures.

**Immunofluorescence.** Sections were rinsed with PBS 1X then incubated with blocking solution (8% Goat serum, 0.3% Bovine Serum Albumin, 0.3% Triton, PBS-0.02% Thimerosal) overnight at 4 °C in primary antibody: rabbit anti-FUS antibody (ProteinTech, 11570-1-AP, 1:100) and mouse anti-parvalbumin antibody (Sigma, P3088, 1:1000). After three rinses in PBS, sections were incubated for 2 h at room temperature with Hoechst (Sigma, B2261, 1/50.000) and secondary antibody: Goat anti-mouse Alexa-488 secondary antibody (Invitrogen, A11034, 1:500) and goat anti-mouse Alexa-647 secondary antibody (Invitrogen, A21245, 1:500). Finally sections were subsequently washed with PBS (3 × 10 min) and mounted in Aqua/polyount (Polysciences, 18606).

Images were acquired along the Z axis (Z stacking) using a Zeiss AxioImage.M2 microscope equipped with a Plan-Apochromat ×20/0.8 objective, high performance B/W camera (Orca Flash4, Hamamatsu) and run by the Zeiss Zen2 software. Images were quantified using the ImageJ freeware. First, the user defined ROIs corresponding to the cytoplasm and nucleus or several PV positive cells at several Z positions. Then a homemade macro was used to calculate the ratio, in the green channel, of the cytoplasm intensity divided by the nucleus one.

**Electron microscopy.** Mice from both sexes were used for electron microscopy. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine chlorhydrate and 5 mg/kg xylazine and transcardially perfused with glutaraldehyde (2.5% in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.4). Brains were dissected and immersed in the same fixative overnight. After three rinses in Cacodylate buffer (EMS, 11650), serial cuts of 80 µm thick were made with vibratome. Slides were then post-fixed in 1% osmium in Cacodylate buffer 1 h at room temperature. Finally, tissues were dehydrated in graded ethanol series and embedded in Embed 812 (EMS, 13940). The ultrathin sections (50 nm) were cut with an ultramicrotome (Leica, EM UC7), counterstained with uranyl acetate (1% (w/v) in 50% ethanol) and observed with a Hitachi 7500 transmission electron microscope (Hitachi High Technologies Corporation, Tokyo, Japan) equipped with an AMT Hamamatsu digital camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). Analysis of electron micrographs was performed as follows: 100 inhibitory synapses located in layers II/III were imaged per animal. Inhibitory synapses were identified as containing at least

one mitochondrion in each synaptic bouton. Synapses morphometry was analyzed using ImageJ freeware (National Institute of Health), where each synaptic boutons' area was manually drawn as previously described<sup>107</sup>. An automated plugin was used to drawn and measure the active zones' length, the number of synaptic vesicles within each bouton and the distance of each vesicle to the active zone, being as the beeline from the vesicle to the active zone. All images were acquired in layer II/III of the M1/M2 regions of the cerebral cortex as defined by the Paxinos Atlas<sup>106</sup> using the following coordinates: interaural 4.06 mm; Bregma 0.26 mm.

**Synaptic density in brain sections.** Male mice were anesthetized by CO<sub>2</sub> inhalation before perfusion with PBS containing 4% paraformaldehyde and 4% sucrose. Brains were harvested and post-fixed overnight in the same fixative and then stored at 4 °C in PBS containing 30% sucrose. Sixty micrometers thick coronal sections were cut on a cryostat and processed for free-floating immunofluorescence staining. Brain sections were incubated with the indicated primary antibodies (Rabbit GABA<sub>A</sub>α3 antibody Synaptic Systems, 1:500; Mouse Gephyrin antibody Synaptic Systems, 1:500, Guinea pig VGAT antibody, Synaptic Systems, 1/500) for 48 h at 4 °C followed by secondary antibodies (1:1000) for 24 h at 4 °C. The antibodies were diluted in 1× Tris Buffer Saline solution containing 10% donkey serum, 3% BSA, and 0.25% Triton-X100. Sections were then mounted on slides with Prolong Diamond (Life Technologies) before confocal microscopy.

