

Université de Montréal

**Altérations des cellules de Schwann pérисynaptiques à la
jonction neuromusculaire: implications pour la sclérose
latérale amyotrophique.**

par Danielle Arbour

Département de Neurosciences
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor*
en Sciences neurologiques

Juillet, 2016

© Danielle Arbour, 2016

Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative foudroyante provoquant la mort des personnes atteintes à l'intérieur de deux à cinq ans suivant leur diagnostic. La SLA est une maladie caractérisée notamment par la dégénérescence des motoneurones et la destruction de la jonction neuromusculaire (JNM). Bien que la contribution des cellules gliales du SNC au développement et à la progression de la maladie soit bien établie, peu d'études se sont intéressées aux propriétés des cellules gliales à la JNM, les cellules de Schwann pérисynaptique (CSPs) dans le contexte de la SLA. Les CSPs sont impliquées dans une multitude de fonctions essentielles à la JNM, dont son établissement lors du développement, son efficacité synaptique, son maintien et sa réparation en cas de blessure. Il a été proposé que la régulation de ces diverses fonctions s'opère via l'activation des récepteurs muscariniques (mAChRs) des CSPs. Puisqu'aucune caractérisation de ces cellules n'a été faite, l'objectif de cette thèse était donc de procéder à une évaluation détaillée de la JNM dans un modèle de souris SOD1 (G37R). Plus particulièrement, je me suis concentrée sur la capacité de détection de la transmission synaptique et de réparation des CSPs. Nos résultats suggèrent qu'un niveau d'activation élevé des mAChRs est un élément déterminant pour la synchronisation des CSPs avec leur synapse et pour leur permettre de procéder à la réparation de la JNM dans des conditions pathologiques de SLA. Dans l'ensemble, ces résultats ont permis d'actualiser la vision de la JNM dans la SLA et sont les premiers à mettre en lumière non seulement les altérations fonctionnelles des CSPs, mais également l'impact physiologique de telles altérations. De plus, les résultats de cette thèse pourraient avoir des implications majeures pour l'avancement des connaissances dans le domaine de recherche sur la SLA, plaçant les CSPs directement sur la liste des cibles thérapeutiques potentielles. Par conséquent, la qualité de vie des patients atteints de cette maladie pourrait être améliorée par la poursuite des travaux issus de cette thèse.

Mots-clés : sclérose latérale amyotrophique, motoneurone, jonction neuromusculaire, cellule de Schwann pérисynaptique, récepteur muscarinique, électrophysiologie, immunohistochimie

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease causing the death of diagnosed people within two to five years. Notably, ALS is a disease characterized by motor neuron degeneration and destruction of the neuromuscular junction (NMJ). Although the contribution of glial cells in the CNS to disease development and progression is now well established, the properties of glial cells at the NMJ, perisynaptic Schwann cells (PSCs), remains ill defined. PSCs are involved in a variety of NMJ functions, including its establishment during development, the regulation of its synaptic transmission and maintenance and its repair in the context of injury. It has been proposed that muscarinic receptors (mAChRs) regulate these functions in PSCs. Since no characterization of these cells in the context of NMJ function has been made in ALS, the objective of this thesis was to conduct a comprehensive assessment of the NMJ in a SOD1 (G37R) mouse model. Most specifically, we have focused on the ability of PSCs to detect synaptic transmission and to promote NMJ repair. Our results suggest that a high level of mAChRs activation is a key element for the synchronization of PSCs with their associated synapse and to enable them to repair the NMJ in ALS. Overall, these results are essential to update the vision of the NMJ in ALS and are the first to put in the spotlight not only functional alterations of PSCs, but also the physiological impact of such alterations. In addition, the results of this thesis could have major implications for the advancement of knowledge in the field of research on ALS, placing PSCs directly on the list of potential therapeutic targets. Therefore, the quality of life of patients with this disease could be improved by further work derived from this thesis.

Keywords : amyotrophic lateral sclerosis, motoneuron, neuromuscular junction, perisynaptic Schwann cell, muscarinic receptor, electrophysiology, immunohistochemistry

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xv
Préambule.....	1
Introduction.....	3
1. Sclérose latérale amyotrophique.....	4
1.1 Étymologie.....	4
1.2 Épidémiologie.....	4
1.2.1 Incidence, prévalence, pronostic et traitements.....	4
1.3 Description de la maladie.....	5
1.3.1 Dégénérescence des motoneurones.....	5
1.3.1.1 Atteinte des motoneurones supérieurs et inférieurs.....	5
1.3.1.2 Motoneurones préservés.....	8
1.3.2 Symptômes et progression.....	9
1.3.2.1 Formes spinale et bulbaire.....	9
1.3.2.2 Atteintes cognitives.....	10
1.3.2.3 Progression.....	10
1.3.3 Formes familiale et sporadique.....	12
1.3.3.1 Différents gènes associés à la maladie.....	14
1.3.3.1.1 Gène et protéine SOD1.....	14
1.3.3.1.2 Mutations de la SOD1 dans la SLA.....	15
1.3.3.1.3 Modèles expérimentaux.....	18
1.3.3.1.3.1 Souris transgéniques SOD1.....	19

1.4	Étiologie.....	20
1.4.1	Stress du réticulum endoplasmique	22
1.4.2	Altérations de l'homéostasie des protéines.....	24
1.4.3	Anomalies des mitochondries.....	25
1.4.4	Stress oxydatif.....	28
1.4.5	Perturbations du métabolisme de l'ARN	30
1.4.6	Sécrétion extracellulaire des protéines SOD1 mutées	31
1.4.7	Excitotoxicité.....	32
1.4.8	Activation différentielle des MNs.....	34
1.4.9	Altérations du transport axonal.....	36
1.4.11	Perturbations vasculaires	38
1.4.12	Perspectives de l'étiologie	39
2.	Contribution des cellules gliales à la SLA.....	43
2.1	Cellules gliales du système nerveux central	45
2.1.1	Astrocytes	45
2.1.1.1	Rôles des astrocytes en conditions physiologiques	45
2.1.1.2	Contribution des astrocytes dans la SLA.....	46
2.1.2	Cellules microgliales.....	49
2.1.2.1	Rôles des cellules microgliales en conditions physiologiques	49
2.1.2.2	Contribution des cellules microgliales dans la SLA	51
2.1.3	Oligodendrocytes	52
2.1.3.1	Rôles des oligodendrocytes en conditions physiologiques.....	52
2.1.3.2	Contribution des oligodendrocytes dans la SLA	53
2.2	Cellules gliales du système nerveux périphérique.....	54
2.2.1	Cellules de Schwann myélinisantes.....	54
2.2.1.1	Rôles des cellules de Schwann myélinisantes en conditions physiologiques....	54
2.2.1.2	Contribution des cellules de Schwann dans la SLA	54
3.	Jonction neuromusculaire	57
3.1	Importance de la JNM dans la SLA.....	57
3.1.1	Concept des unités motrices et diversité fonctionnelle.....	57
3.1.2	Susceptibilité différentielle des UMs.....	61

3.1.3	La JNM, un site primaire de vulnérabilité dans la SLA	62
3.1.4	Mécanismes compensatoires à la JNM	63
3.2	Structure et fonction de la JNM	64
3.2.1	Concept de la synapse tripartite	67
3.2.2	Description des éléments pré- et postsynaptiques	68
3.2.2.1	La terminaison axonale du neurone moteur	68
3.2.2.1.1	Organisation de la terminaison axonale	68
3.2.2.1.2	Relâche de NTs à la JNM	72
3.2.2.2	Les récepteurs nicotiniques de la fibre musculaire	74
3.3	Cellules de Schwann pérисynaptiques	76
3.3.1	Description et rôles	76
3.3.1.1	Développement de la JNM	77
3.3.1.2	Maintien fonctionnel et morphologique de la JNM	79
3.3.1.2	Détection de la transmission synaptique	79
3.3.1.3	Modulation de la transmission synaptique	83
3.3.1.4	Réparation de la JNM	85
3.3.1.5	Activation différentielle des récepteurs des CSPs selon l'état d'innervation ...	89
3.3.1.6	Les mAChRs, une plaque tournante pour les fonctions des CSPs	91
4.	Hypothèse et buts de la thèse	95
5.	Premier article de recherche	99
5.1	Introduction au premier article de recherche	99
5.2	EARLY AND PERSISTENT ABNORMAL DECODING BY GLIAL CELLS AT THE NEUROMUSCULAR JUNCTION IN AN ALS MODEL	101
5.2.1	ABSTRACT	102
5.2.2	INTRODUCTION	103
5.2.3	MATERIALS AND METHODS	105
5.2.4	RESULTS	111
5.2.5	DISCUSSION	141
5.2.6	CONCLUSION	145
5.2.7	ACKNOWLEDGEMENTS	145
5.2.8	REFERENCES	146

6.	Deuxième article de recherche	156
6.1	Introduction au deuxième article de recherche	156
6.2	CHRONIC <i>IN VIVO</i> DAMPENING OF GLIAL EXCITABILITY FOSTERS NEUROMUSCULAR JUNCTION REPAIR IN ALS	158
6.2.1	ABSTRACT	159
6.2.2	INTRODUCTION	160
6.2.3	RESULTS	162
6.2.4	DISCUSSION	198
6.2.5	CONCLUSION.....	203
6.2.6	EXPERIMENTAL PROCEDURES	204
6.2.7	ACKNOWLEDGEMENTS.....	211
6.2.8	REFERENCES	212
7.	Discussion générale	218
7.1	Implications des altérations de la capacité de détection des CSPs	220
7.1.1	Altérations synaptiques à la JNM de SLA	220
7.1.2	Altérations du décodage glial à la JNM de SLA.....	223
7.1.2.1	Impact sur la modulation synaptique	223
7.1.2.1.1	Libération altérée de purines.....	224
7.1.2.2	Impact sur la stabilité morphologique.....	226
7.2	Implications des altérations des mAChRs des CSPs dans la SLA.....	226
7.2.1	Activation muscarinique et purinergique des CSPs.....	226
7.2.1.1	Une balance appropriée pour un phénotype glial approprié	227
7.2.1.2	Notion de seuil d'activation muscarinique	230
7.2.1.3	Mécanismes moléculaires à la base des altérations des mAChRs.....	233
7.2.2	Implications pour la réparation de la JNM dans la SLA.....	234
7.3	Implications morphologiques et fonctionnelles de l'augmentation de la réparation dans la SLA	240
7.3.1	Les processus de réparation : une course contre la montre !	241
7.3.2	Impact sur la survie du motoneurone.....	245

7.4	Introduction à l'article de revue	249
7.4.1	NEW PERSPECTIVES ON THE NEUROMUSCULAR JUNCTION IN ALS: THE ROLE OF GLIAL CELLS	250
7.4.1.1	ABSTRACT	251
7.4.1.2	INTRODUCTION	253
7.4.1.3	ALS-RELATED ELECTROPHYSIOLOGICAL CHANGES IN MNS AND NMJs	256
7.4.1.4	THE ROLE OF PSCs IN PATHOLOGICAL CHANGES AT THE NMJ	262
7.4.1.5	MOLECULAR AND AGE-DEPENDENT INTERACTIONS AT THE NMJ IN ALS	268
7.4.1.6	CONCLUSIONS	275
7.4.1.7	ACKNOWLEDGEMENTS	275
7.4.1.8	REFERENCES	276
7.5	Actualisation du modèle de la JNM et de la contribution gliale dans la SLA	289
7.5.1	Actualisation du modèle de la JNM dans la SLA	289
7.5.2	CSP, un élément glial pouvant influencer le développement et la progression de la maladie	291
7.5.3	Actualisation de la contribution gliale dans le SNC dans la SLA	293
7.6	Implications des résultats de cette thèse pour la recherche fondamentale et clinique	294
7.6.1	Implications pour la recherche fondamentale sur les CSPs à la JNM de souris SLA	295
7.6.2	Implications pour la recherche clinique pour les patients atteints de SLA	296
7.6.3	Implications pour la recherche portant sur le vieillissement normal	296
7.6.4	Implications pour la recherche portant sur d'autres maladies neuromusculaires	297
	Conclusion	299
	Bibliographie	300
	Annexe 1	i

Liste des tableaux

Tableaux de l'introduction

Tableau 3.1	Caractéristiques des différentes UMs	58
Tableau 3.2	Contribution et sensibilité des mAChRs et des P2Rs en fonction de l'âge et de l'état d'innervation.....	90

Tableaux du premier article de recherche

Tableau 5.1	Definition and example of criteria used in the morphological analysis of NMJs	112
Tableau 5.2	Percentage of NMJs that meet criteria used in the morphological analysis for each animal group	115

Tableau de la discussion générale

Tableau 7.1	Liste des différents mécanismes proposés relatant l'implication physiologique potentielle des CSPs dans la maladie de la SLA.....	248
--------------------	---	-----

Liste des figures

Figures de l'introduction

Figure 1.1	Dégénérescence des neurones moteurs dans la SLA.....	7
Figure 1.2	Principaux gènes associés à la SLA	13
Figure 1.3	Séquence et sites de mutations du gène SOD1	17
Figure 1.4	Dix mécanismes potentiels pour expliquer la toxicité conférée par la mutation SOD1	21
Figure 2.1	Contribution des cellules non-neuronales à la SLA	44
Figure 3.1	Concept et vulnérabilité des UMs	60
Figure 3.2	Concept de la synapse tripartite.....	66
Figure 3.3	Organisation structurale de la terminaison axonale.....	70
Figure 3.4	Organisation structurale de l'élément postsynaptique.....	75
Figure 3.5	Organisation structurale de l'élément glial pérисynaptique	81
Figure 3.6	Réparation de la JNM	88
Figure 3.7	Contribution et sensibilité des mAChRs en fonction du statut d'innervation.	91
Figure 3.8	Modèle du niveau d'activation des mAChRs des CSPs et du destin de la JNM.	93
Figure 4.1	Hypothèses de l'activation des mAChRs et la régulation de la réparation par les CSPs à la JNM de souris SLA	97

Figures du premier article de recherche

Figure 5.1	Morphology is unaltered at presymptomatic stage of the disease	113
Figure 5.2	Altered PSC excitability at presymptomatic stage of the disease	118
Figure 5.3	Enhanced synaptic transmission at NMJs from SOD1 ^{G37} mice at presymptomatic stage of the disease.....	121
Figure 5.4	PSC decoding ability is unaffected by an increase in transmitter release	123
Figure 5.5	PSC Ca ²⁺ responses to local application of ATP and muscarine	125

Figure 5.6	Larger contribution of mAChR activation of PSCs during synaptic transmission in SOD1 ^{G37R} mice	129
Figure 5.7	Enhanced synaptic transmission at NMJs from SOD1 ^{G37} mice at preonset stage of the disease.....	132
Figure 5.8	Altered PSC excitability at preonset stage of the disease.....	134
Figure 5.9	PSC Ca ²⁺ responses to local application of ATP and muscarine at preonset stage of the disease	137
Figure 5.10	Timeline of changes in NMJ structure and function at presymptomatic stages of the disease in SOL muscle.....	140

Figures du deuxième article de recherche
--

Figure 6.1	PSC mAChRs sensitivity is altered at denervated NMJs of YFP.SOD1 ^{G37R} animals	163
Figure S6.1	Validation of the denervated and innervated NMJs from YFP.SOD1 ^{G37R} animal	165
Figure S6.2	PSC mAChRs sensitivity at denervated NMJs of YFP.WT animals	166
Figure 6.2	PSCs ability to repair NMJs is altered in symptomatic SOD1 ^{G37R} mouse model	169
Figure 6.3	<i>In situ</i> Pirenzepine selectively decreased PSCs Ca ²⁺ responses induced by muscarine	172
Figure 6.4	Chronic <i>in vivo</i> mAChRs blockade restored PSCs excitability.....	175
Figure S6.3	Controls of chronic <i>in vivo</i> injections.....	177
Figure S6.4	Chronic <i>in vivo</i> injections did not affect animal body weight.....	179
Figure S6.5	Chronic <i>in vivo</i> mAChRs blockade solely changed PSCs excitability to muscarine application in WT animals.....	181
Figure 6.5	Chronic <i>in vivo</i> mAChRs blockade did not affect synaptic properties.....	183
Figure 6.6	Chronic <i>in vivo</i> mAChRs blockade promotes NMJ repair in SOD1 ^{G37R} mice..	185
Figure S6.6	Saline injections do not alter NMJs from WT and SOD1 ^{G37R} animals.....	187
Figure S6.7	Validation of a poly-innervated NMJ from a SOD1 ^{G37R} animal.....	189

Figure 6.7 Chronic <i>in vivo</i> mAChRs blockade promotes poly-innervated NMJs in SOD1 ^{G93A} mice	191
Figure S6.8 Validation of a poly-innervated NMJ from a SOD1 ^{G93A} animal.....	193
Figure 6.8 Chronic <i>in vivo</i> mAChRs blockade promotes a broader diversity of NMJs and a better NMJ repair	195
Figure S6.9 Saline-treated WT and SOD1 ^{G37R} animals share similitudes in the type of NMJs	197

Figures de la discussion générale

Figure 7.1 Modèle des altérations synaptiques et gliales à la JNM de souris SOD1 ^{G37R} ...	219
Figure 7.2 Patron de force synaptique en fonction des réponses calciques des CSPs	221
Figure 7.3 Statut d'innervation en fonction de la sensibilité des mAChRs et des P2Rs dans des conditions normales et pathologiques de SLA	228
Figure 7.4 Adaptabilité muscarinique contextuelle des CSPs	231
Figure 7.5 Modulation de l'activation des mAChRs et impact sur la réparation de la JNM	236
Figure 7.6 Probabilité de réinnervation en fonction de l'activation des mAChRs des CSPs	243
Figure 7.7 Abstract Figure	252
Figure 7.8 Spatial organization of MNs and NMJs	255
Figure 7.9 Potential molecular interactions between PSCs, muscle fibers and motor nerve terminals at NMJs	271
Figure 7.10 Actualisation de la contribution potentielle des CSPs à la JNM dans la maladie de la SLA	293

Liste des sigles et abréviations

ACh : acétylcholine

ATP : adénosine triphosphate

C9orf72 : chromosome 9 open reading frame 72

Ca²⁺ : calcium

Cl⁻ : chlorure

CNTF : facteur neurotrophique ciliaire

CSP : cellule de Schwann pérисynaptique

FF : rapide et fatigable (Fast-fatigable)

FR : rapide et résistante à la fatigue (Fast-resistant)

FTD : démence frontotemporale

FUS : Fused in sarcoma

GABA : acide gamma-aminobutyrique

GFAP : protéine acide fibrillaire gliale

gliot : gliotransmetteur

JNM : jonction neuromusculaire

kDa : kilodalton

LAL : Levator auris longus

mAChR : récepteur muscarinique

MN : motoneurone

mSOD1 : protéine SOD1 mutée

nAChR : récepteur cholinergique nicotinique

NRG : neuréguline

P2R : récepteur purinergique

PPM : potentiel de plaque motrice

PPMm : potentiel de plaque motrice miniature

RE : réticulum endoplasmique

S : lente (Slow)

Sema3A : sémaphorine 3A

SLA : sclérose latérale amyotrophique

SLAf : SLA familiale

SLAs : SLA sporadique

SOD1 : superoxide dismutase 1

SOL : soléus

TDP-43 : TAR DNA-binding protein 43

TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha

UM : unité motrice

*Si je veux être cohérente avec la raison première pour laquelle j'ai choisi de faire le doctorat:
à moi de moi... Cependant, je ne peux m'empêcher de dédier cette thèse à Noëlla Veilleux et
M. Raynald Gagné, tous deux tombés au combat contre la SLA.*

Remerciements

Mes premières pensées vont inévitablement à mon directeur de recherche. Richard, vous m'avez permis de non seulement devenir une scientifique plus mature, mais également de devenir une autre personne. J'ai débuté mon doctorat en sachant ce que je ne voulais pas, alors que je le termine en sachant ce que je veux. Je vous suis également extrêmement reconnaissante pour votre support, votre encadrement, votre confiance, votre patience et l'humanité dont vous avez fait preuve durant ces années. Je souhaite véritablement continuer cette aventure encore longtemps avec vous!

