

**Contribution de l'Activité Muscarinique des Cellules de Schwann Périssynaptiques  
dans la Vulnérabilité Différentielle des Jonctions Neuromusculaires dans la Sclérose  
Latérale Amyotrophique**

par  
Marine Angéline Bord

Département de Neurosciences,  
Faculté de Médecine,  
Université de Montréal

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade  
M. Sc en Neurosciences

Juin 2024

© Marine Bord, 2024

*Ce mémoire intitulé*

**Contribution de l'Activité Muscarinique des Cellules de Schwann Périssynaptiques  
dans la Vulnérabilité Différentielle des Jonctions Neuromusculaires dans la Sclérose  
Latérale Amyotrophique**

*Présenté par*

**Marine Angéline Bord**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Kessen Patten**

Président-rapporteur

**Richard Robitaille**

Directeur de recherche

**Ciaran Murphy Royal**

Membre du jury

## Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative qui affecte spécifiquement les motoneurons (MNs) supérieurs et inférieurs conduisant à une paralysie musculaire. La dénervation des jonction neuromusculaires (JNMs) se produit en amont de la mort des MNs de la moelle épinière chez les patients atteints de la SLA et dans de nombreux modèles murins de la maladie. Récemment, des chercheurs ont révélé une altération de la transmission synaptique, une instabilité morphologique, et une réparation inappropriée des JNMs dans le modèle de souris *SOD1* en amont de l'apparition des désordres moteurs. Tandis que notre laboratoire a étudié les trois éléments synaptiques, ce mémoire porte une attention particulière aux cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs), les cellules gliales à la JNM, considérant leurs rôles fondamentaux dans la régulation de la structure et la fonction de la JNM. Alors que de nombreuses études ont démontré une susceptibilité à la dénervation dépendante du type d'unité motrice, où certaines seraient plus vulnérables au processus de dénervation que d'autres, les propriétés altérées des CSPs ont été généralisées à tous les types de JNMs étudiés. Notamment, des études réalisées dans le laboratoire ont rapporté une capacité inappropriée des CSPs à décoder l'information basée sur une augmentation de l'activation des récepteurs muscariniques (mAChRs). Les fonctions des mAChRs des CSPs sont d'une importance particulière puisque leur activité est essentielle à la stabilité des JNMs et à leur réparation et est régulée par l'activité synaptique. De manière importante, nous avons observé que la diminution chronique *in vivo* de l'activation des mAChRs des CSPs chez les souris *SOD1<sup>G37R</sup>* favorise la réparation de la JNM et améliore les fonctions motrices chez l'animal. Ainsi, la moindre altération dans les propriétés des CSPs pourrait contribuer directement à la vulnérabilité des NMJs dans la SLA. Considérant le rôle crucial des cellules gliales dans la maintenance et la réparation des JNMs, nous avons émis l'hypothèse que les CSPs contribuent à la différence de vulnérabilité observée dans la SLA. Nous avons postulé que l'hyperactivité muscarinique des CSPs contribue à l'instabilité des JNMs vulnérables, alors qu'une activité muscarinique normale contribue à la stabilité des JNMs résistantes.

Pour mieux comprendre les différences dans les propriétés des CSPs contribuant à cette différence de vulnérabilité, nous avons étudié les propriétés fonctionnelles des CSPs par imagerie calcique afin de caractériser la signature muscarinique des CSPs aux JNMs d'un muscle vulnérable, l'*extensor digitorum longus* (EDL). Nous avons évalué l'intégrité des JNMs par un triple marquage immunohistochimique. De manière intéressante, nos résultats ont montré que l'utilisation d'un outil chémogénétique nous a permis d'augmenter l'excitabilité des AChRs des CSPs aux JNMs résistantes des MEOs. L'évaluation de l'intégrité des JNMs par un triple marquage immunohistochimique a montré que le traitement au CNO induit de l'instabilité au niveau des JNMs et nous avons observé des signes de dénervation. Établir un potentiel rôle des CSPs dans la résistance des JNMs a permis de souligner un nouveau facteur important dans la pathophysiologie de la SLA et a fourni des connaissances dans les mécanismes de résistance sélective/vulnérabilité à la dénervation. Cela permet d'ouvrir le champ à de nouvelles cibles thérapeutiques ciblant les cellules gliales à la JNM. De plus, ce nouveau contexte conceptuel de susceptibilité des JNMs peut être transposé à d'autres maladies neuromusculaires.

**Mots clés :** Sclérose latérale amyotrophique, Jonction neuromusculaire, Cellules de Schwann pérисynaptiques, Muscles extraoculaires, Stratégies virales.



## Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal late-onset neurodegenerative disease characterized by progressive loss of upper and lower motor neurons (MNs) leading to muscular paralysis. Denervation of the neuromuscular junction (NMJ) is an early pathological event that occurs before the loss of spinal cord MNs in ALS patients and various murine models of the disease. Recently, authors revealed an alteration of synaptic transmission, morphological instability, and inappropriate repair in NMJs of *SOD1* mice model prior to motor impairments. While our laboratory studied all three synaptic elements, we put a particular attention to Perisynaptic Schwann cells (PSC), glial cells at the NMJ, owing to their fundamental roles in regulating NMJ structure and function. While numerous studies demonstrated a motor-unit type dependent susceptibility to denervation where some motor units (MUs) would be more vulnerable than others, altered PSC properties were generalized among all types of NMJ studied. Notably, studies performed in the laboratory reported an inappropriate PSC decoding capability based on an enhanced activation of mAChRs. PSC mAChR functions is of particular importance since it is essential for the management of NMJ stability and repair and is regulated by synaptic activity. Importantly, we observed that chronic *in vivo* dampening of PSC muscarinic activation in *SOD1<sup>G37R</sup>* fostered NMJ repair and improved motor function in the ALS mouse model. Hence, any alteration of PSC properties may directly contribute to NMJ vulnerability in ALS. Owing to the critical roles of glial cells for the maintenance and repair of NMJs, we hypothesized that PSC contribute to the differential vulnerability observed in ALS. We proposed that the hyperactive muscarinic excitation of PSCs contributes to NMJ instability at vulnerable NMJs while the normal muscarinic activity contributes to their stability in resistant ones.

To better understand the distinctions in PSCs properties contributing to a difference in NMJ vulnerability, we studied the PSC functional properties by calcium imaging to characterize the muscarinic signature of PSCs at the NMJ of a vulnerable muscle, the *extensor digitorum longus* (EDL). We assessed the integrity of the NMJ by a triple immunostaining. Interestingly, our data revealed that altering PSC properties at resistant NMJs by enhancing the muscarinic excitation of PSCs using a viral strategy created NMJ

instability with signs of denervation. Determining the potential role of PSC in the resistance of NMJs highlighted a novel important factor underlying the pathophysiology of ALS and provided significant insights into the mechanisms of selective resistance/vulnerability to denervation. This could pave the way to novel therapeutic targets and strategies targeting glial cells at the NMJ. Furthermore, this novel conceptual context may be carried over to NMJ susceptibility for other neuromuscular diseases.

**Key words:** Amyotrophic lateral sclerosis; Neuromuscular junction; Perisynaptic Schwann cells; Extraocular muscle; Viral strategies.

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	12
Liste des sigles et abréviations .....	14
Remerciements.....	16
<b>Chapitre 1 - Introduction générale.....</b>	<b>17</b>
Préambule.....	17
1.1 La Sclérose Latérale Amyotrophique.....	19
1.1.1 Historique, étymologie et description générale.....	19
1.1.2 Symptomatologie et progression.....	20
1.1.2.1 Forme bulbaire.....	20
1.1.2.2 Forme spinale.....	21
1.1.2.3 Atteinte frontotemporale .....	21
1.1.3 Diagnostic.....	21
1.1.4 Étiologie.....	23
1.1.4.1 Les formes sporadiques et familiales de la SLA.....	23
1.1.4.2 Différents gènes mutés dans la SLA.....	24
1.1.4.3 Les facteurs de risque.....	27
1.1.5 Physiopathologie de la maladie.....	28
1.1.5.1 Réparation de l'ADN et métabolisme des ARNs.....	29
1.1.5.2. Transport axonal.....	30
1.1.5.3. Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif.....	31
1.1.5.4. Excitotoxicité glutamatergique.....	31

1.1.6	Pathogénèse cellulaire non-autonome.....	32
1.1.6.1	Cellules gliales du système nerveux central.....	33
1.1.6.1.1	Les microglies.....	34
1.1.6.1.2	Les astrocytes.....	34
1.1.6.1.3	Les oligodendrocytes.....	35
1.1.6.1	Cellules gliales du système nerveux périphérique.....	35
1.2	Jonction Neuromusculaire.....	36
1.2.1	Rôle de la JNM dans la SLA.....	36
1.2.1.1	Notion d'unité motrice.....	37
1.2.1.2	Vulnérabilité différentielle des UMs.....	37
1.2.1.3	Les muscles extraoculaires (MEOs).....	39
1.2.1.3.1	Neuroanatomie des muscles oculomoteurs.....	39
1.2.1.3.2	Spécificités des UMs des MEOs.....	40
1.2.1.3.3	Atteinte retardée des MEOs dans la SLA.....	40
1.2.2	Structure et fonction de la JNM.....	41
1.2.2.1	Concept de synapse tripartite.....	41
1.2.2.2	Éléments pré-et postsynaptiques.....	42
1.2.2.2.1	Structure et organisation de la terminaison axonale .....	42
1.2.2.2.2	Libération de neurotransmetteurs à la JNM.....	43
1.2.2.3	Élément glial : les cellules de Schwann pérисynaptiques.....	44
1.2.2.3.1	Description et rôles.....	44
1.2.2.3.2	Maintien/réparation, régulation et fonction synaptique à la JNM.....	44
1.2.2.3.3	Contribution des CSPs dans la SLA.....	46
1.2.2.3.5	Importance des mAChRs des CSPs.....	47
1.4	Hypothèse et buts du mémoire.....	47

<b>Chapitre 2 - Matériel et Méthodes</b> .....	50
2.1 Animaux.....	50
2.1.1 Modèle murin utilisé.....	50
2.1.2 Stade et progression de la SLA.....	50
2.2 Stratégies virales.....	51
2.2.1 Réduction de l'activité des mAChRs des CSPs.....	52
2.2.2 Augmentation de l'activité des mAChRs des CSPs.....	53
2.3 Préparations neuromusculaires.....	54
2.4 Imagerie calcique des CSPs.....	57
2.5 Immunohistochimie.....	58
2.6 Analyse morphologique des JNMs.....	59
2.7 Analyse statistique.....	61
<b>Chapitre 3 – Résultats</b> .....	62
3.1 Propriétés des CSPs aux JNMs des muscles EDL.....	62
3.1.1 Caractérisation fonctionnelle des CSPs aux JNMs des muscles EDL.....	62
3.1.2. Atténuation sélective de l'excitabilité muscarinique des CSPs aux JNMs des muscles vulnérables EDL.....	65
3.2 Propriétés des CSPs aux JNMs des MEOs résistants.....	67
3.2.1 Les CSPs aux JNMs des MEOs présentent une activation muscarinique normale.....	67
3.2.2 Propriétés morphologiques des JNMs des MEOs.....	67
3.2.3 Augmentation sélective de l'excitabilité muscarinique des CSPs aux JNMs des MEOs.....	68
3.2.3.1 Augmenter l'excitabilité muscarinique induit des modifications morphologiques aux JNMs résistantes.....	72
3.2.3.2 Augmenter l'excitabilité muscarinique des mAChRs des CSPs induit des modification des processus de plasticité des JNMs.....	74

<b>Chapitre 4 – Discussion</b> .....	76
4.1. Concept de résistance/vulnérabilité dans la SLA.....	76
4.1.1 Facteurs potentiels influençant la vulnérabilité sélective des MNs dans la SLA.....	76
4.1.1.1 Excitabilité différentielle des MNs.....	77
4.1.1.2 Les altérations au niveau du muscle : une communication neurone- muscle, mais d’avantage.....	78
4.1.1.3 La résistance particulière des MEOs.....	79
4.2. Rôle des CSPs dans un contexte de vulnérabilité et de résistance .....	81
4.2.1 Les altérations de la capacité de détection des CSPs à la JNM.....	81
4.3 Hyperactivation muscarinique des CSPs à la JNM.....	82
4.4 Impact de la modulation de l’activité des mAChRs des CSPs .....	82
 Perspectives.....	 84
 Conclusion.....	 86
 Références bibliographiques.....	 87

## **Liste des tableaux**

Tableau 1. Critères d'évaluations des différents éléments morphologique de la JNM....60

## Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de la condition physiologique versus pathologique.....	17
Figure 2. Facteurs de risque dans la SLA.....	27
Figure 3. Mécanismes pathophysiologiques suggérés dans la SLA.....	29
Figure 4. Schéma illustrant la vulnérabilité sélective des UMs dans la SLA.....	38
Figure 5. Représentation schématique de la JNM, une synapse tripartite.....	42
Figure 6. Schéma présentant les mécanismes potentiels responsables de la résistance des MEOs.....	49
Figure 7. Schéma de la stratégie de réduction de l'activité des mAChRs des CSPs.....	53
Figure 8. Schéma de la stratégie d'augmentation de l'activité des mAChRs des CSPs.....	54
Figure 9. L'habileté des CSPs à détecter les signaux muscariniques et purinergiques n'est pas altérée dans le muscle EDL pendant la période présymptomatique de la maladie.....	64
Figure 10. Les injections IP du vecteur viral M3iLoop restore l'excitabilité des mAChRs des CSPs des muscles EDL de souris WT.....	67
Figure 11. Exemples de JNMs d'un MEO de souris WT. ....	68
Figure 12. Préparation neuromusculaire de MEO du rectus droit supérieur et imagerie dynamique.....	70
Figure 13. Le marquage mCherry n'est pas retrouvé aux JNMs des souris non injectées et non traitées.....	71
Figure 14. Le virus cible les CSPs à la JNM et pas les cellules de Schwann axonales.....	72
Figure 15. Le traitement chronique avec le CNO induit des modifications de l'état d'innervation des JNMs.....	74



Figure 16. L'augmentation de l'activité des mAChRs induit des signes de plasticité chez les souris SOD1<sup>G37R</sup> .....75

## Liste des sigles et abréviations

ACh: Acétylcholine  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
ADP: Adénosine diphosphate  
AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolen propionic acid  
ARN: Acide ribonucléique  
ARNm: Acide ribonucléique messenger  
ATP: Acide triphosphate  
ChAT: Choline acétyltransférase  
CNO : Clozapine N-oxide  
CSP: Cellule de Schwann périssynaptique  
C9ORF72: “Chromosome 9 open reading frame 72”  
DCTN1: Dynactin 1  
DFT: Démence frontotemporale  
DPR: Répétitions dipeptidiques  
DREADD: “Designed receptors exclusively activated by designer drugs”  
EAAT2: “Excitatory aminoacid transporter 2”  
EDL: Extensor digitorum longus  
EMG: Électromyographie  
EPP : “End-plate potential” (Potentiel de plaque)  
FF: “Fast fatiguable” (Rapide fatigable)  
FR: “Fast resistant” (Rapide résistante)  
FUS: “Fused in Sarcoma”  
IRM: Imagerie par résonance magnétique  
JNM: Jonction neuromusculaire  
KIF5A : Kinésine 5A  
LCR: Liquide céphalo-rachidien  
mAChR: Récepteur muscarinique à l’acétylcholine  
MEO: Muscle extraoculaire  
MN: Motoneurone  
nAChR: Récepteur nicotinique à l’acétylcholine

NDS : “Normal donkey serum”  
NfL: Neurofilament à chaîne légère  
NMDA: N-méthyl-D-aspartate  
NT: Neurotransmetteur  
PA: Potentiel d’action  
PFA: Paraformaldéhyde  
PFN1: Profilin-1  
PKC: Protéine kinase C  
PPMm: Potentiel de plaque motrice miniature  
SLA: Sclérose latérale amyotrophique  
SLAs: Sclérose latérale amyotrophique sporadique  
SLAf: Sclérose latérale amyotrophique familiale  
SNARE: “Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptors”  
SNC: Système nerveux central  
SNP: Système nerveux périphérique  
SOD1: Cu/Zn Superoxide dismutase 1  
SOL: Soleus  
STM-2: “Stathmin-2”  
TDP-43: “TAR-DNA binding protein 43”  
TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha  
TUBA4A: Tubulin alpha-4A  
UM: Unité motrice

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier et exprimer ma reconnaissance envers mon superviseur, le Dr. Richard Robitaille pour m'avoir accueilli dans son équipe et m'avoir permis de mener à bien ce projet. Je te remercie chaleureusement pour ton écoute et ton soutien sans faille durant mon parcours.

Un immense merci à Dre. Danielle Arbour pour ta générosité, ton grand cœur, ta patience, tes conseils et ton soutien technique qui m'ont permis de m'adapter rapidement et de réaliser au mieux mes expériences. Merci également pour ton écoute bienveillante durant les moments les plus difficiles.

Merci également à Elsa Tremblay pour tes précieux conseils et pour l'ambiance drôle et chaleureuse que tu apportes au quotidien dans le labo. Te côtoyer est un vrai bonheur !

Merci infiniment Geneviève pour ta disponibilité et ton aide précieuse avec la colonie ainsi que pour m'avoir aidé à prendre soin de mes souris.

Je tiens aussi à remercier mon parrain et ma marraine, Dr. Ravi Rungta et Dre. Christine Vande Velde pour leur soutien et leurs discussions stimulantes tout au long de mon parcours.

Merci aussi aux membres du jury, Dr. Kessen Patten et Dr. Ciaran Murphy Royal pour avoir accepté d'examiner mon mémoire.

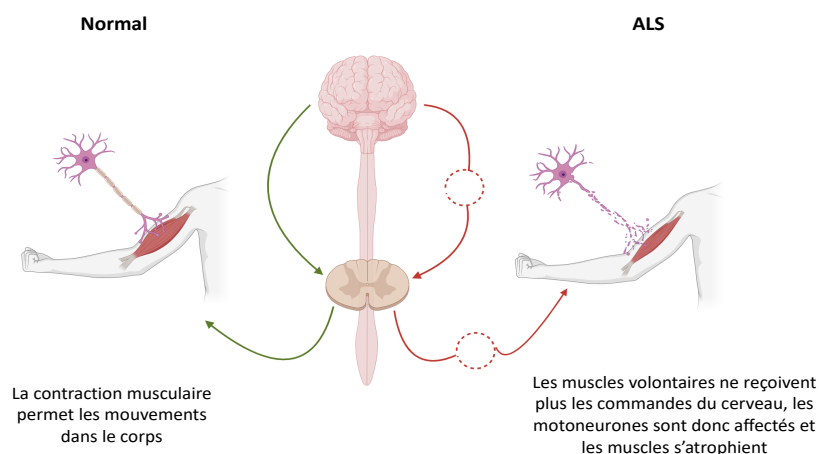
Je voudrais remercier mes amis qui ont suivi mes péripéties tout au long de ma maîtrise, ma meilleure amie Flore, Alice, Steven, Emma, Laurence, Marie-Hélène, Dasha, d'avoir été constamment à mes côtés et de m'avoir soutenu. Je vous remercie de m'avoir accompagné dans les nombreuses sorties à vélo m'aérer l'esprit dans les périodes difficiles.

Je tiens à remercier de tout mon cœur les membres de ma famille qui m'ont soutenu durant ces trois années, vous avez été de réelles sources d'inspirations et de motivations qui m'ont aidé à me surpasser. Un gros merci à mes parents, mon papa et ma maman d'avoir été toujours derrière moi, malgré les 8000 kilomètres qui nous sépare, vous avez su faire preuve de tellement de bienveillance, je vous aime.

## Chapitre 1 – Introduction générale

### Préambule

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie invalidante, chronique et d'évolution fatale. La SLA se caractérise cliniquement par un déficit moteur progressif qui affecte les membres supérieurs, inférieurs et les muscles linguo-pharyngo-laryngés. Anatomiquement, la maladie se traduit par une dégénérescence progressive des neurones moteurs (ou motoneurones; MNs) du cortex cérébral, du tronc cérébral et de la moelle épinière. Cette dégénérescence est un déterminant majeur dans la SLA puisqu'elle entraîne la destruction d'une unité fonctionnelle de communication entre les neurones et les muscles, la jonction neuromusculaire (JNM) (Fischer et al., 2004) (**Figure 1**).



**Figure 1.** Représentation schématique de la condition physiologique versus pathologique. La dégénérescence des motoneurones supérieurs et inférieurs ne permet plus la transmission des influx nerveux de la moelle épinière aux muscles permettant les contractions volontaires. Les muscles s'atrophient.

La perte des JNMs est un élément important puisqu'elle survient avant celle des MNs (Pun et al., 2006), et ce, même si des mécanismes compensatoires mais inefficaces de réparation existent à la JNM. De manière intéressante, une vulnérabilité différentielle au processus de dénervation est observée dans la SLA, où certaines unités motrices (UM : le motoneurone et les fibres musculaires qu'il innerve) seraient plus susceptibles au processus de dénervation que d'autres (Frey et al., 2000). Effectivement, de manière surprenante, la fonction et l'innervation des muscles extraoculaires (MEOs) sont bien

préservés dans la SLA. Malgré l'importance des JNMs, l'identification de mécanismes à l'origine de cette vulnérabilité et de cette capacité de résistance pour compenser restent à définir pour une meilleure compréhension du développement et de la progression de la maladie.

Bien que la paralysie progressive observée dans la SLA résulte de la mort des MNs, plusieurs études ont démontrées que cette dégénérescence nécessite l'implication de cellules non-neuronales environnantes, les cellules gliales (Boillée et al., 2006)(Clement et al., 2003)(Kang et al., 2013)(Yamanaka et al., 2008). C'est alors qu'a émergé le concept de maladie à « pathogénèse cellulaire non-autonome ». Les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs), cellules gliales à la JNM, possèdent une multitude de rôles essentiels au bon fonctionnement de la synapse. En effet, les CSPs ont la capacité de détecter, décoder, mais aussi de s'adapter aux changements synaptiques tels que des changements de sensibilité muscarinique, mais elles ont aussi la capacité de moduler leur réponse calcique. La régulation des fonctions des CSPs s'établit notamment par l'activation de leurs récepteurs muscariniques (mAChRs) et de leur niveau d'activation (Ko and Robitaille, 2015). Des travaux effectués dans le laboratoire ont montré que l'activation muscarinique des CSPs était nettement augmentée aux JNMs d'un modèle murin de SLA (*SOD1<sup>G37R</sup>*), que ce soit aux JNMs dénervées ou bien innervées (Martineau et al., 2020a)(Arbour et al., 2015)(Perez-Gonzalez et al., 2022). Cette hyperexcitabilité est associée à un décodage inadéquat des CSPs conduisant à une régulation inappropriée des processus de dénervation et réinnervation. De manière intéressante, l'hyperexcitabilité des mAChRs des CSPs n'est pas observée aux JNMs résistantes. Malgré la possible présence de certains évènements compensatoires, en augmentant l'excitabilité muscarinique des CSPs aux JNMs des MEOs, est-il possible d'altérer les mécanismes régulant la réparation des JNMs, et ainsi d'observer de la dénervation ?

## **1.1. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)**

Les amyotrophies progressives et incurables se traduisent par la dégénérescence des MNs assurant le contrôle de la motricité, au niveau du cortex moteur, du bulbe rachidien et de la moelle épinière (Strong, 2003)(Monani, 2005). La SLA fait partie des maladies du MNs relativement rares, qui forment un groupe cliniquement hétérogène d'origine familiale ou sporadique, et qui touchent majoritairement les adultes. Dans tous les cas, la détérioration des MNs conduit à une faiblesse et une atrophie musculaire, à des difficultés de langage et de déglutition, ainsi qu'à une détresse respiratoire qui s'en suit inexorablement par la mort des personnes affectées (Gordon, 2013).

### **1.1.1 Historique, étymologie et description générale**

La SLA, connue sous diverses appellations, Maladie de Charcot ou encore Maladie de Lou Gehrig, a été décrite pour la première fois au 17<sup>ème</sup> siècle par le médecin français, Dr. François Amilcar Aran. À cette époque elle est désignée comme étant une « Atrophie Musculaire Progressive » en raison du phénotype observé : perte de poids, faiblesse musculaire, rigidité des membres, difficultés respiratoires, et fasciculations (contractions musculaires involontaires) (Walusinski, 2022). Ce n'est qu'au 19<sup>ème</sup> siècle que le neurologue français, Jean-Martin Charcot met en évidence une altération du bulbe rachidien chez une jeune patiente atteinte d'anormalités sensorielles et d'une faiblesse générale progressive. Après de multiples recherches, il en déduit alors que la sclérose latérale est liée à de la spasticité et des contractions musculaires. C'est ainsi que la maladie prend le nom de « Sclérose Latérale Amyotrophique » (SLA). Il la décrit avec précision en 1874 dans le recueil sur les « Leçons du système nerveux faites à la Salpêtrière ».

Comme mentionnée précédemment, il a été suggéré que la SLA débutait au niveau cortical, avec une hyperexcitabilité cortico-motoneuronale médiée par de la dégénérescence neuronale via un mécanisme trans-synaptique antérograde, l'hypothèse dite « de mort antérograde » (Eisen et al., 1992). Cependant, d'autres chercheurs proposent une autre théorie où la détérioration des MNs inférieurs serait l'élément primaire au déclenchement de la maladie, c'est l'hypothèse dite de « mort rétrograde » (Williamson and Cleveland, 1999) (Fischer et al., 2004).

Le nom de la pathologie fait référence aux différents compartiments de tissus affectés. Le terme « sclérose » désigne un durcissement pathologique du tissu cicatriciel résultant de la dégénérescence des MNs. Ensuite, le mot « latérale » fait référence à la portion de moelle épinière où se trouve les MNs altérés, et enfin « amyotrophique » désigne l'atrophie des fibres musculaires due à une perte de masse musculaire.

La SLA se caractérise principalement par la dégénérescence et la mort des MNs localisés au niveau du cortex moteur et du tronc cérébral (supérieurs) ainsi que dans la corne antérieure de la moelle épinière (inférieurs). Ces MNs ont pour rôle de transmettre des signaux électriques vers les muscles des membres qui contrôlent les mouvements volontaires (Pradat and Bruneteau, 2006). Une caractéristique essentielle de la SLA est qu'en dehors de la motricité, elle respecte les autres fonctions du système nerveux. Les fonctions intellectuelles sont conservées tout le long de la maladie.

### **1.1.2. Symptomatologie et progression**

Bien que la dégénérescence des MNs est la principale caractéristique de la SLA, elle reste une maladie à présentation hétérogène et d'un patient à l'autre, on peut relever des différences dans l'âge du diagnostic, la symptomatologie, et la vitesse de progression de la maladie. Certains patients vont présenter une atteinte dite bulbaire et d'autres, une atteinte dite spinale. L'atteinte est toujours asymétrique au début pour s'étendre progressivement aux autres parties du corps.

#### **1.1.2.1 Forme bulbaire**

La forme bulbaire est associée à la détérioration initiale des MNs de la région cortico-bulbaire du tronc cérébral. Cette région contrôle les muscles du visage, de la tête et du cou. Retrouvée chez environ 20% des patients SLA, elle est plus fréquente chez les femmes âgées et est associée à un mauvais pronostic vital. La maladie se traduit habituellement par des signes de faiblesse des muscles bulbaires c'est-à-dire du pharynx, larynx et des muscles de la langue. Ces patients présenteront de la dysarthrie (troubles de la parole dû à des lésions des MNs dans le bulbe rachidien) suivie d'une dysphagie (difficulté à déglutir). Les individus affectés souffrent de malnutrition, d'anarthrie (impossibilité à articuler), de spasmes involontaires de la langue et d'une hypersalivation.



La faiblesse axiale peut causer une chute de la tête liée à une perte d'équilibre (Gordon, 2013)(Talbot et al., 2016).

#### 1.1.2.2 Forme spinale

La forme spinale représente 75% des patients atteints de SLA et est due à la dégénéscence des MNs des neurones corticaux. La maladie se manifeste par un affaiblissement musculaire non douloureux dans un des membres (Brown and Al-Chalabi, 2017), puis conduit rapidement le patient à perdre sa dextérité, s'en suivra une atrophie musculaire et une paralysie progressive bilatérale. L'apparition progressive des déficits moteurs s'accompagnent également d'une hypertonie, et de fasciculations. Cette forme correspond à la progression la moins sévère.