Confocal images were acquired on a Leica SP8 Falcon microscope using ×63 (NA 1.4) with a zoom power of 3. Images were acquired at a 2048 × 2048 pixel image resolution, yielding a pixel size of 30.05 nm. To quantify the density of synaptic markers, images were acquired in the molecular layer 1/2 of the primary motor cortex area, using the same parameters for all genotypes. Images were acquired from top to bottom with a Z step size of 500 nm. Images were deconvoluted using Huygens Professional software (Scientific Volume Imaging). Images were then analyzed as described<sup>108</sup>. Briefly, stacks were analyzed using the built-in particle analysis function in Fiji<sup>109</sup>. The size of the particles was defined according to previously published studies<sup>77,110</sup>. To assess the number of clusters, images were thresholded (same threshold per marker and experiment), and a binary mask was generated. A low size threshold of 0.01 µm diameter and high pass threshold of 1 µm diameter were applied. Top and bottom stacks were removed from the analysis to only keep the 40 middle stacks. For the analysis, the number of clusters per 40 z stacks was summed and normalized by the volume imaged (75153.8 µm<sup>3</sup>). The density was normalized to the control group.

**Structural MRI scans.** Male mice were used for MRI studies. All data were acquired on a dedicated small bore animal scanner (Biospec 117/16, Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a cryogenically cooled two-element surface (MRI CryoProbe™, Bruker BioSpec, Ettlingen, Germany) transmit/receive coil. Anatomical brain images were acquired in coronal slice orientation (30 slices) applying a gradient-echo (FLASH) sequence with acquisition parameters as: TE/TR 2.95/400 ms (TE = echo time, TR = repetition time), matrix 30 × 340 × 340, resolution 250 × 50 × 50 mm<sup>3</sup>).

Anatomical annotation of brain MRI images was performed in Fiji<sup>58</sup> using custom-written routines. In brief, in order to generate a plate corresponding to a single MRI cross section (Figure 4a1) a macro was run to reslice a stack of sagittal plates pursued via the Scalable Brain Atlas<sup>111</sup> according to a manually defined tilting angle by means of the Dynamic Reslice Fiji plugin (Figure 4a2). Custom-made plates were then registered onto the corresponding MRI slice by the manual denotation of the major, easily recognizable anatomical landmarks with the Big Warp plugin (Figure 4a3). The thresholding of the warped RGB plates (Figure 4a4) according to the brain structure color code resulted in parcellation of the MRI cross section into single regions. Due to the marked ventriculomegaly, for lateral ventricles and medial septum only, a loss of resolution in the custom plates was noticeable upon warping, therefore these areas along with the entire brain cross section (in order to include olfactory bulbs and cerebellum for the overall intracranial volume) were manually delineated. Finally, region volumes were determined following Cavalieri's principle, i.e., the measurement of the scaled cumulative area was multiplied by the slice increment (Figure 4a5). The volumetric analysis was blinded and evaluated by the same investigator. Code used for volumetric quantification of MRI scans is provided in Supplementary Software.

**RNAseq.** RNAseq on frontal cortex was performed as previously described<sup>10,41</sup>. Briefly, RNA from cortex of 22-months-old male *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> mice and their control littermates were extracted with TRIzol (Invitrogen). RNA quality was measured using the Agilent Bioanalyzer system or RNA screenTape (Agilent technologies) according to the manufacturer's recommendations. Samples were processed using the Illumina TruSeq single Stranded mRNA Sample Preparation Kit according to manufacturer's protocol. Generated cDNA libraries were sequenced using an Illumina HiSeq 2000 sequencer with 4–5 biological replicates sequenced per condition using single read, 50 cycle runs. RNA from the cortex of 5-months-old male *Fus*<sup>ΔNLS/+</sup> and control littermate mice was extracted, and libraries were generated using the Illumina TruSeq single Stranded mRNA Sample Preparation Kit. The cDNA libraries were sequenced on a HiSeq 4000 with three biological replicates per condition using single-end 50 bp read. Total reads sequenced varies from 35 to 45 million reads. Complete QC report will be made publicly available.

Raw reads were mapped to the mouse reference genome GRCm38 with STAR version 2.7.0<sup>112</sup> and default parameters using Ensembl gene annotations (version 87). Gene-level abundance estimates were estimated using the option-quantMode geneCount in STAR. We filtered the lowly expressed genes wherein each gene was required to have at least 15 counts across all samples and used both exonic and intronic reads. The filtered set of genes was used for the PCA plot and differential expression analysis. Differential gene expression analysis was performed with the ARMOR workflow<sup>113</sup> and a cut off FDR value of 0.05 was set in both datasets. RNA samples sequenced in the present study from 5–6-months-old mice ( $n = 10$ ) were pooled to the samples from Sahadevan et al., 2020, ( $n = 6$ ).