Je souhaite également remercier mes deux parrains, Dr Jannic Boehm et Dre Christine Vande Velde, qui m'ont suivie tout au cours de mon cheminement académique. Tout particulièrement, je souhaite chaleureusement remercier Dre Vande Velde pour ses commentaires constructifs et son intérêt envers mon projet. Christine, votre rigueur scientifique et votre connaissance de la littérature représenteront toujours une source d'inspiration pour moi.

Afin de poursuivre le survol du milieu académique, je souhaite remercier les membres de mon jury, soit Dr Gregorio Valdez de l'Institut de recherche de Virginia Tech Carilion, Dr Louis-Éric Trudeau, Dre Nathalie Arbour et le Dr Karl J.L. Fernandez de l'Université de Montréal, d'avoir accepté de lire et d'examiner cette thèse. D'ailleurs, les travaux de cette thèse ont été rendus possibles grâce au support financier du GRSNC, du CRSNG ainsi que la FESP de l'Université de Montréal.

Je suis aussi extrêmement reconnaissante des disponibilités et conseils que m'ont offerts Joanne Vallée, Isabel Laplante et Julie Pépin tout au long de ce doctorat. Leur bonne humeur au travail a également grandement contribué à rendre mes journées moins longues et tellement plus agréables! J'ai une pensée spéciale pour la Dre Aude Panatier, qui a su m'accompagner dans les premières années de mon doctorat avec un tel encadrement que je m'en souviendrai toujours. Houssam, cher collègue, merci pour ton aide, ta patience et ta disponibilité. Merci à tous les autres membres passés et présents du laboratoire. Bien évidemment, je tiens à remercier les membres de TEAM ALS, soit Elsa Tremblay et Éric

Martineau. Sans vous deux, mon doctorat n'aurait JAMAIS été le même. Je ne changerais aucune expérience, aucune dissection, aucune sortie au G5, aucune analyse, aucune discussion et aucun congrès passés en votre compagnie. Merci de solliciter le meilleur de moi-même, tous les jours!

Pour finir, je souhaite remercier mon père et ma famille pour m'avoir supportée et encouragée dans cette longue aventure! Vous m'avez fidèlement suivie à distance. Votre présence bienveillante a eu un effet très apaisant. Mes amis, merci à vous pour votre écoute, vos encouragements et nos nombreuses discussions! Merci pour le sport, le divertissement et les fins de semaines en nature! Finalement, je souhaite témoigner ma plus sincère gratitude envers mon conjoint de vie, François. Dans les hauts et les bas de ce doctorat, tu as toujours été là. Ton soutien, tes encouragements mais surtout ton amour indéfectible ont été déterminants pour ma réussite. Et tu sais quoi, tu avais raison (encore!)... l'Amour n'existe pas seul.

Préambule

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale pour laquelle il n'existe, jusqu'à présent, malheureusement aucun traitement efficace (Hardiman et al., 2011). La SLA affecte spécifiquement les neurones moteurs (ou motoneurones; MNs) responsables de la commande motrice nécessaire à la contraction volontaire des muscles. Cette dégénérescence des MNs entraîne inévitablement la destruction de l'interface de communication entre le système nerveux et les muscles, la jonction neuromusculaire (JNM) (Fischer et al., 2004). Par conséquent, les patients atteints de la SLA souffriront de divers symptômes dont, principalement, une paralysie graduelle et rapide de presque tous leurs muscles squelettiques.

La perte des JNMs est un élément clé de la maladie puisqu'elle survient de manière très précoce. Plus précisément, la perte des JNMs précède celle des MNs (Pun et al., 2006). La dénervation de ces synapses périphériques n'est cependant pas uniforme; certaines JNMs seraient plus vulnérables à la dénervation alors que d'autres seraient plus résistantes et tenteraient même de compenser pour la perte des JNMs dénervées (Frey et al., 2000). L'identification des mécanismes à l'origine de cette vulnérabilité et de cette capacité différentielle à compenser serait donc essentielle à la compréhension du développement et de la progression de la pathologie.

Bien que la paralysie progressive dans la SLA résulte de la dégénérescence et de la mort des MNs, les résultats issus de plusieurs études publiées au cours des 15 dernières années ont mis en évidence la contribution d'autres types cellulaires non-neuronaux du SNC dans le développement et la progression de la maladie, notamment les cellules gliales, d'où l'émergence du concept de « non-cell autonomous » (Clement et al., 2003). Les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs), cellules gliales à la JNM, sont impliquées dans une multitude de fonctions essentielles au bon fonctionnement de cette synapse (Feng and Ko, 2008; Sugiura and Lin, 2011). En effet, dans des conditions physiologiques, la CSP est capable de détecter le contexte synaptique (JNM innervée vs dénervée) et d'entrer dans des modes fonctionnels distincts de régulation de la synapse (maintenance et efficacité synaptique vs réparation et plasticité morphologique). Il a été proposé que la détection appropriée de l'état

d'innervation ainsi que le choix du mode de régulation s'effectuent par l'entremise du niveau d'activation des récepteurs muscariniques (mAChRs) des CSPs (Ko and Robitaille, 2015). Étonnamment, en dépit des fonctions essentielles qu'elles assument à la JNM, aucune étude ne s'est encore intéressée aux propriétés des CSPs dans la SLA.

Dans cette thèse, je me suis donc attardée à fonctionnellement caractériser les trois composantes de la JNM, et tout particulièrement la CSP. Une attention toute particulière a d'ailleurs été portée sur les mAChRs des CSPs. Le corps de cette thèse comporte deux articles de recherche démontrant que l'activation des mAChRs des CSPs est altérée de manière précoce et persistante dans un modèle de souris de la SLA et qu'une diminution chronique de cette activation peut rétablir la capacité des CSPs à détecter l'état de la JNM et ainsi favoriser sa réparation. Les résultats de ces deux articles scientifiques auront servi à mettre sous les projecteurs cette cellule qui, jusqu'ici, a été négligée dans la SLA.

Afin de dresser un portrait de la complexité de cette maladie neurodégénérative, l'introduction traitera tout d'abord de l'état actuel des connaissances sur l'épidémiologie et l'étiologie de la SLA. Cette section focalisera, entre autres, sur la mutation d'un gène associé avec la SLA, celui de la superoxyde dismutase 1 ou communément appelé SOD1. Le modèle animal utilisé pour les travaux de cette thèse est d'ailleurs porteur de ce gène muté. Ensuite, le concept de « non-cell autonomy » dans le SNC et SNP sera développé. Puisque cette thèse aborde la problématique de la dénervation de la JNM, il est nécessaire en troisième lieu d'introduire les composantes morphologiques et structurelles de cette dernière. Finalement, une description des CSPs ainsi que leurs fonctions à la JNM sera présentée.

Un article de revue fait également partie de cette thèse. Il est intégré dans la discussion puisqu'il porte sur les perspectives des interactions neurone-glie à la JNM de SLA. Également, en guise d'interprétation des résultats, je discuterai des divers impacts que peut avoir cette thèse. Notamment, il sera question des impacts tant au niveau de la recherche fondamentale portant sur les interactions neurone-glie qu'au niveau d'une application clinique pour l'élaboration d'un traitement thérapeutique combiné pour la SLA ou d'autres maladies neuromusculaires. Un quatrième article scientifique, auquel j'ai participé durant mon doctorat, se retrouve en annexe et contribue à la compréhension de la présente thèse.

Introduction

1. Sclérose latérale amyotrophique

1.1 Étymologie

Les origines du nom SLA sont multiples. En effet, « sclérose » vient du mot grec *sklêrôsis* signifiant une dégénérescence qui induit un durcissement pathologique d'une partie du corps ou une cicatrisation. Ce terme décrit également l'incapacité à évoluer et à s'adapter à une nouvelle situation par manque de dynamisme, vieillissement ou pathologie. Le mot « latérale », tant qu'à lui, tire son origine du latin (*lateralis*) qui signifie de côté et fait référence ici à la portion de la moelle épinière où sont localisées les cellules affectées. Pour ce qui est du mot « amyotrophique », il tire son origine du mot grecque *amyotrophia* où le *a* signifie absence de, *myo* signifie muscle et *trophia*, le manque d'alimentation nerveuse, désignant le signe clinique consistant à une atrophie musculaire. En conclusion, l'étymologie nous permet de retrouver la racine des mots et, dans le cas de la SLA, nous permet également de prendre la mesure sur une partie de la complexité de cette maladie à caractère multifactoriel.

1.2 Épidémiologie

1.2.1 Incidence, prévalence, pronostic et traitements

Le taux d'incidence de la SLA (nombre de nouveaux cas diagnostiqués) est estimé à 2 pour 100 000 personnes chaque année alors que sa prévalence serait une approximation s'élevant entre 2500 et 3000 Canadiens âgés de plus de 18 ans qui vivraient actuellement avec la SLA (site Internet de la Société canadienne de la SLA: <https://www.als.ca/fr/node/373>). Le risque de développer la SLA serait plus important chez les hommes et les personnes âgées entre 45 et 75 ans, et ce risque déclinerait par la suite. Cette caractéristique de la maladie suggère que la SLA ne serait pas uniquement une maladie reliée au vieillissement mais plutôt une maladie pour laquelle l'âge est l'un des nombreux facteurs de risque (Hardiman et al., 2011). Le pronostic des patients atteints de la SLA est difficile à prévoir étant donné qu'il

existe différentes formes (familiale ou sporadique) et origines (spinale ou bulbaire) avec divers degrés d'atteinte cognitive (sujets traités dans la section 1.3.2.2). Ainsi, cette hétérogénéité de phénotypes mène inévitablement à différents profils cliniques avec divers taux de progression de la maladie, ce qui suggère que la SLA devrait plutôt être considérée comme un syndrome ou un continuum plutôt qu'une maladie ayant une entité fixe et définie. Cependant, l'issue demeure sans équivoque; les chances éventuelles de guérison sont quasi nulles puisqu'aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour. Le seul traitement réputé pour prolonger la vie des patients de seulement quelques mois demeure le riluzole (discuté en section 1.4.7) (Miller et al., 2007). La plupart des options thérapeutiques médicales pour la gestion des problèmes cliniques rencontrés par les patients visent donc à préserver leur qualité de vie et d'atténuer leurs symptômes et inconforts (Orsini et al., 2015). Malheureusement, l'espérance de vie d'une personne atteinte est d'environ 2 à 5 ans suivant la tombée du diagnostic. La mort survient, la plupart du temps, suite à des complications respiratoires. Le besoin de trouver de nouveaux traitements thérapeutiques se fait donc criant. Il est d'ailleurs important de mentionner que non seulement des traitements curatifs mais également des traitements pouvant ralentir la progression de la maladie sont grandement recherchés.

1.3 Description de la maladie

1.3.1 Dégénérescence des motoneurones

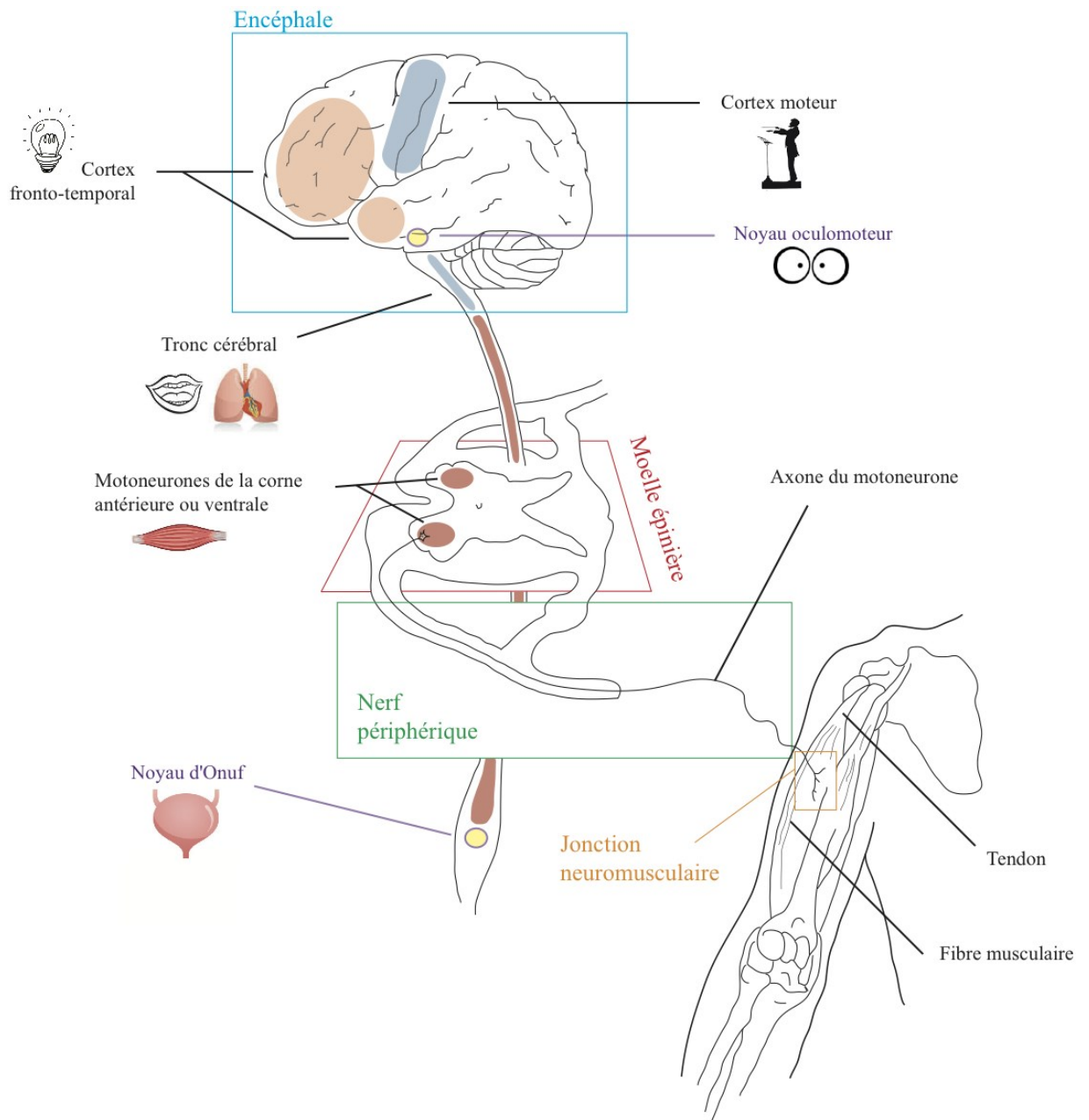
1.3.1.1 Atteinte des motoneurones supérieurs et inférieurs

La SLA peut être aussi désignée soit par la maladie de Charcot, en référence au neurologue français Jean-Martin Charcot ayant été le premier à décrire la maladie au 19^e siècle, ou par la maladie de Lou Gehrig, célèbre joueur de baseball américain non seulement réputé pour son talent mais aussi par le fait qu'il ait été terrassé par la maladie en juin 1941. La SLA est caractérisée par la détérioration et la mort des MNs du cortex moteur, du tronc cérébral ainsi que de la corne antérieure (ou ventrale) de la moelle épinière (Hardiman et al., 2011) (Figure 1.1). Par conséquent, une des principales caractéristiques pathologiques de la SLA est une diminution du nombre de MNs dans le cortex moteur et la moelle épinière (Pioro

et al., 1994; Swash et al., 1986; Wetts and Vaughn, 1996). Notons également la présence d'agrégats de protéines mal repliées et localisés dans les MNs survivants du cortex moteur et de la moelle épinière (Neumann et al., 2006) ainsi qu'une importante activation des astrocytes et des cellules microgliales dans le cortex moteur et la moelle épinière (Henkel et al., 2004; Kawamata et al., 1992; Schiffer et al., 1996). D'une manière non exhaustive, j'ajouterais à cette liste la dénervation de la JNM, qui demeure incontestablement un des éléments clés de cette maladie (Fischer et al., 2004; Liu et al., 2013). Celle-ci sera discutée dans la section 3.1.

Il est intéressant de mentionner que la SLA n'affecte pas uniquement les MNs mais notamment les neurones travaillant en synergie avec ces derniers, soit les neurones sensoriels responsables de la proprioception du muscle (longueur, vitesse et tension) (Vaughan et al., 2015) et les interneurons spinaux et corticaux responsables de l'inhibition des MNs, pour ne nommer que ces deux exemples (Casas et al., 2013; Foerster et al., 2012) (sujet abordé dans la section 1.4.8). Ces dernières observations, acquises grâce à la combinaison de techniques comme l'immunohistochimie et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du GABA, suggèrent que la SLA devrait donc être considérée comme une maladie non seulement multifactorielle mais également neurodégénérative multisystémique (Swinnen and Robberecht, 2014).

Figure 1.1 Dégénérescence des neurones moteurs dans la SLA



La dégénérescence des MNs peut survenir tout le long du circuit moteur dans la SLA. Dans la portion anatomique de l'encéphale, ce sont les MNs supérieurs du cortex moteur et du tronc cérébral qui peuvent être affectés (couleur bleu pâle). Les MNs du cortex moteur sont impliqués dans la planification, le contrôle et l'exécution des mouvements volontaires alors que ceux du tronc cérébral sont impliqués dans l'activation des muscles du visage et de la respiration. Les neurones situés dans le cortex fronto-temporal (couleur beige) peuvent également être atteints et, advenant le cas, les patients

auront des symptômes du spectre de la démence fronto-temporale. Dans la section de la moelle épinière, ce sont les MNs inférieurs de la corne antérieure (portion ventrale, couleur rouge pâle) qui seront touchés par la maladie. La perte de ces MNs entraînera des déficits moteurs majeurs puisque ce sont ces neurones qui sont en connexion avec les muscles squelettiques de l'organisme, via la jonction neuromusculaire (couleur orange). Il est cependant important de souligner que certaines populations de MNs semblent être épargnées par la maladie. Notamment, mentionnons les neurones du noyau oculomoteur et d'Onuf (couleur jaune), respectivement situés dans le tronc cérébral et la portion sacrale de la moelle épinière et responsables de la contraction des muscles extraoculaires et des muscles de la vessie.