#### 1.1.2.3 Atteinte frontotemporale

Initialement, la SLA était diagnostiquée comme une pathologie exclusivement neuromusculaire affectant les motoneurones sans aucune atteinte cognitive. Or, elle est maintenant considérée comme une maladie à large spectre, partageant des caractéristiques communes avec la démence frontotemporale (DFT) (Montuschi et al., 2015) (Jiang and Ravits, 2019). Jusqu'à 50% des cas de SLA présentent des troubles cognitifs et environ 15% développent des signes de DFT, telles que des difficultés au niveau des fonctions exécutives, des changements de de comportement, ou encore des dysfonctions du langage. L'existence d'un chevauchement entre la SLA et la DFT est établi depuis plusieurs années (Lomen-Hoerth et al., 2002), et a été confirmé par la prépondérance de certaines mutations dans les gènes *TARDP* et *C9ORF72* pouvant être responsables de tableaux de SLA et/ou de DFT. Il se peut qu'en raison d'une indécision du patient à suivre les soins, ces cas de SLA-DFT ont un moins bon pronostic.

### 1.1.3 Diagnostic

Le degré de certitude du diagnostic de SLA est basé sur la recherche de ses différents symptômes cliniques. Il sera analysé à l'aide des critères El Escorial. Établis en 1994 par Brooks et ses collaborateurs puis révisés en 2010 par la Fédération mondiale de Neurologie, ces critères permettent de déterminer si le diagnostic de SLA est suspecté,

possible, probable ou définitif (Brooks, 1994). La maladie est suspectée lorsqu'une seule région du cerveau présente des signes d'atteintes des MNs supérieurs et inférieurs. La SLA est possible lorsque les MNs supérieurs sont affectés dans deux régions du cortex moteur, du tronc cérébral, ou de la corne ventrale de la moelle épinière, ou bien lorsqu'une région présente une atteinte des MNs supérieurs et inférieurs. La SLA est dite probable lorsque les populations de neurones sont touchées dans les deux régions. Enfin, la SLA est définie lorsqu'il y a une atteinte des MNs supérieurs et inférieurs dans les trois régions conjointement (Costa et al., 2012).

Bien que le critère El Escorial soit un outil de première intention, le diagnostic de la maladie reste difficile à établir en raison d'un nombre important de maladies présentant des symptômes similaires. Aussi, la spécificité du diagnostic est réduite en raison du sous-développement des biomarqueurs. En effet, plusieurs outils et tests sont utilisés pour aider au diagnostic et évaluer la progression de la maladie. Une publication récente évoque notamment l'utilisation du neurofilament à chaîne légère (NfL) (Benatar et al., 2023) comme potentiel biomarqueur dans le développement des thérapies pour la SLA. Le taux de NfL est beaucoup plus important dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients atteints de DFT que dans celui des individus sains (Meeter et al., 2016). Par ailleurs, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), ou encore l'IRM fonctionnelle qui a pour but d'étudier les activités cérébrales par variation du flux sanguin sont des outils intéressants pour distinguer la SLA d'autres maladies. Par ailleurs, le dysfonctionnement des MNs inférieurs peut être analysé par électrophysiologie. L'électromyographie (EMG) peut être utilisée par les cliniciens afin d'enregistrer une activité musculaire (Joyce and Carter, 2013) (Sorenson, 2012). Les patients SLA présentent un EMG anormal se traduisant par une augmentation de l'amplitude et du potentiel d'action (Lenglet and Camdessanché, 2017). La dégénérescence des MNs inférieurs induit des signes de fasciculations et de fibrillations responsables de la dénervation musculaire observée par EMG. En complément de l'EMG une biopsie musculaire peut être réalisée pour identifier une atrophie ou des signes de dénervation.

Puisque la SLA est une maladie en constante évolution, il est nécessaire d'évaluer régulièrement la progression afin d'adapter la prise en charge des patients. Le score ALS FRS (en anglais : *Amyotrophic Lateral Functional Rating Scale*) (Cedarbaum et al., 1999)

prend en compte quatre paramètres lors de l'évaluation du patient : les fonctions motrices, la capacité respiratoire, les atteintes bulbaires, et de façon plus générale, l'incapacité à effectuer des tâches de la vie quotidienne. Les actions du patient sont notées de 0 à 4 où 0 représente une perte totale de la capacité évaluée et 4 est une fonction normale.

#### **1.1.4 Étiologie**

Ce n'est que dans les années 50 grâce aux travaux de Kurland et Mulder que la SLA est reconnue comme étant une maladie dont les facteurs génétiques peuvent être transmis à la génération suivante et pouvant être responsables du développement de la maladie (Kurland and Mulder, 1954). Actuellement, 10% des cas de SLA sont dû à un facteur héréditaire, tandis que 90% des cas sont liés à une apparition sporadique (SLAs) aléatoire au sein de la population (Rowland and Shneider, 2001). L'étiologie de la SLA est hautement multifactorielle associée à un vaste répertoire de mutations génétiques (Akçimen et al., 2023) (Kim et al., 2020) (Base de données ALSod (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/index.aspx>), mais elle est aussi liée à des mécanismes de toxicités, tel que l'excitotoxicité induite par le glutamate, le stress oxydatif, l'inflammation, des repliements et agrégations de protéines, ou encore un dysfonctionnement mitochondrial (Dunkel et al., 2012). Bien qu'il reste de nouvelles avancées majeures à effectuer vers l'identification de nouveaux facteurs génétiques impliqués dans la SLA, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques permettrait l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques. Dans la section subséquente, les principaux gènes mutés dans la SLA ainsi que les facteurs de risque seront abordés.

##### **1.1.4.1 Les formes sporadiques et familiales de la SLA**

Les mécanismes pathophysiologiques impliqués dans les formes sporadiques et familiales sont encore mal connus du fait de leurs causes multifactorielles. La SLA familiale (SLAf) dépend de facteurs génétiques qui sont, dans la majorité des cas à caractère dominant. Jusqu'à présent, plus de 100 gènes lui sont associés, et la cause génétique est déterminée dans plus de 70% des cas (Chia et al., 2018). En raison leur nombre important, nous présenterons dans la section suivante uniquement les SLAf les plus étudiés et dont les gènes impliqués codent pour des protéines retrouvées dans les

agrégats protéiques situés dans les MNs. Néanmoins, pour la majorité des patients atteints de SLAs, la cause de la maladie demeure encore inconnue (Taylor et al., 2016). Des facteurs de risques environnementaux tels que l'activité physique intense, le tabac, l'exposition à des pesticides et à certains métaux lourds) pourraient expliquer ces cas (Al-Chalabi and Hardiman, 2013).

#### 1.1.4.2 Différents gènes mutés dans la SLA

Certaines formes de SLA sont liées à des mutations dans différents gènes. Parmi les plus documentées, on trouve *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9ORF72*.

En 1993, Rosen et ses collaborateurs, ont identifiés la première mutation du gène codant pour la *SuperOxide Dismutase 1*, *SOD1*, dans la SLA (Rosen et al., 1993). Elle représente actuellement 20% des cas familiaux et 2% des cas sporadiques (Boillée et al., 2006). Des recherches approfondies ont conduit à l'identification de plus de 150 mutations réparties dans les 5 exons du gène, dont la plupart sont des mutations faux-sens et leur transmission à la descendance est dominante. Parmi ces mutations faux-sens, on trouve *SOD1<sup>G37R</sup>* ou *SOD1<sup>G85R</sup>* (remplacement d'une guanine par une arginine), *SOD1<sup>G93A</sup>* (remplacement d'une guanine par une alanine) ainsi que *SOD1<sup>A4V</sup>* (remplacement d'une alanine en position 4 par une valine). Cette dernière est associée aux symptômes cliniques les plus sévères et les patients atteints ont une espérance de vie d'environ un an. La SLA associée au gène *SOD1* est la deuxième forme la plus courante. Le gène *SOD1* code pour une métalloenzyme ubiquitaire de 153 acides aminés, la *superoxide dismutase 1 (SOD1)*, qui est spécifiquement localisée dans le cytosol (Crapo et al., 1992), ainsi que dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Elle est constituée de deux monomères qui s'associent pour former une protéine soluble fonctionnelle homodimère. Chaque monomère peut se lier à un ion de zinc, jouant un rôle structural, et un ion de cuivre, intervenant comme cofacteur catalytique. Fonctionnellement, une mutation de *SOD1* induit un mauvais repliement de la protéine, ce qui la rend insoluble (Bruijn et al., 1998). Cependant, même sans aucun changement d'activité de *SOD1*, le mutant *G85R* induit la mort des motoneurons caractérisée par une progression clinique rapide de la maladie (Bruijn et al., 1997) (Amendola et al., 2004). La protéine *SOD1* peut être aussi impliquée

dans la dégradation des radicaux libres toxiques produits par la respiration mitochondriale (Pickles and Vande Velde, 2012). En effet, la fonction de cette enzyme est de catalyser la dismutation des anions superoxydes ( $O_2^-$ ) toxiques, produits lors de la phosphorylation oxydative des mitochondries en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) grâce à des cycles d'oxydoréduction (Pasinelli and Brown, 2006).

Les mutations dans le gène *TARDBP*, qui code pour la protéine *TDP-43*, une protéine de la famille des hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* en anglais), sont impliquées dans la formation d'agrégats protéiques positifs pour *TDP-43* dans le cytoplasme des cellules du système nerveux central (SNC) (Scotter et al., 2015). La fréquence des mutations *TARDBP* dans les formes familiales de SLA est évaluée entre 4 à 6% (Millecamps et al., 2010). Physiologiquement, *TDP-43* est une protéine majoritairement nucléaire, mais dans le cas d'une protéinopathie, *TDP-43* est délocalisée dans le cytoplasme, et se présente sous forme d'agrégats hyperphosphorylés, ubiquitinylée et tronqués (Scotter et al., 2015). Les inclusions cytoplasmiques de *TDP-43* ont été retrouvées dans le cortex moteur et la moelle épinière de patients SLAs et sont composés de fragments phosphorylés correspondant à la partie C-terminale de la protéine *TDP-43*. De nombreuses études ont montré que des mutations dans cette région du gène *TARDBP* (Sreedharan et al., 2008) (Rutherford et al., 2008) favoriseraient un clivage maladapté de *TDP-43*, générant ainsi un petit fragment C-terminal responsable de la mort cellulaire par gain de fonction toxique (Zhang and Saunders, 2009). Les inclusions cytoplasmiques de *TDP-43* ne sont pas nécessaires à la dégénérescence des MNs (Mitchell et al., 2015). Cependant, la perte de fonction nucléaire serait responsable de l'accélération de la maladie. Un autre mécanisme contribuant à la fonction toxique de *TDP-43* serait la présence de mutations affectant le domaine prion-like de *TDP-43* (Neumann et al., 2006).

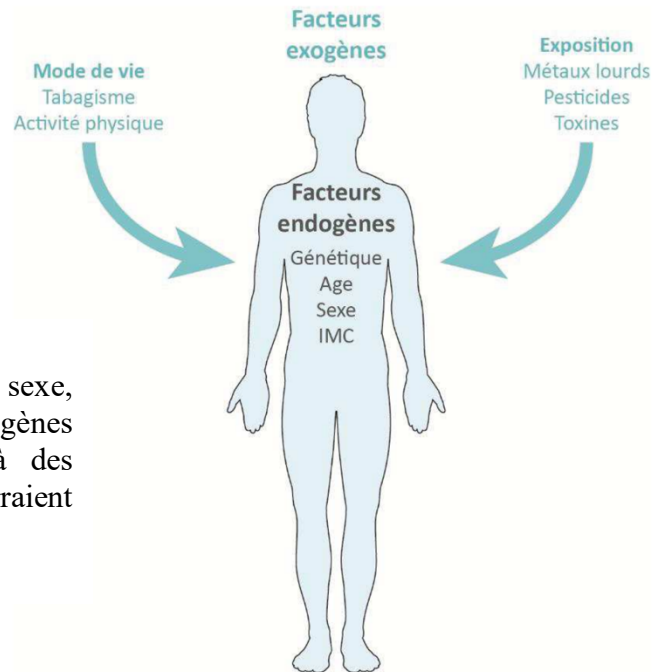
En 2009, rapidement après l'identification de mutations de *TDP-43* dans la SLA, la protéine de liaison à l'ARN (en anglais, RBP pour *RNA-Binding Protein*), *FUS* (*FUsed in Sarcoma*) a été découverte. Tout comme *TDP-43*, elle est impliquée dans la fabrication des micro-ARN, les processus de synthèse, de modification, mais aussi dans le transport de l'ADN (Aman et al., 1996) (Lagier-Tourenne et al., 2010). *FUS* est aussi une protéine

majoritairement nucléaire avec une faible accumulation cytoplasmique. Des études post-mortem de cerveaux et de moelles épinières de patients présentant des mutations dans le gène *FUS* ont montré la présence d'agrégats positifs pour *FUS* dans les neurones et les cellules gliales. Ces inclusions se sont avérées être immunoréactives pour p62 et l'ubiquitine mais de manière étonnante négatives pour *TDP-43*, ce qui suggère que le processus de dégénérescence orchestré par les mutations de *FUS* est indépendant de la délocalisation de *TDP-43* (Saberri et al., 2015). La majorité des patients qui développent la maladie ne présente pas de déficience cognitive; cependant, des études ont introduites des patients développant des DFT avec dégénérescence des MNs et d'autres patients avec une démence sans que les MNs ne soient affectés. Une fois de plus, cela corrobore les liens cliniques, génétiques et pathologiques étroits entre la SLA et la DFT (Lattante et al., 2013).

En 2011, des expansions anormales d'une séquence d'hexanucléotides GGGGCC ont été découvertes dans l'intron 1 du gène *C9ORF72* (abréviation pour *chromosome 9 open reading frame 72* en anglais) dans environ 40% des cas de SLA et 10% des patients atteints de SLAs (Majounie et al., 2012) (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Trois variants d'ARN messenger (ARNm) sont produits par épissage alternatif du gène *C9ORF72* qui sont présents dans la plupart des tissus, dont le cerveau, où ils sont localisés dans le cytoplasme des neurones. Chez les patients SLA-DFT, ces expansions anormales entraînent une diminution significative de la quantité des trois variants produits dans le cortex moteur, le cervelet et la moelle épinière par rapport aux individus sains (Donnelly et al., 2013) (Waite et al., 2014). Bien que les mécanismes pathophysiologiques impliquant *C9ORF72* restent encore à éclaircir, trois hypothèses tentent d'expliquer ces expansions. Premièrement, elles conduiraient à une réduction de l'expression de *C9ORF72*, ce qui causerait une haploinsuffisance. Deuxièmement, la cause de la SLA liée à *C9ORF72* pourrait s'expliquer par la toxicité de l'ARN. En effet, les ARNs contenant les répétitions anormales sens et antisens transcrites du mutant entraînent la séquestration de protéines de liaison à l'ARN et la production de répétitions dipeptidiques (DPR). Ainsi, la troisième hypothèse serait que les DPR sont des produits toxiques induisant un gain de fonction toxique (Jiang and Cleveland, 2016).

#### 1.1.4.3 Les facteurs de risque

Pour la plupart des patients, les causes de la SLA sont inconnues. Bien que la maladie soit cliniquement définie, il a été suggéré que c'est un ensemble d'évènements, ou de facteurs qui doivent être présents pour que la maladie se manifeste (**Figure 2**). Dans cette section, nous couvrons les facteurs environnementaux potentiels impliqués dans la SLA.



**Figure 2.** *Facteurs de risque dans la SLA.*

Certains facteurs endogènes (génétique, âge, sexe, indice de masse corporelle (IMC)) ou exogènes (tabagisme, activité physique, exposition à des métaux lourds, pesticides ou toxines) pourraient augmenter le risque de développer la SLA.

Comme dans de nombreuses maladies neurodégénératives, l'âge représente un facteur de risque dans la SLA. Bien que le risque de développer la SLA augmente avec l'âge jusqu'à 70-79 ans, le risque semble diminuer au-delà (Xu et al., 2020). Les symptômes des patients à un âge plus avancé risquent davantage d'être considérés comme faisant partie du processus de vieillissement normal au lieu d'une atteinte neurologique à proprement parlé; l'analogie doit être prise en considération (Al-Chalabi and Hardiman, 2013). En plus de représenter un facteur de risque, l'âge des patients peut être corrélé à la survie de ces derniers. En effet, la majorité des patients développent leurs premiers symptômes entre 55 et 65 ans. Cependant, des formes juvéniles existent, où les premiers

symptômes se déclarent avant 25 ans. Tandis que ces formes juvéniles progressent lentement, les personnes atteintes aux environs de 60 ans décèdent dans les 3 à 5 ans suivant le diagnostic (Chiò et al., 2009) (Pupillo et al., 2014).

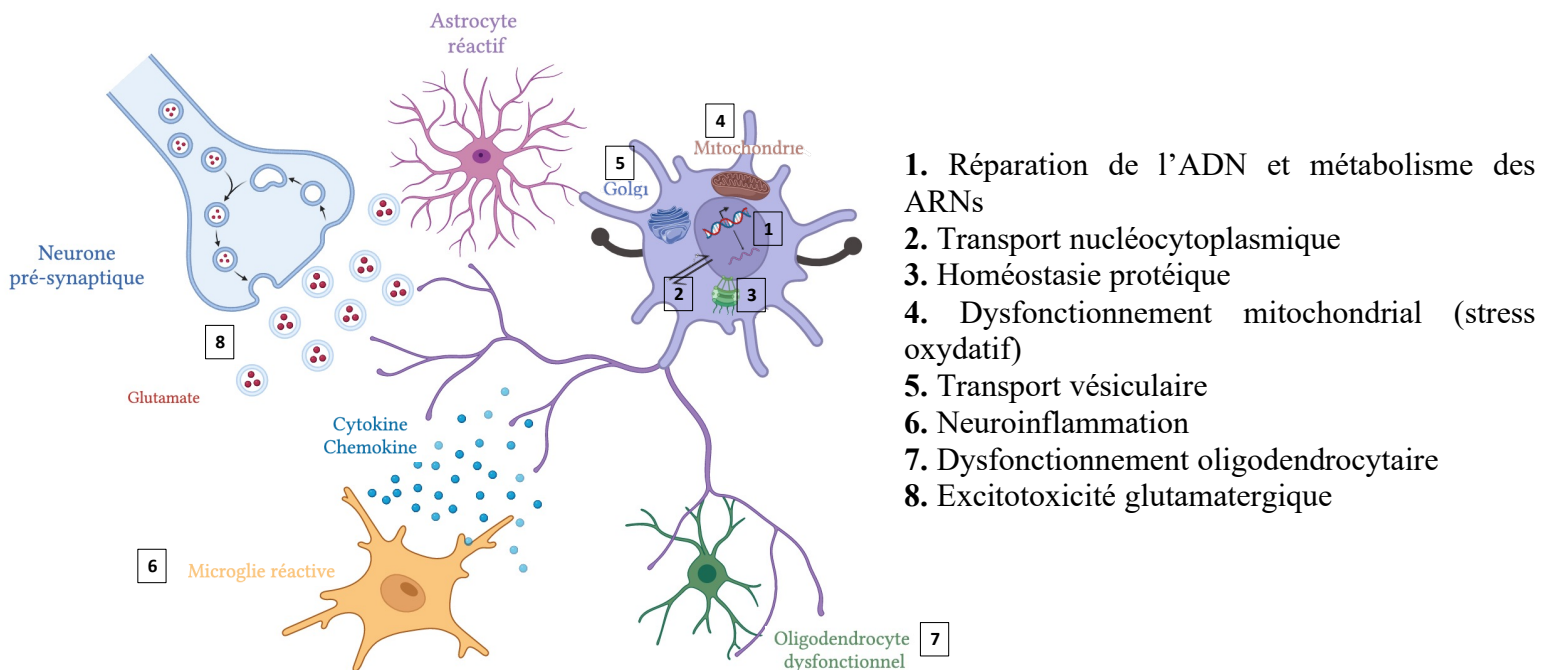
Le sexe a longtemps été considéré comme un facteur de risque avec des incidences et prévalences plus élevées chez l'homme (1,91 et 5,96 respectivement) que la femme (1,36 et 3,90) à l'échelle mondiale (Xu et al., 2020). Dans certains pays comme en Afrique, un ratio homme/femme de 2,9 a même pu être observé (Luna et al., 2019). Cependant, dans la population européenne, le risque global est plus faible avec 1/350 chez l'homme, contre 1/400 chez la femme de développer la SLA, soit un ratio de 1,3 en moyenne (Al-Chalabi and Hardiman, 2013) (Couratier et al., 2016). Ainsi, le sexe pourrait représenter un facteur de risque qui dépend de la zone géographique étudiée. L'évolution du mode de vie de la population jouerait un rôle dans la variation de ce ratio entre les différentes zones prises en compte (Longinetti and Fang, 2019).

Le rôle environnemental comme facteur de risque de SLA est difficile à élucider. Effectivement, les multiples aspects environnementaux, aussi appelés « exposome » évoluent avec le temps, ce qui rend leur étude complexe. Par ailleurs, l'impact de ces facteurs est très souvent corrélé avec le fond génétique (abordé dans la section précédente) propre à chaque personne; et donc, en fonction de celui-ci, une même exposition environnementale conduira à un risque différent (Al-Chalabi and Hardiman, 2013). Malgré la difficulté de ce type d'étude, des chercheurs se sont intéressés à différents éléments pouvant être considérés comme facteur de risque. L'activité physique (Huisman et al., 2013), un faible indice de masse corporelle (Gallo et al., 2013), le tabagisme (Alonso et al., 2010), l'exposition aux métaux lourds (plomb, mercure, aluminium, cadmium, manganèse et sélénium (Sutedja et al., 2009), aux pesticides et produits chimiques utilisés en agriculture (Park et al., 2005) (Sutedja et al., 2009) ou encore à des toxines (exposition à la cyanotoxine dans l'alimentation) (Bradley and Mash, 2009) augmenteraient le risque de développement de SLA.



### 1.1.5 Physiopathologie de la maladie

Les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la SLA sont nombreux et ne sont pas encore totalement identifiés à ce jour. Parmi les mieux caractérisés, on peut citer les perturbations du métabolisme des ARNs, les altérations du transport axonal, l'excitotoxicité du glutamate, et le stress oxydatif incluant des dysfonctions mitochondriales (Gregory et al., 2020) (Le Gall et al., 2020). Il est désormais probable que ce soit un ensemble de mécanismes qui soit à l'origine du développement et de la progression de la pathologie, plutôt qu'un seul et unique évènement (Mejzini et al., 2019) (voir la section 1.1.6 « Pathogénèse cellulaire non-autonome ») (**Figure 3**).



**Figure 3.** Mécanismes pathophysiologiques suggérés dans la SLA. Plusieurs mécanismes ont été proposés comme étant pathologiques dans la SLA. C'est le cas de l'altération de la réparation de l'ADN et du métabolisme des ARNs (1), du transport nucléocytoplasmique (2), de l'homéostasie protéique (3), du fonctionnement des mitochondries (4), du transport neuronal vésiculaire (5), de la microglie (6), des oligodendrocytes (7), ou encore d'une excitotoxicité glutamatergique (8). Figure adaptée de Mejzini et al., 2019 et créée avec BioRender.

#### 1.1.5.1 Réparation de l'ADN et métabolisme des ARNs

Les perturbations du métabolisme et de la régulation ARNs dans un contexte pathologique a débutée avec la découverte de mutations dans les gènes *FUS* et *TARDBP* et

sont des mécanismes physiopathologiques centraux dans la SLA (Butti and Patten, 2018). *FUS* et *TARDBP* sont des protéines de liaison à l'ARN sont toutes les deux impliquées dans de nombreux mécanismes, dont des agrégats cytosoliques ont été rapportés (Taylor et al., 2016), et pourraient avoir un lien étroit avec les expansions répétitives d'hexanucléotides de *C9ORF72* (Cooper-Knock et al., 2014). En condition normale, *FUS* et *TDP-43* sont capables de se lier aux introns afin de les stabiliser. Elles modulent la transcription génique, en assurant entre autres la formation de micro-ARN lorsqu'elles se lient aux ARNs non codant. Une fois dans le cytoplasme, ces protéines interagissent avec les ARN messagers (ARNm). Cependant en condition de stress cellulaire, la fusion de ces protéines aux ARNm conduit à la formation de « granules de stress », dans lequel les ARNm seront séquestrés et leur traduction inhibée (Lagier-Tourenne et al., 2010) (Ling et al., 2013). En effet, dans la moelle épinière de patients SLA, on retrouve une accumulation d'ARN (appelée foci) dans le cytoplasme des MNs et des cellules gliales (Cooper-Knock et al., 2015). Les granules de stress facilitent la survie des cellules par la non-traduction de certains transcrits non essentiels ainsi que de protéines pro-apoptotiques (Protter and Parker, 2016). De manière intéressante, plusieurs des protéines de liaison à l'ARN étudiées dans la SLA contiennent des domaines « prion-like » qui sont impliquées dans la formation des granules de stress, comme *TDP-43*, *FUS*, *TAF15*, *ESWR1*, *hnRNPA1*, et *hnRNPA2B1*. Ces domaines sont importants dans l'assemblage réversible des granules de stress (Harrison and Shorter, 2017). Il est important de noter que des mutations dans les gènes *FUS*, *TDP-43* ou encore *C9ORF72* associées à la SLA, pourraient induire des anomalies dans le métabolisme des granules de stress et mettre en péril l'adaptation des MNs face au stress (Aulas and Vande Velde, 2015).

#### 1.1.5.2 Transport axonal

Dans la SLA, il a été montré que des facteurs génétiques sont impliqués de perturbations de l'intégrité du cytosquelette et du transport axonal (De Vos and Hafezparast, 2017). C'est le cas de la *profilin-1* (*PFN1*) et de la *tubulin alpha-4A* (*TUBA4A*) qui sont responsables de la déstabilisation du réseau de tubulines et des déficits de transport axonal. Des mutations dans l'isoforme 5A à chaîne lourde de la kinésine 5A (*KIF5A*) pourrait altérer le transport antérograde des protéines cargos le long des

microtubules (Brenner et al., 2018). Le complexe Dynactine est un régulateur essentiel des moteurs microtubulaires et un activateur de la dynéine, une protéine associée aux microtubules et qui assure le transport vésiculaire rétrograde. Des mutations dans les sous-unités dans un gène codant pour la *dynactin1* (*DCTN1*), une sous-unité du complexe protéique Dynactine pourrait être responsable de la SLA ou de la DFT (Münch et al., 2004) (Bercier et al., 2019).

La *Stathmin-2* (*STMN2*) est une protéine associée aux microtubules exprimée spécifiquement dans les neurones. Chez l'humain, TDP-43 est nécessaire à l'expression de la protéine dans son intégralité (Baughn et al., 2023). Elle est requise pour le maintien et la régénération axonale après une blessure. Chez les souris la perte ou la diminution de l'expression de cette protéine conduit à des déficits sensoriels et moteurs, qui ressemblent à des caractéristiques phénotypiques retrouvées dans la SLA (Krus et al., 2022). Une étude publiée cette année a révélé un nouveau rôle de la *STMN2* dans la genèse et le maintien de l'organisation axoplasmique des neurofilaments qui est fondamentale pour la vitesse des axones de gros diamètres (López-Erauskin et al., 2024). En somme, ces résultats suggèrent que rétablir le niveau d'expression de la *STMN2* dans les neurones est une potentielle approche thérapeutique pour la SLA et les autres maladies neurodégénératives impliquant *TDP-43*.

#### 1.1.5.3 Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif

Le fonctionnement de la synapse, le maintien du potentiel membranaire de repos ainsi que le transport des métabolites le long de l'axone sont des processus de neurotransmission qui nécessitent un apport important en ATP. Chez certains patients symptomatiques, Boillée et al. relèvent dans des biopsies de muscles et de moelle épinière, des anomalies au niveau des mitochondries, qui comportent notamment de nombreuses vacuoles (Boillée et al., 2006). Ces anomalies causent un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, et *in fine* une faible production d'ATP et une augmentation du stress oxydatif.

#### 1.1.5.4. Excitotoxicité glutamatergique

Une hyperexcitabilité intrinsèque ou extrinsèque aux MNs est observée au niveau cortical et périphérique chez les patients SLA (Shibuya et al., 2022). Le glutamate est un

neurotransmetteur de signaux excitateurs. Lorsqu'il se lie à des récepteurs canaux ionotropiques, NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ou AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolen propionic acid), il entraîne une entrée de sodium ( $\text{Na}^+$ ) et de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et la dépolarisation du neurone. Un potentiel d'action (PA) est alors généré permettant l'activation des MNs spinaux. Dans la SLA, des altérations de mécanismes des astrocytes peuvent contribuer à augmenter le glutamate extracellulaire et avoir un impact sur les cellules du système nerveux central (SNC) et les cellules non-neuronales (voir la revue de Provenzano et al., 2023). Zuo et al. ont récemment montré que l'accumulation extracellulaire excessive de glutamate est responsable de l'activation de la caspase 3 (C3) dans les astrocytes favorisant ainsi la libération de facteurs pro-inflammatoires, tels que le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  (Zuo et al., 2023). La toxicité sélective au glutamate serait déclenchée par l'activation spécifique de certains mGluRs localisés dans la membrane astrocytaire (Torazza et al., 2023). Par ailleurs, il existerait une interaction entre le gène *AEG-1* (*astrocyte elevated gene-1*) et le transporteur de recapture du glutamate *EAAT2* (*excitatory amino acid transporter 2*) exprimé dans les astrocytes. Dans des cultures primaires d'astrocytes de souris *SOD1*<sup>G93A</sup>, *AEG-1* était surexprimé conduisant à la diminution de l'expression de *EAAT2* à la membrane par l'activation de la voie de signalisation NF $\kappa$ B (Yin et al., 2018). L'utilisation de petits ARNs interférents (siAEG-1) a permis de restaurer l'expression de *EAAT2* et ainsi la recapture du glutamate. Ces résultats suggèrent que *AEG-1* et d'autres voies de signalisation impliquant *AEG-1* doivent être investigués comme cible potentielle pour des approches pharmacologiques dans la SLA.