**Weighted-gene coexpression network analysis.** Coexpression network analysis was performed using a user-friendly R WGCNA library<sup>114</sup>. We wanted to investigate mouse brain coexpression networks that are disease specific in *Fus*<sup>ANLS/+</sup> mice. Biweighted midcorrelations were calculated for all pairs of genes, and then a signed similarity matrix was created. In the signed network, the similarity between genes reflects the sign of the correlation of their expression profiles. The signed similarity matrix was then raised to the power  $\beta$  to emphasize strong correlations and reduce the emphasis of weak correlations on an exponential scale. The resulting adjacency matrix was then transformed into a topological overlap matrix as describe<sup>115</sup>. After scaling the network (consensus scaling quantile = 0.2), a threshold power of 5 was chosen (because it was the smallest threshold that resulted in a scale-free  $R^2$  fit of 0.9) and the consensus network was created by calculating the component-wise minimum values for topological overlap. Using  $1 - \text{TOM}$  (dissTOM) as the distance measure, genes were hierarchically clustered. Initial module assignments were determined using the blockwiseModules function as follows: blockwiseModules(datExpr, power = 5, TOMType = "signed", minModuleSize = 30, networkType = "signed", deepSplit = 2, reassignThreshold = 0, mergeCutHeight = 0.35, numericLabels = TRUE, pamRespectsDendro = FALSE, saveTOMs = TRUE, verbose = 3). The resulting modules or groups of coexpressed genes were used to calculate the MEs or the first principal component of the module. MEs were correlated with different biological and technical traits like transgenic condition and batch to find disease-specific modules. Module hubs were defined by calculating module membership (kME) values, which are the Pearson correlations between each gene and each ME. Genes with a  $kME < 0.7$  were removed from the module. Network visualization was done with the igraph package in R. Module definitions from the network analysis were used to create synthetic eigengenes for the 1-month, 6 months and 22-months timepoint and were used to understand the trajectory of various modules across timepoints.

**Enrichment analyses using single-cell experiment data.** To reduce false positives, we used FDR-adjusted  $P$ -values for multiple hypergeometric test comparisons. For cell-type enrichment analysis, we used an already published single-cell mouse brain dataset<sup>116</sup>. Finally, genes in network modules were characterized using EnrichR (version 1.2.5)<sup>117</sup>.

**Synaptosomal enrichment followed by RT-qPCR and western blotting.** Frontal cortex was removed from the brains of 4-months-old female mice by micro-dissection, as previously described<sup>118</sup>, harvested, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use. Synaptosomal fraction was isolated using Syn-PER Synaptic Protein Extraction kit (Thermo Scientific, 87793) according to manufacturer's instructions.

On synaptosomal preparations, RNA was extracted using TRIzol reagent (Sigma-Aldrich, 93289). 1  $\mu\text{g}$  of RNA was reverse transcribed using iScript Ready-to-use cDNA supermix (Bio-Rad, 1708841). Quantitative PCR (qPCR) was performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 172574) and quantified with Bio-Rad CFX Manager software. Gene expression was normalized by computing a normalization factor by Genorm software using three standard genes *Pol2*, *Tbp*, and *Actn* for nervous tissue. Primer sequences are provided in Supplementary Data 2.

For western blotting cytosolic and synaptosomal fractions were prepared using the same protocol, and protein concentration was quantitated using the BCA protein assay kit (Pierce). Fifteen micrograms of proteins were loaded into a gradient 4–20% SDS-PAGE gel (Bio-Rad, 5678094) and transferred on a 0.45  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membrane (Bio-Rad) using a semi-dry Transblot Turbo system (Bio-Rad). Membranes were saturated with 10% nonfat milk in PBS and then probed with the following primary antibodies: Anti-Synaptophysin (Abcam, ab14692, 1:1000), Anti-FUS N-ter1 (ProteinTech, 11570, 1:1000), Anti-FUS N-ter2 (Bethyl, A300-293A, 1:2000), and Anti-FUS C-ter (Bethyl, A300-294A, 1:2000) all diluted in 3% nonfat milk in PBS. Blots were washed and incubated with anti-Rabbit secondary antibody conjugated with HRP (P.A.R.I.S, BI2407, 1:5000) for 2 hours. Membranes were washed several times and analyzed with chemiluminescence using ECL Lumina Forte (Millipore, WBLU0500) using the Chemidoc XRS Imager (Bio-Rad). Total proteins were detected with a stain-free gel capacity and normalized. Uncropped western blot images and stain-free images are provided in supplementary figures.

**Statistics.** If not stated otherwise, data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8

(GraphPad, CA). Unpaired  $t$ -test was used for comparison between two groups, one-way or two-way analysis of the variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test and two-way repeated measures (RM) ANOVA, followed by Sidak multiple comparison post-hoc test were applied for three or more groups. Distributions were compared using the Kolmogorov–Smirnov (KS) test. Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

Source data are provided with this paper as supplementary information. The RNAseq datasets that support the findings of this study have been deposited in GEO with the accession codes GSE166615. Source data are provided with this paper.