1.3.1.2 Motoneurones préservés

En plus de la vulnérabilité sélective des MNs, il a été rapporté, à plusieurs reprises et par différents groupes, qu'il semble également exister des groupes de MNs relativement épargnés par la maladie (Kanning et al., 2010; Wetts and Vaughn, 1996). En effet, des études réalisées chez les patients atteints de SLA (Bergmann et al., 1995; Kihira et al., 1997; Konno et al., 1986; Okamoto et al., 1991; Pullen et al., 1992; Tomonaga, 1980) et dans des modèles de souris de SLA (Ferrucci et al., 2010; Nimchinsky et al., 2000) ont mis en évidence la préservation de l'intégrité neuronale de certains groupes de MNs, ainsi que la fonction qu'ils sous-tendent. Parmi les structures neuronales les moins affectées, notons les noyaux oculomoteur et d'Onuf (Kaminski et al., 2002; Mannen, 2000), respectivement situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière (niveau sacral) et responsables de la contraction des muscles extra-oculaires et du plancher pelvien (sphincters de la vessie et anal) (Figure 1.1). Ces observations ont offert des opportunités majeures aux scientifiques d'identifier des différences tant moléculaires, cellulaires que fonctionnelles présentes au sein de ces groupes de MNs préservés et absentes au sein des groupes de MNs affectés par la SLA. Par exemple, des changements d'expression ont été identifiés pour des protéines responsables du cytosquelette (Comley et al., 2015), de la régulation et du tamponnage du calcium (Ca^{2+}) (Comley et al., 2015; Liu et al., 2013), et des changements des propriétés membranaires ou des sous-unités de certains récepteurs membranaires pouvant affecter l'excitabilité neuronale

(Comley et al., 2015; Lorenzo et al., 2006; Venugopal et al., 2015). Cependant, les implications de ces mécanismes ont eu une portée limitée à ce jour (Beers et al., 2001). Par conséquent, de futures études sont absolument nécessaires afin d'identifier les mécanismes qui sous-tendent cette résistance à la maladie.

1.3.2 Symptômes et progression

1.3.2.1 Formes spinale et bulbaire

La forme de la maladie est souvent catégorisée selon la localisation anatomique de l'apparition initiale des symptômes. La majorité des cas de SLA (65%) est caractérisée par l'apparition des symptômes au niveau des membres distaux (bras ou jambe : forme spinale), alors que 35% présentent des symptômes au niveau bulbaire (forme bulbaire). Dans la forme spinale, les patients peuvent expérimenter des difficultés à exécuter des tâches requérant de la dextérité manuelle fine telles que l'écriture ou des difficultés subtiles lors de la marche relevant de la maladresse (Kiernan et al., 2011). Pour ce qui est de la forme bulbaire, ce sont des difficultés à parler distinctivement ou à avaler ou des perturbations de la mobilité de la langue qui seront plutôt ressenties par les patients. Au fur et à mesure que la maladie progresse et que la dégénérescence des MNs se poursuit, les patients souffrent inéluctablement de divers symptômes tels que de la faiblesse, de l'atrophie et de la paralysie musculaire. Des fasciculations et de la spasticité peuvent également être présentes. De la difficulté à parler, avaler et même éventuellement respirer fait aussi partie de l'éventail des symptômes (Hardiman et al., 2011).

Pour que la SLA soit diagnostiquée, les patients doivent avoir des symptômes qui ne peuvent être attribuables à d'autres maladies, impliquant un diagnostic par exclusion. Une période pouvant aller de 9 à 12 mois peut donc régulièrement s'écouler entre le premier symptôme ressenti et le diagnostic de SLA (Al-Chalabi and Hardiman, 2013). Ce diagnostic tardif a souvent comme effet de retarder l'accès des patients aux différents soins possibles. De plus, au moment du diagnostic, il y aurait déjà approximativement 50% des MNs dégénérés (Laferrriere and Polymenidou, 2015), soulignant l'urgence de développer des outils de

diagnostic précoce, dont l'identification de biomarqueurs spécifiques pour l'apparition et la progression de la maladie, afin de promouvoir un meilleur diagnostic précoce mais, également, afin de permettre d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements.

1.3.2.2 Atteintes cognitives

Jusqu'à récemment, la SLA était généralement considérée comme une maladie à dégénérescence purement motrice. Cependant, il est de plus en plus accepté que la SLA est une maladie cliniquement hétérogène et que des atteintes cognitives mineures et/ou des altérations comportementales peuvent précéder ou suivre l'apparition des symptômes moteurs. Les atteintes cognitives légères se limitent à un dysfonctionnement exécutif associé à une altération du jugement et de l'impulsivité et surviennent dans environ 20% des cas (Hardiman et al., 2011). Également, plus de 50% des patients atteints de la SLA développent de la démence fronto-temporale (FTD) et, inversement, approximativement 15% des cas de patients atteints de FTD développent la SLA (Ng et al., 2015). La FTD est caractérisée, entre autres, par des changements de personnalité, de l'irritabilité ainsi que des déficits exécutifs de nature frontale et est reconnue pour avoir plusieurs chevauchements cliniques, pathologiques et génétiques avec la SLA (Ng et al., 2015; Radford et al., 2015). Étant donné leur degré de similitude, la SLA et la FTD sont désormais considérées comme un continuum phénotypique de la même pathologie (Radford et al., 2015).

1.3.2.3 Progression

À l'apparition des symptômes, les processus pathologiques sous-jacents semblent d'origine focale (unique ou multiple) et stochastique puisque ces derniers semblent n'affecter que les muscles d'un endroit ou d'un même côté du corps (Sekiguchi et al., 2014; Swash et al., 1986). Ensuite, quels que soit les territoires initiaux affectés par la maladie, l'inévitable propagation semble s'opérer par contiguïté, c'est-à-dire que la propagation s'effectuerait dans les axes rostro-caudal et médio-latéral sans jamais sauter de segments neuroanatomiques (Ravits, 2014). Ceci peut s'illustrer de deux différentes façons. Premièrement, le

dysfonctionnement moteur dans une région donnée du corps, où les premiers symptômes sont apparus, devient de plus en plus sévère dans cette même région au fil du temps. Deuxièmement, ce dysfonctionnement peut se propager, par exemple, à partir d'un côté du corps puis l'autre ou d'une région à une autre. Toutefois, si les taux de progression sont les mêmes d'une région à l'autre, dans des cas où il y aurait plusieurs points initiaux de dégénération, s'ils sont indépendants l'un de l'autre et si l'intervalle entre l'initiation des symptômes et la propagation vers une autre région est tributaire de la survie de l'individu, ce sont là toutes des questions qui demeurent sans réponse. Évidemment, les observations mentionnées plus haut ne sont que des simplifications de ce qui s'avère clairement plus complexe, mais elles soulignent que l'apparition locale et aléatoire de la pathologie et sa progression subséquente sont deux événements pathologiques distincts qui contribuent de façon significative à la biologie de la SLA.

Les mécanismes potentiels à l'origine de cette propagation demeurent encore inconnus. Cependant, un nombre croissant de données expérimentales pointe en direction du mauvais repliement des protéines qui participerait à la pathobiologie de la maladie. En effet, ces protéines mal repliées pourraient non seulement induire des changements de conformation pathologiques de leurs espèces natives mais également se propager de cellule en cellule (Grad et al., 2011; Munch et al., 2011). Ce mécanisme de propagation ressemblerait aux événements moléculaires que l'on retrouve dans le cycle infectieux d'un prion, c'est-à-dire l'agrégation auto-suffisante, l'accumulation et la propagation d'une protéine. D'ailleurs, ce mécanisme de propagation, à la manière d'un prion, peut également s'appliquer à plusieurs autres maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington et la FTD (Polymenidou and Cleveland, 2011).

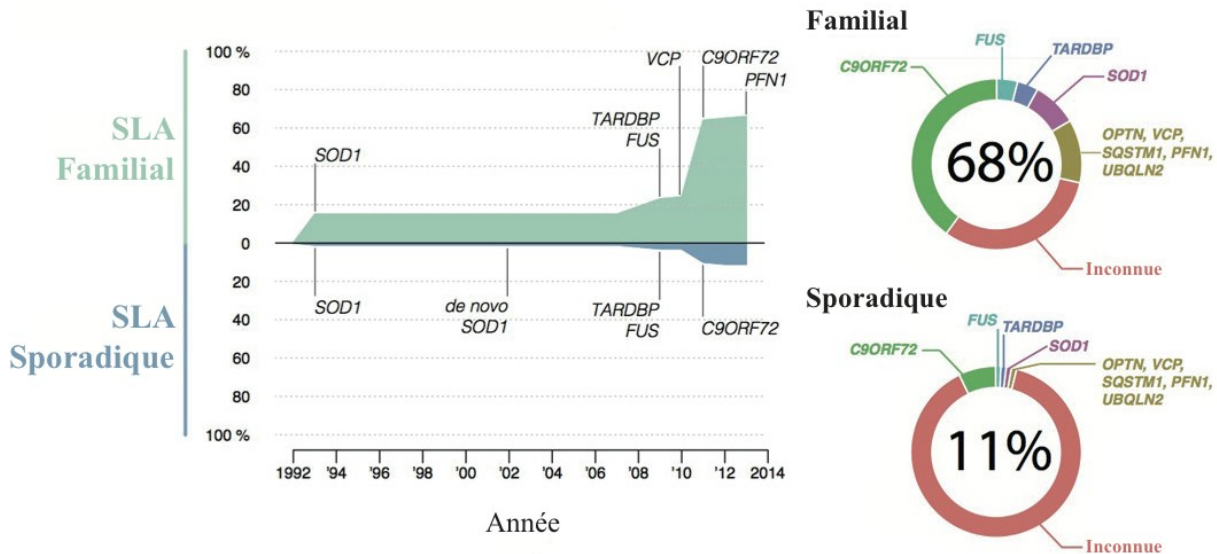
Une étude récente illustre bien ces deux mécanismes de propagation de la maladie, soit le long de segments neuroanatomiques et à la manière d'un prion. En effet, cette étude révèle qu'une injection d'homogénat de moelle épinière de souris SOD1^{G85R} symptomatiques dans le nerf sciatique de souris SOD1^{G85R} non symptomatiques a provoqué une progression beaucoup plus rapide de la maladie (Ayers et al., 2015). Plus précisément, cette progression s'observait sous la forme d'inclusions se propageant, d'abord, de façon ipsilatérale dans les noyaux des cellules des ganglions dorsaux jusque dans les corps cellulaires des neurones de la moelle

épineière lombaire. Par la suite, ces inclusions auraient été observées dans les corps cellulaires des neurones étant en connexion avec ces neurones spinaux, soit jusque dans ceux des neurones de la moelle épinière cervicale, du tronc cérébral et du mésencéphale (Ayers et al., 2015), suggérant également une propagation rostrale. Bien qu'il semble que l'efficacité de la transmissibilité de la maladie varie selon les différentes mutations (Ayers et al., 2014), ces résultats suggèrent qu'une portion de la propagation de la SLA pourrait se faire via la transmission trans-synaptique.

1.3.3 Formes familiale et sporadique

Environ 10% des cas de la SLA sont de forme familiale ou génétique (SLA familiale: SLAf) (Figure 1.2). L'absence d'historique familial n'exclut pas une cause génétique, car il se pourrait qu'un individu avec une mutation d'un gène associée à la SLAf n'ait aucun antécédent familial en raison de facteurs liés à la pénétrance incomplète ou la taille de la famille (Al-Chalabi and Hardiman, 2013). La plupart des cas de SLA (environ 90%) n'a aucune cause connue; ce sont des cas dits sporadiques (SLA sporadique: SLAs). Ces cas de SLAs seraient dus à des composantes environnementales et génétiques. L'identification des facteurs environnementaux représente un réel défi pour les scientifiques, car ces facteurs sont eux-mêmes composés de variables géographiques et temporelles. À titre d'exemple, au Canada, il semble y avoir des provinces, comme la Colombie Britannique (Golby et al., 2016), et même des régions spécifiques dans une province donnée, comme la région du Saguenay Lac Saint-Jean dans la province de Québec (Lareau-Trudel et al., 2013), où une incidence plus élevée de la maladie a été observée dans les 30 dernières années. Sans oublier de mentionner que de nombreuses expositions environnementales sont susceptibles d'agir sur le profil génétique d'un individu. Les coûts associés à ces recherches, la petite taille des échantillons ainsi que le manque de connaissance du profil génétique des participants ont fait en sorte que peu d'études offrent des corrélations claires entre des facteurs environnementaux spécifiques et la SLAs. Parmi les risques environnementaux les plus souvent étudiés, notons l'activité physique intense, avoir fait du service militaire, l'usage du tabac et l'exposition à des pesticides ou à des cyanotoxines (Al-Chalabi and Hardiman, 2013).

Figure 1.2 Principaux gènes associés à la SLA



Historique relatant la découverte des principaux gènes associés aux cas de SLA familiale et sporadique (à gauche). Diagrammes représentant la proportion des cas de SLA familiale et sporadique associés aux différents gènes (à droite).

La figure 1.2 a été modifiée de (Renton et al., 2014).

Bien que la catégorisation des cas de SLAf et SLAs reposant sur la base de l'histoire familiale conserve une certaine utilité, il est clair que la biologie sous-jacente est plus nuancée et que cette classification clinique ne devrait pas être considérée en termes absolus. Les facteurs environnementaux et stochastiques pourraient agir à titre de facteurs précipitants chez les individus génétiquement prédisposés, plutôt que d'être directement causaux (Renton et al., 2011). L'apport de l'environnement dans les cas de SLAs et SLAf contribue également de façon significative à l'hétérogénéité du phénotype; des cas de personnes atteintes de la SLA issus d'une même famille ou même de jumeaux monozygotes n'ayant pas le même phénotype illustrent bien ce besoin d'élucider les facteurs tant environnementaux que génétiques et épigénétiques pouvant caractériser la susceptibilité à la SLA (Meltz Steinberg et al., 2015).

1.3.3.1 Différents gènes associés à la maladie

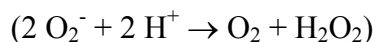
Parmi les gènes associés à la SLA, tant des cas de SLAf que SLAs (transmission mendélienne traditionnelle ou pas), notons ceux de la *SOD1* (Rosen et al., 1993), Fused in sarcoma (*FUS*) (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009), TAR DNA-binding protein 43 (*TARDBP*) (Neumann et al., 2006; Sreedharan et al., 2008) et Chromosome 9 open reading frame 72 (*C9orf72*) (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011) (Figure 1.2). Dans les cas de SLAf, ces gènes sont généralement hérités d'une manière autosomale dominante. Cependant, certains gènes, entre autres associés à des cas de SLAf juvéniles, sont légués d'une manière autosomale récessive. Collectivement, aujourd'hui, plus de 60% des cas de SLAf peuvent être expliqués par des mutations génétiques connues (Laferriere and Polymenidou, 2015). L'avenir de la recherche sur la SLA sera très excitant puisque plusieurs modèles murins ont été générés dans les derniers mois, dont plusieurs reproduisant les expansions pathogènes dues à la mutation du gène *C9orf72* (Chew et al., 2015; Liu et al., 2016; O'Rourke et al., 2015; Peters et al., 2015), mutation la plus fréquemment observée en relation avec les formes de SLAs, SLAf et de FTD.

Pour la suite, nous allons nous concentrer tout particulièrement sur le premier gène identifié en 1993, *SOD1*. Le gène *SOD1* est la deuxième cause en importance pour expliquer les cas de SLA familiale (Figure 1.2) (Renton et al., 2014; Rosen et al., 1993). La découverte de ce gène a mené à l'élaboration de plusieurs modèles expérimentaux qui se retrouvent parmi ceux les plus utilisés et, par conséquent, les mieux caractérisés du domaine de recherche sur la SLA (Bruijn et al., 1997; Gurney et al., 1994; Vinsant et al., 2013a, b; Wong et al., 1995). D'ailleurs, tous les travaux de cette thèse ont eu recours à l'utilisation d'un modèle de souris transgénique *SOD1*.

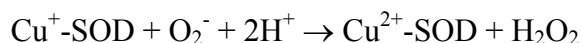
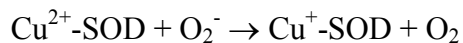
1.3.3.1.1 Gène et protéine *SOD1*

Le gène humain *SOD1* encode une métalloprotéase de 32 kilodalton (kDa). Ce gène est situé sur le chromosome 21 et est constitué de 5 exons encodant une protéine de 153 acides aminés (séparés par 4 introns) (Levanon et al., 1985). Deux monomères, pouvant chacun se lier avec un ion de cuivre et un ion de zinc, s'associent pour former une protéine soluble

fonctionnelle homodimère. Cette protéine possède donc une activité enzymatique de catalyse de la dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxide d'hydrogène (Fridovich, 1989):



Cette catalyse se fait en deux étapes asymétriques et est possible grâce à la dismutation du cuivre qui est alternativement réduit et oxydé :



La conversion des superoxydes, sous-produits naturels de la respiration oxidative, fournit une défense naturelle importante contre les radicaux libres (Pickles and Vande Velde, 2012). Cette enzyme est exprimée de manière ubiquitaire dans toutes les cellules de l'organisme et se retrouve plus spécifiquement dans le cytoplasme et l'espace intermembranaire mitochondrial.

1.3.3.1.2 Mutations de la SOD1 dans la SLA

Jusqu'à 183 mutations ont été identifiées à ce jour (pour consulter une liste continuellement mise à jour: <http://alsod.iop.kcl.ac.uk>) et sont responsables de plus de 20% des cas de SLAf (Laferriere and Polymenidou, 2015). Ces mutations se retrouvent sur toute la séquence de la protéine dont la plupart consiste en une substitution d'un seul acide aminé (Figure 1.3). Certaines mutations altèrent significativement la structure primaire et/ou tridimensionnelle de la protéine, favorisant ainsi son mauvais repliement dû à une incapacité de conserver une structure normale (Pickles and Vande Velde, 2012). Cette déstabilisation de la structure de la protéine peut engendrer, par la suite, des interactions SOD1-SOD1 perturbées et mener à des oligomérisations et à une agrégation anormalement élevée de la protéine SOD1 mutée (mSOD1) (Proctor et al., 2016). Notons également le fait que la plupart des mutations SOD1 affectent la charge globale nette de la protéine. Dans des conditions normales, la plupart des protéines ont une charge nette égale au pH physiologique, ce qui limite le phénomène d'agrégation (Kaur et al., 2016). Étonnamment, aucune corrélation n'a pu être établie entre une augmentation ou une diminution de la charge nette de la protéine et la

propension à s'agréger (Prudencio et al., 2009). Une section détaillée (1.4.2) portera d'ailleurs sur la toxicité conférée par la présence de ces agrégats.

La toxicité conférée par la mutation SOD1 n'est pas uniquement due à des changements de conformation ou d'agglomération. En effet, la mutation peut également affecter la fonction de la protéine SOD1. Plus précisément, la toxicité conférée par la mSOD1 n'est pas due à une perte de fonction, mais plutôt à un gain d'une ou plusieurs propriétés toxiques. Plusieurs résultats confirment cette hypothèse de gain de fonction: 1) les souris dépourvues du gène SOD1 ne développent aucune maladie des MNs (Reaume et al., 1996); 2) le changement d'expression ou d'activité de la protéine sauvage SOD1 n'a aucun effet sur le développement ou la progression de la maladie (Bruijn et al., 1998); 3) il semble n'y avoir aucune corrélation entre les taux d'activité enzymatique de la mSOD1 et la maladie puisqu'elle survient dans des cas de mutations qui provoqueront une perte de l'activité enzymatique de la protéine (comme la G85R par exemple) ou qui excéderont les taux de la protéine sauvage (comme celles de la G93A ou la G37R) (Borchelt et al., 1994).

faux-sens ou même-sens; vert : délétion (del) ou insertion (ins); rouge : mutation non-sens). La mutation d'intérêt pour cette étude (G37R) est mise en évidence par un rectangle rouge.