### 1.1.6 Pathogénèse cellulaire non-autonome

La SLA a longtemps été considérée comme une maladie intrinsèque aux MNs. Cependant, l'utilisation de différents modèles conditionnels de SLA a permis de mettre en exergue l'importance des cellules environnantes non-neuronales dans le développement et la progression de la maladie. Effectivement, la publication de résultats utilisant l'expression de différentes mutations du gène *SOD1* (*G37R*, et *G85R*), via l'utilisation de différents promoteurs tels que Thy1.2 n'ayant pas conduit à l'expression d'un phénotype de SLA, caractérisé par une dégénérescence des MNs. Plusieurs études ont montrées que la surexpression de *SOD1* mutée spécifiquement dans les neurones moteurs n'est pas

suffisante pour induire la SLA (Pramatarova et al., 2001). Cependant, il est tout de même établi que la toxicité de *SOD1* dans les MN contribue à la SLA. En 2006, Boillée et collaborateurs ont montré que des souris avec une mutation conditionnelle de *SOD1*<sup>G37R</sup> dans tout l'organisme présentent une perte de poids, une dénervation et une atrophie musculaire (Boillée et al., 2006). Les chercheurs ont utilisé le système Cre/Lox où des souris *SOD1*<sup>G37R</sup> croisées avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur motoneuronal, Islet-1. Cela induit alors une diminution du mutant *SOD1* dans les MNs qui retarde l'apparition de la SLA et étend la durée de survie des animaux. La protéine *SOD1* dans les MNs participe donc bien au déclenchement de la maladie. Une autre étude clé de Clément et al. a manipulé différentes lignées de souris avec une expression génique aléatoire en mosaïque (Clement et al., 2003). Dans cette lignée de chimère, la protéine *SOD1* a été aléatoirement exprimée dans les MNs et/ou les cellules gliales environnantes. Ceci a permis de corroborer l'importance des cellules gliales dans la SLA, puisque les MNs n'exprimant pas la protéine *SOD1* mutée ont dégénéré bien qu'ils étaient dans un environnement dont les cellules non-neuronales avoisinantes exprimaient la mutation. De ce fait, ces dernières contribuent à la mort des MNs dans la SLA. Dans un premier temps, les chercheurs dans le domaine se sont tout d'abord intéressés à l'étude de la contribution des cellules voisines des MNs, puis la question d'une potentielle atteinte périphérique a été amenée dans les recherches sur la SLA. Notamment, le rôle actif ou passif du muscle dans la SLA a fait l'objet de nombreuses questions dont nous tenterons de répondre dans ce mémoire.

#### 1.1.6.1 Cellules gliales du système nerveux central

Les microglies, astrocytes et oligodendrocytes constituent les cellules gliales majeures du système nerveux central. L'activation de ces cellules conduit à un processus immunitaire appelé neuroinflammation. Les premières études sur la contribution de la neuroinflammation dans la SLA ont conduit à la découverte d'une augmentation du taux de prostaglandines E2 dans le liquide céphalorachidien des patients (Almer et al., 2002). Dix ans plus tard, la neuroinflammation fut observée dans les tissus post-mortem de patients et de souris atteints de SLA (Corcia et al., 2012) (Brites and Vaz, 2014). Un lien entre les trois types cellulaires a donc été émis dans la SLA.

#### 1.1.6.1.1 Les microglies

Les microglies sont les cellules immunitaires résidentes du SNC. Ces cellules vont être en mesure de maintenir l'homéostasie neuronale en fonction des récepteurs et des cytokines qu'elles expriment. Dans la SLA, il a été montré qu'un stade pro-inflammatoire délétère est présent en fin de maladie, suivi d'un transfert vers un état anti-inflammatoire (Liao et al., 2012). Cependant, ce concept semble être à présent controversé (Ransohoff, 2016). La neuroprotection est donc réduite dans les derniers stades de la maladie, laissant ainsi la place à l'inflammation. Effectivement, une altération de la libération de cytokines, une surexpression des marqueurs microgliaux de présentation antigène (C11c, ICAM-1, Iba1) a été reportée chez des souris présentant une mutation *SOD1* en fin de maladie (Corcia et al., 2012) (Henkel et al., 2004) (Henkel et al., 2006) (Nguyen et al., 2001). L'implication de la microglie a également été caractérisée à l'aide d'un knock down de *SOD1* dans les cellules microgliales. Pour cela, des souris présentant une mutation conditionnelle de *SOD1*<sup>G37R</sup> dans tout l'organisme ont été croisées avec des souris exprimant la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur CD11b. La réduction spécifique du gène *SOD1* a diminué la toxicité microgliale et a rallongé la survie des animaux de 99 jours, sans toutefois affecter l'apparition de la maladie (Boillée et al., 2006). En 2016, El Oussini et collaborateurs ont rapporté une partie de la physiopathologie liée aux microglies (El Oussini et al., 2016). Lors d'une étude focalisée sur le rôle du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> dans la SLA, il a été montré que l'expression de ce récepteur 5-HT<sub>2B</sub> affecte la progression de la SLA aussi bien chez les patients que les souris. Ce récepteur est surexprimé dans les microglies et est requis pour l'activation des phagocytes mononucléaires pendant la maladie. L'absence du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> est alors associée à la dégénérescence des phagocytes mononucléaires de la moelle épinière et une accélération de la progression de la maladie, mais ne change son apparition. Ces récepteurs pourraient donc jouer un rôle important dans la progression de la SLA.

#### 1.1.6.1.2 Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes du SNC. Ils participent au soutien des neurones en favorisant leur approvisionnement en nutriments et en limitant

la toxicité du milieu extracellulaire, notamment par un mécanisme de recapture du glutamate. Ce type cellulaire joue aussi un rôle non négligeable dans la SLA. Dans un contexte pathologique, les astrocytes réactifs peuvent adopter un phénotype pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire en libérant des facteurs spécifiques qui modulent l'activation microgliale. Dans la SLA, il a été montré que la surexpression de *SOD1* mutée spécifiquement dans les astrocytes conduit à la mort des MNs spinaux (Nagai et al., 2007), alors que l'excision spécifique du mutant *SOD1<sup>G37R</sup>* spécifiquement dans les astrocytes permet un ralentissement de la progression de la maladie (Yamanaka et al., 2008). Il a également été montré que l'implantation d'astrocytes de patients SLA au niveau de la moelle épinière lombaire de souris sauvages entraîne l'atrophie des MNs spinaux, la formation d'inclusions protéiques, ainsi qu'une importante dénervation (Qian et al., 2017).

#### 1.1.6.1.3 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules myélinisantes du SNC. Elles sont responsables de la formation de la gaine de myéline qui recouvre les axones. Chez les patients SLA, on constate une pâleur myélinique due à une myéline moins compacte et qui présente moins de lipides, ainsi qu'à une perte du nombre de fibres musculaires (Hayashi et al., 2001). Chez les modèles murins de SLA, on constate une modification de la structure des oligodendrocytes dans la moelle épinière des souris mutantes *FUS* (Scekic-Zahirovic et al., 2017). Kang et al. ont aussi montré que l'élimination spécifique de la mutation *SOD1<sup>G37R</sup>* dans les oligodendrocytes retarde l'apparition de la maladie sans affecter sa progression une fois déclenchée et diminue la réactivité microgliale (Kang et al., 2013).

#### 1.1.6.1.4 Cellules gliales du système nerveux périphérique

Les cellules de Schwann sont les cellules gliales que l'on retrouve au niveau du système nerveux périphérique (SNP). Il en existe deux types : les cellules de Schwann axonales et les cellules de Schwann non-myélinisantes dites pérисynaptiques (CSPs) ou terminales (voir les revues de littérature suivantes (Todd et al., 2006) (Griffin and Thompson, 2008) (Ko and Robitaille, 2015)). Une section complète sur l'élément glial synaptique sera décrite subséquemment (voir section 1.2.2.3). Les cellules de Schwann axonales ont une fonction semblable aux oligodendrocytes mis à part qu'elles s'enroulent

spécifiquement autour d'un seul et unique axone. L'implication de ces cellules dans la SLA est controversée. Une étude a rapporté des perturbations myéliniques dans le SNP et l'excision de la mutation *SOD1<sup>G37R</sup>* dans ces cellules accélère la progression de la maladie (Lobsiger et al., 2009). Or, un an plus tard, il a été révélé que l'accumulation de *SOD1<sup>G93A</sup>* dans les CSPs n'est pas pathologique; et sa surexpression spécifique ne conduit pas à la perte de MNs, ni à phénotype moteur (Turner et al., 2010).

## **1.2 Jonction Neuromusculaire**

La synapse correspondant au contact anatomique et fonctionnel qui s'effectue entre la terminaison nerveuse d'un motoneurone et une région de la fibre musculaire striée squelettique est appelée la jonction neuromusculaire (JNM). Dans ce mémoire, nous nous focaliserons sur la JNM des vertébrés, qui, du fait de sa grande taille et de sa simplicité apparente, se présente comme un modèle propice à l'exploration des processus de synaptogénèse (Engel, 2008). Le développement de la JNM fait intervenir une communication dynamique via différents processus de signalisation réciproques entre les différents acteurs qui l'entourent et son organisation et ses propriétés synaptiques sont hautement structurées. Toute perturbation ou dysfonctionnement de la JNM survient dans un large spectre de maladies neuromusculaires, où notamment la SLA en fait partie.

### **1.2.1 Rôle de la JNM dans la SLA**

La JNM représente un site primaire de vulnérabilité dans la SLA, où une altération musculaire différentielle survient au sein de celle-ci. Plusieurs articles fondateurs ont mis en évidence que la destruction de la JNM est un évènement pathologique précoce qui survient avant la perte des axones des MNs dans la moelle épinière (Pun et al., 2006) (Fischer et al., 2004) (Frey et al., 2000) (Hegedus et al., 2007). En effet, des altérations précoces et durables aux JNMs ont été mises en évidence chez des souris ainsi que des patients atteints de SLA. Les différents acteurs et les mécanismes pathophysiologiques impliqués dans le maintien et la stabilité de la JNM font donc l'objet d'études intensives.



### 1.2.1.1 Notion d'unité motrice

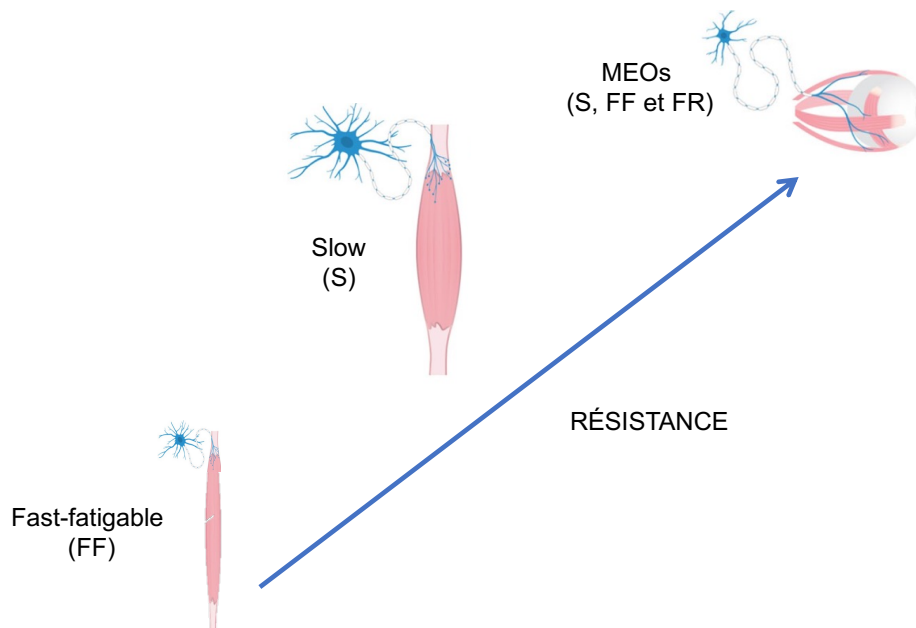
Les MNs  $\alpha$  sont responsables de la contraction musculaire et sont particulièrement susceptibles à la dégénérescence dans la SLA (Conradi and Ronnevi, 1993). L'unité motrice (UM), initialement décrite et définie en 1925 par Sherrington et Liddell, comme la « voie finale commune » de toute action motrice est l'ensemble formé par le MN  $\alpha$  et les fibres musculaires (cellules musculaires) qu'il innerve (Liddell and Sherrington, 1925) (Kanning et al., 2010). Chaque UM est composée d'un seul type de fibres musculaires alors que le muscle au complet comporte plusieurs types d'unités motrices. Il est important de noter que les propriétés électriques et morphologiques des MNs ainsi que les propriétés métaboliques et de contractions des fibres musculaires sont des facteurs qui dépendent de l'ordre de recrutement des UMs et de leur taille (Burke et al., 1973). En effet, il est possible de différencier trois types d'UMs en fonction de la fatigabilité et de de la vitesse de contraction de leurs fibres : les UMs lentes (*slow*, S), les UMs rapides et fatigables (*fast-fatigable*, FF), et les UMs rapides et résistantes à la fatigue (*fast-resistant*, FR) (Purves, 2001) (Valdez et al., 2012). Somme toute, la perte des JNMs est un évènement qui survient en amont de celle des MNs dans la SLA. Cependant, la dénervation de ces synapses musculaires périphériques n'est pas uniforme; certaines JNMs seraient plus susceptibles, alors que d'autres seraient résistantes.

### 1.2.1.2 Vulnérabilité différentielle des UMs

Toutes les jonctions neuromusculaires n'ont pas une susceptibilité identique à la dénervation. Dans différents modèles murins de maladie du motoneurone, des études ont permis de mettre en évidence l'existence d'une vulnérabilité sélective des UMs de type FF (Fischer et al., 2004) (Frey et al., 2000) (Pun et al., 2006). Frey et al. ont observé au sein du muscle triceps une perte précoce des JNMs chez la souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, localisée dans les régions musculaires contenant des fibres de type IIb (synapses de type FF), suivi de la perte des JNMs dans les régions synaptiques des fibres IIa (synapses de type FR). Les UMs de type S semblaient au contraire particulièrement résistantes au processus de dénervation (Pun et al., 2006). Par ailleurs, dans ce même modèle animal, une équipe a constaté une diminution de 40% du nombre de JNMs innervées dès le 30<sup>ème</sup> jour de vie de l'animal, et cette dénervation précoce était déjà associée à une altération des fonctions motrices

(Vinsant et al., 2013). D'autres travaux sont venus apporter des éléments supplémentaires, corroborant l'atteinte sélective et précoce des UMs de type FF. Des enregistrements des propriétés électrophysiologiques contractiles de fibres individuelles (Atkin et al., 2005) (Bączyk et al., 2022) et des marquages immunohistochimiques ont confirmés la perte des UMs FF de manière synchrone et rapide décelable avant même l'apparition des symptômes (Hegedus et al., 2007).

Les JNMs ont une vulnérabilité différentielle à la dénervation dans la SLA. De manière intéressante, la vulnérabilité des JNMs à la dénervation est hautement corrélée au sous-type d'UM, où les UMs aux propriétés rapidement fatigable (FF) sont les plus vulnérables dans la SLA (**Figure 4**) À l'extrême de ce spectre, une étonnante observation est la conservation de l'intégrité structurale des JNMs des MEOs (Nijssen et al., 2017) (Pedrosa Domellöf, 2020) permettant aux patients de communiquer avec leur yeux grâce à des dispositifs de suivi oculaire. En effet, la fonction des MEOs et l'innervation des JNMs sont bien préservées dans la plupart des cas chez l'humain (Ahmadi et al., 2010) (Sharma, 2011) et dans les modèles animaux (Comley et al., 2016) (Nijssen et al., 2017).



**Figure 4.** Schéma illustrant la vulnérabilité sélective des UMs dans la SLA. Certaines UMs seraient plus vulnérables au processus de dénervation que d'autres. En effet, les UMs de type FF (*Fast-Fatigable*) sont les plus vulnérables au processus de dénervation, suivies des UMs de type FR (*Fast-resistant*) et S (*Slow*). À l'extrémité du spectre, on retrouve les MEOs, composés de l'ensemble des UMs cités qui sont préservés et résistants dans la SLA.

### 1.2.1.3 Les muscles extraoculaires (MEOs)

Les MEOs sont les effecteurs pour la motilité oculaire et ont des propriétés physiologiques qui les séparent des autres muscles du corps humain, de par leur résistance particulière dans les dystrophies musculaires (Domellöf, 2012).

#### 1.2.1.3.1 Neuroanatomie, physiologie et physiopathologie des muscles oculomoteurs

Le globe oculaire est divisé en six muscles oculomoteurs permettant la mobilisation du bulbe de l'œil dans les différentes directions de la vision. Il existe quatre muscles droits extraoculaires (médial, supérieur, latéral et inférieur) et deux muscles obliques (supérieur et inférieur). Il est à noter qu'à ces six muscles, on ajoute aussi le muscle releveur de la paupière supérieure et la motricité de la pupille et de l'accommodation. La commande nerveuse est volontaire ou réflexe et est véhiculée par les trois paires de nerfs crâniens suivantes : III (oculomoteur), IV (trochléaire) et VI (abducens). Les noyaux des nerfs oculomoteurs sont localisés dans le tronc cérébral.

Les muscles droits ont une origine commune : l'anneau tendineux de Zinn. Chaque muscle se transforme en un tendon large d'environ 10mm de couleur blanc nacré et se termine au niveau d'une structure blanchâtre appelée la sclère. Les muscles obliques quant à eux, s'attachent à l'os médial de l'orbite. Le muscle oblique supérieur est le plus long des MEOs, c'est un muscle digastrique; contrairement au muscle oblique inférieur qui est le plus court et le seul qui ne prend pas son origine au sommet de l'orbite. Chaque MEO est entouré d'une gaine très fine formant un manchon cellulo-fibreux que l'on appelle un fascia musculaire.

Pour effectuer des mouvements oculaires bilatéraux (conjugés des deux yeux), il faut une coordination des muscles latéraux et médiaux. La vision binoculaire est permise grâce à la synergie d'action entre les MEOs : chaque muscle possède un antagoniste homolatéral et un synergiste (agoniste) controlatéral. Ainsi, par exemple, le gauche latéral gauche a comme antagoniste le gauche médial gauche et comme agoniste le gauche médial droit. Cette synergie est réglée par les lois d'Herring et Sherrington (Hung and Ciuffreda, 2002).

#### 1.2.1.3.2 Spécificités des UMs des MEOs

Les MEOs sont fortement innervées et leurs UMs sont très petites, entre 7 et 25 fibres musculaires, contrairement aux UMs des muscles des jambes qui en contiennent près d'une centaine. La majorité des fibres nerveuses sont larges et myélinisées. Les fibres musculaires des MEOs sont relativement petites et ont une composition assez complexe en regard de la majorité des protéines qui déterminent la force contractile et la vitesse des fibres (Rodríguez et al., 2018) (Pedrosa Domellöf, 2020). Par ailleurs, les MEOs diffèrent des autres muscles striés (Spencer and Porter, 2006) (Fischer et al., 2002)

Les MEOs ont une composition unique et la diversité de leurs UMs en font des muscles remarquablement bien préservés jusqu'aux derniers stades de la maladie chez les patients donneurs et les modèles animaux de la SLA.

#### 1.2.1.3.3 Atteinte retardée des MEOs dans la SLA

Les MNs extraoculaires et les JNMs montrent une résistance particulière contrairement à ceux des muscles des jambes ou du tronc (Ahmadi et al., 2010) (Nijssen et al., 2017) (Comley et al., 2016) (Valdez et al., 2012). Les MEOs maintiennent l'intégrité de leurs NMJs. Notamment, cette résistance a été attribuée aux différences d'expression de multiples protéines calciques tampons dans les corps cellulaires de MNs extraoculaires (Alexianu et al., 1994), alors que d'autres ont reportés une expression différentielle de leurs récepteurs synaptiques suggérant une plus faible vulnérabilité à l'excitotoxicité par rapport aux neurones moteurs spinaux (Brockington et al., 2013) (Comley et al., 2016). Cependant, au niveau de la JNM, les facteurs contribuant à leur préservation sont encore inconnus. De manière intéressante, ce sont les protéines gliales à la JNM qui ont montrées une expression différentielle (ex. S100 $\beta$ , GDNF) (Harandi et al., 2014) (Liu et al., 2013). De plus, les fonctions motrices des muscles oculomoteurs, telles que les saccades et la poursuite lente des mouvements ont été reportées comme étant affectées chez la patients SLA avec une tendance plus importante ceux ayant une atteinte bulbaire que ceux ayant une atteinte spinale (Donaghy et al., 2010) (Kang et al., 2018). Par ailleurs, comme mentionné précédemment dans ce mémoire, les propriétés des CSPs aux JNMs des muscles vulnérables sont altérées dans la SLA (Arbour et al., 2015) (Perez-Gonzalez et al., 2022), mais cette observation n'est pas retrouvée aux MEOs résistants (Provost, F, 2020

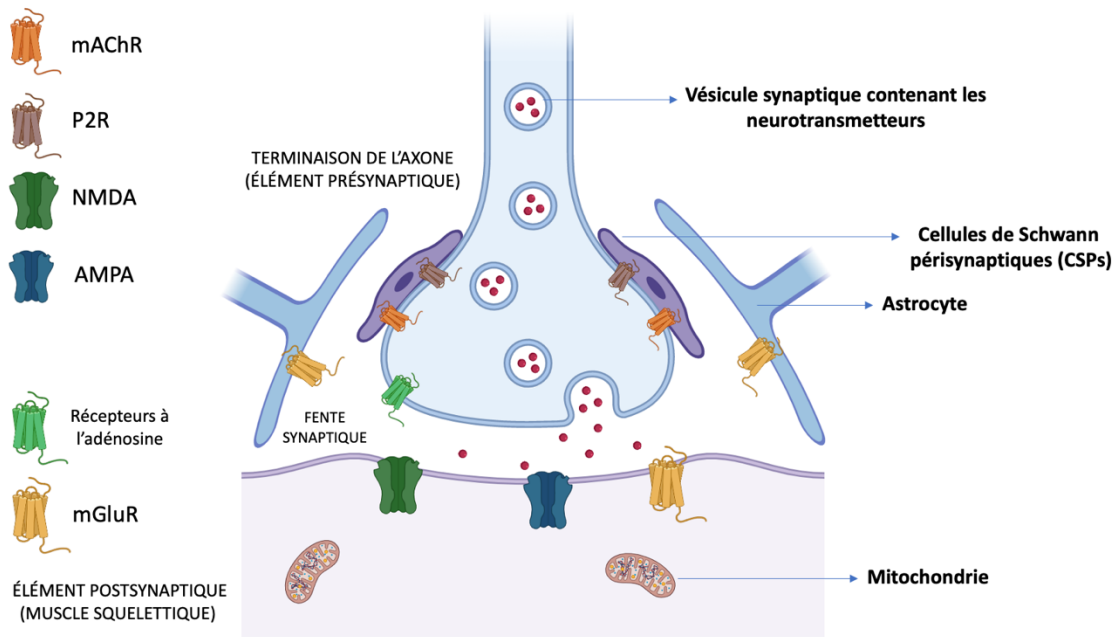
[Mémoire de maîtrise, Université de Montréal]). L'élément glial serait donc tributaire de cette résistance au processus de dénervation ? Dans les sections suivantes, nous aborderons la structure et le rôle de la JNM avec la contribution des CSPs dans les fonctions de la JNM et leur implication dans la SLA.

### 1.2.2 Structure et fonction de la JNM

La JNM opère en tant que synapse chimique dans le SNP et joue un rôle fondamental dans la transmission de l'information entre le système nerveux et les muscles squelettiques pour générer le mouvement (Jones et al., 2017). La JNM partage de nombreuses similarités avec les synapses chimiques retrouvées dans le système nerveux central (SNC). Plusieurs des principes fondamentaux gouvernant la structure et le fonctionnement synaptique ont été découverts en utilisant les JNMs comme cible dans des modèles expérimentaux (Jahromi et al., 1992) (Robitaille, 1998) (Todd et al., 2010) (Slater, 2015). Des études se sont d'ailleurs intéressées aux JNMs dans le contexte du contrôle de la plasticité synaptique chez la drosophile (Newman et al., 2017) ainsi qu'au déclin lié à l'âge (Liu et al., 2017).

#### 1.2.2.1 Concept de synapse tripartite

La jonction neuromusculaire (JNM) est le site au niveau duquel l'influx nerveux arrive au niveau du muscle squelettique et provoque sa contraction. La JNM est une synapse chimique dite tripartite (Araque et al., 1999) (Panatier and Robitaille, 2012), composée d'un élément pré- (terminaison axonale du MN) et postsynaptique (récepteurs nicotiques sur la fibre musculaire) et également d'un élément glial, les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs) (**Figure 5**).



**Figure 5.** Représentation schématique de la JNM, une synapse tripartite. Cette synapse est composée d'un élément pré-synaptique (la terminaison axonale), post-synaptique (la fibre musculaire), et un élément glial (la CSP). La synapse est englobée par un compartiment astrocytaire. Notons encore la présence des récepteurs présents dans chacune des composantes synaptiques (légende à gauche de l'image).

### 1.2.2.2 Éléments pré- et postsynaptiques

#### 1.2.2.2.1 Structure et organisation de la terminaison axonale

La terminaison axonale du motoneurone correspond à l'élément pré-synaptique. Elle est dépourvue en gaine de myéline et forme le bouton terminal. L'acétylcholine (ACh), support de la communication trans-synaptique est le neurotransmetteur clé de la JNM. Il est synthétisé dans le cytoplasme du bouton terminal à partir de la choline et de l'acétylcoenzyme A grâce à une enzyme appelée la choline acétyltransférase (ChAT). Elle est ensuite entreposée dans les vésicules synaptiques, qui sont transportées le long de l'axone et sont stockées dans la terminaison axonale du MN (Harlow et al., 2013). L'arrivée d'un potentiel PA provoque l'ouverture des canaux calciques voltages dépendants conduisant à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'espace pré-synaptique. L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$

intracellulaire déclenche la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane de l'axone, et la relâche de l'ACh dans la fente synaptique, un processus appelé exocytose. La fusion des membranes vésiculaires avec celle de la membrane postsynaptique est permise grâce à un complexe moléculaire appelé SNARE (en anglais, *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptors*) (El Far and Seagar, 2011). Dans ce complexe, on retrouve des protéines vésiculaires telles que la synaptotagmine et la synaptobrevine, cette dernière étant particulièrement sensible au  $Ca^{2+}$ . Somme toute, la terminaison axonale est hautement structurée et contient des compartiments fonctionnels bien distincts au sein desquels on retrouve les vésicules synaptiques, dont leurs contenus répondent aux besoins et à l'efficacité de la synapse.

#### 1.2.2.2.2 Libération de neurotransmetteurs à la JNM

Les premières découvertes à la JNM chez la grenouille ont révélés que l'ACh et l'ATP sont les deux NTs à être synthétisés et libérés à la terminaison axonale (Redman and Silinsky, 1994). Si un nombre suffisant de neurotransmetteurs (NTs) se lie aux récepteurs nicotiques (nAChRs) de la membrane post-synaptique, ceci provoque l'entrée d'ions  $Na^+$  et la membrane se dépolarise. Cette activité spontanée provoque de petites dépolarisations de la membrane de la fibre musculaire (dont l'amplitude est inférieure à 1mV) que l'on appelle potentiel de plaque motrice miniature (PPMm) (Fatt and Katz, 1952). Au regard de la terminaison nerveuse se trouve le sarcolemme de la fibre musculaire, qui adopte une forme caractéristique : il forme de profonds replis fonctionnels augmentant la surface de contact synaptique (Hall and Sanes, 1993) (Martyn et al., 2009). Quand la sommation des PPMm atteint une amplitude suffisante, des canaux sodiques ionotropiques voltages-dépendants localisés dans les replis du sarcoplasme s'ouvrent, ce qui permet ainsi la dépolarisation de la membrane musculaire, et la genèse d'un potentiel de plaque (EPP, en anglais *end-plate potential*) qui se propage à travers le muscle. La liaison de l'ACh à son récepteur est réversible, ce qui permet au NT de se dissocier avant d'être hydrolysé en choline; cette dernière est recyclée par la terminaison axonale et utilisée pour synthétiser à nouveau de l'ACh.