## Code availability

The code used for MRI analysis is provided as supplementary files.

Received: 25 May 2020; Accepted: 13 April 2021;

Published online: 21 May 2021

## References

- Taylor, J. P., Brown, R. H. Jr. & Cleveland, D. W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* **539**, 197–206 (2016).
- Brown, R. H. Jr. & Al-Chalabi, A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **377**, 162–172 (2017).
- van Es, M. A. et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **390**, 2084–2098 (2017).
- Dormann, D. & Haass, C. TDP-43 and FUS: a nuclear affair. *Trends Neurosci.* **34**, 339–348 (2011).
- Dormann, D. & Haass, C. Fused in sarcoma (FUS): an oncogene goes awry in neurodegeneration. *Mol. Cell Neurosci.* **56**, 475–486 (2013).
- Kwiatkowski, T. J. Jr et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**, 1205–1208 (2009).
- Vance, C. et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* **323**, 1208–1211 (2009).
- Waibel, S., Neumann, M., Rabe, M., Meyer, T. & Ludolph, A. C. Novel missense and truncating mutations in FUS/TLS in familial ALS. *Neurology* **75**, 815–817 (2010).
- Waibel, S. et al. Truncating mutations in FUS/TLS give rise to a more aggressive ALS-phenotype than missense mutations: a clinico-genetic study in Germany. *Eur. J. Neurol.* **20**, 540–546 (2013).
- Scelkic-Zahirovic, J. et al. Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J.* **35**, 1077–1097 (2016).
- Dormann, D. et al. ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J.* **29**, 2841–2857 (2010).
- Dormann, D. et al. Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS. *EMBO J.* **31**, 4258–4275 (2012).
- Huey, E. D. et al. FUS and TDP43 genetic variability in FTD and CBS. *Neurobiol. Aging* **33**, 1016 e9–1016 17 (2012).
- Van Langenhove, T. et al. Genetic contribution of FUS to frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* **74**, 366–371 (2010).
- Broustal, O. et al. FUS mutations in frontotemporal lobar degeneration with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Alzheimers Dis.* **22**, 765–769 (2010).
- Blair, I. P. et al. FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **81**, 639–645 (2010).
- Flies, C. M. & Veldink, J. H. Chorea is a pleiotropic clinical feature of mutated fused-in-sarcoma in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **21**, 309–311 (2020).
- Yamashita, S. et al. Sporadic juvenile amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant FUS/TLS: possible association of mental retardation with this mutation. *J. Neurol.* **259**, 1039–1044 (2012).
- Yan, J. et al. Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology* **75**, 807–814 (2010).
- Merner, N. D. et al. Exome sequencing identifies FUS mutations as a cause of essential tremor. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 313–319 (2012).
- Tyzack, G. E. et al. Widespread FUS mislocalization is a molecular hallmark of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **142**, 2572–2580 (2019).