La figure 1.3 a été modifiée de (Kaur et al., 2016).

Un dernier point important à ne pas minimiser est la contribution de la protéine SOD1 sauvage dans la SLA. Des études ayant utilisé soit la surexpression (Jaarsma et al., 2000) ou la co-surexpression des protéines SOD1 mutées et sauvages (Wang et al., 2009a) ont suggéré le recrutement de la protéine sauvage aux foyers de toxicité. Bien que ce ne soit pas le cas pour toutes les mutations SOD1 (Audet et al., 2010; Prudencio et al., 2010), il semble en effet que des interactions entre les protéines mutée et sauvage pourraient mener à des changements de conformation (Bosco et al., 2010) et d'oxydation de la protéine sauvage (Ezzi et al., 2007). Il a même été suggéré que la protéine SOD1 sauvage pourrait participer aux mécanismes d'agrégation et de propagation (Grad et al., 2014b). Il est d'ailleurs intéressant de mentionner que le mauvais repliement de la protéine SOD1 sauvage a également été enregistré dans des cas de mutations TDP-43 et FUS et que ce changement de conformation pouvait être à l'origine de la propagation intercellulaire de la protéine SOD1 sauvage mal repliée (Pokrishevsky et al., 2016). En résumé, il semble que tant la protéine SOD1 mutée que sauvage pourraient contribuer aux phénomènes de toxicité liés à la maladie, ainsi qu'à l'exacerbation et à la propagation de cette dernière.

1.3.3.1.3 Modèles expérimentaux

La découverte du gène *SOD1* associé à la SLA a permis de générer des modèles animaux exprimant différentes variantes de cette même mutation et récapitulant les symptômes de la maladie. Les modèles animaux couramment utilisés dans la recherche sur la SLA sont variés, passant du modèle du rat, de la souris, au poisson, jusqu'à la mouche. Parmi ceux énumérés, le modèle murin de souris demeure, de loin, le mieux caractérisé. La découverte du gène *SOD1* muté dans la SLA a favorisé la création de souris exprimant la

protéine humaine mutée de manière ubiquitaire, généralement sous le contrôle du promoteur du gène SOD1 humain ou murin à des taux d'expression variés. Parmi les plus couramment utilisés, notons les souris SOD1^{G93A} (Gurney et al., 1994), SOD1^{G37R} (Wong et al., 1995) et SOD1^{G85R} (Bruijn et al., 1997).

1.3.3.1.3.1 Souris transgéniques SOD1

Pour la grande majorité des expériences issues de cette thèse, nous avons opté pour le modèle SOD1^{G37R} (lignée 29), ayant une glycine au lieu d'une arginine en position 37. Cette souris est caractérisée par un niveau d'expression de la mSOD1 d'environ 5 fois plus élevée que celle de la protéine de souris endogène dans la moelle épinière (Wong et al., 1995). Il est à noter que la mSOD1^{G37R} conserve son activité enzymatique dans un modèle *in vitro* et dans des lymphocytes isolés de patients (Borchelt et al., 1994). Toutefois, dans la moelle épinière de ce modèle de souris, des niveaux d'activité enzymatique 7 fois plus élevés par rapport à celle de la protéine de souris endogène ont été rapportés (Wong et al., 1995). La mutation G37R survient dans une région de la protéine où la structure tridimensionnelle est considérée comme critique pour le maintien de la stabilité de la protéine (Hart et al., 1998), réduisant de 2 fois la stabilité de la mSOD1 comparativement à la forme sauvage (Borchelt et al., 1994).

Nous avons favorisé ce modèle au lieu d'un autre qui surexprime la mSOD1 à des taux plus élevés (environ 20 fois : SOD1^{G93A}). Il est primordial d'avoir recours à des modèles animaux surexprimant la mSOD1 à des niveaux plus bas afin de s'assurer, d'une part, que l'on se rapproche des taux physiologiques retrouvés chez l'humain et, d'autre part, que les effets observés seront davantage en lien avec la mutation plutôt que la surexpression de la protéine mutée elle-même. D'ailleurs, il semble qu'une souris transgénique surexprimant uniquement la protéine humaine SOD1 sauvage développe une gamme de changements neurodégénératifs comprenant des altérations mitochondriales dans les axones de la moelle épinière, de la dégénérescence axonale dans le faisceau corticospinal ainsi qu'une perte modérée des MNs de la moelle épinière (Graffmo et al., 2012; Jaarsma et al., 2000). De plus, lorsque cette souris est elle-même croisée avec une souris surexprimant la mSOD1 humaine (G85R ou G93A), donnant ainsi lieu à une souris double transgénique exprimant des taux élevés de la protéine

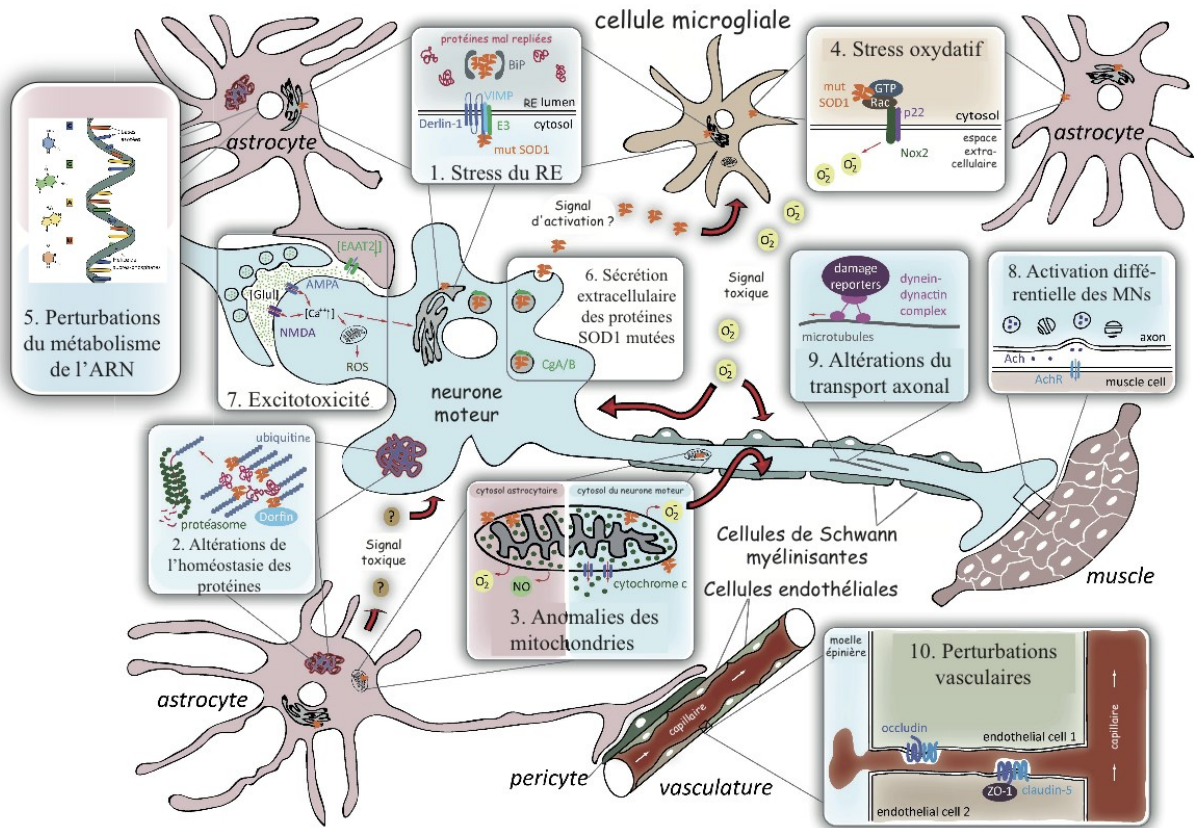
humaine SOD1 sauvage et mutée, la mort des MNs, le développement ainsi que la progression de la maladie surviennent plus rapidement comparativement à celle qui surexprime uniquement la protéine mSOD1 humaine (Jaarsma et al., 2000; Wang et al., 2009a). Bien que ces effets ne soient pas toujours observés selon la mutation affectant le gène *SOD1* (Audet et al., 2010), les résultats de ces études suggèrent que la surexpression de la protéine sauvage SOD1 pourrait faciliter ou accentuer les effets délétères de la mSOD1, provoquer l'oxydation de la protéine sauvage, un changement de conformation de la protéine sauvage menant à un gain de toxicité et/ou provoquer une séquestration excessive du cuivre (Bosco et al., 2010; Jaarsma et al., 2000). Mis ensemble, ces résultats révèlent l'importance du contrôle de la concentration et de l'accumulation de la protéine SOD1 dans les procédés impliqués dans la survie des MNs.

De manière analogue aux patients atteints de la maladie et à d'autres modèles de souris transgéniques (Vinsant et al., 2013a, b), toutes les souris exprimant le gène humain *SOD1*^{G37R} développent un phénotype de SLA: faiblesse et paralysie musculaire, dégénérescence des JNMs et des MNs de la corne ventrale de la moelle épinière et du tronc cérébral (Wong et al., 1995). De plus, d'un point de vue histopathologique, des analyses de tissus post-mortem révèlent des vacuoles dans le neuropile de la corne ventrale, la présence de neurofilaments phosphorylés, une ubiquitination des dendrites et des axones moteurs ainsi qu'une activation des astrocytes et des microglies (Wong et al., 1995). Pour finir, ces souris développent la maladie et en succombent dans des échelles temporelles comparables à celles observées chez l'humain, en ayant une durée de vie qui se prolonge au delà des 500 jours post-nataux (site du fournisseur : <https://www.jax.org/strain/008229>).

1.4 Étiologie

Près de 23 ans après la découverte initiale du gène *SOD1* muté dans la SLA (Rosen et al., 1993), aucun consensus n'a encore émergé concernant les raisons provoquant la dégénérescence spécifique des MNs. Parmi plusieurs hypothèses proposées, dix mécanismes, opérant à travers une grande diversité de voies métaboliques, reviennent de façon récurrente dans la littérature (Figure 1.4).

Figure 1.4 Dix mécanismes potentiels pour expliquer la toxicité conférée par la mutation SOD1



Parmi les mécanismes les mieux étudiés et les plus souvent rapportés dans la littérature, notons le stress du réticulum endoplasmique (1), des altérations de l'homéostasie des protéines (2), des anomalies des mitochondries (3), le stress oxydatif (4), les perturbations du métabolisme de l'ARN (5), la sécrétion extracellulaire des protéines SOD1 mutées (6), l'excitotoxicité (7), l'activation différentielle des MNs (8), des altérations du transport axonal (9) ainsi que des perturbations vasculaires (10). Pour davantage de détails concernant chacun de ces mécanismes, voir la section 1.4 (pages 22 à 39).

La figure 1.4 a été modifiée de (Ilieva et al., 2009).

Ainsi, pour chacun de ces mécanismes, une brève description ainsi qu'un aperçu des différentes évidences et questions en suspens seront présentés. Bien que cette section se concentre sur les mécanismes en relation avec la mutation du gène *SOD1*, un lien sera fait avec les autres mutations lorsque l'information est disponible.

1.4.1 Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'organite prépondérant dans la plupart des cellules eucaryotes, car sa structure a la forme d'un réseau étendu et complexe. Il est distribué dans tout le volume interne des cellules et partage des interfaces spécialisées avec d'autres organites tels que le noyau, les mitochondries, l'appareil de Golgi, les lysosomes et les phagosomes. Il constitue non seulement un élément essentiel au réseau interne membranaire de la cellule mais il est également impliqué dans des rôles majeurs de biosynthèse et de sécrétion. En effet, le RE rugueux (ou granuleux) participe à l'assemblage (traduction), à la modification et au repliement (maturation) et au transport des protéines (tri et exportation) (Cooper, 1999). Le contrôle de la qualité de ces protéines est également assuré par cet organite. Le RE lisse, tant qu'à lui, participe à la synthèse des lipides et joue un rôle primordial dans la régulation et l'entreposage du Ca^{2+} de la cellule (Cooper, 1999).

Cet organite joue également un rôle majeur dans l'orchestration d'une réponse cellulaire adaptée en réponse à des facteurs de stress. Notamment, le RE est responsable de l'activation de différentes voies de signalisation suite à l'accumulation de protéines mal repliées dans son lumen (de l'anglais, *Unfolded Protein Response*), d'où son importance dans la SLA (Saxena and Caroni, 2011). Cette réponse peut mener à différents scénarios. Initialement, la restauration de la fonction normale de la cellule est visée. Ceci s'effectuera en mettant fin à la traduction des protéines, en dégradant les ARN associés au RE et en inhibant l'import de protéines (Rutkowski and Kaufman, 2007). L'étape suivante met en branle l'activation de voies de signalisation qui conduisent à faciliter les fonctions du RE en augmentant la production de protéines chaperons impliquées dans la gestion des protéines mal repliées et les processus de dégradation (Rutkowski and Kaufman, 2007). Collectivement, cette réponse veille à ce que l'exposition au stress du RE, même brève ou prolongée, modifie

fondamentalement de multiples processus cellulaires reliés à l'amélioration de son efficacité. Cependant, si le stress persiste, la réponse du RE activera éventuellement d'autres voies de signalisation, mais, cette fois-ci, impliquées dans l'apoptose. En d'autres mots, en fonction de la nature, la gravité et la durée de l'agent stressant, la réponse du RE est conçue pour faciliter à la fois l'adaptation au stress et à l'apoptose. Par conséquent, cette réponse s'avère particulièrement importante dans la gestion de l'accumulation de protéines mSOD1 mal repliées ainsi que la survie même des MNs dans la SLA.

Plusieurs études ont démontré l'importance de la régulation de la réponse du stress du RE ainsi que l'impact sur le développement et la progression de la maladie. En effet, les MNs les plus vulnérables à la maladie démontrent une augmentation graduelle des marqueurs de stress du RE dans deux différents modèles de souris SOD1 (G93A et G85R) (Saxena et al., 2009). Dans un même ordre d'idées, l'injection d'un agent anti-stress du RE a ralenti la progression de la maladie chez des souris SOD1^{G93A} (Saxena et al., 2013). De plus, dans la moelle épinière de modèles animaux SOD1, les agrégats de mSOD1 s'accumulent dans les membranes du RE et se lient avec des protéines chaperons responsables de la traduction des protéines (Kikuchi et al., 2006). D'autres études rapportent l'interaction des agrégats de mSOD1 avec des protéines qui inhibent les voies de dégradation et mènent à l'activation des voies de l'apoptose (Kieran et al., 2007; Nishitoh et al., 2008). D'ailleurs, dans des souris SOD1^{G93A}, la perturbation de la liaison entre les mSOD1 et ces protéines prévient la mort cellulaire des MNs et a un impact soit sur le développement de la maladie (Kieran et al., 2007) ou sa progression (Nishitoh et al., 2008). Il est important de mentionner que d'autres mutations encodant les gènes *TARDBP* et *FUS* induisent également un stress du RE (Farg et al., 2012; Wang et al., 2015). Ces exemples démontrent bien que la maladie, et plus particulièrement la mSOD1, provoque non seulement l'activation précoce de la réponse au stress dans le RE mais, également, semble être un agent interférant avec les différentes voies de signalisation activées.

Puisqu'une perte de fonction interférant avec la voie de signalisation du RE, responsable de la suppression de la traduction des protéines, mène à une accélération significative du développement de la maladie et une plus petite espérance de vie chez des souris SOD1^{G85R} (Wang et al., 2011), ces résultats suggèrent que de cibler la réponse du RE

pourrait avoir des effets protecteurs dans la SLA. Pour finir, notons également le fait que l'association des mSOD1 avec le RE peut interférer avec la synthèse de toute protéine dont la synthèse et la maturation sont dépendantes du passage dans le RE (par exemple EAAT2, qui sera discuté dans la section 1.4.7) (Ilieva et al., 2009).

1.4.2 Altérations de l'homéostasie des protéines

Une grande partie de l'homéostasie des protéines dépend notamment de leur quantité, distribution et qualité (Yerbury et al., 2016). Le protéasome, un complexe enzymatique multiprotéique cytosolique, joue un rôle clé dans ce processus puisqu'il a pour fonction principale de dégrader les protéines mal repliées, dénaturées ou désuètes, et ce, de manière ciblée. Lorsque l'ubiquitine est attachée à une protéine, elle sert de signal de reconnaissance pour le protéasome pour son éventuelle dégradation. La régulation minutieuse de l'activité de ces protéasomes est primordiale afin de réduire la toxicité qui pourrait être associée à des protéines mutantes, mal repliées ou, tout simplement, endommagées (Yerbury et al., 2016). Par conséquent, la maintenance et l'efficacité des protéasomes semblent directement reliées à la longévité cellulaire et organismale.

Puisque toutes les mutations de la SLA associées à la protéine SOD1 augmentent la propension inhérente de la protéine à s'agréger (Prudencio et al., 2009), il n'y a donc rien d'étonnant d'observer des agrégats immunoréactifs pour SOD1 dans le cytoplasme des MNs et des astrocytes les entourant. Ces inclusions cytoplasmiques, également immunoréactives pour l'ubiquitine, sont présentes dans les modèles de souris SOD1 communs ainsi que dans plusieurs cas humains rapportés de SLAs et SLAf (Bruijn et al., 1998; Wong et al., 1995), suggérant un mécanisme commun dans la SLA. L'accumulation de mSOD1 ubiquitinées peut donc avoir de graves conséquences sur le système protéosomale, car la dégradation de la protéine SOD1 ainsi que les agrégats de SOD1 est dépendante des protéasomes (Urushitani et al., 2002). En effet, une inhibition partielle du système protéosomale a été associée avec la dégénérescence de cellules non neuronales en culture exprimant des protéines SOD1 mutantes (Bruijn et al., 2004; Urushitani et al., 2002). De plus, une diminution de l'efficacité des protéasomes a été rapportée dans des MNs primaires en culture (Urushitani et al., 2002) ainsi

que dans la moelle épinière lombaire de souris SOD1 (Ilieva et al., 2009). Une inhibition des protéasomes pourrait provoquer à la fois l'accumulation d'autres protéines aberrantes et des diminutions d'activité de certaines protéines chaperons et d'organelles comme le RE et les mitochondries. Sans oublier le fait que ces agrégats peuvent provoquer la séquestration de certaines protéines, ce qui est d'ailleurs susceptible d'engendrer des pertes de fonction des protéines séquestrées, dorénavant absentes du cytoplasme (Bruijn et al., 1998). Par conséquent, la composition des agrégats est un élément non négligeable pour évaluer la toxicité conférée par ces derniers.