### 1.2.2.3 Élément glial : les cellules de Schwann périssynaptiques

À la JNM des vertébrés, la terminaison nerveuse est coiffée par une cellule gliale non myélinisante du SNP : la cellule de Schwann terminale ou cellule de Schwann périssynaptique (CSP) (Corfas et al., 2004). Les CSPs ont pour origines la cellule souche des crêtes neurales et terminent leur différenciation une fois établie à la JNM. Les CSPs ont plusieurs fonctions principales à la JNM que nous décrirons ci-après.

#### 1.2.2.3.1 Description et rôles

Les CSPs sont des cellules de Schwann non myélinisantes (Sugiura and Lin, 2011) (Corfas et al., 2004), dont leur nombre est positivement corrélé avec l'aire qu'elles recouvrent selon la taille des JNMs (principe de taille). On trouve en moyenne 4 à 5 CSPs sur une JNM adulte de muscle Soleus (SOL) de souris (Love and Thompson, 1998). C'est au cours du développement embryonnaire que leur devenir de cellules de Schwann axonales ou terminales est établi (Darabid et al., 2013). À la JNM, les CSPs joueraient un rôle dans le maintien fonctionnel et morphologique de la JNM ainsi que de sa réparation en cas de dénervation (Ko and Robitaille, 2015).

#### 1.2.2.3.2 Maintien/réparation, régulation et fonction synaptique à la JNM

Premièrement, la CSP participe à la **stabilité** de la synapse neuromusculaire. Après stimulation présynaptique, la CSP mature est capable de détecter la libération de NTs car elle possède des récepteurs muscariniques (mAChRs) (M1, M3 et M5), purinergiques (récepteurs Adénosine 1) et couplés aux protéines G (RCPG, en anglais, *G protein-coupled receptors*) (Rochon et al., 2001) (Wright et al., 2009). La liaison des NTs aux récepteurs de la CSP induit l'activation d'une voie de signalisation dépendante de la protéine kinase C (PKC) et de l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et conduit à l'augmentation des taux intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> dans la CSP. Une augmentation de la libération d'ACh par la terminaison axonale entraîne une activation soutenue des mAChRs qui ferait la promotion d'un phénotype glial favorisant la stabilité des JNMs. À l'inverse, une faible activation des mAChRs, via la diminution de la relâche d'ACh conduirait à des changements phénotypiques de la CSP, mais aussi dans l'expression génique, priorisant la réparation de la JNM (Georgiou et al., 1999) (Georgiou et al., 1994) (Son and Thompson, 1995a,b). Le



niveau d'activation des CSPs semblent jouer un rôle clé dans le devenir de la JNM (maintien vs réparation) (Ko and Robitaille, 2015). Ce concept sera discuté plus en détails dans la section 1.2.2.4.6. Reddy et ses collaborateurs ont aussi notés des modifications morphologiques des JNMs compromettant leur stabilité (Reddy et al., 2003). Puisque l'ablation des CSPs à la JNM de grenouille a conduit à la dénervation de la JNM, la diminution du nombre de CSPs pourrait compromettre la stabilité des JNMs. Ainsi, ces résultats sous-tendent que la CSP est non seulement critique pour la formation de la JNM, mais elle est aussi essentielle à sa maintenance à long terme.

Deuxièmement, la CSP participe à la régulation de la fonction synaptique à la JNM. La JNM des vertébrés est hautement plastique, c'est-à-dire qu'elle a la capacité de réagir aux dommages et aux blessures et de s'adapter à divers changements synaptiques, tels que des changements de sensibilité muscarinique (voir la section 1.2.2.4.6), mais aussi elles sont capables de modifier leur réponse calcique. De manière intéressante, l'activité calcique des CSPs ne dépend pas seulement de l'activité présynaptique et de la relâche de NTs, mais également de leurs propriétés intrinsèques (Arbour et al., 2015). La stimulation à haute fréquence de la terminaison axonale du nerf moteur conduit à l'élévation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  dans les CSPs. La régulation des niveaux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire est importante pour le contrôle de la transmission synaptique; cette dernière régulée par les cellules gliales. L'activation des CSPs qui intervient dans la régulation de l'efficacité synaptique est différente à celle observée chez les neurones puisqu'elle est dépendante de l'élévation en  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Castonguay and Robitaille, 2001). En effet, dans cette étude, les chercheurs se sont intéressés à la modulation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire des CSPs et ont conclu que ces dernières jouent un rôle dans la modulation de la transmission synaptique. Un des types de canaux intracellulaires responsable de la libération du  $Ca^{2+}$  stocké dans le réticulum sarcoplasmique est les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3R$ ). L' $IP_3$  est un second messenger intracellulaire utilisé pour libérer le  $Ca^{2+}$  des réserves internes. L'injection d' $IP_3$  et d'un chélateur de  $Ca^{2+}$ , le BAPTA, ont conduit respectivement à accentuer la libération de NTs et à augmenter la dépression synaptique (Castonguay and Robitaille, 2001). Ainsi, cette étude atteste l'implication des CSPs dans la potentialisation de la transmission synaptique. Par ailleurs, Reddy et al. ont effectués des expériences d'ablations des CSPs *in vivo* chez les amphibiens, et ont aussi observés des changements

de la régulation de la fonction synaptique avec une diminution de 50% de la transmission synaptique.

Troisièmement, la CSP contrôle la plasticité synaptique. En condition pathologique, par exemple après la lésion d'un nerf périphérique, les terminaisons nerveuses dégénèrent et la CSP subit un changement phénotypique, où elle va notamment changer son expression génique en surexprimant la *GFAP* (Georgiou et al., 1999) (Georgiou et al., 1994). Elle participe au processus de phagocytose et élimine les débris issus des terminaisons nerveuses en dégénérescence. Peu de temps après la dénervation de la JNM, la CSP est capable d'établir des contacts avec d'autres CSPs aux JNMs innervées sur lequel un bourgeonnement de la terminaison nerveuse est guidé (Son and Thompson, 1995a) (Son and Thompson, 1995b). Ces contacts sont appelés ponts gliaux et permettent d'induire un bourgeonnement de la terminaison axonale (en anglais, *sprouting*). Les CSPs guideront ensuite cette terminaison vers la JNM dénervée (Son and Thompson, 1995a) (Son and Thompson, 1995b).

#### 1.2.2.3.3 Contribution des CSPs dans la SLA

Plusieurs études ont montré que le développement et la progression de la SLA dépendent des interactions entre les neurones et leurs cellules environnantes (Wang et al., 2012) (Sun et al., 2015). Du fait de leurs multiples rôles à la JNM, il est important de considérer les CSPs comme des partenaires actifs pour mieux comprendre comment se comporte la JNM dans la SLA. Fonctionnellement, l'amplitude des réponses calciques des CSPs est corrélée avec la différence de force synaptique entre les terminaisons axonales (Darabid et al., 2013). Lorsque les CSPs interagissent avec des terminaisons axonales de forces synaptiques différentes, elles génèrent des réponses calciques d'amplitudes différentes (Rousse et al., 2010) (Darabid et al., 2013). Cependant les différences d'amplitudes des réponses calciques sont à l'origine d'un manque de discernement des CSPs qui occasionne des altérations dans la régulation de leurs fonctions à la JNM (Arbour et al., 2015) (Perez-Gonzalez et al., 2022). La capacité des CSPs à décoder l'environnement est cruciale pour la première étape des processus de réparation, soit de détecter l'état d'innervation. Cette mauvaise capacité de détection serait responsable du développement et de la progression de la maladie.

#### 1.2.2.3.4 Importance des mAChRs des CSPs

L'activation des mAChRs régule le programme génétique des CSPs et leur permet d'assurer la stabilité et le bon fonctionnement des JNMs (Ko and Robitaille, 2015). Cependant, ce signal muscarinique est réduit durant la formation postnatale de la JNM, aux JNMs dénervées et en cours de réinnervation, ce qui permet l'expression des gènes requis pour la réparation des JNMs et ainsi la régulation des processus de dénervation et réinnervation (Perez-Gonzalez et al., 2022). En revanche, des études du laboratoire ont démontré que l'activation muscarinique des CSPs était nettement augmentée (et non réduite) aux JNMs d'un modèle murin de SLA (*SOD1<sup>G37R</sup>*), que ce soit aux JNMs innervées ou dénervées (Martineau et al., 2018) (Arbour et al., 2015) (Perez-Gonzalez et al., 2022). Cette hyperexcitabilité est associée à plusieurs réactions inadéquates des CSPs conduisant à une régulation inappropriée des processus de dénervation et réinnervation. De manière importante, des données préliminaires du laboratoire montrent que l'hyperexcitabilité des mAChRs des CSPs n'est pas observée aux JNMs résistantes. En effet, l'imagerie calcique des CSPs des JNMs des MEOs des souris *SOD1<sup>G37R</sup>* confirment qu'elles possèdent une sensibilité normale (même niveau de réponse que les souris WT) aux agonistes Muscarine et ATP (voir Chapitre 3 – Résultats). Par ailleurs, une étude préclinique réalisée dans le laboratoire a démontré que le blocage pharmacologique des mAChRs par la Darifenacin, un antagoniste sélectif des mAChRs de type 3, améliore significativement l'état d'innervation neuromusculaire, les fonctions motrices, et la survie des JNMs, des MNs et prolonge l'espérance de vie des animaux (Tremblay et al., *in preparation*). Cela démontre l'importance du rôle des CSPs et du niveau d'activation de leurs mAChRs dans la régulation de l'innervation des JNMs dans la SLA.

## 1.4 Hypothèse et buts du mémoire

La SLA est une maladie neurodégénérative se caractérisant par la dégénérescence des MNs et la destruction des JNMs, qui est un événement inéluctablement précoce. Les cellules gliales contribuent grandement au développement et à la progression de la pathologie (Boillée et al., 2006)(Clement et al., 2003) (Yamanaka et al., 2008). Les CSPs, cellules gliales terminales à la JNM, assurent de nombreux rôles essentiels afin de

promouvoir l'efficacité et la réparation de la JNM (Ko and Robitaille, 2015). En outre, l'excitabilité des mAChRs des CSPs est un indicateur clé de l'état d'innervation et du devenir de cette synapse tripartite. Les précédents résultats obtenus dans le laboratoire confirment la présence d'une hyperactivité des mAChRs aux stades présymptomatiques (P180-P380) et qui persiste lorsque la maladie progresse (P450) chez les souris *SOD1<sup>G37R</sup>*. Ce phénotype ne permet pas à la CSP de détecter correctement l'état d'innervation de la JNM et de procéder à sa réparation (Arbour et al., 2015) (Arbour et al., 2017). De manière intéressante, aucun signe d'hyperexcitabilité muscarinique n'est présent aux CSPs des JNMs des MEOs, ce qui contribuerait potentiellement à leur résistance dans la SLA (Provost, F, 2020 [Mémoire de maîtrise, Université de Montréal]). Ainsi, moduler spécifiquement l'activité des CSPs des MEOs en augmentant l'expression des mAChRs devrait compromettre cette résistance et induire des altérations morphologiques tels que des signes de dénervation partielle et des désordres gliaux.

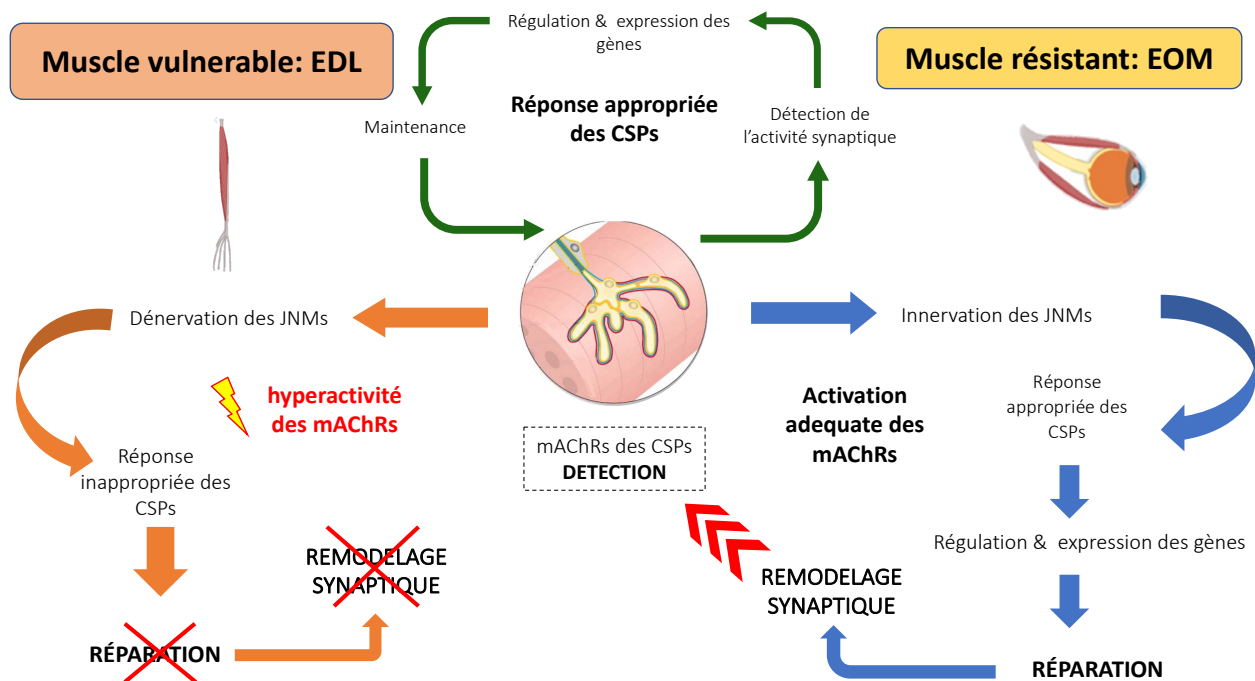
Étant donné l'importance des CSPs à la JNM, nous proposons l'hypothèse générale suivante :

**L'activité muscarinique des CSPs contribuent à la vulnérabilité différentielle des JNMs observée dans la SLA.**

Dans ce mémoire, nous proposons deux objectifs afin de tester cette hypothèse :

Objectif 1 : Caractérisation de la signature muscarinique des CSPs aux JNMs d'un muscle vulnérable (*Extensor Digitorum Longus*, ou EDL).

Objectif 2 : Modulation spécifique des CSPs du muscle vulnérable EDL, versus celle du résistant (Muscle extraoculaire, MEO).



**Figure 6.** Schéma présentant les mécanismes potentiels responsables de la résistance des MEOs. Adaptée de Njissen et al., Acta Neuropathologica (2017). Creative Common Attribution 4.0 International License (CC-BY).

Une combinaison de diverses méthodes a été employée afin d'évaluer l'excitabilité des CSPs (imagerie calcique) et leur modulation (stratégies virales) ainsi que les propriétés morphologiques des JNMs (immunohistochimie).

Dans ce mémoire, j'ai procédé à toutes les expériences impliquant les techniques mentionnées ci-haut. J'ai analysé et interprété les résultats et j'ai monté les figures. Dr. Richard Robitaille a participé à l'élaboration du projet et des expériences et à la relecture et corrections de ce présent mémoire.

## **Chapitre 2 - Matériel et Méthodes**

### **2.1 Animaux**

#### **2.1.1 Modèle murin utilisé**

Dans les expériences présentées dans ce mémoire, nous avons utilisé un modèle de souris mâles porteuses du gène humain *SOD1* avec une mutation *G37R* (remplacement d'une glycine par une arginine en position 37) (*SOD1<sup>G37R</sup>*) obtenues au Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) et élevées dans notre animalerie sous le fond génétique C57BL/6. Spécifiquement, la lignée 29 utilisée se caractérise par l'expression de deux copies du gène humain. L'expression anormale de la protéine *SOD1* cause des altérations cellulaires conduisant à l'apparition de déficiences motrices observée dans la SLA, notamment un affaiblissement et une paralysie progressive des muscles des membres supérieurs et inférieurs dues à la mort des motoneurones de la moelle épinière (Tremblay et al., 2017).

#### **2.1.2 Stade et progression de la SLA**

Le génotypage de chaque souris a été effectué par le prélèvement d'un échantillon de la queue et l'amplification du gène humain *SOD1* par PCR. Les biopsies ont été collectées immédiatement après le sevrage des animaux, soit entre 21 et 30 jours post natal. Les souris n'exprimant pas le gène muté ont été utilisées comme souris contrôle (WT).

Le modèle murin utilisé résume l'ensemble des propriétés de la maladie humaine de la SLA et se distingue par une apparition tardive des symptômes ainsi qu'une progression lente de la maladie. Pour éviter toute ambiguïté associée aux différences liées au genre, des souris mâles ont été uniquement utilisées pour l'étude présentée. Comme publié précédemment par Tremblay, Martineau et al., 2017, la médiane d'âge d'apparition des symptômes est observée à environ P420-460. Différents stades de la maladie ont alors été établis. Le stade présymptomatique se situe de P0 à P380 et se décrit comme une période où s'opère de nombreuses altérations morphologiques. Durant cette période, les souris ne présentent aucun signe de perte de poids et aucun symptôme moteur. À la suite de l'apparition de la maladie, un stade symptomatique précoce est observé. À ce second stade, les animaux ont perdu environ 10% de leur masse et présentent certains symptômes

moteurs tels qu'une perte de réflexe d'extension des membres inférieurs et un déficit de la marche. Ce stade est observé vers P420. Comme proposé précédemment, nous référons l'apparition de la maladie (onset) au pic de la courbe de poids de l'animal (Boillée et al., 2006). Cet âge coïncide également avec le début de rétractation des axones des synapses neuromusculaires. Pour l'ensemble des expériences présentées, l'apparition de la maladie a été évalué avec précaution chaque semaine par la pesée des animaux et l'observation des performances motrices, incluant la présence de tremblements et la perte de réflexes d'extension des pattes arrière. La fragilité et l'état des préparations neuromusculaires ne nous a pas permis l'utilisation d'animaux après l'apparition des symptômes de la maladie pour la réalisation de l'imagerie calcique. La phase terminale de la maladie est repérable par une perte de poids supérieure à 20% et une paralysie prononcée des membres inférieurs vers P535. Pour répondre aux différents objectifs proposés dans ce mémoire, nous avons opté pour le modèle *SODI*<sup>G37R</sup>. Nous avons favorisé ce modèle de souris au lieu d'un autre, car il est caractérisé par un niveau d'expression de la protéine mutée *SODI* d'environ 5 fois plus élevé que celle de la protéine de souris endogène dans la moelle épinière (Wong et al., 1995). Par ailleurs, il est intéressant de noter que de façon semblable aux patients atteints de la SLA, toutes les souris exprimant le gène humain *SODI* doté de la mutation en *G37R* développent le phénotype de la maladie: dégénérescence des JNMs et des MNs de la corne ventrale de la moelle épinière et du tronc cérébral, faiblesse et paralysie musculaire (Wong et al., 1995). Les animaux ont été euthanasiés en phase terminale en utilisant une dose létale d'isoflurane suivie par une dislocation cervicale / exsanguination selon le type d'expérience et le muscle disséqué.

Toutes les expériences ont été effectuées en accord avec les lignes directrices sur le maintien et les soins de santé en animalerie approuvées par le Conseil Canadien de Protection des Animaux ainsi que par le Comité de Déontologie sur l'Expérimentation Animale de l'Université de Montréal.

## **2.2 Stratégies virales**

Puisqu'il n'existe actuellement aucun knockout (KO) spécifique aux CSPs de disponible, nous aurions dû utiliser un KO général. Cependant, cela aurait pu introduire des éléments du système nerveux central non spécifiques aux CSPs et nous ne souhaitons

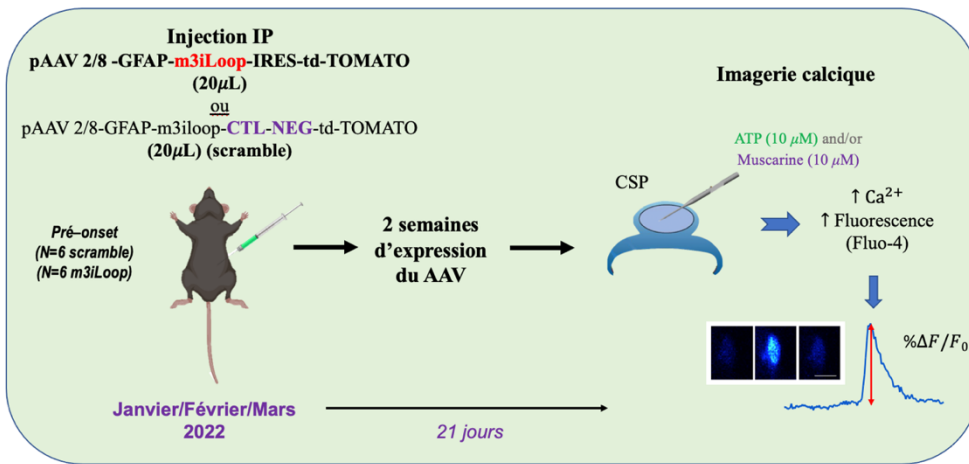
pas s'affranchir du rôle important des mAChRs dans la fonction des CSPs. C'est pourquoi nous avons plutôt choisi de développer une approche virale nous permettant de cibler spécifiquement les CSPs. Les vecteurs viraux ont été construits et produits par la Plateforme d'Outils Moléculaires du Centre de Neurophotonique au Centre de Recherche CERVO à Québec. Dans le laboratoire, il a été démontré qu'une simple injection intrapéritonéale (IP) d'un vecteur adénoassocié de sérotype 8 (AAV8) utilisé fréquemment dans les thérapies géniques ciblant les muscles (Koppanati et al., 2009), offre une transfection sélective et efficace des CSPs lorsqu'utilisé en combinaison avec le promoteur humain du gène *GFAP*, utilisé de façon routinière pour contrôler l'expression dans les astrocytes (Keller et al., 2009) (Middeldorp and Hol, 2011) (Panatier et al., 2011). En effet, la protéine gliale *GFAP* est exprimée dans les CSPs (Georgiou et al., 1999)(Keller et al., 2009).

Deux stratégies virales ont été utilisées pour moduler spécifiquement l'activité des CSPs. Une ayant pour but de réduire l'activité des mAChRs de type 3 et l'autre visant à augmenter l'activité des CSPs.

### **2.2.1 Réduction de l'activité des mAChRs des CSPs**

Premièrement, la fonction du mAChR de type 3 a été altérée par la surexpression de la troisième boucle intracellulaire du récepteur (M3iLoop), créant un peptide dominant négatif entrant en compétition avec les protéines G réduisant ainsi son interaction avec les récepteurs endogènes. L'expression du peptide contrôle (« scramble ») n'a aucun effet. Nous avons effectué un traitement viral *in vivo* avec des injections IP d'un pAAV 2/8-GFAP-IRES-m3iLoop-td-tomato ( $1.3 \times 10^{13}$  particules/ $\mu$ l). Dépendamment des objectifs des expériences, nous avons utilisé différents temps d'expression. L'administration virale a été réalisée avant l'apparition des symptômes de la maladie (soit environ vers 300 jours. Après 21 jours d'expression virale, les réponses calciques des CSPs ont été induites à la suite de l'application exogène de Muscarine et d'ATP (**Figure 7**).



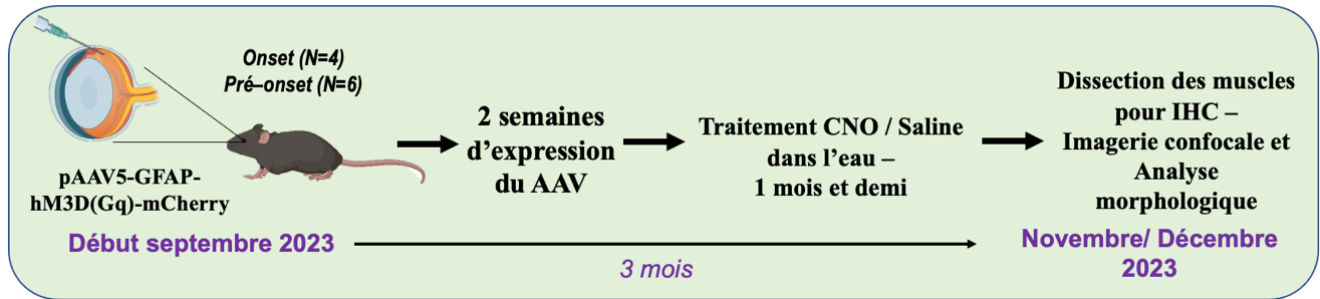


**Figure 7.** Schéma présentant le déroulement de l'expérience. Des injections intrapéritonéales d'un virus pAAV 2/8-GFAP-IRES-m3iLoop-td-tomato ont été effectuées chez des souris WT scramble (N=6) et M3iLoop (N=6). 21 jours après l'expression virale, les réponses des CSPs ont été enregistrées par imagerie calcique à la suite de l'application de Muscarine (10µM) et d'ATP (10µM).

### 2.2.2 Augmentation de l'activité des mAChRs des CSPs

Deuxièmement, nous avons utilisé une approche chémogénétique, les DREADDs (« Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs » en anglais) (Lee et al., 2014) (Roth, 2016). Les DREADDs utilisent des récepteurs à acétylcholine muscarinique qui sont spécifiquement activés par un ligand inerte, la clozapine-N-oxide (CNO) (Armbruster et al., 2007). Une stratégie non-invasive de traitement avec du CNO conférant une activation robuste des DREADDs (hM3Dq) a précédemment été décrite dans la littérature (Zhan et al., 2019). Ainsi, nous avons administré un DREADD pAAV5-GFAP-hM3D(Gq)-mCherry, dans la cavité périoculaire des animaux sous anesthésie. Nous avons choisi de ne pas administrer le virus en IP afin d'éviter que l'hyperactivation n'affecte les CSPs des muscles vulnérables, ce qui aurait pu exacerber l'impact de l'hyperexcitabilité des CSPs à ces JNMs. Deux titres ont été déterminés,  $4.6 \times 10^{12}$  particules/µl pour l'œil gauche et  $7.4 \times 10^{12}$  particules/µl pour l'œil droit, afin de voir si une différence d'impact sur les JNMs serait observée. Les injections virales ont été effectuées à deux stades de la maladie : présymptomatique (preonset) (environ P380) et à l'âge d'apparition de la maladie (onset) (environ P425 jours). Après deux semaines d'expression virale, nous avons effectué un traitement chronique avec du CNO (5 mg) dissous dans 1ml de solution saline stérile à 0.9% (Zhan et al., 2019) et dilué dans 20 ml d'eau dans des tubes coniques (Falcon) de 50ml gradués fermés avec des bouchons adaptés (Ancare : « standard stoppers, cat #6.5N et « drinking tubes, cat #TD-102) (**Figure 7**). Afin d'éviter tout effet indésirable de la lumière sur la stabilité du CNO, les falcons ont été recouverts de papier aluminium. Le traitement de CNO a été effectué pendant 5 semaines. Une semaine avant le début du traitement, les bouteilles d'eau régulières ont été remplacées par les falcons contenant 20

mL d'eau afin d'habituer les souris. La consommation d'eau pour chaque souris a été mesurée quotidiennement.



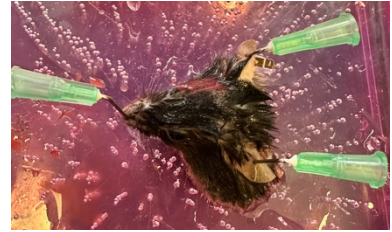
**Figure 8.** Schéma présentant le déroulement de l'expérience. Un DREADD pAAV5-GFAP-hM3D(Gq)-mCherry a été administré dans la cavité périoculaire de souris *SOD1<sup>G37R</sup>* avant et après l'âge médian d'apparition des symptômes. Deux semaines après l'expression virale, les souris ont été traitées avec du CNO (N=7) et de la saline (N=3) pendant un mois et demi. Les muscles rectus supérieur, inférieur et latéraux ont ensuite été prélevés pour l'immunohistochimie et leur observation par imagerie confocale.