22. Deng, H. X. et al. FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **67**, 739–748 (2010).
23. Ikenaka, K. et al. Characteristic features of FUS inclusions in spinal motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **79**, 370–377 (2020).
24. Snowden, J. S. et al. The most common type of FTL-D-FUS (aFTLD-U) is associated with a distinct clinical form of frontotemporal dementia but is not related to mutations in the FUS gene. *Acta Neuropathol.* **122**, 99–110 (2011).
25. Seelaar, H. et al. Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *J. Neurol.* **257**, 747–753 (2010).
26. Josephs, K. A. et al. Caudate atrophy on MRI is a characteristic feature of FTL-D-FUS. *Eur. J. Neurol.* **17**, 969–975 (2010).
27. Suarez-Calvet, M. et al. Monomethylated and unmethylated FUS exhibit increased binding to Transportin and distinguish FTL-D-FUS from ALS-FUS. *Acta Neuropathol.* **131**, 587–604 (2016).
28. Urwin, H. et al. FUS pathology defines the majority of tau- and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol.* **120**, 33–41 (2010).
29. Mackenzie, I. R. et al. Pathological heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations: two distinct patterns correlating with disease severity and mutation. *Acta Neuropathol.* **122**, 87–98 (2011).
30. Neumann, M. et al. FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTL-D with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations. *Brain* **134**, 2595–2609 (2011).
31. Doi, H., Koyano, S., Suzuki, Y., Nukina, N. & Kuroiwa, Y. The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases. *Neurosci. Res.* **66**, 131–133 (2010).
32. Mori, S. et al. Expanded polyglutamine impairs normal nuclear distribution of fused in sarcoma and poly (rC)-binding protein 1 in Huntington's disease. *Neuropathology* **39**, 358–367 (2019).
33. Rogelj, B. et al. Widespread binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain. *Sci. Rep.* **2**, 603 (2012).
34. Lagier-Tourenne, C. et al. Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat. Neurosci.* **15**, 1488–1497 (2012).
35. Kino, Y. et al. FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* **3**, 24 (2015).
36. Orozco, D. et al. Loss of fused in sarcoma (FUS) promotes pathological Tau splicing. *EMBO Rep.* **13**, 759–764 (2012).
37. Ishigaki, S. et al. Altered Tau isoform ratio caused by loss of FUS and SFPQ function leads to FTL-D-like phenotypes. *Cell Rep.* **18**, 1118–1131 (2017).
38. Yokoi, S. et al. 3'UTR length-dependent control of SynGAP isoform alpha2 mRNA by FUS and ELAV-like proteins promotes dendritic spine maturation and cognitive function. *Cell Rep.* **20**, 3071–3084 (2017).
39. Ishigaki, S. & Sobue, G. Importance of functional loss of FUS in FTL-D/ALS. *Front. Mol. Biosci.* **5**, 44 (2018).
40. Neumann, M. & Mackenzie, I. R. A. Review: Neuropathology of non-tau frontotemporal lobar degeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **45**, 19–40 (2019).
41. Scekic-Zahirovic, J. et al. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **133**, 887–906 (2017).
42. Sun, S. et al. ALS-causative mutations in FUS/TLS confer gain- and loss-of-function by altered association with SMN and U1-snRNP. *Nat. Commun.* **6**, 6171 (2015).
43. Sun, S. et al. ALS-causative mutations in FUS/TLS confer gain and loss of function by altered association with SMN and U1-snRNP. *Nat. Commun.* **6**, 6171 (2015).
44. Lopez-Erauskin, J. et al. ALS/FTD-linked mutation in FUS suppresses intra-axonal protein synthesis and drives disease without nuclear loss-of-function of FUS. *Neuron* **100**, 816–830 e7 (2018).
45. Ling, S. C. et al. Overriding FUS autoregulation in mice triggers gain-of-toxic dysfunctions in RNA metabolism and autophagy-lysosome axis. *elife* **8**, e40811 (2019).
46. Devoy, A. et al. Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in 'FUSDelta14' knockin mice. *Brain* **140**, 2797–2805 (2017).
47. So, E. et al. Mitochondrial abnormalities and disruption of the neuromuscular junction precede the clinical phenotype and motor neuron loss in hFUSWT transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 463–474 (2018).
48. Schoen, M. et al. Super-resolution microscopy reveals presynaptic localization of the ALS/FTD related protein FUS in hippocampal neurons. *Front. Cell Neurosci.* **9**, 496 (2015).
49. Picchiarrelli, G. et al. FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* **22**, 1793–1805 (2019).