La localisation (Weisberg et al., 2012) et la solubilité des agrégats de SOD1 (Brotherton et al., 2013) sont deux autres facteurs contribuant à augmenter la toxicité de ces derniers. Bien que le mauvais repliement des mSOD1 semble être l'initiateur probable de la formation de ces agrégats, aucune donnée ne semble suggérer avec certitude qu'un mauvais fonctionnement du protéosome pourrait être soit la cause ou la conséquence de ces agrégats. La contribution d'autres protéines (ex. TDP-43) ou d'organites telles que les mitochondries ou d'autres mécanismes impliqués dans l'autophagie fait probablement partie du portrait complexe de la SLA en matière d'homéostasie des protéines (Edens et al., 2016).

1.4.3 Anomalies des mitochondries

La mitochondrie est un organite présent dans la plupart des cellules eucaryotes. Un des caractères distinctifs de cet organite est le fait qu'elle possède un dispositif bimembranaire formé d'une membrane interne et externe, toutes deux séparées par un espace intermembranaire. La membrane interne est plissée en un grand nombre de crêtes qui font saillie dans l'intérieur (matrice) de l'organite. Chacun de ces éléments joue un rôle particulier, mais ce sont la matrice et la membrane interne qui sont les compartiments les plus actifs de la mitochondrie. Bien que la mitochondrie intervienne dans une panoplie d'évènements cellulaires importants tels que la différenciation, la croissance et la signalisation cellulaire, elle est davantage reconnue pour produire la plus grande partie de l'énergie libre utilisable. Plus précisément, l'énergie est tirée de la dégradation des acides gras et des glucides et est transformée en adénosine triphosphate (ATP) via les processus de β -oxydation (acides gras),

cycle de Krebs et phosphorylation oxydative (glucides) (Cooper, 1999). Outre leur rôle dans le métabolisme énergétique cellulaire, les mitochondries se distinguent également par le fait qu'elles possèdent leur propre ADN ainsi que tout l'équipement enzymatique nécessaire afin de réaliser leur propre biosynthèse des protéines. Il est toutefois important de noter que l'import de certaines protéines en provenant du cytosol est nécessaire car ces dernières sont encodées dans le génome nucléaire. C'est dans la matrice que se concentre les ribosomes, l'ARN de transfert, l'ARN ribosomal, quelques protéines mitochondriales et plusieurs copies de l'ADN du génome mitochondrial (Cooper, 1999). Par ailleurs, l'ADN mitochondrial présente de nombreuses analogies avec le génome de bactéries.

Les mitochondries sont également les gardiens de deux autres fonctions essentielles reliées à la survie de la cellule : le tamponnage du Ca^{2+} et l'apoptose. En effet, la mitochondrie possède une grande capacité à court terme à tamponner le Ca^{2+} cytoplasmique. Dans les neurones, les mitochondries peuvent soit atténuer l'amplitude ou prolonger la durée des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} (Wang et al., 2003). Il est intéressant de mentionner que cette fonction de tamponnage est, en réalité, un vase communicant avec d'autres fonctions de la mitochondrie. Par exemple, un surplus de Ca^{2+} influencera la quantité d'ATP produite (Coussee et al., 2011). Également, lorsqu'un excès de Ca^{2+} survient, ceci peut contribuer à ouvrir le pore de transition de perméabilité mitochondriale qui, par la suite, provoque la relâche du cytochrome c : deux évènements précoces reliés aux voies de l'apoptose (Damiano et al., 2006; Parone et al., 2013).

Les premières anomalies mitochondriales ont été observées *in vitro* dans des cellules surexprimant la protéine SOD1^{G93A} (Carri et al., 1997) ainsi que dans les MNs spinaux de souris SOD1 présentant des taux d'expression élevés de la mSOD1 ayant une activité enzymatique (Higgins et al., 2003; Wong et al., 1995). Ces mitochondries d'apparence vacuolées et dilatées étaient visibles à des stades présymptomatiques de la maladie, soit avant même l'apparition des premiers symptômes ou la perte des MNs. Ces anomalies auraient également été observées dans les terminaisons axonales des MNs provenant de biopsies musculaires de patients ayant reçu un diagnostic précoce de SLAs (Siklos et al., 1996) et chez des souris présymptomatiques exprimant la SOD1^{G93A} (Magrane et al., 2014; Vinsant et al., 2013a, b). Des anomalies morphologiques des mitochondries sont également présentes dans

un modèle de souris exprimant la TDP-43 mutée (Magrane et al., 2014). Toutefois, il est important de souligner que ces anomalies morphologiques sont également rapportées chez des souris exprimant des taux élevés de la protéine humaine SOD1 sauvage (Jaarsma et al., 2000) alors qu'elles sont absentes chez des souris exprimant la mSOD1 qui n'a aucune activité enzymatique (Bruijn et al., 1997). Ces résultats suggèrent que la vacuolisation des mitochondries peut être difficilement perçue comme étant un évènement pathogénique responsable de la dégénérescence des MNs.

Or l'apparence des mitochondries, l'association entre la mitochondrie et les mSOD1, représente une plus grande source d'inquiétudes dans le domaine. En effet, la présence de mSOD1, avec différentes mutations, a été rapportée dans l'espace intermembranaire et la matrice des mitochondries isolées de moelle épinière (Boillee et al., 2006; Vande Velde et al., 2008). De cette association pourraient donc découler des altérations mitochondriales importantes. D'ailleurs, des différences significatives dans la composition ainsi que dans l'import des protéines ont été rapportés entre des populations de mitochondries issues de rats mutants SOD1^{G93A} et sauvages (Li et al., 2010). Puisque la majorité des protéines mitochondriales sont encodées dans le noyau et par la suite importées dans la mitochondrie (seulement 13 protéines sur ~1400 seraient encodées par l'ADN mitochondrial), ces changements de composition et de transport protéiques risquent d'avoir des impacts majeurs sur les fonctions vitales assumées par les mitochondries telles que la production d'ATP, le tamponnage du Ca²⁺ et le déclenchement de l'apoptose.

Il n'y a toujours pas de consensus sur les processus, voire l'existence même d'une altération de certaines fonctions mitochondriales dans la SLA. Par exemple, dans le même modèle de souris SOD1 (G93A), les niveaux d'ATP ont été rapportés comme étant soit diminués (Ferri et al., 2006; Mattiazzi et al., 2002) ou inchangés (Damiano et al., 2006). Ces résultats suggèrent qu'une altération de la chaîne oxydative reste à être validée. En ce qui concerne le tamponnage du Ca²⁺, des diminutions de la capacité des mitochondries ont été observées dans deux modèles de souris SOD1 (G93A et G85R) (Damiano et al., 2006). Une étude subséquente a donc fait une ablation génétique de la cyclophiline D, une composante responsable de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale dépendante du Ca²⁺, et ce, dans des souris exprimant trois différentes mutations SOD1 (Parone et al., 2013).

L'ablation génétique de la cyclophiline D a permis une augmentation de la capacité de tamponnage du Ca^{2+} , de la production d'ATP et a également prévenu le changement de morphologie des mitochondries, sans toutefois réussir à prévenir la dénervation de la JNM, la dégénérescence des axones moteurs, ou influencer la progression de la maladie et prolonger l'espérance de vie des animaux (Parone et al., 2013). Ces derniers résultats remettent une fois de plus en question l'implication de cette altération mitochondriale comme étant un facteur primaire contribuant à la maladie.

Pour finir, plusieurs données issues de modèles *in vitro* (Pasinelli et al., 1998; Pasinelli et al., 2000) et de tissus de souris SOD1 (Li et al., 2000; Pasinelli et al., 1998; Pasinelli et al., 2000) suggèrent que la mort des MNs spinaux serait due à l'activation temporelle et séquentielle de certaines caspases (1, 3, 7 et 9 par exemples). Cependant, ces observations n'ont pas été rapportées unanimement dans les tissus de souris SOD1 (Migheli et al., 1999). Des expériences tentant d'inhiber une ou plusieurs de ces caspases ont pourtant prolongé la vie des souris transgéniques (Li et al., 2000). De plus, en activant constitutivement l'expression de Bcl-2, une molécule anti-apoptotique, on constate le retardement du développement de la maladie, une protection des MNs et une prolongation de la vie des souris SOD1^{G93A} (Kostic et al., 1997). Dans un même ordre d'idées, ces derniers résultats sont cohérents avec ceux d'une autre étude ayant fait la délétion génétique de Bax, une molécule pro-apoptotique (Gould et al., 2006). Toutefois, la pertinence de l'emploi de tels traitements thérapeutiques ciblant l'apoptose chez des patients atteints de SLA demeure questionnable puisqu'aucun traitement chez la souris n'a eu un effet sur la progression de la maladie, suggérant que ces traitements ne peuvent être bénéfiques qu'avant l'apparition des symptômes.

1.4.4 Stress oxydatif

La production d'espèces réactives oxygénées (de l'anglais, *Reactive Oxygen Species*, ROS), rendues très réactives en vertu de la présence d'électrons de valence non appariés, tels que l'anion superoxide (O_2^-) ou le peroxide d'hydrogène (H_2O_2), est normale. En effet, la production de tels radicaux libres constitue un sous-produit naturel du métabolisme aérobie. Le stress oxydatif résulte donc d'un déséquilibre entre la production de ROS et la capacité du

système à enlever ou de réparer les dommages causés et de restaurer l'environnement réducteur qui prévaut. Par exemple, les mitochondries sont exposées à la génération constante d'espèces oxydantes, par le flux de O₂ généré par la chaîne respiratoire (Collins et al., 2012). Cependant, l'organite demeure fonctionnel en raison de l'existence d'un système de défense antioxydant pour réparer les dommages oxydatifs générés au cours du métabolisme aérobique normal. Par conséquent, une des fonctions des mitochondries est étroitement liée au maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction (rédox). Les principaux systèmes rédox tampons dans les mitochondries sont les glutathions, les systèmes glutarédoxine et thiorédoxine (Mari et al., 2009). Ce système rédox peut subir des réactions d'oxydation ou de réduction réversibles, maintenant ainsi l'équilibre rédox approprié dans la cellule. Si un déséquilibre survient, le stress oxydatif peut causer des dommages cellulaires majeurs comme des changements de conformation de protéines, des dommages oxydatifs protéiques et lipidiques, des modifications de la dynamique des membranes cellulaires, des dommages à l'ARN et l'ADN ainsi qu'ultimement, l'activation des voies de l'apoptose via la relâche du cytochrome c mitochondrial (Collins et al., 2012). Pour finir, malgré le fait que les ROS sont réputées être des agents nuisibles, une vision plus nuancée a été récemment proposée; il est désormais accepté que certaines ROS puissent agir à titre de messagers aussi bien dans le milieu extracellulaire que dans le cytoplasme (Hitchler and Domann, 2014).

Puisque la protéine SOD1 est responsable de la conversion des superoxydes, une des premières hypothèses à être proposée pour expliquer la SLA fut celle du stress oxydatif. En effet, l'évaluation de marqueurs de stress oxydatif dans le cerveau et la moelle épinière de patients de SLAs et SLAf a révélé la présence de dommages oxydatifs causés, entre autres, aux protéines (Ferrante et al., 1997a). D'ailleurs, des altérations similaires ont été observées particulièrement dans le cortex moteur ainsi que dans les MNs spinaux de souris SOD1^{G93A} (Ferrante et al., 1997b). De plus, quatre mutations différentes de la protéine SOD1 ont toutes causé une augmentation du taux de superoxyde au sein de la mitochondrie (Zimmerman et al., 2007). Il a été suggéré qu'une modification des superoxydes pourrait créer un environnement mitochondrial plus oxydatif et être à l'origine du déséquilibre de la signalisation rédox (Ferri et al., 2006). Cependant, une réduction de l'efficacité du système rédox mitochondrial *in vivo* n'a eu d'effets que sur certains mutants SOD1 (Vargas et al., 2011), suggérant que ce système

antioxydant pourrait être un modificateur spécifique dans certains cas de SLAf. Cependant, ce système pourrait nous aider à comprendre diverses voies moléculaires par lesquelles les différents mutants SOD1 causent la maladie.

1.4.5 Perturbations du métabolisme de l'ARN

La régulation dynamique de l'expression des gènes et son lien avec l'expression des protéines sont de plus en plus connus pour être régis par des déterminants du métabolisme de l'ARN. Notamment, ces déterminants régulent le traitement post-transcriptionnel, la compartimentation, le transport, la stabilisation, la traduction, ainsi que la dégradation de l'ARN (Strong, 2010). Tous ces processus entourant le métabolisme de l'ARN permettent non seulement une induction rapide et localisée de la synthèse des protéines mais sont également impliqués dans des phénomènes de plasticité et de dégénérescence.

Bien que le métabolisme de l'ARN semble beaucoup plus perturbé dans des cas de SLA impliquant des mutations touchant les protéines TDP-43, FUS et C9orf72, quelques cas ont été rapportés concernant la mutation SOD1. Parmi ceux-ci, citons notamment une étude ayant fait l'évaluation spatiotemporelle de l'expression de trois protéines nucléaires impliquées dans le métabolisme de l'ARN, dont TDP-43 et FUS. Les résultats suggèrent qu'une diminution de l'expression d'une protéine nucléaire a été enregistrée à un stade symptomatique précoce de la maladie dans les MNs protubérants de la moelle épinière lombaire et cervicale de souris SOD1^{G93A}, alors que des changements similaires ont été observés pour TDP-43 et FUS seulement à un stade symptomatique avancé de la maladie (Miyazaki et al., 2013). Une autre étude ayant fait l'analyse de l'ensemble du profil de transcriptome des MNs de moelle épinière de souris SOD1^{G85R} relate cependant qu'aucune perturbation importante du métabolisme de la maturation de l'ARN n'a pu être observée dans des stades asymptomatiques de la maladie (Bandyopadhyay et al., 2013), n'éliminant toutefois pas que la toxicité de la mSOD1 pourrait être conférée par l'induction de modifications touchant la traduction et les étapes post-traductionnelles. D'ailleurs, l'expression de la mSOD1 peut entraîner la formation d'un complexe ribonucléoprotéique aberrant qui semble, d'une part, déstabiliser l'ARNm d'un certain facteur de croissance et, d'autre part, diminuer la quantité de protéine produite de ce dernier (Lu et al., 2007). Ce facteur est le facteur de

croissance vasculaire endothélial (de l'anglais, *vascular endothelial growth factor*, VEGF) et a d'ailleurs été étiqueté comme facteur de risque dans la SLA (Bruijn et al., 2004). Également, des changements de localisation de protéines (du noyau au cytoplasme) impliqués dans la stabilisation de l'ARN ont été rapportés *in vitro* et *in vivo* (Lu et al., 2007). En résumé, de plus amples recherches sont nécessaires afin de corrélérer la toxicité de la mSOD1 avec des répercussions inhérentes pour le métabolisme de l'ARN et le produit final, celui d'un trouble fondamental dans l'expression et l'éventuelle fonction des protéines.

1.4.6 Sécrétion extracellulaire des protéines SOD1 mutées

Tel que mentionné précédemment (voir la section 1.3.2.3), la propagation de la mSOD1 semble être l'une des signatures moléculaires de la maladie (Grad et al., 2011; Munch et al., 2011). Cette propagation intercellulaire peut se faire via la relâche d'agrégats de mSOD1 libérés par des cellules mortes pour être ensuite efficacement absorbés par les cellules avoisinantes (neuronales ou gliales) via le processus de macropinocytose (Munch et al., 2011). La relâche de mSOD1 dans l'environnement extracellulaire peut également se faire de façon dépendante ou indépendante d'exosomes sécrétés (Grad et al., 2014a). En effet, les exosomes ont été identifiés comme étant des mécanismes de sécrétion pour la protéine SOD1 sauvage et mutée dans des cellules ressemblant à des neurones moteurs en culture (Gomes et al., 2007). Il est intéressant de mentionner ici que la mSOD1 mal repliée se localise à la surface extérieure de la membrane de l'exosome, contrairement à la protéine native qui réside dans le lumen de ce dernier (Grad et al., 2014b). Cette localisation différentielle pourrait contribuer à la transmissibilité de la mSOD1, mais pourrait également servir à sa reconnaissance et à sa désactivation ultérieure via de potentiels traitements pharmacologiques ou immunologiques. D'autres vésicules de sécrétion que les exosomes ont aussi été observés dans ce même type de cellules en culture (Urushitani et al., 2006). Notons également que la propagation intercellulaire trans-synaptique de TDP-43 peut se faire via des microvésicules/exosomes (Feiler et al., 2015). Toutefois, plusieurs questions demeurent toujours sans réponse à ce jour. Par exemple, comment les mSOD1 mal repliées évitent-elles la dégradation par le système protéosomal, comment s'incorporent-elles dans les voies de signalisation de sécrétion de sorte qu'elles restent associées à la surface des vésicules et quels récepteurs, le cas échéant,

permettent d'interagir avec les mSOD1 mal repliées? Puisqu'il a été suggéré que la présence *in vitro* de 10 mutants différents SOD1 ait tous compromis les voies de signalisation de sécrétion (Turner et al., 2005), il faut également se demander quelles répercussions pourraient avoir la mSOD1 sur le fonctionnement et la survie cellulaire.

1.4.7 Excitotoxicité

Une des premières hypothèses ayant été suggérée pour expliquer la mort des MNs, avant même la découverte du gène SOD1, fut celle de l'excitotoxicité reliée à des niveaux excessifs de glutamate (Bendotti and Carri, 2004). L'excitotoxicité consiste ici en la génération répétée de potentiel d'action et/ou une élévation excessive de Ca^{2+} intracellulaire générée par l'activation de récepteurs glutamatergiques perméables au Ca^{2+} . La prémisse veut que le glutamate relâché par le neurone présynaptique s'accumule dans la fente synaptique et cause ce phénomène d'excitotoxicité (Cleveland and Rothstein, 2001). Dans des conditions physiologiques, la grande majorité du glutamate extracellulaire se disperse rapidement de la fente synaptique en étant recapté par les astrocytes environnants via les transporteurs au glutamate EAAT2 (ou GLT-1 chez les rongeurs).

Dans des conditions pathologiques de SLA, les premières données suggérant cette hypothèse proviennent du fait que des taux anormalement élevés de glutamate ont été retrouvés dans le liquide cébrospinal de patients atteints de SLAs et SLAf (Rothstein et al., 1991; Rothstein et al., 1990) ainsi que dans le plasma de patients atteints spécifiquement de la forme spinale (Andreadou et al., 2008). Une étude de 1995, ayant fait des mesures directes du transport du glutamate chez des patients atteints de SLAs, rapporte des diminutions marquées particulièrement dans les régions du cerveau affectées par la maladie (Rothstein et al., 1995). D'ailleurs, une perte prononcée du transporteur glial EAAT2 semble expliquer ces résultats (Rothstein et al., 1995). La perte de ce transporteur glial est également une des caractéristiques de plusieurs modèles de souris et de rats SOD1 (Bruijn et al., 1997; Howland et al., 2002). De plus, il semblerait que l'oxydation de ce transporteur glial par l'action de certains mutants SOD1 *in vitro* causerait une diminution de la fonction de ce dernier (Trotti et al., 1999). La création d'une souris transgénique surexprimant ce transporteur glial ainsi qu'une mutation

SOD1 (EAAT2/G93A) a permis de retarder le développement de la maladie, sans toutefois ralentir sa progression (Guo et al., 2003). Une autre étude a traité des souris mutantes SOD1^{G93A} avec un antibiotique stimulant l'expression des EAAT2 et a démontré un retard dans le développement de la maladie, un ralentissement de sa progression ainsi qu'une prolongation de la vie des souris traitées (Rothstein et al., 2005). En résumé, ces derniers résultats suggèrent que la perte du transporteur glial EAAT2 pourrait contribuer à la pathogénèse et la progression de la dégénérescence des MNs.