### 2.3 Préparations neuromusculaires

Des préparations neuromusculaires ont été prélevées chez des souris WT et *SOD1<sup>G37R</sup>* respectivement des muscles vulnérables *Extensor Digitorum Longus* (EDL) et résistants, muscles extraoculaires (rectus supérieur, médial et latéral et inférieur). Afin d'assurer le bon déroulement du prélèvement des préparations neuromusculaires des muscles EDL et oculomoteurs, une solution saline physiologique de Ringer a été utilisée. Cette dernière contient les composés suivants (en mM) : 110 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 11 glucoses, 0.3 glutamate, 0.4 glutamine, 5 BES (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>S), 0.036 choline chloride et de  $4.34 \times 10^{-7}$  thiamine décarboxylase. Pour procéder à l'imagerie calcique, les préparations neuromusculaires intactes ont par la suite été épinglées dans une chambre d'enregistrement préalablement remplie de Silgard et les bout de nerfs coupés et insérés dans une électrode de stimulation contenant la solution de Ringer oxygénée. Les expériences ont été effectuées à  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  sous une perfusion constante de solution de Ringer oxygénée (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) maintenue à un pH entre 7.2 et 7.4.

Déroulement du processus de dissection des muscles extraoculaires : Pour isoler adéquatement les muscles oculomoteurs murins, dans un contenant profond rempli de Silgard (Dow Corning, Silicone Elastomer Kit) :

- 1) Stabiliser et bien humidifier la tête de l'animal et épingler le museau et les oreilles à l'aide des épingles.



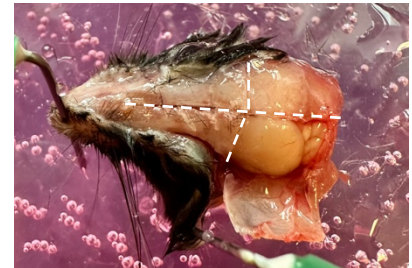
- 2) Retirer entièrement la peau du crâne (A) mais veillez à garder une certaine quantité de peau autour des yeux (B).



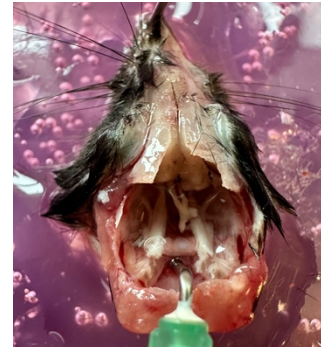
- 3) À l'aide du ciseau le plus fin, couper en dessous de l'os supérieur et de l'arcade zygomatique afin de faire une « crack » qui aidera à l'oxygénation des muscles le temps de la dissection.



- 4) Enlever les muscles des joues puis couper horizontalement et verticalement le crâne pour retirer tous les os de l'enveloppe frontale grâce à la paire de ciseaux robustes (FST, 15124-12).

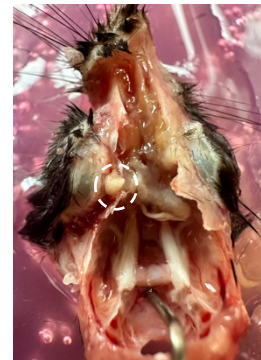


5) Retirer le cerveau avec précaution en évitant de couper les nerfs optiques dans le fond de la boîte crânienne et placer une aiguille dans l'orifice traversant le palais pour maintenir la tête stable.



6) Couper verticalement l'os de la cavité nasale et retirer les tissus mous et l'os de la mâchoire pour ne garder uniquement les os du crâne et les yeux.

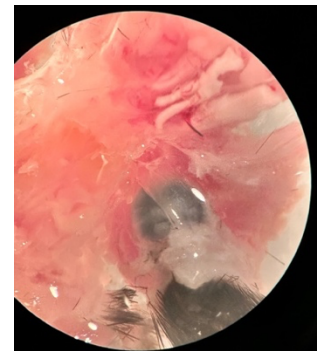
7) Afin d'assurer un niveau de tension optimal des muscles oculomoteurs, placer une aiguille au niveau de la paupière supérieure.



8) Retirer les glandes lacrymales de chaque œil en faisant attention à ne pas couper les muscles oculomoteurs.

9) Afin de procéder à l'extraction des muscles oculomoteurs pour les marquages immunohistochimiques, fixer la préparation pendant 10 minutes dans de la PFA 4% puis laver trois fois pendant 5 minutes dans une solution de PBS 1X filtré.

10) Pour de l'imagerie dynamique, s'assurer de bien nettoyer le tissu conjonctif sur le muscle rectus supérieur pour permettre une bonne pénétration du Fluo-4 AM.



## 2.4 Imagerie calcique des CSPs

Puisque l'activation des récepteurs muscariniques des CSPs engendre la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves internes, nous avons effectué de l'imagerie calcique sur des préparations de muscles entiers, EDL et EOM de souris *SOD1<sup>G37R</sup>* et WT, afin d'évaluer la capacité des CSPs à décoder les neurotransmetteurs. Nous avons utilisé une méthode publiée précédemment qui a permis l'incorporation d'un indicateur calcique dans les CSPs (Georgiou et al., 1999)(Rousse et al., 2010)(Todd et al., 2010)(Arbour et al., 2015). Les préparations neuromusculaires des muscles EDL et oculomoteurs ont été incubées deux fois pendant 35 minutes dans une solution oxygénée de Ringer contenant  $10\mu\text{M}$  de Fluo-4 AM et 0.02% d'acide pluronique (Invitrogen, P68647) à  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Ensuite, les récepteurs nicotiniques postsynaptiques (nAChRs) ont été marqués avec  $20\mu\text{L}$  de toxine  $\alpha$ -bungarotoxine conjuguée à l'Alexa-594 ( $2.0\mu\text{g}/\text{mL}$ , Invitrogen, B13423) (2 fois  $10\mu\text{L}$  pendant 10min à  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ).

L'activité calcique des CSPs a été observée à l'aide des objectifs à immersion à l'eau (20x, 0.95 NA, XLUMPlanFl et 60x, 0.90 NA, LUMPLFLN) d'un microscope confocal FV1000. La vitesse d'acquisition fut de  $4.0\mu\text{s}$  par pixel pour une image de  $256 \times 256$  pixels, donc 8 images/seconde. Pour chaque enregistrement, nous avons utilisé un niveau de fluorescence basal des CSPs entre 170 et 300 pixels et un agrandissement maximal de 2,5 fois. Les changements de fluorescence ont été déterminés avec la formule suivante :

$$\% \Delta F / F = (F - F_{\text{base}}) / F_{\text{base}} \times 100$$

La mesure de l'excitabilité des CSPs a été effectuée par l'application d'agonistes des récepteurs muscariniques en utilisant une brève pression pulsée positive (20-40 PSI, 150-200 ms) générée par un Picospritzer II (Instrument Parker) induit au travers d'une pipette de verre ( $5 \text{ m}\Omega$ , pointe  $\sim 2 \text{ mm}$  de diamètre) positionnée à proximité des cellules. De la muscarine ( $20\mu\text{M}$ , Sigma) et de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) ( $10\mu\text{M}$ , Sigma) ont été dissous dans la même solution de Ringer utilisée pour l'expérience. Un intervalle minimal de 20 minutes pour des applications successives sur la même cellule a été octroyé dû à l'observation d'une désensibilisation des récepteurs muscariniques (Jahromi et al., 1992).

## 2.5 Immunohistochimie

Les différents compartiments de la JNM des muscles oculomoteurs ont été marqués grâce à un marquage immunohistochimique, soit par l'utilisation d'anticorps qui reconnaissent des antigènes spécifiques aux protéines de la JNM. Les muscles ont été fixés pendant 10 minutes après la dissection dans de la paraformaldéhyde (PFA) 4% diluée dans une solution de PBS (en mM : 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) à température ambiante. Les préparations neuromusculaires ont ensuite été perméabilisées à l'aide d'une solution glaciale de 100% méthanol pendant 6 minutes à -20°C, puis lavé trois fois dans du PBS pendant 5 minutes. Afin d'éviter le marquage non spécifique des anticorps, chacun des muscles oculomoteurs a été incubé dans une solution contenant 10% *Normal Donkey Serum* (NDS) diluée dans du PBS 1% Triton X-100 pendant 20 minutes à température ambiante.

Les cellules de Schwann pérисynaptiques ont été marquées avec l'anticorps anti-S100 lapin (1 :4, Dako, cat #41453189) pendant une durée de 2 heures. Les axones et les éléments présynaptiques ont été marqués avec respectivement les anticorps anti-neurofilament M [NFM] poulet (1 :1000, Rockland Immunochemicals, cat # 49595) et anti-synaptique vesicular protein 2 [SV2] souris IgG1 (1 :2000, Developmental Studies Hybridoma Bank) pour une durée de 2 heures également. Les récepteurs acétylcholinergiques modifiés (DREADD) spécifiquement activés par le ligand inerte clozapine N-oxide (CNO) ont été marqués avec l'anticorps anti-mCherry chèvre (1 :50, Cederlane, cat #AB0081-500).

Par la suite, les muscles ont été incubés avec les anticorps secondaires suivants : âne anti-chèvre Alexa-594 (1 :500, Cederlane, cat #705-585-147), chèvre anti-souris Alexa-405 (1 :500, Jackson ImmunoResearch Laboratories, cat #162898), âne anti-lapin Alexa-647 (1 :500, Jackson ImmunoResearch Laboratories, cat #161973) pendant 1 heure. Finalement, les récepteurs postsynaptiques cholinergiques nicotiniens (nAChRs) ont été marqués avec la toxine  $\alpha$ -bungarotoxine conjuguée à l'Alexa-488 (2.0  $\mu$ g/ml, Thermo Fisher Scientific, cat #1750294) pendant 1 heure. L'ensemble des dilutions d'anticorps a été réalisée dans du PBS 1X contenant 0.01% Triton X-100 et du NDS 2%, et après chaque incubation (excepté le blocage NDS), les muscles ont été rincés trois fois pendant 5 minutes

dans du PBS 0.01% Triton X-100. Tous les muscles ont été montés sur lame avec le Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, lot #2641999).

Les différents éléments de la JNM ont été imagés via le microscope confocal Olympus FV1000 équipé d'un objectif 60x à huile à immersion (NA : 1.4; Olympus). Aucune manipulation des images n'a été effectuée après acquisition. Pour chaque JNM, l'acquisition de plusieurs images a permis de créer un montage des images consécutives (intervalle en z) d'une même JNM permettant ainsi d'effectuer une analyse morphologique adéquate.

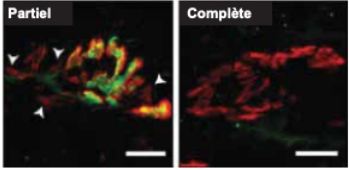
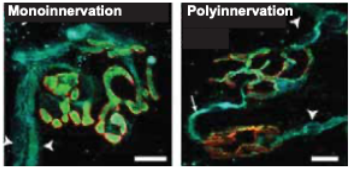
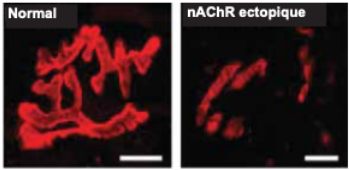
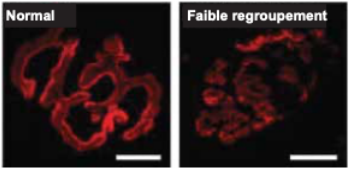
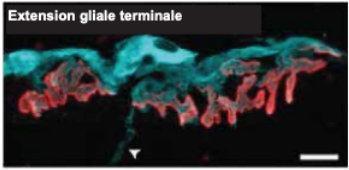
## **2.6 Analyse morphologique des JNMs**

L'analyse morphologique des JNMs a été basée sur sept critères décrits et illustrés antérieurement dans le laboratoire (Darabid et al., 2013)(Arbour et al., 2015)(Tremblay et al., 2017). L'évaluation de la fragmentation et du regroupement des récepteurs postsynaptiques n'a pas été effectuée pour des raisons de simplicité d'analyse.



**Tableau 1.** Critères d'évaluations des différents éléments morphologiques de la JNM.

Adapté de Tremblay et al., The Journal of Neuroscience (2017). Creative Common Attribution 4.0 International License (CC-BY).

	Critères	Description	Exemple
Présynaptique	Recouvrement plaque motrice	<p>Dénervation complète : lorsque la plaque motrice, n'a aucun recouvrement de la terminaison axonale</p> <p>Partiellement recouverte : lorsque la plaque motrice est recouverte à 90% et moins par la terminaison axonale.</p> <p>Totalement recouverte : lorsque la plaque motrice est recouverte à plus de 90% par la terminaison axonale.</p>	
	État d'innervation	<p>Monoinnervation : lorsque la plaque motrice est innervée par une seule et unique terminaison axonale.</p> <p>Polyinnervation : lorsque la plaque motrice est innervée par plusieurs terminaisons axonales.</p>	
Postsynaptique	Récepteurs ectopiques	Lorsque sur la même fibre musculaire on retrouve deux regroupements de récepteurs nAChR d'une distance minimale de 5 µm.	
	Faible regroupement	Lorsque la plaque motrice ressemble à celle retrouvée dans une JNM immature, on observe un marquage des récepteurs nACh mal défini ainsi que leur distribution non uniforme.	
Glial	Extensions gliales terminales	Lorsqu'une CSP va créer une extension fine au-delà de la plaque motrice de plus de 10 µm exempt de terminaison axonale.	



## 2.7 Analyse statistique

Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur type de la moyenne (SEM), et ce, pour chacun des groupes d'animaux donnés (*SOD1* ou WT). N représente le nombre d'animaux (réplicas biologiques) et n représente le nombre de JNMs ou de CSPs (réplicas statistiques).

Pour les réponses calciques induites par l'application d'agoniste, des *t test* non pairés ont été effectués pour comparer deux conditions différentes provenant de deux expériences différentes. Dans le cas où les tests classiques ont révélé des distributions non gaussiennes, le test de Mann-Whitney a été utilisé afin de déterminer la présence ou l'absence de différences significatives entre deux groupes.

Comme publié précédemment (Tremblay et al., 2017), les résultats de l'analyse morphologique ne suivent pas une distribution gaussienne, mais une distribution logistique, impliquant une variance inconstante. Les tests statistiques classiques (comme le *t test* ou l'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA)) ne pouvant être utilisés, un modèle linéaire généralisé (GLM, pour « Generalized Linear Model » en anglais) utilisant une distribution logistique a été employé afin de comparer les différents pourcentages de JNMs innervées vs dénervées.

Tous les résultats possédant un intervalle de confiance de 95% sont considérés significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

## **Chapitre 3 – Résultats**

Pour investiguer la contribution des CSPs dans la vulnérabilité différentielle des JNMs dans la SLA, nous avons en premier effectué une caractérisation fonctionnelle de l'excitabilité des CSPs des muscles EDL dans un modèle murin de SLA afin de déterminer si une activation anormalement élevée des mAChRs des CSPs était présente à ces JNMs. Par la suite, l'application locale d'agonistes couplée à de l'imagerie calcique à la suite de l'administration d'un vecteur viral a été utilisée dans les muscles EDL afin de voir l'impact fonctionnel de la réduction spécifique de l'activité des mAChRs des CSPs de type 3. Finalement, une approche chémozénotique a été employée pour augmenter les mAChRs des CSPs des MEOs résistants de souris *SOD1<sup>G37R</sup>* aux stades présymptomatique et symptomatique de la maladie, afin de recueillir des données morphologiques liées à l'état d'innervation et la plasticité des JNMs.

### **3.1 Propriétés des CSPs aux JNMs des muscles EDL**

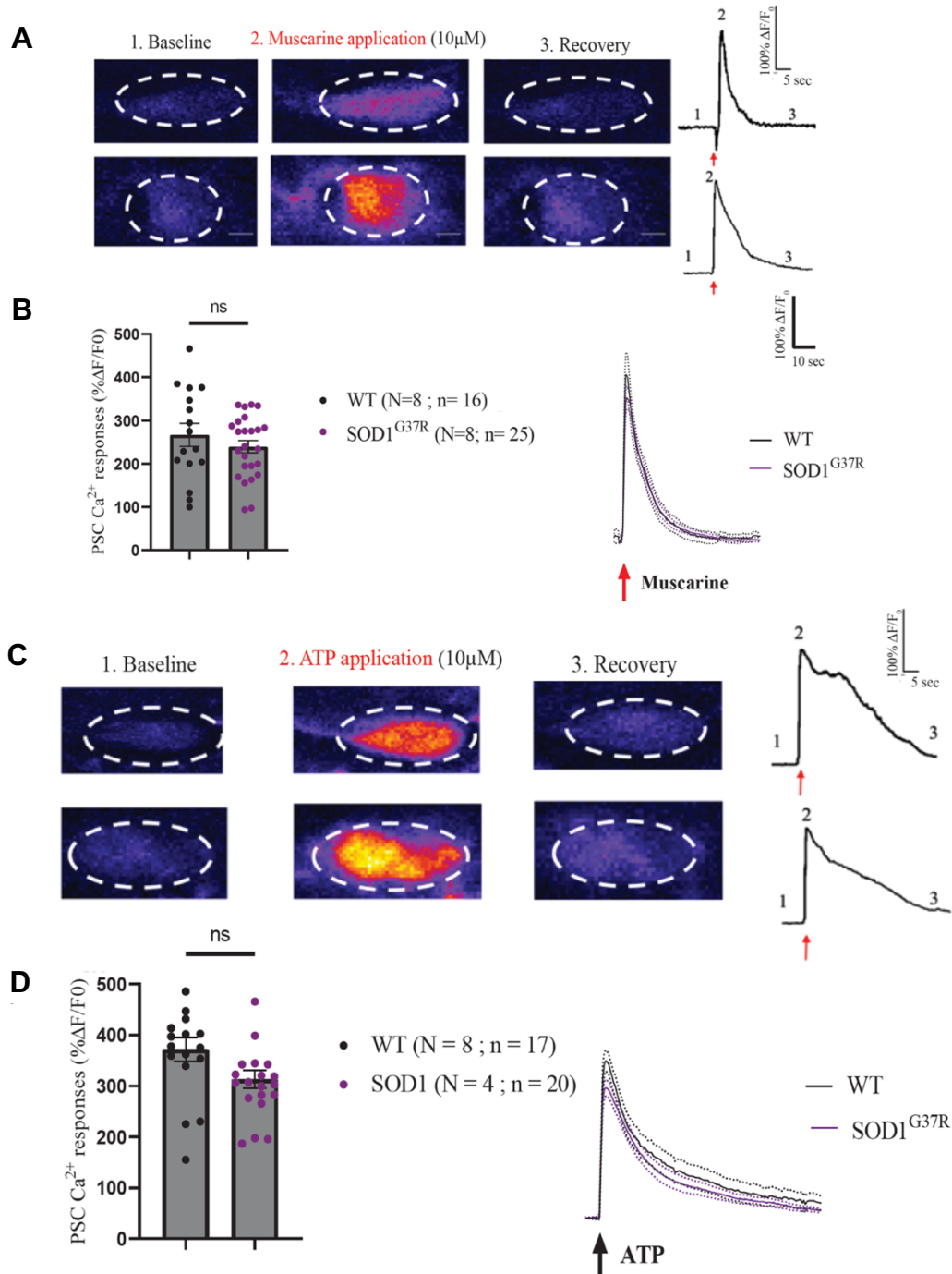
#### **3.1.1 Caractérisation fonctionnelle des CSPs aux JNMs des muscles EDL**

L'acétylcholine (ACh) et l'ATP relâchés durant la transmission synaptique activent les récepteurs purinergiques et muscariniques des CSPs pour induire des réponses calciques (Rochon et al., 2001). Nous savons qu'il existe des changements dans la capacité des CSPs à décoder l'activité synaptique qui compromettent l'habileté des CSPs à passer d'un mode de maintenance à celui de réparation de la JNM. Des données du laboratoire confirment la présence d'une hyperactivité des mAChRs des CSPs dans le muscle SOL en période présymptomatique (P120-P380), et qui persiste à l'apparition des symptômes (P450) (Arbour et al., 2015) (Martineau et al., 2020a). Et de manière importante, ce phénotype muscarinique est observé à toutes les JNMs, indépendamment du type d'UMs (Arbour et al., 2015).

Nous avons décidé d'utiliser le muscle EDL comme muscle vulnérable, puisqu'une dénervation importante de la plaque motrice (Tremblay et al., 2017) se produit au cours de la maladie. Ce muscle a également été utilisé dans des études pré-cliniques montrant

l'efficacité de certains traitements ciblant les JNMs dans la SLA. Ce muscle représente donc un bon modèle de JNMs vulnérables pour notre étude comparative.

Dans un premier temps, nous avons déterminé le niveau d'hyperexcitabilité des CSPs du muscle EDL puisqu'aucune étude en imagerie calcique n'avaient encore été réalisée. Nous souhaitons ainsi valider si les CSPs aux JNMs des muscles vulnérables EDL présentait une hyperexcitabilité des mAChRs pendant la communication synaptique (contribution des mAChRs) chez les souris *SOD1<sup>G37R</sup>* à un stade pré-onset (P280-300). Nous avons testé si les réponses calciques induites par l'application locale de muscarine étaient altérées aux JNMs des muscles EDL chez notre modèle de souris *SOD1<sup>G37R</sup>*. Les données recueillies ne montrent aucune différence significative des réponses calciques des CSPs aux JNMs de l'EDL chez les souris *SOD1* par rapport aux réponses des CSPs de souris WT ( $p=0.33$  ns, test de t non pairé) (**Figure 9**).



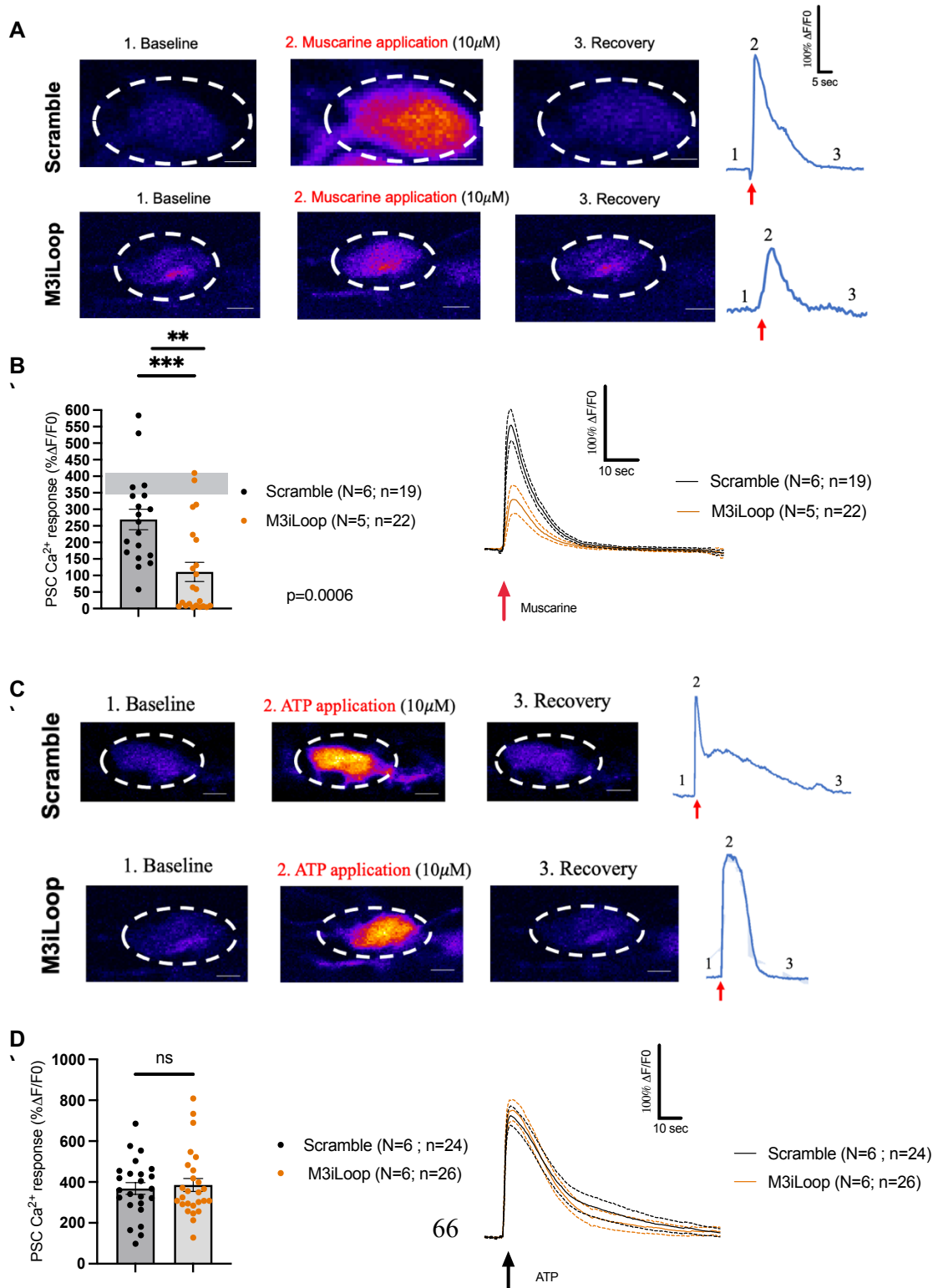
**Figure 9.** L'habileté des CSPs à détecter les signaux muscariniques et purinergiques n'est pas altérée dans le muscle EDL pendant la période présymptomatique de la maladie. **A**, Images confocales en fausses couleurs des CSPs chargées d'un indicateur calcique, le Fluo-4 AM avant (« Baseline »), pendant (« Muscarine application ») et après (« Recovery ») les applications locales de Muscarine aux JNMs de souris WT et SOD1<sup>G37R</sup>. Les changements de fluorescences sont illustrés sur la droite et un grossissement plus élevé des CSPs est présent dans chaque figure. **B**, Histogramme déchiffrant la moyenne  $\pm$  SEM de l'amplitude des réponses des CSPs induites par l'application de Muscarine. **C-D**, Représentation similaire qu'en A-B, mais illustrant l'application d'ATP. Il n'y a pas de différence statistique entre les deux groupes d'animaux que ce soit pour l'application d'ATP, ou de Muscarine ( $p > 0.05$  ns, one-way ANOVA). Échelle, 10 $\mu$ m.

Ces résultats sont consistants avec ceux observés dans un autre muscle avec des UMs vulnérables, le muscle sternomastoïdien (STM), où l'hyperexcitabilité n'était évidente lors de l'activation exogène (Martineau et al., 2020a). Des expériences de stimulation du nerf de l'EDL seront à compléter pour une observation plus détaillée du processus lors de la communication endogène, c'est-à-dire lors de la libération de NTs pendant la transmission synaptique.

### **3.1.2. Atténuation sélective de l'excitabilité muscarinique des CSPs aux JNMs des muscles vulnérables EDL**

L'augmentation de l'excitabilité muscarinique des CSPs est corrélée avec le manque de signes de réparation des CSPs à la JNM, suggérant que les fonctions des mAChRs des CSPs sont impliqués dans le remodelage et la réparation des JNMs dans la SLA. Il a été montré que l'activation des mAChRs des CSPs peut être spécifiquement diminué *in situ* et *in vivo* grâce à une technique appropriée d'injection intermusculaire (Wright et al., 2009). Dans cette étude, le blocage *in vivo* des mAChRs a induit des modifications dans le phénotype des CSPs facilitant la réinnervation des JNMs (par exemple : extensions gliales et prolongements axonaux). Afin de cibler spécifiquement les CSPs pour déterminer leur implication dans la vulnérabilité différentielle des JNMs pour notre étude, une approche virale a été développée dans le laboratoire. Il a été démontré qu'une simple injection intrapéritonéale (IP) d'un virus AAV8 utilisé dans des thérapies géniques ciblées offre une transfection sélective et efficace lorsqu'utilisé en combinaison avec le promoteur GFAP (Koppanati et al., 2009). Ainsi, nous avons utilisé une stratégie virale afin de réduire spécifiquement l'activité des mAChRs des CSPs de type 3 (M3) (voir la section 2.2.1 pour plus de détails). Afin de caractériser les interactions des mAChRs M3 avec les protéines G, nous avons monitoré l'activité des CSPs des muscles EDL en utilisant l'imagerie calcique 14 jours après l'injection IP du virus AAV200 M3iLoop. Une cohorte de souris WT traitées (N=6) et WT contrôles (N=6) âgées entre 300 et 320 jours ont été utilisées. Les données montrent une diminution de l'amplitude des réponses calciques des CSPs après l'application de muscarine suivant l'infection des souris WT ( $p < 0.05^*$ , test de Mann-Whitney), confirmant ainsi un blocage partiel de la signalisation muscarinique des

CSPs (**Figure 10**). Les amplitudes des réponses calciques des CSPs après l'application d'ATP sont inchangées. Une expression excessive du vecteur viral pourrait résulter en un blocage complet de la signalisation muscarinique des CSPs. Or, nos résultats indiquent que ce n'est pas le cas. Globalement, ces données suggèrent que l'outil viral utilisé est spécifique pour les mAChRs des CSPs et attestent de l'efficacité et de la fiabilité de la stratégie.