50. Deshpande, D. et al. Synaptic FUS localization during motoneuron development and its accumulation in human ALS synapses. *Front. Cell Neurosci.* **13**, 256 (2019).
51. Sephton, C. F. et al. Activity-dependent FUS dysregulation disrupts synaptic homeostasis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E4769–E4778 (2014).
52. Sahadevan, S. et al. Synaptic FUS accumulation triggers early misregulation of synaptic RNAs in a mouse model of ALS. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23188-8>. (2021).
53. Frankland, P. W. & Bontempi, B. The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 119–130 (2005).
54. Neary, D., Snowden, J. & Mann, D. Frontotemporal dementia. *Lancet Neurol.* **4**, 771–780 (2005).
55. Bang, J., Spina, S. & Miller, B. L. Frontotemporal dementia. *Lancet* **386**, 1672–1682 (2015).
56. Piguet, O., Hornberger, M., Mioshi, E. & Hodges, J. R. Behavioural-variant frontotemporal dementia: diagnosis, clinical staging, and management. *Lancet Neurol.* **10**, 162–172 (2011).
57. Roberson, E. D. Mouse models of frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* **72**, 837–849 (2012).
58. Schindelin, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
59. Zhang, Y., Parmigiani, G. & Johnson, W. E. ComBat-seq: batch effect adjustment for RNA-seq count data. *NAR Genom. Bioinform.* **2**, lqaa078 (2020).
60. Wojcik, S. M. et al. A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron* **50**, 575–587 (2006).
61. Fritschy, J. M. & Mohler, H. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J. Comp. Neurol.* **359**, 154–194 (1995).
62. Choi, G. & Ko, J. Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. *Exp. Mol. Med.* **47**, e158 (2015).
63. Kubota, Y., Karube, F., Nomura, M. & Kawaguchi, Y. The diversity of cortical inhibitory synapses. *Front. Neural Circuits* **10**, 27 (2016).
64. Shiihashi, G. et al. Dendritic homeostasis disruption in a novel frontotemporal dementia mouse model expressing cytoplasmic fused in sarcoma. *EBioMedicine* **24**, 102–115 (2017).
65. White, M. A. et al. TDP-43 gains function due to perturbed autoregulation in a Tardbp knock-in mouse model of ALS-FTD. *Nat. Neurosci.* **21**, 552–563 (2018).
66. Jiang, J. et al. Gain of toxicity from ALS/FTD-linked repeat expansions in C9ORF72 is alleviated by antisense oligonucleotides targeting GGGGCC-containing RNAs. *Neuron* **90**, 535–550 (2016).
67. Gascon, E. et al. Alterations in microRNA-124 and AMPA receptors contribute to social behavioral deficits in frontotemporal dementia. *Nat. Med.* **20**, 1444–1451 (2014).
68. Goldstein, L. H. & Abrahams, S. Changes in cognition and behaviour in amyotrophic lateral sclerosis: nature of impairment and implications for assessment. *Lancet Neurol.* **12**, 368–380 (2013).
69. Beeldman, E. et al. The cognitive profile of behavioural variant FTD and its similarities with ALS: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **89**, 995–1002 (2018).
70. Ling, S. C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* **79**, 416–438 (2013).
71. Tavares, T. P. et al. Ventricular volume expansion in presymptomatic genetic frontotemporal dementia. *Neurology* **93**, e1699–e1706 (2019).
72. Knopman, D. S. et al. Brain and ventricular volumetric changes in frontotemporal lobar degeneration over 1 year. *Neurology* **72**, 1843–1849 (2009).
73. Manera, A. L., Dadar, M., Collins, D. L., Ducharme, S. & Frontotemporal Lobar Degeneration Neuroimaging Initiative. Deformation based morphometry study of longitudinal MRI changes in behavioral variant frontotemporal dementia. *Neuroimage Clin.* **24**, 102079 (2019).
74. Convery, R. S. et al. Basal forebrain atrophy in frontotemporal dementia. *Neuroimage Clin.* **26**, 102210 (2020).
75. Schmeisser, M. J. et al. Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature* **486**, 256–260 (2012).
76. Peixoto, R. T., Wang, W., Croney, D. M., Kozorovitskiy, Y. & Sabatini, B. L. Early hyperactivity and precocious maturation of corticostriatal circuits in Shank3B(-/-) mice. *Nat. Neurosci.* **19**, 716–724 (2016).
77. Craig, A. M., Banker, G., Chang, W., McGrath, M. E. & Serpinsky, A. S. Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **16**, 3166–3177 (1996).
78. Dejanovic, B. et al. Palmitoylation of gephyrin controls receptor clustering and plasticity of GABAergic synapses. *PLoS Biol.* **12**, e1001908 (2014).
79. Tretter, V. et al. Molecular basis of the gamma-aminobutyric acid A receptor alpha3 subunit interaction with the clustering protein gephyrin. *J. Biol. Chem.* **286**, 37702–37711 (2011).