Dans un même ordre d'idées, parmi les récepteurs pour le glutamate des MNs, des données suggèrent que les récepteurs ionotropes de type α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate (AMPA) puissent également jouer un rôle dans ce phénomène d'excitotoxicité (Carriedo et al., 1996). En effet, ils seraient plus sensibles à l'excitotoxicité causée par le glutamate due à leur plus grande perméabilité au Ca^{2+} , elle-même expliquée par une mauvaise édition de l'ARN d'une de ces sous-unités, GluR2 (Kawahara et al., 2004). Des traitements avec des antagonistes des récepteurs AMPA se sont avérés avoir des effets positifs sur les élévations de Ca^{2+} intracellulaires, la progression de la maladie et la survie des souris traitées (Van Damme et al., 2003b). En ce qui concerne la gestion du Ca^{2+} intracellulaire, des études préliminaires ont démontré des différences notables dans l'expression de certaines protéines responsables du tamponnage du Ca^{2+} entre les groupes de MNs résistants et vulnérables (Alexianu et al., 1994; Elliott and Snider, 1995). Cependant, des études subséquentes ayant obtenus des résultats divergents n'ont pu confirmer avec certitude l'hypothèse selon laquelle cette capacité influencerait soit le développement ou la progression de la maladie (Beers et al., 2001; Irvin et al., 2015).

Finalement, bien que plusieurs questions demeurent toujours sans réponse concernant ce mécanisme d'excitotoxicité, il est notable que le seul médicament approuvé portant le sceau de la FDA (U.S. Food and Drug Administration) soit le riluzole : un médicament inhibant, entre autres, la relâche quantique du glutamate et réputé pour ralentir la progression de la maladie de quelques mois chez les patients atteints de SLA (Doble, 1996). Cependant, ce même problème d'excitotoxicité peut également résulter d'un déséquilibre dans les niveaux d'excitation et d'inhibition de la transmission synaptique.

1.4.8 Activation différentielle des MNs

Cette section décrira les différences d'expression et de fonction de certains neurotransmetteurs/récepteurs régulant l'inhibition des MNs. Les modifications des propriétés intrinsèques d'excitabilité du MN seront plutôt traitées dans la section 7.4.1.3.

L'inhibition de l'activité synaptique des MNs peut être provoquée par deux types principaux de neurotransmetteurs (NTs), l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et la glycine; cette dernière étant particulièrement localisée dans la moelle épinière. Alors qu'un seul type de récepteur existe pour la glycine, les récepteurs glycinergiques, deux familles de récepteurs ont été identifiées pour le GABA. En effet, il existe une famille de récepteurs ionotropes, perméables aux anions (tel que le chlorure, Cl^-), nommée GABA_A , et une famille de récepteurs métabotropes, nommée GABA_B . Un déséquilibre soit dans l'expression ou la fonction de ces récepteurs pourrait engendrer des perturbations de l'activation des MNs et, ainsi, provoquer leur dégénérescence.

Une expression différentielle des récepteurs GABA_A et glycinergiques a été observée entre les MNs vulnérables et résistants à la maladie dans des rats normaux (Lorenzo et al., 2006). D'ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus en comparant les taux d'expression de l'ARNm de ces récepteurs dans le cortex moteur (Petri et al., 2003), temporal et préfrontal de patients atteints de SLAs (Petri et al., 2006). Cependant, des résultats divergents ont également été obtenus pour le GABA_A dans les MNs spinaux de souris SOD1 (Petri et al., 2005). De plus, contrairement au taux anormalement élevé de glutamate, le taux de glycine dans le plasma issu de patients atteints de SLA ne s'est pas avéré être différent de celui de patients témoins (Andreadou et al., 2008). Outre ces résultats non concluants concernant la simple expression de ces récepteurs, il n'en demeure pas moins que la fonction et l'efficacité de ces derniers demeurent primordiales dans l'évaluation de la pertinence de ces mécanismes dans la pathologie de la SLA.

Une étude, ayant utilisé la technique électrophysiologique d'enregistrement des courants ioniques à travers les membranes cellulaires (de l'anglais, *patch-clamp* de cellules entières), a rapporté que les courants inhibiteurs glycinergiques, tant miniatures qu'évoqués, étaient significativement plus petits dans les MNs dissociés de moelle épinière de souris

SOD1^{G93A} que ceux de MNs issus de souris sauvages (Chang and Martin, 2011). La combinaison de ces résultats avec ceux de marquages immunohistochimiques et ceux de la méthode quantitative d'amplification génomique appliquée sur une cellule unique (une transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase; de l'anglais, *quantitative single-cell RT-PCR*) a permis de conclure qu'une diminution des récepteurs glycinergiques étaient observées sur les MNs mutants (Chang and Martin, 2011). Cette diminution contribuerait donc à une inhibition insuffisante des MNs spinaux exprimant la SOD1^{G93A} et à renforcer l'hypothèse d'excitotoxicité. Une autre étude, ciblant les récepteurs GABA_A, a également rapporté des dysfonctions, mais cette fois-ci dans le sens opposé. Plus spécifiquement, les récepteurs GABA_A auraient davantage d'affinités pour le GABA et, suite à des modifications de leurs sous-unités, se désensibiliseraient beaucoup moins facilement (Carunchio et al., 2008). Dans la plupart des neurones, l'influx de Cl⁻ entrant, suite à une activation des récepteurs GABA_A, diminue l'excitabilité neuronale et aide à contrecarrer l'action des NTs comme le glutamate. Cependant, dans les MNs spinaux, il a été démontré que l'entrée simultanée d'ions Cl⁻ avec la stimulation soutenue des récepteurs AMPA pourrait être nocive (Van Damme et al., 2003a). Bien que le rôle des ions Cl⁻ soit bien moins défini que celui du Ca²⁺ dans les lésions neuronales, il n'en demeure pas moins que des élévations de Cl⁻ intracellulaires pourraient contribuer à des dommages structurels ainsi qu'à la mort neuronale (De Koninck, 2007).

Les interneurones sont une autre source majeure d'inhibition des MNs au sein de la moelle épinière puisqu'ils sécrètent des NTs inhibiteurs comme le GABA et la glycine. D'ailleurs, une étude a rapporté des changements dans l'activité et les propriétés intrinsèques des interneurones spinaux (Jiang et al., 2009). Il est aussi important de mentionner qu'il existe une autre classe particulière d'interneurones spinaux, les interneurones cholinergiques. Ils sont situés tout près du canal central, font synapses avec les MNs par l'entremise de bouton en forme de « c » et sont susceptibles de grandement influencer non seulement l'excitabilité des MNs mais également l'intensité de la contraction musculaire générée (Miles et al., 2007; Witts et al., 2014). De plus, il y aurait une forte corrélation entre le nombre de boutons-c observés et la vulnérabilité sélective des MNs, où les MNs les plus vulnérables compteraient le plus grand nombre de ce type de synapse (Hellstrom et al., 2003). Cette classe d'interneurones représente

donc un très bon candidat pour l'exploration des changements d'activation des MNs. Cependant, des résultats pour le moment divergents ont été publiés, où soit une perte de ces boutons-c (Casas et al., 2013; Nagao et al., 1998) ou une augmentation de leur territoire (Pullen and Athanasiou, 2009) ont été observées. Leur implication dans la maladie reste toujours à être validée à ce jour.

Pour conclure, d'autres phénomènes (ex. l'atrophie dendritique) peuvent également affecter l'activation des MNs (Wong et al., 1995). De plus, outre les anomalies touchant les MNs spinaux, il faut aussi considérer l'ensemble des composantes du circuit moteur, toutes susceptibles d'être affectées par la maladie (de Carvalho et al., 2014).

1.4.9 Altérations du transport axonal

Une des caractéristiques distinguant les MNs spinaux des autres cellules est leur extrême asymétrie. Ils possèdent un très gros volume (près de 5000 fois plus élevé qu'une cellule typique) et un très long axone (parfois allant plus d'un mètre de long) (Bruijn et al., 2004). Ces caractéristiques mettent une énorme charge métabolique sur le corps cellulaire dont le travail consiste à synthétiser les composantes nécessaires à son bon fonctionnement et à acheminer certaines de ces composantes vers les extrémités, c'est-à-dire du corps cellulaire jusqu'à la JNM et vice-versa. La régulation du transport antérograde et rétrograde semble donc cruciale autant pour réduire le stress du MN que pour assurer le bon fonctionnement de la JNM.

L'altération de la structure axonale est un phénomène bien documenté, et ce, autant chez des modèles animaux de souris SOD1 (Bruijn et al., 1998; Wong et al., 1995) que chez des patients atteints de SLAs et SLAf (Hirano et al., 1984a; Hirano et al., 1984b). Tout particulièrement, des accumulations inappropriées et désorganisées de neurofilaments caractérisent ces changements structuraux. D'ailleurs, une souris exprimant une mutation dans le gène encodant un type de neurofilament, dit léger, développe un phénotype de maladie des MNs (Lee et al., 1994). De plus, une souris surexprimant le neurofilament humain de type lourd développe de l'atrophie ainsi que des secousses musculaires (Cote et al., 1993). Les neurofilaments sont transportés le long de microtubules par le complexe dynactine/dynéine.

Tel qu'observé dans des souris mutantes pour la dynactine, des dysfonctions de ce complexe entraînent des accumulations de neurofilaments dans les axones et le corps cellulaire, une dégénérescence de la terminaison axonale ainsi que des altérations du transport axonal (Laird et al., 2008; Puls et al., 2003).

Des changements de fonction sont normalement sous-jacents à des changements de structure. En effet, l'expression de différentes mutations SOD1 (G93A, G37R et G85R) chez la souris a favorisé une réduction du transport soit antérograde (Williamson and Cleveland, 1999) ou rétrograde (Perlson et al., 2009). Parmi les conséquences découlant des anomalies du transport axonal dans la SLA, notons des changements dans le transport d'organites telles que les mitochondries. Avant même l'apparition des symptômes, une réduction dans la fréquence des mouvements rétrograde et antérograde des mitochondries a été observée dans le nerf sciatique de souris SOD1^{G93A} (Magrane et al., 2014; Marinkovic et al., 2012). Ces résultats suggèrent que les axones peuvent quand même survivre en dépit de longues périodes caractérisées par des déficits de transport. Cependant, ces altérations du transport axonal n'ont pas pu être confirmées dans un autre modèle de souris SOD1 (G85R), et ce, malgré la présence d'une dégénérescence axonale (Marinkovic et al., 2012). Les déficits de transport ne semblent donc pas nécessaires pour la dégénérescence axonale. De plus, des résultats divergents ont été obtenus chez des souris surexprimant la protéine SOD1 sauvage (Magrane et al., 2014; Marinkovic et al., 2012). Par conséquent, l'ensemble de ces données semble suggérer que les perturbations du transport d'organites ne sont pas une étape nécessaire dans l'apparition de la dégénérescence des MNs.

Toutefois, on ne peut sous-estimer le transport axonal en provenance de la JNM. En effet, celui-ci pourrait devenir une source additionnelle de stress pour le MN, puisqu'il semble y avoir des changements dans la nature et la fréquence des signaux envoyés. En parallèle avec une diminution globale du transport rétrograde de facteurs neurotrophiques et de survie cellulaire, une augmentation du transport rétrograde de protéines reliées au stress et à la mort cellulaire a également été observée chez les souris SOD1^{G93A} (Perlson et al., 2009). D'ailleurs, l'inhibition de ce transport rétrograde de stress a prévenu la dégénérescence du corps cellulaire de MNs en culture (Perlson et al., 2009). De plus, il a été démontré que d'autres mutations pouvaient également engendrer des problèmes de transport axonal. En effet, des mutations

affectant la protéine TDP-43 peuvent altérer le transport d'ARNm ayant pour destination finale la JNM (Alami et al., 2014). De telles perturbations pourraient grandement affecter la transmission synaptique à la JNM puisque la plupart des ARNm ciblés par la protéine TDP-43 sont en lien avec la fonction synaptique (Narayanan et al., 2013). D'ailleurs, les altérations synaptiques caractérisant la JNM seront discutées en section 7.4.1.3. Ainsi, dans ce portrait complexe de la maladie, il serait donc plausible de penser que certaines anomalies synaptiques en périphérie pourraient être expliquées par des déficits de transport axonal comme, par exemple, l'obstruction des vésicules synaptiques (de l'anglais, *vesicles stalling*) (Pun et al., 2006). Sachant que la survie des JNMs n'est pas tributaire de la survie des MNs (sujet discuté en section 3.1.3), l'élucidation des relations entre le transport axonal et la dégénérescence des MNs/JNMs s'avère donc essentielle pour le développement de thérapies efficaces.

1.4.11 Perturbations vasculaires

Outre la barrière hémato-encéphalique, il existe une deuxième frontière entre la circulation sanguine et le SNC : la barrière sang-liquide cérébro-spinal. Ces barrières sont toutes deux formées notamment de cellules endothéliales spécialisées reliées par des jonctions serrées. La découverte de composantes du plasma et de sérum dans le SNC de patients a contribué à l'émergence du concept que les barrières vasculaires pouvaient être affectées dans la SLA (Annunziata and Volpi, 1985). Une analyse de la barrière hémato-encéphalique et de la barrière sang-liquide cérébro-spinal en microscopie électronique a confirmé des atteintes de l'ultrastructure de ces dernières (Garbuzova-Davis et al., 2007). À des stades précoces et avancés de la maladie, les auteurs ont également rapporté la dégénérescence des cellules endothéliales ainsi que celle de leurs mitochondries et un enflement au niveau des pieds astrocytaires en contact avec les cellules endothéliales. Ces changements structuraux sont également corroborés avec des changements d'expression protéique aux jonctions serrées et la présence de microhémorragies dans la moelle épinière de souris SOD1, et ce, bien avant l'apparition des symptômes (Zhong et al., 2008). Des diminutions de l'ARNm de ces mêmes protéines de jonctions serrées ont aussi été répertoriées chez l'humain (Henkel et al., 2009). D'ailleurs, des résultats issus d'une autre étude réalisée chez l'humain supportent ces

observations; l'analyse d'imagerie par résonance magnétique a permis d'observer de l'hypoperfusion dans l'hémisphère contralatéral des membres les plus touchés par la maladie (Rule et al., 2010). Il est intéressant de mentionner que le niveau d'hypoperfusion a été également corrélé avec la gravité de la maladie. Bien que l'administration d'un anticoagulant après le développement de la maladie ait retardé sa progression ainsi que prolongé la survie des souris SOD1 traitées, l'ablation génétique de SOD1 dans les cellules endothéliales n'a eu aucun effet bénéfique (Zhong et al., 2009). Ces derniers résultats suggèrent que les mSOD1 pourraient ne pas être les seuls agents responsables de la perte d'efficacité de ces barrières et que celles-ci pourraient aussi dépendre de la contribution d'autres cellules, comme les astrocytes ou les cellules microgliales.

Pour conclure, il est important de mentionner que tous ces mécanismes sont des composantes critiques au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il est également important de rajouter que d'autres mutations de gènes associés à la SLA (*TDP-43*, *FUS* et *C9orf72*) peuvent causer des perturbations sévères dans le métabolisme des granules de stress, ce qui pourrait grandement compromettre la réponse adaptative du MN face à un stress (Aulas and Vande Velde, 2015; Maharjan et al., 2016). Cette hétérogénéité des mécanismes de toxicité potentiellement causée par l'expression de gènes mutés souligne les difficultés auxquels se heurtent les scientifiques essayant de comprendre la pathogénèse de la SLA et de trouver un éventuel traitement curatif.

1.4.12 Perspectives de l'étiologie

À l'analyse de l'ensemble de ces résultats, il semble impossible de pointer un seul mécanisme en particulier comme étant à l'origine de la pathogénèse de la SLA. Ces résultats semblent soutenir, à première vue, une série décourageante de possibilités divergentes. Cependant, cette maladie donne plutôt l'impression d'être la résultante d'une combinaison de procédés biologiques aberrants. En d'autres mots, plutôt que de considérer ces différents mécanismes comme des alternatives, la vulnérabilité spécifique du MN ainsi que le moment de sa mort sont probablement dépendants de la malheureuse convergence spatiotemporelle d'une série de facteurs, qui sont tous nécessaires pour placer les MNs à risque (Cleveland and Rothstein, 2001).

Ils ne sont pas rares les cas d'études rapportant des interactions entre les différents mécanismes ci-haut mentionnés, suggérant que ces derniers ne soient pas mutuellement exclusifs. Par exemple, notons des études ayant rapporté une oxydation de l'ARN (Chang et al., 2008), une inhibition du protéasome qui augmenterait la sécrétion extracellulaire de mSOD1 (Urushitani et al., 2006), la protéine SOD1 qui induirait une signature transcriptionnelle indicative de l'activation du stress du RE et des voies de signalisation en réponse à des protéines mal repliées, une diminution de la fonction mitochondriale, une augmentation du stress oxydatif ainsi qu'un transport subcellulaire modifié (Kiskinis et al., 2014). Suite à cette longue énumération, il semble donc que plusieurs de ces facteurs de stress peuvent converger et se renforcer mutuellement, le tout engendrant un cercle vicieux pouvant conduire au dysfonctionnement et la dégénérescence éventuelle des MNs vulnérables et de leur environnement local (Saxena and Caroni, 2011).

Cette hypothèse, selon laquelle la toxicité de la mSOD1 serait due à une combinaison de procédés biologiques aberrants, offre l'avantage de ne pas être dépendante d'un seul mécanisme d'induction de la maladie. Il consisterait plutôt en une voie commune dans laquelle une multiplicité d'effets biologiques apparemment divergents peuvent converger. Au minimum, l'hypothèse fournit un cadre conceptuel dans lequel il est possible d'envisager de nouvelles thérapies combinées pour la SLA et d'autres maladies neurodégénératives (Strong, 2010). Par conséquent, l'utilisation d'une combinaison de médicaments concentrés sur plus d'une voie pathogénique pourrait ralentir la progression de la maladie dans un mode additif ou synergique (Orsini et al., 2015).