**Figure 10.** Les injections IP du vecteur viral M3iLoop restore l'excitabilité des mAChRs des CSPs des muscles EDL de souris WT. **A**, Images confocales en fausses couleurs des changements de fluorescences du Fluo-4 AM représentant les changements en  $Ca^{2+}$  intracellulaire avant, pendant et après l'application de Muscarine, deux semaines après l'expression virale du M3iLoop. L'expression du vecteur contrôle (*scramble*) n'a aucun effet. **B**, Histogramme représentant la moyenne  $\pm$  SEM des réponses calciques des CSPs induites après l'application locale de Muscarine chez les souris WT ( $p=0.002 < 0.05^*$ , test de t non pairé). **C**, Images confocales en fausses couleurs avant, pendant et après l'application d'ATP, deux semaines après l'expression virale du M3iLoop. **D**, Histogramme représentant la moyenne  $\pm$  SEM des réponses calciques des CSPs induites après l'application locale d'ATP chez les souris WT ( $p > 0.05$  ns, test de t non pairé).

### 3.2 Propriétés des CSPs aux JNMs des MEOs résistants

#### 3.2.1 Les CSPs aux JNMs des MEOs présentent une activation muscarinique normale

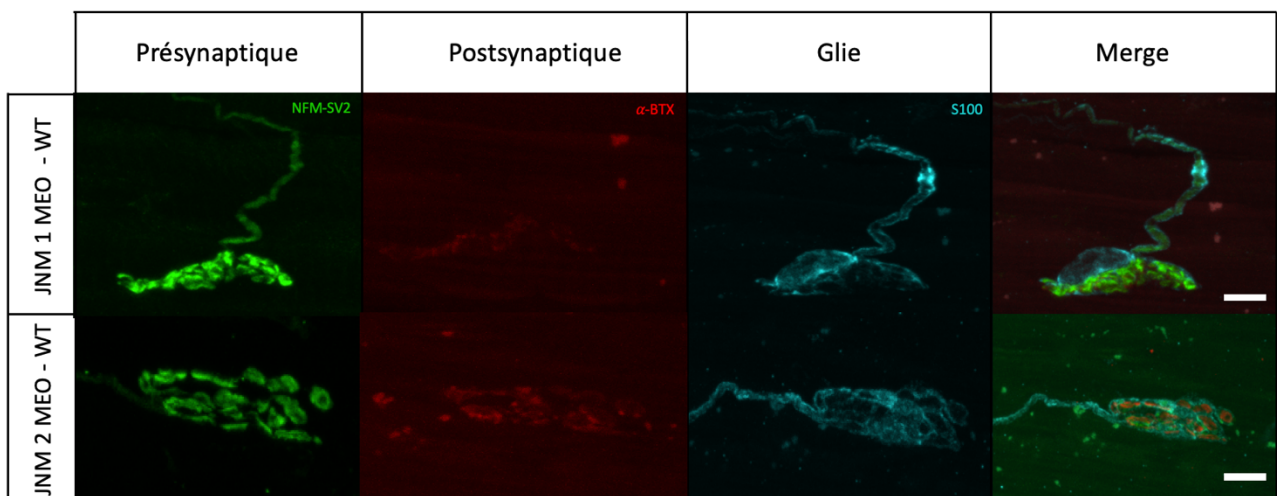
Nous postulons que l'augmentation de l'excitabilité des mAChRs des CSPs aux JNMs résistantes est normale. Puisque l'activité des CSPs est dépendante du calcium, les MEOs ont été prélevés et l'amplitude des réponses calciques a été mesurée. Les données non publiées obtenues dans le laboratoire des travaux réalisés par Frédéric Provost en collaboration avec Justine Martineau rapportent que l'activation muscarinique et purinergique des CSPs ne diffèrent pas entre les souris *SOD1<sup>G37R</sup>* et les WT (Provost, F, 2020 [Mémoire de maîtrise, Université de Montréal]). C'est une observation importante puisque les mAChRs sont des modulateurs essentiels des propriétés des CSPs, leur permettant de réguler la maintenance et la réparation des JNMs.

#### 3.2.2 Propriétés morphologiques des JNMs des MEOs

La résistance des MEOs peut être expliquée soit par la présence de mécanismes intrinsèques adaptés, soit par le fait que les MEOs pourraient avoir une atteinte tardive dans la maladie. Afin d'investiguer les potentielles altérations morphologiques des JNMs des MEOs, il a été nécessaire d'isoler les muscles extraoculaires à un stade avancé de la maladie, soit, lorsque les souris *SOD1<sup>G37R</sup>* ont perdu entre 20%-30% de leur poids maximal et lorsque l'on reporte une paralysie accentuée des membres inférieurs, soit environ vers

530 jours postnatal. À l'œil nu, l'acquisition et l'observation au microscope confocal de JNMs de MEOs de souris WT (N=2, n=101 JNMs) révèlent la superposition complète des trois éléments synaptiques (pré-, postsynaptique et glie) (**Figure 11**).

L'analyse détaillée des différents aspects morphologiques de la JNM n'a révélée aucune différence morphologique entre les JNMs des souris WT et *SOD1<sup>G37R</sup>* (Provost, F, 2020 [Mémoire de maîtrise, Université de Montréal]). De plus, l'analyse de l'état d'innervation de la JNM, reflétée par le recouvrement de la plaque motrice par la terminaison axonale, ne révèle aucune différence au niveau de l'organisation des récepteurs postsynaptiques et de potentielles altérations, ainsi que dans le recouvrement de la plaque motrice entre les souris mutées et leurs contrôles (Provost, F, 2020 [Mémoire de maîtrise, Université de Montréal]).



**Figure 11.** Exemples de JNMs d'un MEO de souris WT. Images confocales en fausses couleurs des différents éléments de la JNM des MEOs de souris WT. L'élément présynaptique est marqué avec le NFM-SV2 (vert), l'élément postsynaptique avec l' $\alpha$ -BTX (rouge), la glie avec le S100. Échelle : 50 $\mu$ m. À noter que la faible expression du marquage postsynaptique serait due à une mauvaise incubation de l'anticorps.

### 3.2.3 Augmentation sélective de l'excitabilité muscarinique des CSPs aux JNMs des MEOs

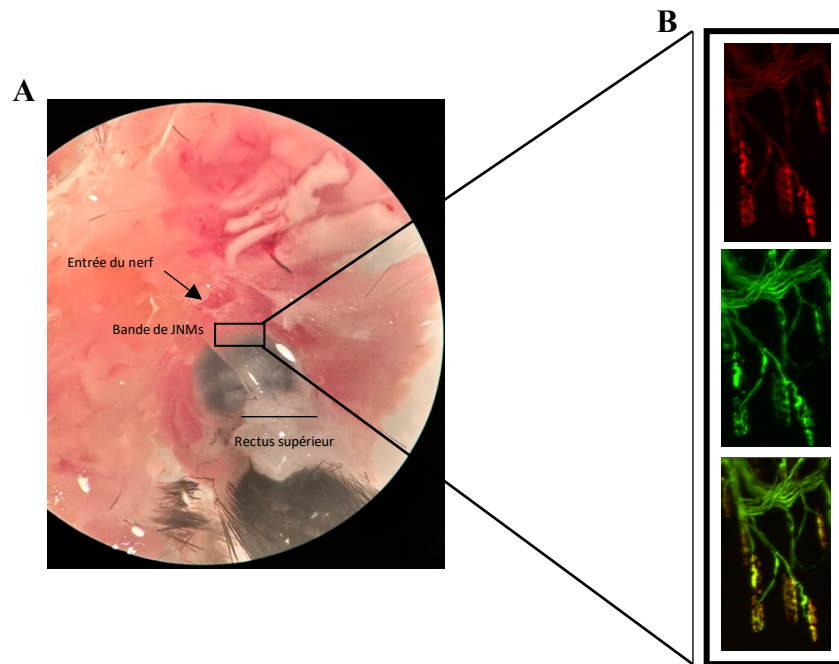
Les JNMs ont des vulnérabilités différentes à la dénervation dans la SLA. À l'extrême de ce spectre, les JNMs des MEOs sont les plus résistantes comparées à celles du tronc ou des jambes (Nijssen et al., 2017) (Valdez et al., 2012). En effet, dans la plupart



des cas de SLA, on observe que l'intégrité structurale des JNMs des MEOs est conservée, ce qui permet aux patients de communiquer via un système de suivi des mouvements des yeux, et ce, même à un état avancé de la maladie.

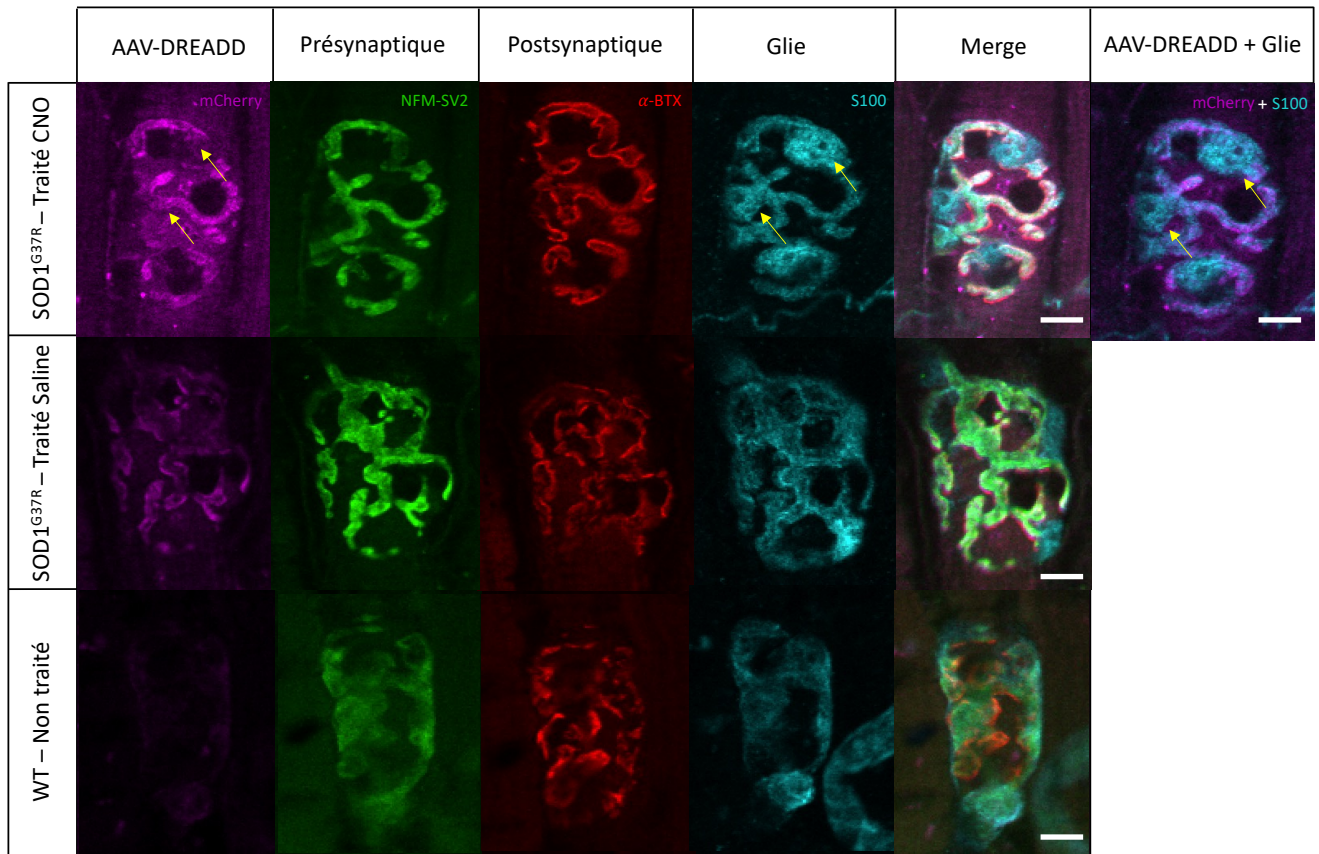
Nous avons décidé d'utiliser également une approche virale, comme pour le muscle EDL. Cependant, dans cette étude, nous souhaitons rendre plus vulnérables les JNMs résistantes des MEOs. Les DREADDs (« Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs » en anglais) (Lee et al., 2014) (Roth, 2016) utilisent des récepteurs à acétylcholine muscarinique qui s'activent de façon spécifique par un ligand inerte, la clozapine-N-oxide (CNO) (Armbruster et al., 2007). Nous avons donc infecté sélectivement les CSPs avec un DREADD en utilisant un vecteur viral (AAV-5) jumelé au promoteur GFAP. Les injections ont été effectuées dans la cavité périoculaire de souris *SOD1<sup>G37R</sup>* (N=10) sous anesthésie âgés entre 360 et 430 jours post natal (période présymptomatique et symptomatique). Un titrage différent et plus élevée a été utilisé pour les injections des muscles rectus droits extraoculaires (voir Chapitre 2 – 2.2 Stratégies virales pour plus de détails). Les animaux ont ensuite été traités quotidiennement avec du CNO (N=7) et de la saline (N=3) pendant cinq semaines. Pour reproduire l'hyperexcitabilité des CSPs aux JNMs des muscles vulnérables, nous avons administré le CNO dans l'eau des souris. De cette façon, à chaque fois que les animaux boivent, l'activation des mAChRs s'effectue de manière chronique tout au long de la journée.

L'objectif était de valider la faisabilité de notre approche d'injection dans la cavité périoculaire de souris et de confirmer que nous pouvions observer que toutes les JNMs des MEOs étaient exposées à la solution d' $\alpha$ -bungarotoxin injectée (**Figure 12**). L'imagerie sur un MEO vivant, dix minutes après l'injection a révélé la présence des JNMs marquées à l' $\alpha$ -bungarotoxin (en rouge), ainsi que leurs axones marqués en vert (NFM) chez une souris Thy1 exprimant de manière transgénique la protéine fluorescente jaune (YFP, « *yellow fluorescent protein* ») dans les motoneurones.



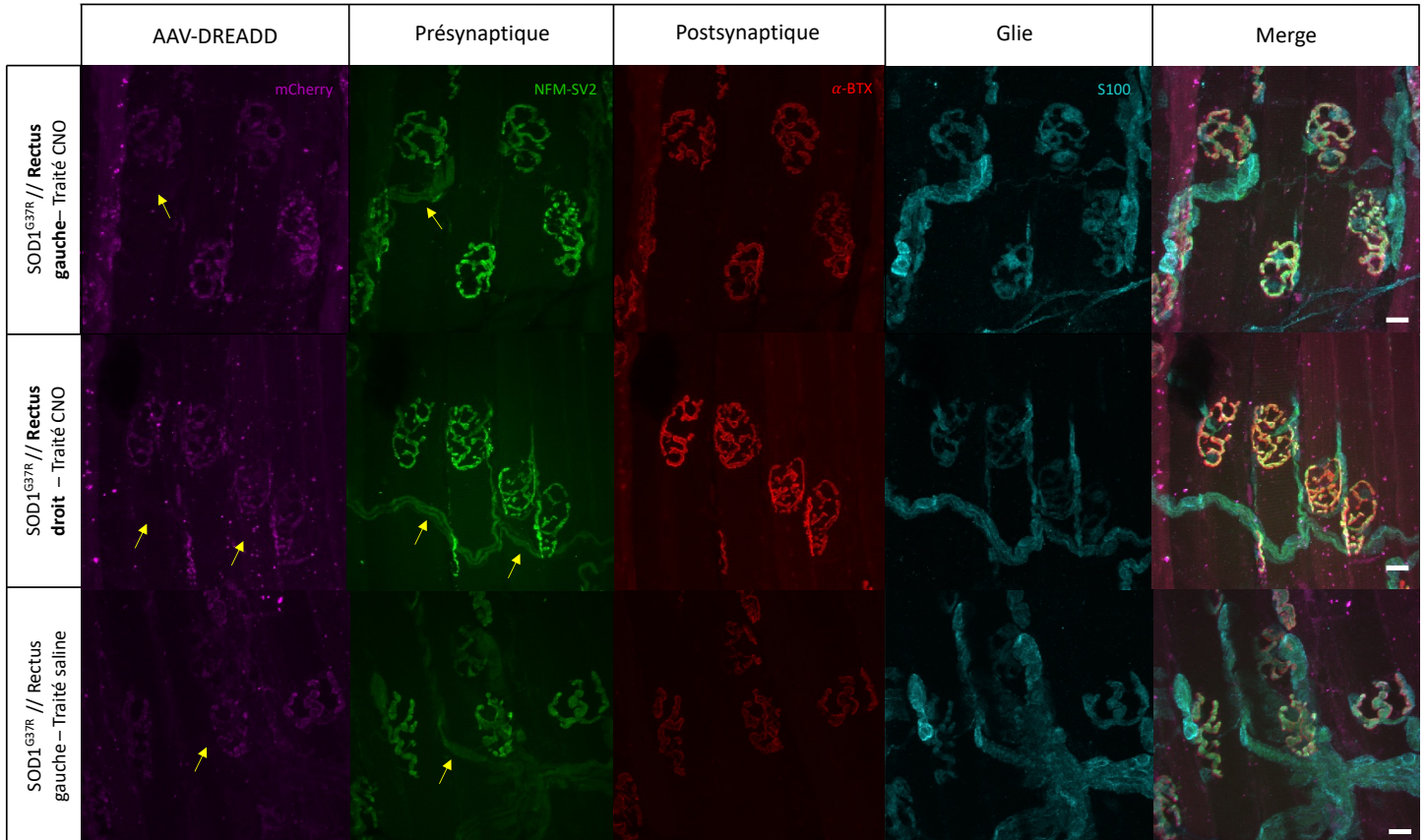
**Figure 12.** Préparation neuromusculaire de MEO du rectus droit supérieur et imagerie dynamique. **A**, Photographie prise au microscope binoculaire illustrant la préparation du MEO DS et de son innervation. Échelle : 1,59 mm. **B**, Images prises lors de l'imagerie calcique des CSPs d'une souris transgénique Thy1 exprimant la protéine fluorescente jaune YFP dans les motoneurones. Échelle : 30  $\mu$ m.

Par la suite, nous souhaitons mettre l'accent sur la sélectivité de notre stratégie afin de montrer que le DREADD est exprimé uniquement aux JNMs des souris *SOD1<sup>G37R</sup>* injectées. L'immunohistochimie des rectus droit et gauche (RD et RG) des MEOs a révélé que le marquage mCherry est présent aux JNMs des muscles traités avec le CNO et la saline. Cependant, il n'est pas retrouvé aux JNMs des MEOs de souris WT non injectées (**Figure 13**).



**Figure 13.** Le marquage *mCherry* n'est pas retrouvé aux JNMs des souris non injectées et non traitées. Images confocales en fausse couleur confirmant la localisation du marquage *mCherry* chez des souris *SOD1<sup>G37R</sup>* injectées avec le AAV-DREADD et traitées avec du CNO et de la saline, mais pas chez une souris WT injectée et non traitée. L'élément présynaptique est marqué avec le NFM-SV2 (vert), l'élément postsynaptique avec l' $\alpha$ -BTX (rouge), la glie avec le S100 et le AAV-DREADD avec le *mCherry*. Échelle : 50 $\mu$ m.

Il est important de noter que l'expression du DREADD est seulement restreinte aux CSPs (flèches jaunes, **Figure 13**). En effet, le marquage *mCherry* n'est pas présent au niveau des axones (flèches jaunes) où seraient localisées les cellules de Schwann axonales (**Figure 14**). Cette observation corrobore la spécificité de la stratégie choisie.



**Figure 14.** Le virus cible les CSPs à la JNM et pas les cellules de Schwann axonales. Images confocales en fausse couleur des RG et RD de souris SOD1<sup>G37R</sup> traitées avec du CNO et de RG traités avec de la saline respectivement. L'élément présynaptique est marqué avec le NFM-SV2 (vert), l'élément postsynaptique avec l' $\alpha$ -BTX (rouge), la glie avec le S100 et le AAV-DREADD avec le mCherry. Il est à noter qu'aucun marquage mCherry n'est présent au niveau des axones myélinisés (flèches jaune), mais est retrouvé de manière importante au niveau de la plaque motrice. Échelle : 20 $\mu$ m.

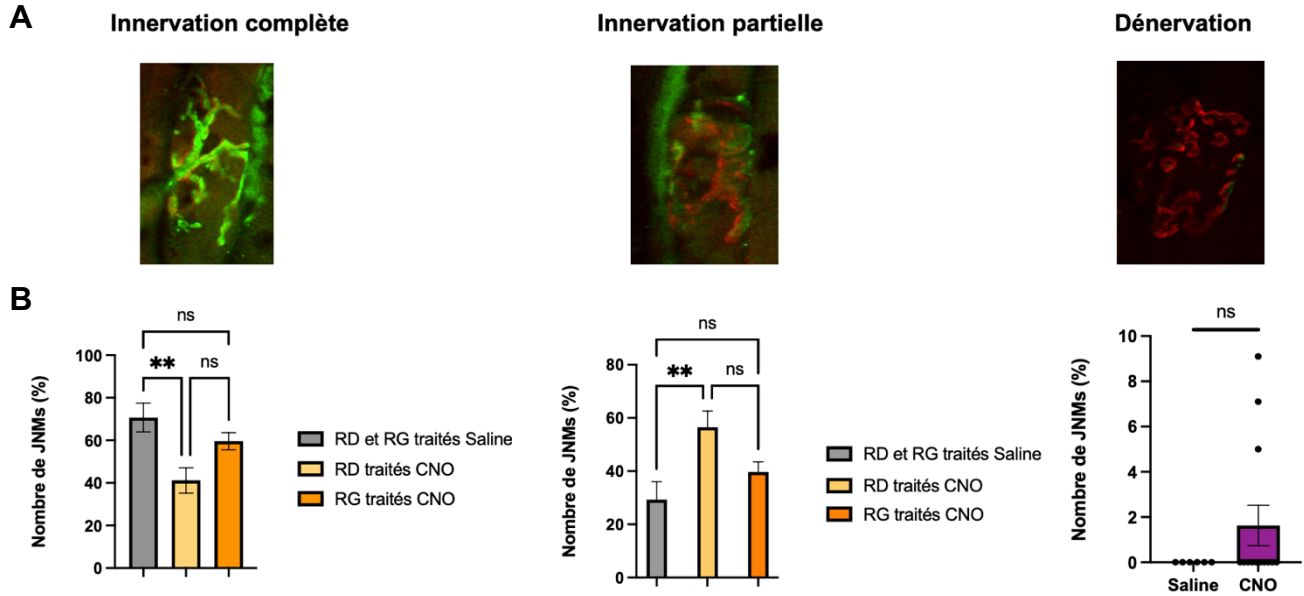
### 3.2.3.1 Augmenter l'excitabilité muscarinique induit des modifications morphologiques aux JNMs résistantes

Sachant que les CSPs des JNMs des muscles vulnérables ont une hyperactivité muscarinique, contrairement à celle aux JNMs des muscles résistants qui est normale, nous postulons que l'augmentation de l'activité muscarinique va créer de l'instabilité et une réparation anormale des JNMs, et ainsi les rendre vulnérables dans la SLA.

Un élément crucial à investiguer est l'état d'innervation de la JNM caractérisé par le recouvrement de la plaque motrice par la terminaison axonale. À l'œil nu, lorsqu'environ 30% du marquage de la terminaison axonale n'était pas présent, les JNMs ont été

considérés comme « innervés partiellement ». Lorsque l'élément présynaptique est absent de la plaque motrice, les JNMs ont été catégorisées comme étant « dénervées ». Nous avons donc analysé l'état d'innervation des JNMs des RD et RG des MEOs en utilisant la microscopie confocale et l'immunohistochimie des éléments pré- et postsynaptiques de souris *SODI<sup>G37R</sup>* traitées avec du CNO ou de la saline (**Figure 15**). Un total de 394 JNMs a été analysé (*SODI<sup>G37R</sup>* traitées avec la saline : N=3, n=115 JNMs – et *SODI<sup>G37R</sup>* traitées avec le CNO : N=7, n = 279 JNMs). L'analyse de l'état d'innervation des JNMs des quatre RG et RD des MEOs a montré une diminution significative du pourcentage de JNMs des RD innervés complètement chez les animaux traités avec du CNO par rapport aux RD et RG des animaux traités avec la saline ( $p=0.005^{**}$ , one-way ANOVA). Cette observation est en corrélation avec une élévation du titre de la solution virale administrée dans la cavité périoculaire des RD des MEOs ( $7.4^{E+12}$  GC/mL) par rapport à celle administrée dans les RG ( $4.6^{E+12}$  GC/mL). Par ailleurs, nous notons une augmentation du pourcentage de JNMs partiellement innervés dans les RD des MEOs des souris *SODI<sup>G37R</sup>* traitées avec le CNO par rapport aux RD et RG des animaux traités avec la saline ( $p=0.009^{**}$ , one-way ANOVA). Il est important de constater qu'à la suite des cinq semaines de traitement on dénote de la dénervation complète des JNMs dans les RG et RD des souris traitées chroniquement avec le CNO, mais qu'aucune dénervation complète n'est présente chez les animaux traités avec la solution contrôle ( $p>0.05$  ns, test de Mann-Whitney). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la signalisation muscarinique des CSPs grâce à l'approche chémo-génétique induit des changements morphologiques au niveau des JNMs des souris *SODI<sup>G37R</sup>*.





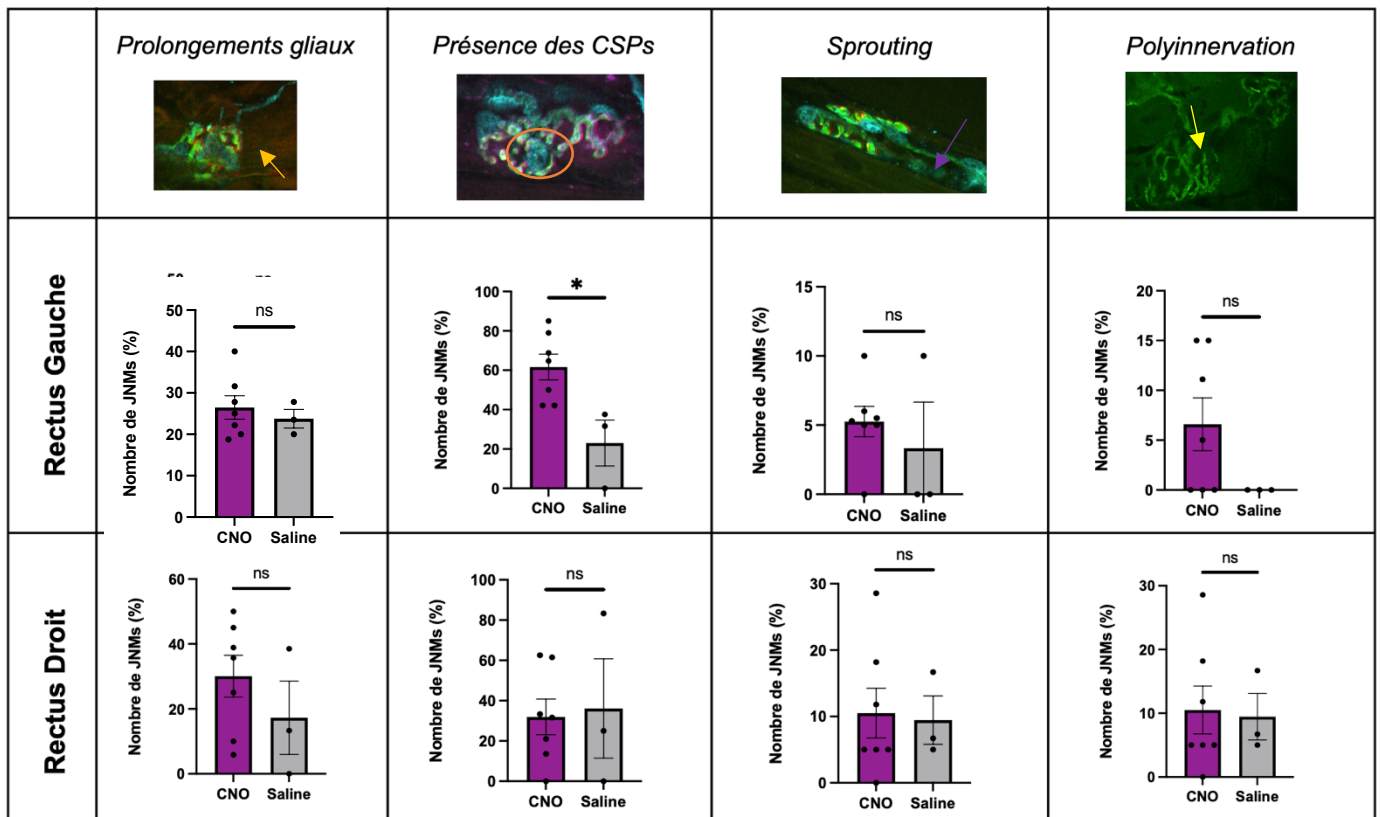
**Figure 15.** Le traitement chronique avec le CNO induit des modifications de l'état d'innervation des JNMs. **A**, Images confocales en fausses couleurs de rectus de MEOs illustrant l'innervation complète (quand tous les éléments (pré et postsynaptiques et glie se recouvrent parfaitement), partielle (quand une partie de la plaque motrice n'est pas recouverte par la terminaison présynaptique nerveuse) et la dénervation (quand l'élément présynaptique est absent de la plaque motrice) des JNMs des MEOs. **B**, Histogrammes représentant le pourcentage du nombre de JNMs complètement innervées, partiellement, ou dénervées (des RD et RG des MEOs de souris *SOD1<sup>G37R</sup>* traitées avec du CNO et de la saline. *SOD1<sup>G37R</sup>* traitées avec la saline : N=3, n=115 JNMs – et *SOD1<sup>G37R</sup>* traitées avec le CNO : N=7, n = 279 JNMs.