80. Mukherjee, J. et al. The residence time of GABA(A)Rs at inhibitory synapses is determined by direct binding of the receptor alpha1 subunit to gephyrin. *J. Neurosci.* **31**, 14677–14687 (2011).
81. Lin, T. W. et al. Regulation of synapse development by Vgat deletion from ErbB4-positive interneurons. *J. Neurosci.* **38**, 2533–2550 (2018).
82. Borghese, C. M. et al. An isoflurane- and alcohol-insensitive mutant GABA(A) receptor alpha(1) subunit with near-normal apparent affinity for GABA: characterization in heterologous systems and production of knockin mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 208–218 (2006).
83. Yee, B. K. et al. A schizophrenia-related sensorimotor deficit links alpha 3-containing GABAA receptors to a dopamine hyperfunction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 17154–17159 (2005).
84. Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S. X., Linhoff, M. W. & Craig, A. M. Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* **119**, 1013–1026 (2004).
85. Grayton, H. M., Missler, M., Collier, D. A. & Fernandes, C. Altered social behaviours in neurexin alpha knockout mice resemble core symptoms in neurodevelopmental disorders. *PLoS ONE* **8**, e67114 (2013).
86. Sudhof, T. C. Synaptic neurexin complexes: a molecular code for the logic of neural circuits. *Cell* **171**, 745–769 (2017).
87. Chen, L. Y., Jiang, M., Zhang, B., Gokce, O. & Sudhof, T. C. Conditional deletion of all neurexins defines diversity of essential synaptic organizer functions for neurexins. *Neuron* **94**, 611–625 e4 (2017).
88. Tsuiji, H. et al. TDP-43 accelerates age-dependent degeneration of interneurons. *Sci. Rep.* **7**, 14972 (2017).
89. Khademullah, C. S. et al. Cortical interneuron-mediated inhibition delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **143**, 800–810 (2020).
90. Zhang, W. et al. Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nat. Neurosci.* **19**, 557–559 (2016).
91. Clark, R. M., Brizuela, M., Blizzard, C. A. & Dickson, T. C. Reduced excitability and increased neurite complexity of cortical interneurons in a familial mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell Neurosci.* **12**, 328 (2018).
92. Gunes, Z. I., Kan, V. W. Y., Ye, X. & Liebscher, S. Exciting complexity: the role of motor circuit elements in ALS pathophysiology. *Front. Neurosci.* **14**, 573 (2020).
93. Kim, J. et al. Changes in the excitability of neocortical neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis are not specific to corticospinal neurons and are modulated by advancing disease. *J. Neurosci.* **37**, 9037–9053 (2017).
94. Geevasinga, N., Menon, P., Ozdinler, P. H., Kiernan, M. C. & Vucic, S. Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 651–661 (2016).
95. Lim, L., Mi, D., Llorca, A. & Marin, O. Development and functional diversification of cortical interneurons. *Neuron* **100**, 294–313 (2018).
96. Udagawa, T. et al. FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat. Commun.* **6**, 7098 (2015).
97. Yasuda, K. et al. The RNA-binding protein Fus directs translation of localized mRNAs in APC-RNP granules. *J. Cell Biol.* **203**, 737–746 (2013).
98. Moreau, P. H., Cosquer, B., Jeltsch, H., Cassel, J. C. & Mathis, C. Neuroanatomical and behavioral effects of a novel version of the cholinergic immunotoxin mu p75-saporin in mice. *Hippocampus* **18**, 610–622 (2008).
99. Gould, T. D. *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (Humana Press, 2009).
100. Witt, R. M., Galligan, M. M., Despinoy, J. R. & Segal, R. Olfactory behavioral testing in the adult mouse. *J. Vis. Exp.* **23**, 949 (2009).
101. Winslow, J. T. Mouse social recognition and preference. *Curr. Protoc. Neurosci.* **10.1002/0471142301.ns0816s22** (2003).
102. Cholvin, T. et al. Dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex each contribute to the retrieval of a recent spatial memory in rats. *Brain Struct. Funct.* **221**, 91–102 (2016).
103. Chen, T. W. et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**, 295–300 (2013).
104. Liebscher, S., Keller, G. B., Goltstein, P. M., Bonhoeffer, T. & Hubener, M. Selective persistence of sensorimotor mismatch signals in visual cortex of behaving Alzheimer's disease mice. *Curr. Biol.* **26**, 956–964 (2016).
105. Dana, H. et al. High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. *Nat. Methods* **16**, 649–657 (2019).
106. Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press/Elsevier, 2001).
107. Dorgans, K. et al. Short-term plasticity at cerebellar granule cell to molecular layer interneuron synapses expands information processing. *elife* **8**, e41586 (2019).
108. De Rossi, P. et al. Aberrant accrual of BIN1 near Alzheimer's disease amyloid deposits in transgenic models. *Brain Pathol.* **29**, 485–501 (2019).
109. Rueden, C. T. et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* **18**, 529 (2017).
110. Specht, C. G. et al. Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: counting gephyrin molecules and receptor binding sites. *Neuron* **79**, 308–321 (2013).
111. Bakker, R., Tiesinga, P. & Kotter, R. The Scalable Brain Atlas: instant web-based access to public brain atlases and related content. *Neuroinformatics* **13**, 353–366 (2015).
112. Dobin, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
113. Orjuela, S., Huang, R., Hembach, K. M., Robinson, M. D. & Soneson, C. ARMOR: An Automated Reproducible MODular Workflow for Preprocessing and Differential Analysis of RNA-seq Data. *G3 (Bethesda)* **9**, 2089–2096 (2019).
114. Langfelder, P. & Horvath, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* **9**, 559 (2008).
115. Li, A. & Horvath, S. Network neighborhood analysis with the multi-node topological overlap measure. *Bioinformatics* **23**, 222–231 (2007).
116. Ximerakis, M. et al. Single-cell transcriptomic profiling of the aging mouse brain. *Nat. Neurosci.* **22**, 1696–1708 (2019).
117. Kuleshov, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90–W97 (2016).
118. Spijker, S. in *Neuroproteomics* (ed. Li, K. W.) 23–26 (Humana Press, 2011).