Bien que plusieurs de ces troubles du métabolisme cellulaire décrits plus haut semblent en apparence différents, ils semblent pourtant tous converger vers le même phénotype de SLA. Toutefois, il est pertinent de soulever la possibilité que la SLA serait, en fait, différentes maladies nommées SLA (Orsini et al., 2015). Ces différentes maladies pourraient puiser leur origine dans les différents niveaux de susceptibilité. Plus précisément, le premier niveau correspondrait à l'atteinte spécifique des MNs. D'ailleurs, ce premier échelon représente le seul motif de regrouper tous les cas de SLA. Les niveaux sous-jacents seraient ceux reliées aux différentes voies de toxicité interférant avec la fonction et la viabilité neuronale (Saxena and Caroni, 2011). Par exemple, ces différents niveaux pourraient sous-tendre des mécanismes

moléculaires ayant différentes séquences spatiotemporelles d'activation, spécifiques pour chacune des mutations. Ceci étant écrit, il est fort probable que toutes les mutations ne sous-tendent pas les mêmes mécanismes spatiotemporels de toxicité. Bien que la mutation SOD1 semble avoir une signature moléculaire bien particulière comparativement aux autres mutations (Keller et al., 2012; Kiskinis et al., 2014), même au sein d'une même famille de mutants (ex. SOD1), tous ne sont pas égaux en terme de toxicité et de spécificité concernant les mécanismes cellulaires impliqués (Pickles and Vande Velde, 2012). De plus, il semble que la nature de la mutation, le niveau d'activité enzymatique ainsi que le taux d'expression de la protéine mutée influencent énormément l'issue de la maladie (développement, progression, etc).

Il est également nécessaire de rajouter que la SLA semble avoir d'autres mécanismes de toxicité que la simple expression de protéines mutées dans les MNs. En effet, l'utilisation précoce d'ARN interférant ciblant les mSOD1, injecté soit dans le cortex moteur (Thomsen et al., 2014), dans la moelle épinière (Foust et al., 2013) ou dans différents groupes de muscles (Ralph et al., 2005), a permis de retarder le développement et la progression de la maladie tout en prolongeant la survie des MNs, mais sans toutefois éradiquer complètement la maladie. Ces résultats suggèrent que des cascades d'évènements intra- et intercellulaires seraient déjà initiées à des stades asymptomatiques de la maladie et que les mutations associées aux cas de SLA pourraient aggraver la sensibilité des MNs à ces différents mécanismes de toxicité (Saxena and Caroni, 2011).

C'est pourquoi, à cette notion de convergence de mécanismes, il est important d'ajouter la notion de seuil. L'existence d'un seuil biologique correspondrait à un point au-delà duquel le MN serait désormais incapable de maintenir ses fonctions ainsi qu'une homéostasie cellulaire appropriée. Cette notion de seuil peut d'ailleurs très bien s'illustrer par le fait que la plupart des cas de SLA se développent une fois rendu à l'âge adulte. Une multitude de mécanismes compensatoires doivent donc exister afin de pallier à la maladie avant l'apparition des premiers symptômes. De nombreux évènements biomoléculaires pourraient influencer le développement de la maladie d'une manière telle que la maladie ne deviendrait cliniquement apparente que lorsque ces mécanismes compensatoires intrinsèques ne parviendraient plus à compenser (Eisen et al., 2014). En résumé, tous les mécanismes de

toxicité impliqués dans la pathogénèse ainsi que la progression de la maladie seraient de nature complexe, interactive et progressive. À savoir quels sont les facteurs déterminants à ce que des dysfonctions bénignes associées à la maladie deviennent ou progressent en des mécanismes de neurodégénérescence et de propagation, cela demeure une des nombreuses questions sans réponse à ce jour. Dans un même ordre d'idées, qu'est-ce qui justifie que le seuil des cas de patients atteints de SLA soit parfois atteint à des âges juvéniles plutôt que des âges matures (Zou et al., 2015)?

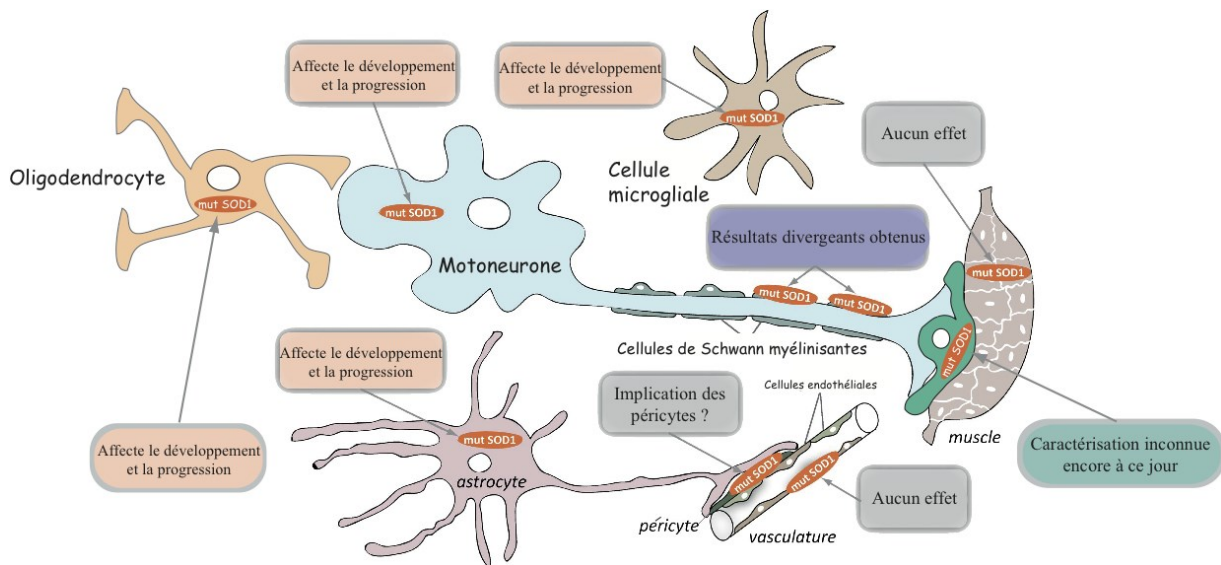
La SLA, comme d'autres maladies neurodégénératives, est une maladie multifactorielle complexe avec des variations dans la sensibilité individuelle, l'âge du développement et la progression de la maladie. Des facteurs tant génétiques, environnementaux qu'épigénétiques, influençant la sensibilité des MNs, conduisent à une grande diversité d'individualités phénotypiques. Ces facteurs sont probablement une autre des clés pour élucider les mécanismes de toxicité pathogénique de la SLA. Bien entendu, la toxicité causée aux MNs n'émane pas que d'eux-mêmes, leur dégénérescence sélective est également tributaire des dommages subis dans d'autres types cellulaires.

2. Contribution des cellules gliales à la SLA

La plupart des études initiales assumaient que la maladie de la SLA était uniquement tributaire des dommages cellulaires causés dans les MNs (cell-autonomous). Cependant, cette notion fut ébranlée par la publication de résultats issus d'études ayant limité aux MNs l'expression de différentes mutations SOD1 (G37R, G93A et G85R), via l'utilisation de différents promoteurs, tel que Thy1.2 ou neurofilament de type léger, et n'ayant pas mené à l'expression d'un phénotype de SLA (dégénérescence des MNs) (Lino et al., 2002; Pramatarova et al., 2001). Pourtant, l'emploi de manipulations génétiques similaires a mené, quelques années plus tard, à la publication de résultats opposés (Jaarsma et al., 2008). Cependant, il faut noter que, parmi les animaux de cette dernière étude, même ceux ayant le plus haut taux d'expression de la mSOD1, certains n'ont développé la maladie que très tardivement, et ce, sans jamais atteindre le même degré de sévérité de paralysie que leurs congénères exprimant la même mutation de façon ubiquitaire (Jaarsma et al., 2008). De plus, l'analyse d'une souris chimère exprimant une mixité de cellules exprimant soit la protéine mutante ou sauvage a démontré que, si des MNs exprimaient de façon chronique la protéine mutée mais étaient suffisamment entourés de cellules non-neuronales saines, ils survivaient (Clement et al., 2003). L'ensemble de ces résultats suggère que des dommages causés dans des cellules non-neuronales sont requis afin de permettre l'expression complète de la maladie (non-cell autonomous) (Figure 2.1).

L'identification de cellules, au-delà des MNs, contribuant à la maladie a été notamment possible grâce à l'emploi d'une autre manipulation génétique, cette fois-ci plutôt basée sur l'excision du gène *SOD1* muté (« floxed ») suite à l'action de la Cre recombinase. L'excision du gène *SOD1* muté exclusivement dans les MNs a retardé l'apparition des symptômes (Boillee et al., 2006; Wang et al., 2009b; Yamanaka et al., 2008b). Une excision similaire du gène *SOD1* muté des MNs et des interneurons a, tant qu'à elle, retardé l'apparition des symptômes et ralenti la progression précoce de la maladie (Wang et al., 2009b). Mis ensemble, les résultats issus de ces deux approches ont permis de conclure que les MNs semblent déterminer le développement initial et la progression précoce de la maladie.

Figure 2.1 Contribution des cellules non-neuronales à la SLA



Malgré la perte spécifique des MNs dans la SLA, les résultats de plusieurs études suggèrent que les cellules non-neuronales contribuent de manière significative à la maladie. L'expression du gène SOD1 muté dans les MNs a eu un impact sur le développement ainsi que sur la progression précoce de la maladie, alors que l'expression du gène SOD1 dans les cellules gliales du SNC (astrocytes, cellules microgliales ou oligodendrocytes) a affecté le développement et la progression de la maladie. L'impact de l'expression du gène SOD1 dans les cellules de Schwann myélinisantes du SNP n'est toujours pas déterminé, car des résultats divergents ont été obtenus dans la littérature scientifique. En ce qui concerne la contribution de cellules de Schwann terminales ou pérисynaptiques du SNP, elle demeure toujours inconnue à ce jour. En fait, aucune étude portant sur la caractérisation fonctionnelle de ces cellules n'a encore été publiée dans la SLA. L'expression du gène SOD1 muté dans les cellules musculaires ou endothéliales, tant qu'à elle, n'a eu aucun effet sur la maladie. Bien que des perturbations vasculaires aient été observées dans la SLA, l'implication des péricytes demeure toujours à être évaluée.

La figure 2.1 a été modifiée de (Ilieva et al., 2009).

Bien que la notion du « non-cell autonomy » soit bien acceptée dans les cas de SLA dû à des mutations du gène *SOD1*, ce n'est pas nécessairement le cas pour les autres gènes mutés. En effet, des résultats controversés (*TARDBP*) (Serio et al., 2013; Zhao et al., 2015) ou des modèles de souris trop récents (*C9orf72*) (Chew et al., 2015; Liu et al., 2016; O'Rourke et al., 2015; Peters et al., 2015) n'ont pas encore permis d'élucider la contribution des cellules gliales dans d'autres modèles animaux de SLA à ce jour.

Dans les sections à venir, il y aura une brève description des fonctions des différentes cellules gliales à travers le système nerveux central et périphérique, suivi de quelques résultats expérimentaux rapportant la contribution de chacune de ces cellules dans la SLA.

2.1 Cellules gliales du système nerveux central

2.1.1 Astrocytes

2.1.1.1 Rôles des astrocytes en conditions physiologiques

Les astrocytes constituent les cellules proéminentes du SNC et jouent une multitude de rôles majeurs dans l'homéostasie neuronale. Notamment, les astrocytes assument des rôles de support métabolique (Machler et al., 2016), de contrôle du débit sanguin (MacVicar and Newman, 2015), de régulation de l'équilibre ionique (Chever et al., 2010; Morquette et al., 2015) et des NTs dans la fente synaptique (Rothstein et al., 1996).

Ces cellules sont également des partenaires actifs dans la transmission synaptique; ce sont des cellules pouvant non seulement détecter l'activité synaptique basale (Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011) et décoder l'activité synaptique de réseau (Serrano et al., 2006) mais également en moduler la résultante via la relâche de gliotransmetteurs (GliotTs), tels que le glutamate, le GABA, l'ATP, la D-serine et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) (Araque et al., 2014). D'ailleurs, de nombreuses données montrent que la relâche de GliotTs a une incidence sur le comportement *in vivo* de l'animal (pour une revue exhaustive sur le sujet : (Oliveira et al., 2015)). Ainsi, plusieurs groupes de recherches différents ont participé à l'émergence du concept de la synapse tripartite (qui sera plus explicitement détaillé dans la

section 3.2.1) proposant que les trois éléments synaptiques (neurones pré- et postsynaptique et l'élément glial) soient des composantes indispensables au bon fonctionnement de la transmission synaptique.

Lorsque les astrocytes font face à un danger biologique dans leur environnement immédiat, ils deviennent réactifs. Cet état est caractérisé par des changements d'expression génique et morphologique. Plus précisément, une augmentation de l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (de l'anglais, *Glial fibrillary acidic protein*, GFAP) ainsi que des altérations morphologiques de leurs fins prolongements sont observés (Bruijn et al., 1997).

Étant donné la diversité et la complexité de leurs activités, il semble raisonnable de postuler que toute altération de la physiologie astrocytaire pourrait contribuer de façon importante à la manifestation d'une variété de conditions pathologiques, dont la SLA (Valori et al., 2014).

2.1.1.2 Contribution des astrocytes dans la SLA

L'expression du gène *SOD1* dans des modèles de souris transgénique a permis d'observer des inclusions dans les astrocytes ainsi que la présence d'astrocytes activés dans la moelle épinière (Bruijn et al., 1997; Gurney et al., 1994; Keller et al., 2009; Wong et al., 1995). La présence d'astrocytes activés a également été corroborée dans des tissus de patients atteints de SLA (cerveau et moelle épinière; discuté dans (Philips and Rothstein, 2014). L'activation astrocytaire se fait d'ailleurs de plus en plus prééminente dans des stades avancés de la maladie (Keller et al., 2009). Toutes ces observations ont mené à l'étude du rôle potentiel des astrocytes dans la pathogénèse et la progression de la SLA. Cependant, une expression limitée du gène *SOD1* dans les astrocytes n'a pas été suffisante pour induire le phénotype de la SLA (Gong et al., 2000). Bien que les premières études n'ont pas été concluantes sur le rôle des astrocytes, les interactions entre les MNs et les astrocytes ont été reconsidérées comme instrumentales dans les processus neurodégénératifs lors de l'analyse de souris chimère (Clement et al., 2003). De plus, ce n'est que plus tard, lorsque l'ablation du gène *SOD1*^{G37R} uniquement dans les astrocytes a mené à un ralentissement considérable de la progression de

la maladie (Yamanaka et al., 2008b), que la contribution de ce type de cellules gliales a été consolidée.

Afin d'obtenir de plus amples détails quant à la nature des interactions altérées entre les MNs et les astrocytes, l'élaboration de cocultures primaires MNs-astrocytes ou dérivés de tissus embryonnaires fut notoire. En effet, des astrocytes exprimant le gène *SOD1* muté peuvent diminuer la survie cellulaire des MNs. Plus précisément, il semblerait que cette toxicité des astrocytes 1) soit spécifique aux MNs (Nagai et al., 2007), 2) puisse également provenir du liquide issu d'un milieu conditionné provenant d'une culture cellulaire d'astrocytes mutants (Nagai et al., 2007) et 3) affecte autant les MNs de type sauvage que muté (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007).

L'isolement d'astrocytes provenant de souris transgéniques a également permis d'observer qu'une certaine proportion d'astrocytes avait un phénotype aberrant. Ce phénotype est caractérisé par une diminution de leur capacité de support pour les MNs, des taux de prolifération élevés ainsi qu'une augmentation de leur capacité de relâche de facteurs neurotoxiques, tels que des cytokines (Das and Svendsen, 2015; Diaz-Amarilla et al., 2011). D'ailleurs, l'inhibition de l'exocytose astrocytaire retarderait le développement de la maladie chez des souris *SOD1*^{G93A} (Kawamata et al., 2014). De façon complémentaire à cette dernière observation, des astrocytes dérivés de fibroblastes ou isolés de tissus post-mortem de patients SLAs et SLAf ont également provoqué la mort de MNs en culture (Haidet-Phillips et al., 2011; Meyer et al., 2013; Re et al., 2014). À savoir si tous ces phénomènes observés en culture surviennent également dans des modèles *in vivo* de la maladie demeure toujours sans réponse à ce jour. Toutefois, il est intéressant de mentionner qu'une étude de 2013 relate une surprenante uniformité entre les changements d'expression génique observés dans les MNs et les astrocytes en culture et ceux issus de la moelle épinière de souris transgéniques *SOD1* (Phatnani et al., 2013). Ceci suggérerait que des parallèles entre des modèles *in vitro* et *in vivo* puissent, dans certains cas, être tracés.

Plusieurs travaux de recherche ont été effectués pour tenter d'identifier les mécanismes de toxicité exercés par les astrocytes. En effet, ces mécanismes se regroupent en deux grandes catégories : une première selon laquelle les astrocytes libèrent différentes molécules entraînant une cascade neurotoxique affectant les MNs et une deuxième voulant que ce sont les

astrocytes eux-mêmes qui présentent des anomalies fonctionnelles. Par exemple (première catégorie), les MNs démontrent une diminution de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I) due à des facteurs sécrétés par les astrocytes (Song et al., 2016). Les molécules de CMH-I, un système de reconnaissance du soi, agissent comme des ligands inhibiteurs pour certaines cellules (e.g. les cellules NK, de l'anglais *Natural Killer*). Ainsi, la diminution de l'expression des molécules CMH-I permet à des mécanismes cytotoxiques, normalement inhibés, de se déployer. Un autre exemple (deuxième catégorie) serait celui où une mauvaise communication entre astrocytes serait observée dans la SLA. La communication intercellulaire entre les astrocytes est un élément essentiel au bon fonctionnement du système nerveux et est due à la présence de jonctions communicantes, aussi appelées jonctions gap (Orellana et al., 2016). Ces jonctions gap permettent aux astrocytes d'être couplés et de former un syncytium glial qui s'est révélé avoir notamment des implications physiologiques dans l'homéostasie ionique et la transmission synaptique (Morquette et al., 2015). Toutefois, dans des conditions pathologiques, l'expression de certaines composantes protéines indispensables aux canaux formant ces jonctions gap, comme les connexines, ainsi que la fonction de ces dernières sont altérées. Par exemple, des travaux récents ont démontré une expression élevée de la connexine 43, uniquement exprimée par les astrocytes, tant dans les échantillons de moelle épinière et de cortex moteur de patients atteints de la SLA que dans des modèles de souris SOD1^{G93A} (Almad et al., 2016). De plus, l'utilisation d'un bloqueur de ces connexines a eu un effet neuroprotecteur sur des MNs en coculture avec des astrocytes exprimant la SOD1^{G93A}. Par conséquent, cette expression anormale de connexines est un autre mécanisme par lequel les astrocytes pourraient exercer une toxicité envers les motoneurones dans la SLA.

Enfin, j'aimerais signaler à nouveau l'implication des astrocytes dans le phénomène d'excitotoxicité, mais, cette fois-ci, dans un contexte plus global de changements de la transmission synaptique. Étant donné l'implication des astrocytes dans la régulation synaptique en conditions physiologiques, il est raisonnable de penser que ces cellules gliales aient également un rôle à jouer en condition pathologique de SLA. Par exemple, les niveaux de D-serine sont particulièrement élevés dans la moelle épinière de souris transgéniques ainsi que dans celle des patients atteint de SLAs et SLAf (Sasabe et al., 2007). Puisque la D-serine

est un co-agoniste des récepteurs NMDA et qu'elle peut être relâchée par les astrocytes (Henneberger et al., 2010), on peut penser que cette relâche pourrait contribuer à exacerber le phénomène d'excitotoxicité. Cependant, la relâche anormale de la D-serine astrocytaire reste toujours à être validée. Les astrocytes mutants, étant eux-mêmes sensibles à l'excitotoxicité (Rossi et al., 2008), perdraient également leur capacité à réguler l'expression des sous-unités GluR2 des récepteurs AMPA neuronaux (Van Damme et al., 2007). La perméabilité au Ca^{2+} des récepteurs AMPA est justement déterminée par la présence de ces sous-unités. Ainsi, une diminution de l'expression neuronale de ces sous-unités, qui résulterait en une augmentation de la perméabilité au Ca^{2+} et une plus grande vulnérabilité face à des phénomènes d'excitotoxicité, pourrait être en partie dû aux astrocytes mutants.