### 3.2.3.2 Augmenter l'excitabilité muscarinique des mAChRs des CSPs induit des modifications des processus de plasticité des JNMs

La présence d'extensions gliales et de prolongements axonaux a été observée dans des modèles animaux de SLA (Frey et al., 2000) (Arbour et al., 2015) (Martineau et al., 2020a) (Tremblay et al., 2017), et leur tendance est augmentée aux muscles vulnérables SOL et EDL. Cependant, cette observation n'a pas été retrouvée au niveau des MEOs (Provost, F. (2020) [Mémoire de maîtrise, Université de Montréal]). Nous postulons qu'augmenter l'excitabilité des CSPs aux JNMs des MEOs augmenterait la présence de ces marqueurs de plasticité et, ainsi, que la réparation des JNMs des MEOs serait altérée dans ce contexte. Nous avons quantifié les altérations morphologiques des RD et RG des JNMs de MEOs de souris *SOD1<sup>G37R</sup>* à un stade symptomatique, en mettant l'emphase sur les paramètres de plasticité, soit les prolongements gliaux et les prolongements axonaux.

Un total de 394 JNMs a été analysé (*SOD1<sup>G37R</sup>* traitées avec la saline : N=3, n=115 JNMs – et *SOD1<sup>G37R</sup>* traitées avec le CNO : N=7, n = 279 JNMs). Nos résultats montrent que le pourcentage de JNMs élaborant des extensions gliales, des prolongements axonaux et de la polyinnervation est similaire entre les animaux traités avec le CNO de ceux traités avec la saline entre les RG et les RD (**Figure 16**), suggérant la présence de mécanismes de plasticité complexes des CSPs dans la réinnervation des JNMs.

En résumé, la stratégie virale sélective d'augmentation de l'excitabilité des mAChRs des CSPs avec les DREADDs induit de l'instabilité au niveau des JNMs des RD et RG des MEOs des souris *SOD1<sup>G37R</sup>*. Nous n'observons pas de signes clairs de plasticité induit par les CSPs, suggérant que ces dernières n'adoptent pas un phénotype propice à la réparation des JNMs dans ce modèle murin de SLA.



**Figure 16.** L'augmentation de l'activité des mAChRs induit des signes de plasticité chez les souris *SOD1<sup>G37R</sup>*. Histogramme représentant les moyennes ± SEM des paramètres de plasticité suivants : prolongements gliaux, présence des CSPs, « sprouting ou prolongement axonal » et polyinnervation des RD et RG des MEOs des animaux ayant reçu le traitement quotidien dans l'eau de CNO ou de saline. Chaque point représente un individu. Notons les exemples montrant les extensions gliales des CSPs (flèche orange), les cellules gliales marquées avec le S100 (cercle orange), les prolongements axonaux (flèche mauve) et la polyinnervation (flèche jaune). *SOD1<sup>G37R</sup>* traitées avec la saline : N=3, n=115 JNMs – et *SOD1<sup>G37R</sup>* traitées avec le CNO : N=7, n = 279 JNMs.

## Discussion

Dans ce mémoire, j'ai cherché à comprendre la possible contribution des CSPs à la vulnérabilité différentielle des JNMs au sein de deux muscles : un vulnérable, l'EDL et un résistant : le MEO dans un contexte de SLA. J'ai également étudié les répercussions fonctionnelles et morphologiques de la modulation de l'activité de leurs récepteurs muscariniques. Plus spécifiquement, nous avons montré que : **1)** Les réponses calciques des CSPs ne sont pas significatives aux JNMs de l'EDL chez les souris *SOD1<sup>G37R</sup>* comparativement aux souris WT. Cependant, des séries d'expériences sont à compléter sachant que l'hyperexcitabilité est évidente lors de la communication endogène dans un autre muscle vulnérable, le Sternomastoïdien (STM) (Martineau et al., 2020a); **2)** Un outil viral dont la stratégie d'injection a été développée dans le laboratoire est capable de réduire spécifiquement l'activité des mAChRs des CSPs pour rétablir leur capacité de détection; **3)** L'augmentation de l'activité des mAChRs des CSPs des muscles résistants MEOs induit des signes d'instabilité au niveau des JNMs. Cette étude met en lumière une corrélation entre la capacité de détection des CSPs via leur niveau d'activation muscarinique et l'impact sur les processus de réparation à la JNM. De manière intéressante, ces travaux montrent que l'approche virale est un nouvel outil pour cibler les CSPs dans la SLA.

### 4.1 Concept de résistance/vulnérabilité dans la SLA

#### 4.1.1 Facteurs potentiels influençant la vulnérabilité sélective des MNs dans la SLA

Il semblerait que plusieurs facteurs pourraient converger mutuellement et conduire au dysfonctionnement et à la dégénérescence des MNs vulnérables et de leur environnement local. De manière intéressantes, certains MNs sont affectés plus tardivement dans la maladie, et il semble que leur environnement soit plus résistant. À savoir quels sont les facteurs déterminants qui perturberaient l'homéostasie et progresseraient en mécanismes de neurodégénérescence, ou non, cela demeure une des nombreuses questions sans réponse à ce jour. Nous allons donc énumérer certains facteurs pouvant perturber la vulnérabilité sélective des MNs dans la maladie.



#### 4.1.1.1 Excitabilité différentielle des MNs

Des altérations précoces ont été rapportées dans les propriétés électriques des MNs spinaux dans la SLA. En effet, au moment où la compétition synaptique est grandement présente à la JNM, l'excitabilité de MNs lombaires de souris *SOD1<sup>G93A</sup>* âgées de 7 jours apparaît être similaire comparée aux animaux contrôles (Quilan et al., 2011). Pourtant, Martinez-Silva et al. ont découvert des marqueurs électriques et moléculaires capables de distinguer des MNs aux propriétés rapides de ceux aux propriétés lentes in vitro (Leroy et al., 2014), et ces marqueurs ont été utilisés pour montrer que ce sont uniquement les MNs lents qui ont une excitabilité plus marquée durant les premières semaines de vie d'un modèle de souris SLA (Martínez-Silva et al., 2018). Les chercheurs ont stimulé des MNs individuellement, enregistrer leurs réponses électriques et la force générée par les muscles. Ils ont noté que les MNs rapides devenaient moins réceptifs aux stimulations répétées et qu'ils devenaient hypoexcitables, et ce, en période présymptomatique lorsque les JNMs ne sont pas encore affectées. Sachant que les MNs lents n'étaient pas impactés par ces stimulations, on peut supposer que l'hypoexcitabilité pourrait conduire à la dégénérescence des JNMs. La diminution de l'activité de ces neurones hypoexcitables pourrait aussi empêcher l'expression des facteurs de croissance qui stabilisent les JNMs. De façon consistante, la transmission synaptique est augmentée aux JNMs stables et matures des muscles du diaphragme et du Soleus (SOL) chez les souris mutantes *SOD1* portant les mutations G93A et G37R (Rocha et al., 2013) (Arbour et al., 2015) (Tremblay et al., 2017). Ces muscles sont composés respectivement des UMs S (lentes) et FR (résistantes à la fatigue). De manière intéressante, les altérations des propriétés synaptiques ont été observées aux JNMs les plus résistantes du muscle SOL ainsi qu'aux JNMs plus susceptibles du muscle EDL (Tremblay et al., 2017), supportant l'idée qu'une importante résilience à la maladie pourrait être liée à une plus forte activité synaptique (Saxena et al., 2013) (Leroy et al., 2014). Cette observation pourrait également s'appliquer aux MEOs. Sachant que les muscles vulnérable EDL eux possèdent des UMs FF (rapidement fatigables), nous devrions observer une faible excitabilité des MNs.

4.1.1.2 Les altérations au niveau du muscle : une communication neurone-muscle, mais d'avantage...

Dans la SLA, la dénervation musculaire progressive conduit à des réponses compensatoires des muscles qui aident à la réinnervation de la fibre musculaire dénervée. Parmi ces réponses, on trouve notamment des facteurs de croissance (ex. IGF-1, GDNF). Ces réponses sont semblables à celles retrouvées lors du développement normal de la JNM, où il existe une navigation initiale des axones moteurs en direction de leurs muscles cibles. Les CSPs ne sont pas nécessaires à l'établissement du premier contact neurone-muscle (Chow and Poo, 1985). Cependant, elles sont impliquées dans les étapes du développement normal de la JNM, où elles libèrent des molécules influençant le guidage de l'extrémité axonale et la croissance de la JNM (Darabid et al., 2013). Le fait que la CSP soit capable de détecter et de décoder l'activité synaptique en font les candidats principaux de la modulation de la transmission synaptique. En effet, une étude a priorisé l'approche du  $Ca^{2+}$  glial pour démontrer ce propos. L'injection d' $IP_3$  et de BAPTA a provoqué l'augmentation de la libération de NTs et l'élévation de la dépression synaptique. De manière importante, des facteurs neurotrophiques (ex. BDNF, substance P) peuvent également moduler au besoin l'activité calcique des CSPs et celles de leurs récepteurs muscariniques et purinergiques (Bourque and Robitaille, 1998) (Todd et al., 2007).

Des études *in vitro* ont montré que des déficits morpho-fonctionnel du muscle squelettique dans la SLA ont des conséquences sur l'intégrité et la fonction de la JNM humaine (Picchiarelli et al., 2019) (Badu-Mensah et al., 2023) (Ding et al., 2015). Dans ces études, les cellules musculaires squelettiques humaines des mutants *SOD1* et *FUS*, mais aussi celles de patients SLA sporadiques, ont montré des altérations des propriétés des JNMs, telles que l'expression des AChR, la densité et la stabilité des JNMs, ou encore leurs index de fatigue. Globalement, ces études suggèrent que les muscles squelettiques dérivés de patients SLA ont des propriétés intrinsèques qui affectent l'intégrité et la fonction des JNMs indépendamment de l'influence des MNs. Une potentielle explication à ce phénotype est que les mécanismes de signalisation permettant le maintien de la synapse neuromusculaire sont altérés dans muscles de patients SLA. Les mécanismes de réponse aidant la réparation des JNMs impliquent les CSPs (Perez-Gonzalez et al., 2022). Cependant, une étude de notre laboratoire a montré que les propriétés de ces cellules ne

sont pas adaptées chez les souris *SOD1<sup>G37R</sup>*, contribuant à l'instabilité des JNMs. Ainsi, sachant que le dialogue entre le muscle et les MNs est altéré dans la SLA et que les CSPs sont essentielles pour le maintien et la stabilité des JNMs, la modulation des propriétés fonctionnelles des CSPs permettraient aux JNMs des muscles vulnérables d'adopter un profil pro-régénérateur ?

Une analyse longitudinale et approfondie est nécessaire afin de comprendre comment la sélectivité des propriétés synaptiques des MNs vulnérables et résistants impacte ultimement les fonctions des JNMs dans la SLA. Cependant, au-delà des propriétés des MNs, des altérations sont aussi présentes à d'autres niveaux à la JNM, et notamment dans une de ses composantes essentielles, les CSPs. Les études présentées démontrent qu'il existe des interactions bidirectionnelles dynamiques pas uniquement entre les neurones et les muscles mais aussi entre neurones-glie, et soulignent l'importance des CSPs comme partenaires actifs à la JNM.

#### 4.1.1.3 La résistance particulière des MEOs

Les études publiées dans la littérature sont consistantes avec la possibilité que la suractivation des mAChRs des CSPs aux JNMs vulnérables altère l'habileté des CSPs à réparer les JNMs de façon efficace (modifie l'expression des gènes et réduit la formation de ponts et de prolongements gliaux) (Ko and Robitaille, 2015) (Arbour et al., 2015) (Martineau et al., 2020b) (Georgiou et al., 1999) (Wright et al., 2009). De manière intéressante, la paralysie à la toxine botulique, une protéine aux propriétés neurotoxiques, ne produit aucune atrophie des MEOs, seulement quelques changements structuraux minimes du globe oculaire chez le singe adulte (Spencer and McNeer, 1987) suggérant que des mécanismes favorisant la réparation et la réinnervation des JNMs sont présents dans ces muscles résistants. Dans la SLA, des dysfonctions du système oculomoteur ont été reportées, ce qui pourrait expliquer que la dénervation aux JNMs des MEOs soit retardée (Ahmadi et al., 2010) (Pedrosa Domellöf, 2020). Et ces dysfonctions sont significativement corrélées avec des anomalies cognitives (Poletti et al., 2021). Par ailleurs, l'intégrité structurale des JNMs des MEOs est maintenue, ce qui permet aux patients de communiquer via des appareils de suivi du mouvement des yeux, et ce même, jusque dans les derniers stades de leur maladie. Surprenamment, en plus des éléments déjà identifiés et contribuant

à la résistance des MEOs dans la SLA, l'élément glial à la JNM n'a jamais été considéré. Nous supposons que comprendre les propriétés des CSPs aux JNMs résistantes pourra permettre de mieux comprendre la vulnérabilité des JNMs dans la SLA. À la suite de l'augmentation constitutive de l'activité des mAChRs des CSPs aux JNMs des MEOs par les DREADDs, des récepteurs couplés aux protéines G (M3), nous avons observé de l'instabilité au niveau des JNMs. Il semble que cette instabilité soit dépendante du titre du virus. En effet, l'innervation des JNMs semble d'avantage perturbée au niveau des JNMs des rectus droits que celles des rectus gauche, les premiers aillant été exposés à un titre plus élevé du virus. L'activation chronique du DREADD avec le CNO dans l'eau semble avoir induit une activité soutenue des CSPs, reflétant l'hyperactivité des CSPs observée aux JNMs vulnérables. Malheureusement, cette observation ne pourra être confirmée, puisque la fragilité et l'état d'innervation des préparations neuromusculaires ne nous permet pas d'effectuer de l'imagerie calcique avec un taux de succès suffisant chez des animaux dont la maladie est avancée. De plus, il sera important de tester si les fonctions motrices des MEOs sont altérées dues à l'hyperactivation muscarinique en utilisant la vidéo-oculographie, une méthode d'enregistrement automatisée et informatisée des mouvements oculaires. Cet outil s'avère d'ailleurs de plus en plus intéressant dans le diagnostic précoce de maladies neurodégénératives (Chudzik et al., 2024). Une étude protéomique effectuée dans le laboratoire (Provost, F, 2020 [Mémoire de maîtrise, Université de Montréal], *résultats non publiés*) a révélé qu'il existe une expression différentielle des canaux calciques entre les MEOs de souris SOD1 de ceux des souris WT. Ceci pourrait potentiellement expliquer une adaptation synaptique des MEOs conduisant au maintien des éléments de la JNM. Il serait donc intéressant de faire une étude protéomiques après le traitement de CNO afin de voir si l'hyperactivation des mAChRs avec les DREADDs a un impact sur les protéines différentiellement exprimées. Dans la section suivante, nous aborderons un élément essentiel de la synapse tripartite capable de détecter et de moduler l'activité synaptique (section 1.2.2.3.2) : les CSPs, et nous discuterons de leur rôle dans les processus de réparation aux JNMs résistantes et vulnérables.

## 4.2. Rôle des CSPs dans un contexte de vulnérabilité et de résistance

Il semble y avoir des différences importantes dans le patron des forces synaptiques des terminaisons axonales entre les différents types d'UMs (S < FR < FF) (Reid et al., 1999). La survie des MNs dépend de cellules environnantes, les CSPs (Boillée et al., 2006) (Clement et al., 2003) (Kang et al., 2013) (Yamanaka et al., 2008). Le phénotype des CSPs semble grandement corrélé à la vulnérabilité sélective différentielle des JNMs dans la SLA. En effet, nos résultats sur les CSPs aux JNMs du muscle EDL ainsi que les données précédemment recueillies dans le laboratoire, suggèrent que la différence de phénotype entre les CSPs pourrait contribuer à la différence de vulnérabilité observée entre les JNMs dans la SLA.

### 4.2.1 Les altérations de la capacité de détection des CSPs à la JNM

Malgré l'attention particulière apportée aux CSPs dans l'intégrité et la fonction des JNMs au cours des dernières années, cela reste de façon surprenante challengeant d'étudier les CSPs comme un type cellulaire en tant que tel. Cette difficulté vient en partie du fait qu'elles sont étroitement liées à d'autres structures à la JNM, se faisant, elles sont difficiles à isoler. De plus, elles expriment des marqueurs identiques à d'autres cellules de Schwann, notamment le S100 (Jablonka-Shariff et al., 2021). Bien que longtemps étudié comme un marqueur de cellules progénitrices gliales comme celles de la lignée des oligodendrocytes (McTigue et al., 2006), une étude a révélé que les CSPs expriment le NG2 proteoglycan à la JNM (Castro et al., 2020). En croisant des souris NG2dsRed avec une protéine verte fluorescente exprimée dans les cellules S100<sup>+</sup> (S100-EGFP), les auteurs ont été capables d'identifier la présence de cellules qui coexpriment les protéines S100-NG2<sup>+</sup> au niveau de la plaque motrice du muscle EDL dans des conditions physiologiques (Castro et al., 2020). De manière surprenante, l'expression du marquage était maintenue après une lésion nerveuse. Cette étude a mis pour la première fois l'emphase qu'il est possible de cibler et de mieux comprendre les changements des CSPs suivant une dénervation. La CSP est une composante essentielle de la maintenance et de la plasticité de la JNM et ces études récentes ont mis en exergue des marqueurs spécifiques montrant qu'il est possible de les étudier plus clairement qu'il ne l'était possible auparavant.

### **4.3 Hyperactivation muscarinique des CSPs à la JNM**

L'hyperactivité muscarinique des CSPs apparaît dans un premier temps aux JNMs dénervées des muscles SOL et STM dans les stades présymptomatiques de la maladie, nuirait par la suite aux processus de réinnervation des JNMs au cours de la progression de la maladie, ce qui contribueraient à leurs vulnérabilité (Martineau et al., 2018). Nous n'observons pas d'hyperactivité des mAChRs des CSPs à la suite de l'application des agonistes, mais il est possible que celle-ci soit présente lors de la communication endogène après la stimulation du nerf et l'application de l'antagoniste atropine. Cette observation viendrait confirmer les données de Martineau et al. (2018) dans le muscle STM. Par ailleurs, il existerait une corrélation entre l'augmentation de l'excitabilité des mAChRs des CSPs avec le degré de résistance des unités motrices. La *GFAP* est une protéine exprimée par les CSPs et impliquée dans leurs modifications de cytosquelette (Georgiou et al., 1994). Puisque l'activation des mAChRs des CSPs est capable de diminuer l'expression de la *GFAP* (Arbour et al., 2015), il est probable que l'hyperactivité des mAChRs des CSPs observée aux muscles vulnérables puisse être à l'origine de dérèglements et avoir des conséquences sur les changements morphologiques des CSPs. Ainsi, la diminution de l'excitabilité des CSPs pourrait rétablir les niveaux d'expression des GFAP. Cependant, cette possibilité reste à valider par une analyse moléculaire.

### **4.4 Impact de la modulation de l'activité des mAChRs des CSPs**

L'activation des mAChRs des CSPs est un évènement clé qui influence l'état des JNMs vers un phénotype de maintenance ou de réparation. La capacité de détection et le niveau d'activation des mAChRs des CSPs semblent être tributaires d'une réparation efficace et organisée de la JNM (Arbour et al., 2015) (Perez-Gonzalez et al., 2022). D'ailleurs, la stratégie virale utilisée dans ce mémoire avec le traitement M3iLoop est en accord avec cela; la diminution de l'excitabilité des CSPs permet le retour des CSPs dans un état favorisant la plasticité. Rappelons que la fonction du mAChR de type 3 a été altérée par la surexpression de la troisième boucle intracellulaire du récepteur (M3iLoop), créant un peptide dominant négatif entrant en compétition avec les protéines G et réduisant ainsi son interaction avec les récepteurs endogènes.

Même si la pertinence morphologique et la qualité de notre traitement reste à évaluer et à optimiser, notre outil viral demeure une stratégie prometteuse. Par ailleurs, l'optimisation des processus de réinnervation pourrait avoir un meilleur impact fonctionnel comme une meilleure préservation de la masse musculaire et une augmentation de la force maximale générée par le muscle (Sobotka and Mu, 2015). Puisque le traitement M3iLoop restaure l'habileté des CSPs aux JNMs du muscle EDL à décoder l'information, nous prédisons que l'atténuation sélective des mAChRs des CSPs aux JNMs des MEOs serait délétère pour la réparation des JNMs dans la SLA et induirait de l'instabilité. D'ailleurs, les résultats de Wright et al. (2009) montrent que le blocage des mAChRs des CSPs conduit ces dernières à se comporter similairement qu'en cas de dénervation partielle (Wright et al., 2009). Il est également important de mentionner qu'une diminution de l'activation des mAChRs des CSPs favoriserait le retour d'un guidage dirigé des terminaisons axonales par les CSPs en direction de JNMs dénervées et une meilleure réinnervation. La contribution et la sensibilité des mAChRs des CSPs est grandement diminué lorsque des réarrangements morphologiques et fonctionnels sont requis à la JNM. Il semblerait qu'un changement dans les propriétés muscariniques des CSPs causant ultimement des défauts de réparations et de réinnervation des JNMs.

Sachant que les CSPs participe activement au maintien et à la réparation des synapses neuromusculaires (Reynolds and Woolf, 1992) (Son et al., 1996) (Georgiou et al., 1999) (O'Malley et al., 1999) (Feng and Ko, 2008), tout signe d'altération de détection des CSPs couplée à des changements morphologiques des JNMs serait un signe clair de l'incapacité des CPS à maintenir l'intégrité des JNMs. L'augmentation de la présence de prolongements gliaux ainsi que des prolongements axonaux pourrait promouvoir une plus forte réinnervation et aider à préserver la fonction musculaire (Sobotka and Mu, 2015). Or, concernant les MEOs, à la suite du traitement avec le DREADD, nous n'observons pas d'augmentation significative de la polyinnervation des JNMs chez les souris *SOD1<sup>G37R</sup>* qui participerait à la réinnervation. Il est à supposer que la durée de la période de traitement n'est peut-être pas optimale afin d'observer de tels changements au niveau de l'adaptation morphologique des CSPs.

## Perspectives

Les résultats de ce mémoire montrent qu'il est possible de cibler l'excitabilité des CSPs aux jonctions vulnérables grâce à un outil viral. Bien que des travaux du laboratoire sur le modèle *Profilin-1 (PFN-1)* montrent aussi des altérations dans les CSPs, d'autres études dans d'autres modèles de SLA (ex. *TDP-43*, *FUS* et *C9ORF72*) pourraient s'avérer nécessaire afin de souligner une implication plus vaste des CSPs dans la régulation des fonctions de la JNM dans la SLA. Une future série d'expériences importantes serait d'effectuer une étude comportementale afin d'évaluer la fonction musculaire et les performances motrices des animaux à la suite du traitement. Afin de corroborer notre approche de réduction de l'activité des mAChRs des CSPs aux muscles EDL, il serait aussi intéressant d'utiliser un autre outil, les shRNA. Ces petits ARNs en épingles à cheveux sont communément utilisés pour mettre sous silence l'expression d'un gène cible par l'ARN interférence (*RNAi*). Les séquences des shRNA sont encodés dans un vecteur d'ADN qui peut être introduit dans les cellules par transfection d'un plasmide. Des plasmides shRNA encodant des séquences « scrambled » (par réarrangement de la séquence nucléotidique des shRNA) pourraient être utilisées comme contrôle et ne participeraient pas, en effet, à la dégradation spécifique du message cellulaire. Nous nous attendons à des résultats similaires à ceux du virus M3iLoop, c'est-à-dire un blocage partiel de la signalisation muscarinique des CSPs. Pour s'assurer de la reproductibilité des expériences, il serait aussi important d'évaluer les temps d'injections et l'apparition et la progression de la maladie.

L'impact de la diminution de la régulation des mAChRs des CSPs sur les MNs et la survie des axones moteurs requièrent une attention particulière, puisque la préservation des fonctions des JNMs pourrait réduire les signaux de stress et promouvoir la survie des MNs (Perlson et al., 2009). En effet, des travaux dans le laboratoire qui ont conduit à des essais cliniques ont permis d'appuyer ce propos (Tremblay et al., *en préparation*). Puisque nous savons qu'une excitabilité neuromusculaire prolongée corrélée avec l'hyperexcitabilité des MNs est associée à la dégénérescence des MNs dans la SLA, il serait intéressant d'évaluer l'excitabilité des MNs aux JNMs vulnérables et résistantes en utilisant l'électrophysiologie avant et après le traitement viral. Exploiter les capacités intrinsèques



des CSPs afin de promouvoir la réparation des JNMs pourrait avoir un impact prometteur sur la réparation des JNMs et pourrait contribuer à soulager les symptômes dévastateurs des maladies du motoneurones comme la SLA et ainsi améliorer la qualité de vie des patients.

## **Conclusion**

Nos résultats révèlent de profondes altérations fonctionnelles des CSPs aux JNMs vulnérables, affectant leurs trois rôles fondamentaux à la JNM. Notre approche virale est consistante avec l'optique du rôle important des CSPs dans la vulnérabilité des JNMs. Notre étude physiologique et morphologique aux JNMs résistantes a conduit à une nouvelle perspective de la maladie, des cellules gliales ainsi que des fonctions neuromusculaires. Au-delà de la compréhension de la contribution des CSPs dans la SLA sous-tendant la vulnérabilité des JNMs dans la SLA, cette étude a permis d'apporter des connaissances nous permettant de créer des stratégies ciblées envers les CSPs à la JNM. Promouvoir la réparation des JNMs en réduisant l'activation muscarinique des CSPs pourrait être un grand pas vers le maintien des fonctions musculaires des patients et améliorer leur qualité de vie. L'utilisation d'approches thérapeutiques ciblées pourrait renforcer nos efforts actuels d'études des antagonistes de type M3 pour restaurer et maintenir l'innervation des JNMs des patients atteints de SLA.

## Références bibliographiques

- Ahmadi M, Liu J-X, Brännström T, Andersen PM, Stål P, Pedrosa-Domellöf F (2010) Human Extraocular Muscles in ALS. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:3494.
- Akçimen F, Lopez ER, Landers JE, Nath A, Chiò A, Chia R, Traynor BJ (2023) Amyotrophic lateral sclerosis: translating genetic discoveries into therapies. *Nat Rev Genet* 24:642–658.
- Al-Chalabi A, Hardiman O (2013) The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* 9:617–628.
- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 36:846–858.
- Almer G, Teismann P, Stevic Z, Halaschek-Wiener J, Deecke L, Kostic V, Przedborski S (2002) Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology* 58:1277–1279.
- Alonso A, Logroscino G, Jick SS, Hernán MA (2010) Association of smoking with amyotrophic lateral sclerosis risk and survival in men and women: a prospective study. *BMC Neurol* 10:6.
- Aman P, Panagopoulos I, Lassen C, Fioretos T, Mencinger M, Toresson H, Höglund M, Forster A, Rabbitts TH, Ron D, Mandahl N, Mitelman F (1996) Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics* 37:1–8.
- Amendola J, Verrier B, Roubertoux P, Durand J (2004) Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20:2822–2826.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208–215.
- Arbour D, Tremblay E, Martineau É, Julien J-P, Robitaille R (2015) Early and Persistent Abnormal Decoding by Glial Cells at the Neuromuscular Junction in an ALS Model. *J Neurosci* 35:688–706.
- Arbour D, Vande Velde C, Robitaille R (2017) New perspectives on amyotrophic lateral sclerosis: the role of glial cells at the neuromuscular junction: Neuron-glia interactions at the NMJ in ALS. *J Physiol* 595:647–661.
- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL (2007) Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5163–5168.