## Acknowledgements

We thank the Imaging Platform of the CRBS (PIC-STRA UMS 38, Inserm, Unistra) and the Plateforme Imagerie In Vitro de Strasbourg for their help in performing imaging for this study. This work was funded by Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE92-0031 to A.L.B. and L.D., ANR-16-CE16-0015 to L.D., ANR-19-CE17-0016 to L.D.), by Fondation pour la recherche médicale (FRM, DEQ2018039179), Axa Research Funds (rare diseases award 2019, to L.D.), Fondation Thierry Latran (HypnotALS, to L.D. and F.R. and TRIALS to F.R.), Radala Foundation (F.R.), MNDA (Dupuis/Apr16/852-791 to L.D.), ALSA (2235, 3209, and 8075 to L.D. and C.L.T.), Target ALS (to C.L.T.), NINDS/NIH R01-NS108769 (to C.L.T.), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy within the framework of the Munich Cluster for Systems Neurology—EXC 2145 SyNergy—ID 390857198 (S.L.), under individual grants no. 431995586, 443642953, 446067541 (F.R.) and under the Sonderforschungsbereich (SFB) 1149/2 (251293561 to F.R.), Emmy Noether Programme (S.L.), the Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (S.L.), and the Graduate School for Systemic Neurosciences GSN-LMU (V.K.). C.L.T. is the recipient of the Araminta Broch-Healey Endowed Chair in ALS. The collaborative work between L.D. and M.P. laboratories was funded by ARSLA (2016). I.S.R. was funded by the Région Grand Est (France).

## Author contributions

J.S.Z. and I.S.R. performed behavioral analysis with help of R.C., L.T., and G.P. I.S.R. and J.S.Z. performed histology, imaging, and electron microscopy with help of P.D.R., M.J., P.K., V.D., and S.D.G. V.K. performed in vivo calcium imaging. S.M. performed RNAseq analysis, with the help of S.S., K.M.H., N.M., C.L.T., and M.P. D.W. performed and analyzed MRI with the help of J.S.Z., H.P.M., S.A., J.K., V.R., A.L., and F.R. S.D. performed synaptosomal extractions, western blotting and RT-qPCR with the help of I.S.R. and G.P. A.L., A.L.B., F.R., M.P., C.L.T., S.L., and L.D. secured funding. M.P., C.L.T., S.L., and L.D. designed and coordinated experiments. J.S.Z., I.S.R., S.L., and L.D. wrote the manuscript.

## Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23187-9>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to S.L. or L.D.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks Abraham Acevedo-Aroza, Sami Barmada and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

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



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

© The Author(s) 2021

## Rôle des oligodendrocytes dans le continuum Sclérose Latérale Amyotrophique-Démence Frontotemporale lié à la protéine FUS

### Résumé

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) et la Démence Frontotemporale (DFT) sont deux maladies incurables entraînant une perte progressive des neurones et la dégradation rapide de l'état du patient. Elles forment un continuum histologique et clinique caractérisé par des altérations motrices et comportementales. La délocalisation cytoplasmique de la protéine FUS est l'une des caractéristiques de ce continuum, et est notamment observée dans les oligodendrocytes, un type cellulaire affecté dans la SLA-DFT. Cependant, la manière dont FUS affecte les oligodendrocytes et dont ces derniers contribuent aux phénotypes SLA-DFT liés à FUS n'est pas claire. Dans cette étude, nous montrons que la mutation FUS oligodendrocytaire entraîne des altérations de la myéline en affectant l'expression de la protéine MBP, et est suffisante pour provoquer l'apparition d'un phénotype comportementale de type DFT, qui se manifeste différemment chez les mâles et les femelles.

**Mots-clés : Sclérose Latérale Amyotrophique, Démence Frontotemporale, FUS, oligodendrocytes, myéline, MBP**

### Summary

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Dementia (FTD) are two incurable diseases resulting in progressive neuronal loss and rapid deterioration of the patient's condition. They form a histological and clinical continuum characterized by motor and behavioral alterations. Cytoplasmic delocalization of the FUS protein is one of the hallmarks of this continuum, and is notably observed in oligodendrocytes, a cell type affected in ALS-FTD. However, how FUS affects oligodendrocytes and how oligodendrocytes contribute to FUS-related ALS-FTD phenotypes is unclear. In this study, we show that the oligodendroglial FUS mutation leads to myelin alterations by affecting MBP protein expression, and is sufficient to cause a FTD-like behavioral phenotype in a sex-dependant manner.

**Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis, Frontotemporal Dementia, FUS, oligodendrocytes, myelin, MBP**