- Atkin JD, Scott RL, West JM, Lopes E, Quah AKJ, Cheema SS (2005) Properties of slow- and fast-twitch muscle fibres in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord* 15:377–388.
- Aulas A, Vande Velde C (2015) Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Front Cell Neurosci* 9:423.
- Bączyk M, Manuel M, Roselli F, Zytnicki D (2022) From Physiological Properties to Selective Vulnerability of Motor Units in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Adv Neurobiol* 28:375–394.
- Badu-Mensah A, Guo X, Mendez R, Parsaud H, Hickman JJ (2023) The Effect of Skeletal Muscle-Specific Creatine Treatment on ALS NMJ Integrity and Function. *IJMS* 24:13519.
- Baughn MW et al. (2023) Mechanism of STMN2 cryptic splice-polyadenylation and its correction for TDP-43 proteinopathies. *Science* 379:1140–1149.
- Benatar M, Ostrow LW, Lewcock JW, Bennett F, Shefner J, Bowser R, Larkin P, Bruijn L, Wu J (2023) Biomarker Qualification for Neurofilament Light Chain in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Theory and Practice. *Ann Neurol*.
- Bercier V, Hubbard JM, Fidelin K, Duroire K, Auer TO, Revenu C, Wyart C, Del Bene F (2019) Dynactin1 depletion leads to neuromuscular synapse instability and functional abnormalities. *Mol Neurodegeneration* 14:27.
- Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW (2006) Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. *Science* 312:1389–1392.
- Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 512 ( Pt 1):197–209.
- Bradley WG, Mash DC (2009) Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotroph Lateral Scler* 10 Suppl 2:7–20.
- Brenner D et al. (2018) Hot-spot KIF5A mutations cause familial ALS. *Brain* 141:688–697.
- Brites D, Vaz AR (2014) Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. *Front Cell Neurosci* 8:117.
- Brockington A, Ning K, Heath PR, Wood E, Kirby J, Fusi N, Lawrence N, Wharton SB, Ince PG, Shaw PJ (2013) Unravelling the enigma of selective vulnerability in neurodegeneration: motor neurons resistant to degeneration in ALS show distinct gene expression characteristics and decreased susceptibility to excitotoxicity. *Acta Neuropathol* 125:95–109.

- Brooks BR (1994) El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial “Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis” workshop contributors. *J Neurol Sci* 124 Suppl:96–107.
- Brown RH, Al-Chalabi A (2017) Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 377:162–172.
- Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327–338.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281:1851–1854.
- Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234:723–748.
- Butti Z, Patten SA (2018) RNA Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Genet* 9:712.
- Castonguay A, Robitaille R (2001) Differential Regulation of Transmitter Release by Presynaptic and Glial Ca<sup>2+</sup> Internal Stores at the Neuromuscular Synapse. *J Neurosci* 21:1911–1922.
- Castro R, Taetzsch T, Vaughan SK, Godbe K, Chappell J, Settlage RE, Valdez G (2020) Specific labeling of synaptic schwann cells reveals unique cellular and molecular features. *Elife* 9:e56935.
- Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, Nakanishi A (1999) The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci* 169:13–21.
- Chia R, Chiò A, Traynor BJ (2018) Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol* 17:94–102.
- Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, Traynor BG, Eurals Consortium (2009) Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler* 10:310–323.
- Chow I, Poo MM (1985) Release of acetylcholine from embryonic neurons upon contact with muscle cell. *J Neurosci* 5:1076–1082.

- Chudzik A, Śledzianowski A, Przybyszewski AW (2024) Machine Learning and Digital Biomarkers Can Detect Early Stages of Neurodegenerative Diseases. *Sensors* 24:1572.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Julien J-P, Goldstein LSB, Cleveland DW (2003) Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science* 302:113–117.
- Comley LH, Nijssen J, Frost-Nylen J, Hedlund E (2016) Cross-disease comparison of amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy reveals conservation of selective vulnerability but differential neuromuscular junction pathology. *J Comp Neurol* 524:1424–1442.
- Conradi S, Ronnevi LO (1993) Selective vulnerability of alpha motor neurons in ALS: relation to autoantibodies toward acetylcholinesterase (AChE) in ALS patients. *Brain Res Bull* 30:369–371.
- Cooper-Knock J, Higginbottom A, Stopford MJ, Highley JR, Ince PG, Wharton SB, Pickering-Brown S, Kirby J, Hautbergue GM, Shaw PJ (2015) Antisense RNA foci in the motor neurons of C9ORF72-ALS patients are associated with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol* 130:63–75.
- Cooper-Knock J, Walsh MJ, Higginbottom A, Robin Highley J, Dickman MJ, Edbauer D, Ince PG, Wharton SB, Wilson SA, Kirby J, Hautbergue GM, Shaw PJ (2014) Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. *Brain* 137:2040–2051.
- Corcia P, Tauber C, Vercoullie J, Arlicot N, Prunier C, Praline J, Nicolas G, Venel Y, Hommet C, Baulieu J-L, Cottier J-P, Roussel C, Kassiou M, Guilloteau D, Ribeiro M-J (2012) Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7:e52941.
- Corfas G, Velardez MO, Ko C-P, Ratner N, Peles E (2004) Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J Neurosci* 24:9250–9260.
- Costa J, Swash M, de Carvalho M (2012) Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol* 69:1410–1416.
- Couratier P, Corcia P, Lautrette G, Nicol M, Preux P-M, Marin B (2016) Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Rev Neurol (Paris)* 172:37–45.
- Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY (1992) Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10405–10409.

- Dale Purves, George J Augustine, David Fitzpatrick, Lawrence C Katz, Anthony-Samuel LaMantia, James O McNamara, and S Mark Williams. (2001) *Neuroscience*, 2nd edition. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10799/>.
- Darabid H, Arbour D, Robitaille R (2013) Glial Cells Decipher Synaptic Competition at the Mammalian Neuromuscular Junction. *J Neurosci* 33:1297–1313.
- De Vos KJ, Hafezparast M (2017) Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research? *Neurobiol Dis* 105:283–299.
- DeJesus-Hernandez M et al. (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72:245–256.
- Ding X, Ma M, Teng J, Teng RKF, Zhou S, Yin J, Fonkem E, Huang JH, Wu E, Wang X (2015) Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. *Oncotarget* 6:24178–24191.
- Domellöf FP (2012) Extraocular Muscles Response to Neuromuscular Diseases and Specific Pathologies. In: *Craniofacial Muscles* (McLoon LK, Andrade F, eds), pp 75–88. New York, NY: Springer New York. Available at: [https://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4466-4\\_5](https://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4466-4_5) [Accessed February 5, 2024].
- Donaghy C, Pinnock R, Abrahams S, Cardwell C, Hardiman O, Patterson V, McGivern RC, Gibson JM (2010) Slow saccades in bulbar-onset motor neurone disease. *J Neurol* 257:1134–1140.
- Donnelly CJ et al. (2013) RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron* 80:415–428.
- Dunkel P, Chai CL, Sperlágh B, Huleatt PB, Mátyus P (2012) Clinical utility of neuroprotective agents in neurodegenerative diseases: current status of drug development for Alzheimer’s, Parkinson’s and Huntington’s diseases, and amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 21:1267–1308.
- E. G. T. Liddell and Charles S. Sherrington (1925) Recruitment and some other features of reflex inhibition. Available at: <https://www.jstor.org/stable/81056>.
- Eisen A, Kim S, Pant B (1992) Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve* 15:219–224.
- El Far O, Seagar M (2011) SNARE, V-ATPase et neurotransmission. *Med Sci (Paris)* 27:28–31.

- El Oussini H et al. (2016) Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 131:465–480.
- Engel AG (2008) The neuromuscular junction. *Handb Clin Neurol* 91:103–148.
- Fatt P, Katz B (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117:109–128.
- Feng Z, Ko C-P (2008) *The Role of Glial Cells in the Formation and Maintenance of the Neuromuscular Junction*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1132:19–28.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental Neurology* 185:232–240.
- Fischer MD, Gorospe JR, Felder E, Bogdanovich S, Pedrosa-Domellöf F, Ahima RS, Rubinstein NA, Hoffman EP, Khurana TS (2002) Expression profiling reveals metabolic and structural components of extraocular muscles. *Physiol Genomics* 9:71–84.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P (2000) Early and Selective Loss of Neuromuscular Synapse Subtypes with Low Sprouting Competence in Motoneuron Diseases. *J Neurosci* 20:2534–2542.
- Georgiou J, Robitaille R, Charlton MP (1999) Muscarinic Control of Cytoskeleton in Perisynaptic Glia. *J Neurosci* 19:3836–3846.
- Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Chariton MP (1994) Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12:443–455.
- Gordon PH (2013) Amyotrophic Lateral Sclerosis: An update for 2013 Clinical Features, Pathophysiology, Management and Therapeutic Trials. *Aging Dis* 4:295–310.
- Gregory JM, Fagegaltier D, Phatnani H, Harms MB (2020) Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Genet Med Rep* 8:121–131.
- Griffin JW, Thompson WJ (2008) Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 56:1518–1531.
- Hall ZW, Sanes JR (1993) Synaptic structure and development: The neuromuscular junction. *Cell* 72:99–121.
- Harandi VM, Lindquist S, Kolan SS, Brännström T, Liu J-X (2014) Analysis of neurotrophic factors in limb and extraocular muscles of mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 9:e109833.



- Harlow ML, Szule JA, Xu J, Jung JH, Marshall RM, McMahan UJ (2013) Alignment of synaptic vesicle macromolecules with the macromolecules in active zone material that direct vesicle docking. *PLoS One* 8:e69410.
- Harrison AF, Shorter J (2017) RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. *Biochem J* 474:1417–1438.
- Hayashi S, Sakurai A, Amari M, 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.
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T (2007) Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 28:154–164.
- Henkel JS, Beers DR, Siklós L, Appel SH (2006) The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Mol Cell Neurosci* 31:427–437.
- Henkel JS, Engelhardt JI, Siklós L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH (2004) Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 55:221–235.
- Huisman MHB, Seelen M, de Jong SW, Dorresteyn KRIS, van Doormaal PTC, van der Kooi AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, van den Berg LH, Veldink JH (2013) Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:976–981.
- Hung GK, Ciuffreda KJ (2002) Models of Saccade-Vergence Interactions. In: *Models of the Visual System* (Hung GK, Ciuffreda KJ, eds), pp 431–462 *Topics in Biomedical Engineering International Book Series*. Boston, MA: Springer US. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-5865-8\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-5865-8_11) [Accessed February 12, 2024].
- Jablonka-Shariff A, Broberg C, Rios R, Snyder-Warwick AK (2021) T-box transcription factor 21 is expressed in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Muscle and Nerve* 64:109–115.
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069–1077.
- Jiang J, Cleveland DW (2016) Bidirectional Transcriptional Inhibition as Therapy for ALS/FTD Caused by Repeat Expansion in C9orf72. *Neuron* 92:1160–1163.
- Jiang J, Ravits J (2019) Pathogenic Mechanisms and Therapy Development for C9orf72 Amyotrophic Lateral Sclerosis/Frontotemporal Dementia. *Neurotherapeutics* 16:1115–1132.

- Jones RA, Harrison C, Eaton SL, Llaverro Hurtado M, Graham LC, Alkhamash L, Oladiran OA, Gale A, Lamont DJ, Simpson H, Simmen MW, Soeller C, Wishart TM, Gillingwater TH (2017) Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction. *Cell Reports* 21:2348–2356.
- Joyce NC, Carter GT (2013) Electrodiagnosis in persons with amyotrophic lateral sclerosis. *PM R* 5:S89-95.
- Kang BH, Kim JI, Lim YM, Kim KK (2018) Abnormal Oculomotor Functions in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Clin Neurol* 14:464–471.
- Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothstein JD, Bergles DE (2013) Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 16:571–579.
- Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE (2010) Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 33:409–440.
- Keller AF, Gravel M, Kriz J (2009) Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells. *Glia* 57:1130–1142.
- Kim G, Gautier O, Tassoni-Tsuchida E, Ma XR, Gitler AD (2020) ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies. *Neuron* 108:822–842.
- Ko C-P, Robitaille R (2015) Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020503.
- Koppanati BM, Li J, Xiao X, Clemens PR (2009) Systemic delivery of AAV8 in utero results in gene expression in diaphragm and limb muscle: treatment implications for muscle disorders. *Gene Ther* 16:1130–1137.
- Krus KL, Strickland A, Yamada Y, Devault L, Schmidt RE, Bloom AJ, Milbrandt J, DiAntonio A (2022) Loss of Stathmin-2, a hallmark of TDP-43-associated ALS, causes motor neuropathy. *Cell Rep* 39:111001.
- Kurland LT, Mulder DW (1954) Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution, with special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations. *Neurology* 4:355–378.
- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW (2010) TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19:R46-64.
- Lattante S, Rouleau GA, Kabashi E (2013) TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Hum Mutat* 34:812–826.

- Le Gall L, Anakor E, Connolly O, Vijayakumar UG, Duddy WJ, Duguez S (2020) Molecular and Cellular Mechanisms Affected in ALS. *J Pers Med* 10:101.
- Lee H-M, Giguere PM, Roth BL (2014) DREADDs: novel tools for drug discovery and development. *Drug Discov Today* 19:469–473.
- Lenglet T, Camdessanché J-P (2017) Amyotrophic lateral sclerosis or not: Keys for the diagnosis. *Rev Neurol (Paris)* 173:280–287.
- Leroy F, Lamotte d’Incamps B, Imhoff-Manuel RD, Zytnicki D (2014) Early intrinsic hyperexcitability does not contribute to motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *eLife* 3:e04046.
- Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Appel SH (2012) Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol* 237:147–152.
- Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79:416–438.
- Liu J-X, Brännström T, Andersen PM, Pedrosa-Domellöf F (2013) Distinct changes in synaptic protein composition at neuromuscular junctions of extraocular muscles versus limb muscles of ALS donors. *PLoS One* 8:e57473.
- Liu W, Klose A, Forman S, Paris ND, Wei-LaPierre L, Cortés-López M, Tan A, Flaherty M, Miura P, Dirksen RT, Chakkalakal JV (2017) Loss of adult skeletal muscle stem cells drives age-related neuromuscular junction degeneration. *Elife* 6:e26464.
- Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, Cleveland DW (2009) Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4465–4470.
- Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B (2002) The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* 59:1077–1079.
- Longinetti E, Fang F (2019) Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Curr Opin Neurol* 32:771–776.
- López-Erauskin J et al. (2024) Stathmin-2 loss leads to neurofilament-dependent axonal collapse driving motor and sensory denervation. *Nat Neurosci* 27:34–47.
- Love FM, Thompson WJ (1998) Schwann cells proliferate at rat neuromuscular junctions during development and regeneration. *J Neurosci* 18:9376–9385.
- Majounie E et al. (2012) Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 11:323–330.

- Martineau É, Arbour D, Vallée J, Robitaille R (2020a) Properties of Glial Cell at the Neuromuscular Junction Are Incompatible with Synaptic Repair in the *SOD1*<sup>G37R</sup> ALS Mouse Model. *J Neurosci* 40:7759–7777.
- Martineau É, Di Polo A, Vande Velde C, Robitaille R (2018) Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS. *eLife* 7:e41973.
- Martineau É, Di Polo A, Vande Velde C, Robitaille R (2020b) Sex-Specific Differences in Motor-Unit Remodeling in a Mouse Model of ALS. *eNeuro* 7:ENEURO.0388-19.2020.
- Martínez-Silva MDL, Imhoff-Manuel RD, Sharma A, Heckman C, Shneider NA, Roselli F, Zytnicki D, Manuel M (2018) Hypoexcitability precedes denervation in the large fast-contracting motor units in two unrelated mouse models of ALS. *eLife* 7:e30955.
- Martyn JAJ, Fagerlund MJ, Eriksson LI (2009) Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia* 64:1–9.
- McTigue DM, Tripathi R, Wei P (2006) NG2 colocalizes with axons and is expressed by a mixed cell population in spinal cord lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:406–420.
- Meeter LH et al. (2016) Neurofilament light chain: a biomarker for genetic frontotemporal dementia. *Ann Clin Transl Neurol* 3:623–636.
- Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, Akkari PA (2019) ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front Neurosci* 13:1310.
- Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93:421–443.
- Millecamps S et al. (2010) SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 47:554–560.
- Mitchell JC, Constable R, So E, Vance C, Scotter E, Glover L, Hortobagyi T, Arnold ES, Ling S-C, McAlonis M, Da Cruz S, Polymenidou M, Tassarolo L, Cleveland DW, Shaw CE (2015) Wild type human TDP-43 potentiates ALS-linked mutant TDP-43 driven progressive motor and cortical neuron degeneration with pathological features of ALS. *Acta Neuropathol Commun* 3:36.
- Monani UR (2005) Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* 48:885–896.
- Montuschi A, Iazzolino B, Calvo A, Moglia C, Lopiano L, Restagno G, Brunetti M, Ossola I, Lo Presti A, Cammarosano S, Canosa A, Chiò A (2015) Cognitive correlates in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study in Italy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86:168–173.

- Münch C, Sedlmeier R, Meyer T, Homberg V, Sperfeld AD, Kurt A, Prudlo J, Peraus G, Hanemann CO, Stumm G, Ludolph AC (2004) Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology* 63:724–726.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10:615–622.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130–133.
- Newman ZL, Hoagland A, Aghi K, Worden K, Levy SL, Son JH, Lee LP, Isacoff EY (2017) Input-Specific Plasticity and Homeostasis at the *Drosophila* Larval Neuromuscular Junction. *Neuron* 93:1388-1404.e10.
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2001) Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1beta in neurodegeneration. *Ann Neurol* 50:630–639.
- Nijssen J, Comley LH, Hedlund E (2017) Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133:863–885.
- O'Malley JP, Waran MT, Balice-Gordon RJ (1999) In vivo observations of terminal Schwann cells at normal, denervated, and reinnervated mouse neuromuscular junctions. *J Neurobiol* 38:270–286.
- Panatier A, Robitaille R (2012) [Astrocyte, a key partner of neurons during basal synaptic transmission]. *Med Sci (Paris)* 28:582–584.
- Panatier A, Vallée J, Haber M, Murai KK, Lacaille J-C, Robitaille R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785–798.
- Park RM, Schulte PA, Bowman JD, Walker JT, Bondy SC, Yost MG, Touchstone JA, Dosemeci M (2005) Potential occupational risks for neurodegenerative diseases. *Am J Ind Med* 48:63–77.
- Pasinelli P, Brown RH (2006) Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7:710–723.
- Pedrosa Domellöf F (2020) The Extraocular Muscles Are Selectively Spared in ALS. In: *Amyotrophic Lateral Sclerosis - Recent Advances and Therapeutic Challenges* (L. Hegde M, ed). IntechOpen. Available at: <https://www.intechopen.com/books/amyotrophic-lateral-sclerosis-recent-advances-and-therapeutic-challenges/the-extraocular-muscles-are-selectively-spared-in-als> [Accessed January 21, 2024].

- Perez-Gonzalez AP, Provost F, Rouse I, Piovesana R, Benzina O, Darabid H, Lamoureux B, Wang YS, Arbour D, Robitaille R (2022) Functional adaptation of glial cells at neuromuscular junctions in response to injury. *Glia* 70:1605–1629.
- Perlson E, Jeong G-B, Ross JL, Dixit R, Wallace KE, Kalb RG, Holzbaur ELF (2009) A switch in retrograde signaling from survival to stress in rapid-onset neurodegeneration. *J Neurosci* 29:9903–9917.
- Picchiarelli G et al. (2019) FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 22:1793–1805.
- Pickles S, Vande Velde C (2012) Misfolded SOD1 and ALS: zeroing in on mitochondria. *Amyotroph Lateral Scler* 13:333–340.
- Poletti B, Solca F, Carelli L, Diena A, Colombo E, Torre S, Maranzano A, Greco L, Cozza F, Lizio A, Ferrucci R, Girotti F, Verde F, Morelli C, Lunetta C, Silani V, Ticozzi N (2021) Association of Clinically Evident Eye Movement Abnormalities With Motor and Cognitive Features in Patients With Motor Neuron Disorders. *Neurology* 97:e1835–e1846.
- Pradat P-F, Bruneteau G (2006) [Differential diagnosis and atypical subsets of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 162 Spec No 2:4S81-84S90.
- Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21:3369–3374.
- Protter DSW, Parker R (2016) Principles and Properties of Stress Granules. *Trends in Cell Biology* 26:668–679.
- Provenzano F, Torazza C, Bonifacino T, Bonanno G, Milanese M (2023) The Key Role of Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Their Commitment to Glutamate Excitotoxicity. *Int J Mol Sci* 24:15430.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P (2006) Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9:408–419.
- Pupillo E, Messina P, Logroscino G, Beghi E, SLALOM Group (2014) Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Ann Neurol* 75:287–297.
- Qian K, Huang H, Peterson A, Hu B, Maragakis NJ, Ming G-L, Chen H, Zhang S-C (2017) Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports* 8:843–855.

- Ransohoff RM (2016) A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* 19:987–991.
- Reddy LV, Koirala S, Sugiura Y, Herrera AA, Ko C-P (2003) Glial Cells Maintain Synaptic Structure and Function and Promote Development of the Neuromuscular Junction In Vivo. *Neuron* 40:563–580.
- Redman RS, Silinsky EM (1994) ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J Physiol* 477:117–127.
- Reid B, Slater CR, Bewick GS (1999) Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *J Neurosci* 19:2511–2521.
- Reynolds ML, Woolf CJ (1992) Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol* 21:50–66.
- Robitaille R (1998) Modulation of Synaptic Efficacy and Synaptic Depression by Glial Cells at the Frog Neuromuscular Junction. *Neuron* 21:847–855.
- Rocha MC, Pousinha PA, Correia AM, Sebastião AM, Ribeiro JA (2013) Early Changes of Neuromuscular Transmission in the SOD1(G93A) Mice Model of ALS Start Long before Motor Symptoms Onset Raoul C, ed. *PLoS ONE* 8:e73846.
- Rochon D, Rouse I, Robitaille R (2001) Synapse–Glial Interactions at the Mammalian Neuromuscular Junction. *J Neurosci* 21:3819–3829.
- Rodríguez MA, Liu J-X, Parkkonen K, Li Z, Pedrosa Domellöf F (2018) The Cytoskeleton in the Extraocular Muscles of Desmin Knockout Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59:4847.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O’Regan JP, Deng HX (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59–62.
- Roth BL (2016) DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89:683–694.
- Rouse I, St.-Amour A, Darabid H, Robitaille R (2010) Synapse–glial interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties. *Neuroscience* 167:621–632.
- Rowland LP, Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344:1688–1700.
- Rutherford NJ et al. (2008) Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 4:e1000193.
- Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J (2015) Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol Clin* 33:855–876.

- Saxena S, Roselli F, Singh K, Leptien K, Julien J-P, Gros-Louis F, Caroni P (2013) Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival. *Neuron* 80:80–96.
- Scekic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, Wagner M, Sun Y, Allmeroth K, Dieterlé S, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, René F, Dormann D, Haass C, Ludolph AC, Lagier-Tourenne C, Storkebaum E, Dupuis L (2017) Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133:887–906.
- Scotter EL, Chen H-J, Shaw CE (2015) TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics* 12:352–363.
- Sharma R (2011) Oculomotor Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Comprehensive Review. *Arch Neurol* 68:857.
- Shibuya K, Otani R, Suzuki Y-I, Kuwabara S, Kiernan MC (2022) Neuronal Hyperexcitability and Free Radical Toxicity in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Established and Future Targets. *Pharmaceuticals (Basel)* 15:433.
- Slater CR (2015) The functional organization of motor nerve terminals. *Prog Neurobiol* 134:55–103.
- Sobotka S, Mu L (2015) Muscle reinnervation with nerve-muscle-endplate band grafting technique: correlation between force recovery and axonal regeneration. *J Surg Res* 195:144–151.
- Son Y-J, Thompson WJ (1995a) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by schwann cells. *Neuron* 14:133–141.
- Son Y-J, Thompson WJ (1995b) Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 14:125–132.
- Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ (1996) Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci* 19:280–285.
- Sorenson EJ (2012) The electrophysiology of the motor neuron diseases. *Neurol Clin* 30:605–620.
- Spencer RF, McNeer KW (1987) Botulinum toxin paralysis of adult monkey extraocular muscle. Structural alterations in orbital, singly innervated muscle fibers. *Arch Ophthalmol* 105:1703–1711.
- Spencer RF, Porter JD (2006) Biological organization of the extraocular muscles. *Prog Brain Res* 151:43–80.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Bellerocche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-



- Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319:1668–1672.
- Strong MJ (2003) The basic aspects of therapeutics in amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacol Ther* 98:379–414.
- Sugiura Y, Lin W (2011) Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function. *Biosci Rep* 31:295–302.
- Sun S, Sun Y, Ling S-C, Ferraiuolo L, McAlonis-Downes M, Zou Y, Drenner K, Wang Y, Ditsworth D, Tokunaga S, Kopelevich A, Kaspar BK, Lagier-Tourenne C, Cleveland DW (2015) Translational profiling identifies a cascade of damage initiated in motor neurons and spreading to glia in mutant SOD1-mediated ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E6993-7002.
- Sutedja NA, Veldink JH, Fischer K, Kromhout H, Heederik D, Huisman MHB, Wokke JHJ, van den Berg LH (2009) Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Amyotroph Lateral Scler* 10:302–309.
- Talbott EO, Malek AM, Lacomis D (2016) The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handb Clin Neurol* 138:225–238.
- Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW (2016) Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 539:197–206.
- Todd KJ, Auld DS, Robitaille R (2007) Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse: Neurotrophin signalling to PSCs. *European Journal of Neuroscience* 25:1287–1296.
- Todd KJ, Darabid H, Robitaille R (2010) Perisynaptic Glia Discriminate Patterns of Motor Nerve Activity and Influence Plasticity at the Neuromuscular Junction. *J Neurosci* 30:11870–11882.
- Todd KJ, Serrano A, Lacaille J-C, Robitaille R (2006) Glial cells in synaptic plasticity. *J Physiol Paris* 99:75–83.
- Torazza C, Provenzano F, Gallia E, Cerminara M, Balbi M, Bonifacino T, Tessitore S, Ravera S, Usai C, Musante I, Puliti A, Van Den Bosch L, Jafar-nejad P, Rigo F, Milanese M, Bonanno G (2023) Genetic Downregulation of the Metabotropic Glutamate Receptor Type 5 Dampens the Reactive and Neurotoxic Phenotype of Adult ALS Astrocytes. *Cells* 12:1952.
- Tremblay E, Martineau É, Robitaille R (2017) Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model: When Motor Units Matter. *J Neurosci* 37:8901–8918.

- Turner BJ, Ackerley S, Davies KE, Talbot K (2010) Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. *Hum Mol Genet* 19:815–824.
- Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Fox MA, Sanes JR (2012) Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One* 7:e34640.
- Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del Gaizo Moore V, Yoshikawa M, Hampton TG, Prevette D, Caress J, Oppenheim RW, Milligan C (2013) Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav* 3:335–350.
- Waite AJ, Bäumer D, East S, Neal J, Morris HR, Ansorge O, Blake DJ (2014) Reduced C9orf72 protein levels in frontal cortex of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration brain with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion. *Neurobiol Aging* 35:1779.e5-1779.e13.
- Walusinski O (2022) François-Amilcar Aran (1817-1861) and the recognition of spinal muscular atrophy. *Rev Neurol (Paris)* 178:756–765.
- Wang L, Pytel P, Feltri ML, Wrabetz L, Roos RP (2012) Selective knockdown of mutant SOD1 in Schwann cells ameliorates disease in G85R mutant SOD1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 48:52–57.
- Williamson TL, Cleveland DW (1999) Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2:50–56.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14:1105–1116.
- Wright MC, Potluri S, Wang X, Dentcheva E, Gautam D, Tessler A, Wess J, Rich MM, Son Y-J (2009) Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses. *J Neurosci* 29:14942–14955.
- Xu L, Liu T, Liu L, Yao X, Chen L, Fan D, Zhan S, Wang S (2020) Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol* 267:944–953.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11:251–253.
- Yin X, Wang S, Qi Y, Wang X, Jiang H, Wang T, Yang Y, Wang Y, Zhang C, Feng H (2018) Astrocyte elevated gene-1 is a novel regulator of astroglialosis and excitatory

- amino acid transporter-2 via interplaying with nuclear factor- $\kappa$ B signaling in astrocytes from amyotrophic lateral sclerosis mouse model with hSOD1 G93A mutation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 90:1–11.
- Zhan J, Komal R, Keenan WT, Hattar S, Fernandez DC (2019) Non-invasive Strategies for Chronic Manipulation of DREADD-controlled Neuronal Activity. *J Vis Exp*.
- Zhang C, Saunders AJ (2009) An emerging role for Ubiquilin 1 in regulating protein quality control system and in disease pathogenesis. *Discov Med* 8:18–22.
- Zuo T, Gong B, Gao Y, Yuan L (2023) An in vitro study on the stimulatory effects of extracellular glutamate on astrocytes. *Mol Biol Rep* 50:6611–6617.