En résumé, la mutation *SOD1* pourrait à la fois provoquer une perte de fonction (relâche de facteurs neurotrophiques, régulation anormale des sous-unités GluR2 et du transporteur au glutamate) ainsi qu'un gain de fonction (relâche de facteurs toxiques et relâche excessive de D-serine) chez les astrocytes. De plus, sans oublier de mentionner qu'un dialogue fonctionnel important a lieu entre les astrocytes et les cellules microgliales, puisque la diminution sélective de l'expression du gène *SOD1* muté dans les astrocytes a retardé l'activation microgliale et fortement ralenti la progression de la maladie chez des souris *SOD1*^{G37R} (Yamanaka et al., 2008b). Dans un même ordre d'idées, il a d'ailleurs été suggéré qu'une activation des cellules microgliales pourrait expliquer que l'introduction de cellules précurseurs des astrocytes exprimant une mutation *SOD1* dans la moelle épinière de souris sauvage soit suffisante pour induire la dégénérescence des MNs (Papadeas et al., 2011).

2.1.2 Cellules microgliales

2.1.2.1 Rôles des cellules microgliales en conditions physiologiques

Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires primaires du SNC. Ces cellules gliales sont bien reconnues pour leur rôle dans le développement et dans l'élimination de débris cellulaires et de synapses surnuméraires. Ce processus d'élimination, dépendant de l'activité des synapses, contribue au raffinement des circuits neuronaux (Schafer et al., 2012).

De plus, ces cellules gliales patrouillent continuellement leur environnement. En effet, des expériences d'imagerie *in vivo* ont révélé que les prolongements des cellules microgliales sont très mobiles; ces derniers sont constamment en train de s'étendre, de se rétracter et d'interagir avec les synapses environnantes (Nimmerjahn et al., 2005; Wake et al., 2009). Il est important de mentionner que plus les niveaux d'activité synaptique sont élevés, plus la surveillance microgliale est intensifiée (Li et al., 2012). Cette surveillance dynamique correspond à leur état dit « de repos » (de l'anglais, *resting state*).

Lorsqu'un élément perturbateur les active, les cellules microgliales « activées » modifient leur morphologie, migrent en direction des signaux de détresse ou du site endommagé, prolifèrent, éliminent les débris et relâchent une grande diversité de molécules pro-inflammatoires (Beers et al., 2006; Hensley et al., 2003; Hensley et al., 2002). Les cellules microgliales relâchant des molécules pro-inflammatoires, telles que $TNF\alpha$, interleukine-12 et des ROS, sont communément appelées microglies activées de type M1 (Philips and Rothstein, 2014). Cette relâche de molécules neurotoxiques peut donc exacerber un phénomène neurodégénératif en engendrant un cercle vicieux de neuro-inflammation (Lasiene and Yamanaka, 2011). Cependant, en condition physiologique, toute cette séquence d'évènements sera normalement compensée par la relâche de molécules anti-inflammatoires afin de promouvoir la réparation des tissus lésés. D'ailleurs, l'interleukine-4 et -10 et le facteur de croissance 1 semblable à l'insuline (de l'anglais, *insulin-like growth factor-1*, IGF-1) sont des exemples de molécules anti-inflammatoires relâchées par les cellules microgliales activées de type M2 (Philips and Rothstein, 2014). Il est important de mentionner que les cellules microgliales ne sont pas exclusivement caractérisées par ces deux phénotypes d'activation (M1 ou M2) (Liao et al., 2012), mais peuvent aussi relâcher une combinaison de substances dépendant de l'environnement auquel elles sont exposées (Chiu et al., 2013). Les cellules microgliales sont donc des cellules à double tranchant recrutées dans plusieurs maladies neurodégénératives (Philips and Rothstein, 2014).

2.1.2.2 Contribution des cellules microgliales dans la SLA

Puisque dans la moelle épinière de patients décédés de SLAs et SLAf ainsi que dans celle de différents modèles de souris transgéniques on observe des cellules microgliales activées, cette activation est perçue comme un des signes distinctifs de la maladie (Henkel et al., 2004; Kawamata et al., 1992; Vinsant et al., 2013a, b; Wong et al., 1995). Dans des modèles de souris SOD1, cette activation a lieu avant l'apparition des symptômes moteurs et devient plus prééminente avec la progression de la maladie (Saxena et al., 2009). Une étude, conduite chez des patients vivants atteints de SLA et ayant eu recours à la technique d'imagerie de tomographie par émission de positrons, a permis de non seulement confirmer cette activation microgliale dans le cerveau des patients mais également de corrélérer cette activation avec la sévérité des dommages affectant les MNs supérieurs (Turner et al., 2004). Il est intéressant de mentionner que l'activation microgliale pourrait être déclenchée, entre autres, par la sécrétion de la mSOD1 (Urushitani et al., 2006; Zhao et al., 2010). De plus, un changement dans l'expression des substances pro- et anti-inflammatoires a également été rapporté autant dans des tissus post-mortem de patients que dans des modèles de souris transgéniques (Henkel et al., 2004; Hensley et al., 2003; Hensley et al., 2002). D'ailleurs, le fait de promouvoir la sécrétion d'interleukine-10 (molécule anti-inflammatoire) par les cellules microgliales, via une approche de thérapie génique, a significativement retardé le développement et la progression de la maladie dans un modèle de souris SOD1 (Gravel et al., 2016). L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle des cellules microgliales dans la SLA.

Différentes études *in vitro* ont rapporté l'implication des cellules microgliales dans la mort des MNs, mais leur rôle dans la progression de la maladie a été consolidé par la publication de trois études indépendantes réalisées *in vivo*. En effet, la diminution de l'expression de la SOD1 dans les cellules microgliales et les macrophages a permis de ralentir la progression de la maladie chez des souris SOD1^{G37R} (Boillee et al., 2006) et SOD1^{G85R} (Wang et al., 2009b). Une approche complémentaire, ayant utilisé le remplacement des microglies/macrophages par greffe de moelle osseuse, a montré que des microglies/macrophages sauvages pouvaient ralentir la progression de la maladie dans la souris SOD1^{G93A} (Beers et al., 2006). La progression de la maladie ne semble pas être tributaire de la prolifération des microglies mutantes en réponse initiale des blessures, puisque

la réduction d'environ la moitié de la microglie proliférante n'a pas affecté le taux de progression dans cette même souche de souris SOD1 (Gowing et al., 2008).

L'étude des mécanismes cellulaires sous-jacents à cette toxicité microgliale demeure toujours d'actualité. La simple prévention de l'activation microgliale, via l'utilisation de minocycline par exemple, ou l'inhibition de certaines voies de signalisation ou de relâche de molécules neurotoxiques, ne sont malheureusement pas des interventions ayant eu un impact significatif sur la maladie (pour une revue sur le sujet: (Philips and Robberecht, 2011). En fait, la plupart de ces stratégies thérapeutiques manque de spécificité spatiale et temporelle, car elles se doivent de cibler, globalement, autant les procédés bénéfiques et néfastes de la réaction inflammatoire (Philips and Rothstein, 2014). De plus, il semble que les autres composantes de la réponse inflammatoire doivent également être prises en considération puisque le dialogue entre les cellules gliales et les lymphocytes T s'avère être un élément clé dans le contrôle de la toxicité microgliale et astrocytaire (Beers et al., 2008; Chiu et al., 2008).

2.1.3 Oligodendrocytes

2.1.3.1 Rôles des oligodendrocytes en conditions physiologiques

Les oligodendrocytes sont des cellules indispensables au bon fonctionnement des neurones puisqu'elles servent notamment à augmenter la vitesse de propagation des influx nerveux et à offrir un support métabolique adéquat. En effet, l'enroulement de leur membrane autour des axones des neurones génère les gaines de myéline. Ces couches grasses agissent non seulement en tant que couche protectrice mais permettent également l'isolation nécessaire à la conduction saltatoire des potentiels d'action sur toute la longueur des axones myélinisés (Nave, 2010). Mais la contribution des oligodendrocytes ne se limite pas qu'à la formation et au maintien de ces gaines de myéline. De nombreuses données démontrent qu'ils expriment également un transporteur de lactate (monocarboxylate transporter 1, MCT1) afin de fournir un soutien métabolique aux axones et aux neurones (Kang et al., 2013; Lee et al., 2012; Nave, 2010; Philips et al., 2013). Les neurones sont d'ailleurs grandement dépendants de ce transporteur de lactate, car une souris transgénique, ayant une expression réduite de ce

transporteur, développe une dégénérescence des MNs et de leurs axones (Lee et al., 2012). De plus, une ablation génétique des oligodendrocytes est suffisante pour provoquer l'apoptose des neurones (Pohl et al., 2011), ce qui laisse présager que toute perte de ces cellules ou de leurs fonctions serait susceptible d'avoir des effets néfastes sur l'intégrité et la survie des MNs dans la SLA.

2.1.3.2 Contribution des oligodendrocytes dans la SLA

Des anomalies liées à la gaine de myéline ainsi qu'une diminution de l'expression du transporteur de lactate ont été observées dans la moelle épinière autant de modèles animaux murins que chez des patients atteints de SLA (Hayashi et al., 2001; Kang et al., 2013; Lee et al., 2012; Niebroj-Dobosz et al., 2007; Philips et al., 2013). Bien que certaines de ces observations aient préalablement suggéré que ces cellules pourraient être matières à investigation, une étude publiée en 2008 a, tant qu'à elle, semé le doute. Cette étude, ayant fait l'analyse d'une souris chimère où tous les MNs ainsi que tous les oligodendrocytes exprimaient la mutation *SOD1* à des taux élevés, a rapporté que le développement de la maladie était significativement retardé, suggérant que tous les autres types cellulaires pouvaient être des facteurs contribuant à la pathogénèse de la SLA (Yamanaka et al., 2008a). Ce n'est qu'après la publication du groupe de recherche du Dr Bergles en 2013 que la contribution des oligodendrocytes à la pathogénèse de la SLA a été clarifiée. Cette étude relate que ces cellules subissent une dégénérescence intensive dans la substance grise de la moelle épinière de souris *SOD1*^{G93A} dans des stades présymptomatiques de la maladie (Kang et al., 2013). Bien que dans des cas de blessure, de démyélinisation ou de neurodégénérescence, le renouvellement des oligodendrocytes est assuré par la division et la différenciation de leurs précurseurs, les cellules de types NG2+ (Kang et al., 2010), les oligodendrocytes nouvellement formés ne parviennent pas à atteindre une maturation complète, le tout résultant en une démyélinisation progressive (Kang et al., 2013). Ces oligodendrocytes nouvellement formés sont également caractérisés par une expression plus faible du transporteur MCT1 (Kang et al., 2013; Lee et al., 2012; Philips et al., 2013). L'excision du gène *SOD1* dans les cellules NG2+ a eu comme effet de retarder le développement de la maladie ainsi que de

favoriser une prolongation de la survie des souris (Kang et al., 2013). L'ensemble de ces résultats suggère donc que les oligodendrocytes pourraient jouer un rôle majeur dans la pathophysiologie de la SLA.

2.2 Cellules gliales du système nerveux périphérique

2.2.1 Cellules de Schwann myélinisantes

2.2.1.1 Rôles des cellules de Schwann myélinisantes en conditions physiologiques

Le rôle des cellules de Schwann dans le SNP ressemble énormément à celui des oligodendrocytes dans le SNC. En effet, à la différence des oligodendrocytes qui s'enroulent autour de plusieurs neurones différents, les cellules de Schwann myélinisantes, quant à elles, s'enroulent uniquement autour d'un seul et unique axone. Suite à des dommages axonaux, ces cellules peuvent participer, de concert avec les macrophages, à l'élimination de débris en plus de fournir les signaux nécessaires et les repères spatiaux pour la survie des axones lésés, la régénérescence et le guidage de l'axone (Jessen and Mirsky, 2016). Le rôle de ces cellules apparaît donc comme essentiel à une réinnervation ciblée dans des cas de dommage axonal.

2.2.1.2 Contribution des cellules de Schwann dans la SLA

Bien que des changements de myéline le long des axones aient été rapportés suite à des analyses de tissus post-mortem (Perrie et al., 1993) et que les cellules de Schwann semblent être dans un état activé dans des souris SOD1 avant l'apparition de symptômes moteurs (Keller et al., 2009), le rôle de cette population de cellules gliales semble encore indéterminé dans la SLA. En effet, les études portant sur l'impact *in vivo* des cellules de Schwann dans la pathogénèse de la SLA, soit par l'expression ou l'ablation spécifique de la SOD1 mutante dans ces cellules, ont fourni des résultats divergents. Par exemple, l'expression spécifique et élevée de la SOD1^{G93A} dans les cellules de Schwann n'a mené à aucun phénotype moteur, aucune perte de MNs ou de dégénérescence axonale (Turner et al., 2010). Alors qu'une deuxième approche, l'ablation de la SOD1 spécifiquement dans ces cellules a mené à deux

scénarios différents, tout dépendant du type d'activité enzymatique de la SOD1 : 1) l'ablation de la SOD1^{G37R} s'est avérée être neurotoxique et a provoqué une accélération substantielle de la maladie (Lobsiger et al., 2009), alors que 2) l'ablation de la SOD1^{G85R} a été neuroprotectrice et a provoqué le retardement de la perte des MNs, de l'activation des astrocytes et des cellules microgliales tout en décalant le développement ainsi que la progression de la maladie (Wang et al., 2012). Il est à noter que, à cause de contraintes méthodologiques (absence de marqueurs spécifiques), ces études ont également ciblé une petite proportion des cellules de Schwann non-myélinisantes (Lobsiger et al., 2009). La différence entre ces deux populations distinctes de cellules de Schwann ainsi que des détails quant à la disparité de ces résultats seront respectivement discutés en section 3.3.1 et 7.5.1. Considérant la proximité anatomique des cellules de Schwann myélinisantes et des axones des MNs, ces cellules méritent clairement davantage d'attention dans la recherche sur la SLA et l'élucidation de leur contribution dans la maladie nous aiderait à mieux comprendre sa pathophysiologie.

En résumé, il semble que le développement et la progression de la SLA dépendent des interactions complexes entre les neurones et leurs cellules environnantes. En effet, la combinaison des dysfonctions de ces différents types cellulaires, tant neuronaux que non neuronaux, ainsi que la synergie s'installant entre ces dernières semblent toutes deux primordiales pour permettre la pleine expression de la maladie. Il n'est pas difficile d'imaginer que des interactions cellulaires pourraient commencer focalement dans les MNs et par la suite déclencher une cascade de changements se propageant dans les autres types cellulaires. D'ailleurs, une étude récente a procédé à une analyse spatiotemporelle des ARNm activement traduits dans les ribosomes de différentes cellules. Leurs résultats suggèrent que la pathogénèse de la SLA impliquerait une cascade temporelle de dommages spécifiques s'initiant dans les MNs pour ensuite se propager dans les cellules gliales avoisinantes (Sun et al., 2015). Ainsi, chaque cellule contribuerait à l'initiation et la progression de la maladie d'une manière coordonnée dans le temps et l'espace.

À la lumière des résultats présentés dans cette première section de l'introduction, la dégénérescence des MNs semble donc être la résultante de la toxicité émanant autant de l'expression de protéines mutées en leur sein que dans les cellules les entourant, les cellules

gliales (Lobsiger and Cleveland, 2007). L'environnement cellulaire des MNs semble contribuer de manière significative autant à leur survie qu'à leur dégénérescence. Serait-il donc possible d'exporter ce concept de « non-cell autonomy » mais cette fois-ci à la JNM, élément anatomique grandement affecté par la SLA? Il est également important de garder en mémoire que la JNM demeure la sortie (de l'anglais, *output*) ultime du prolongement motoneuronal. Plus spécifiquement, l'exploration de la JNM et de ces composantes, dont celle de la cellule gliale, amène aux sujets principaux traités dans la prochaine section de l'introduction de cette thèse.

3. Jonction neuromusculaire

3.1 Importance de la JNM dans la SLA

3.1.1 Concept des unités motrices et diversité fonctionnelle

La dégénérescence des MNs entraîne la perte d'une unité fonctionnelle essentielle pour l'exécution des mouvements, l'unité motrice (UM). Une UM est composée d'un MN de type alpha ainsi que des fibres musculaires innervées par ses terminaisons axonales (Kanning et al., 2010) (Figure 3.1). Alors qu'un MN fait synapse avec de multiples fibres musculaires, une fibre musculaire est innervée par la terminaison axonale d'un seul MN, et ce, à un endroit unique. Lorsqu'un MN émet un potentiel d'action, toutes les fibres musculaires qu'il innerve se contractent, suggérant que les fibres musculaires issues d'une même UM ont toutes les mêmes propriétés métaboliques et contractiles (Tableau 3.1)

Tableau 3.1 Caractéristiques des différentes UMs

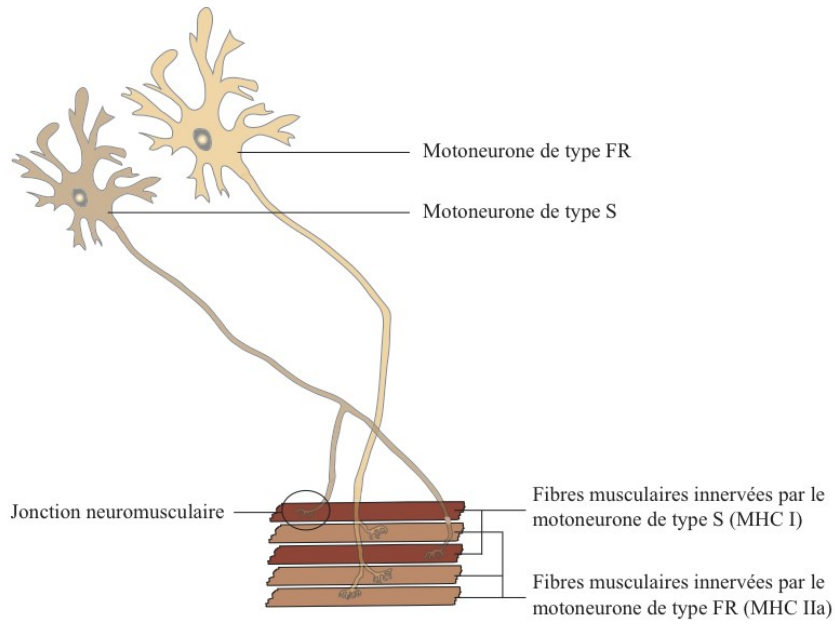
<i>Caractéristique de l'UM</i>	<i>Unité lente</i>	<i>Unité rapide et résistante à la fatigue</i>	<i>Unité rapide et fatigable</i>
Grosseur du corps cellulaire	Plus petite	Intermédiaire	Plus grande
Arborisation dendritique	Moins élaborée	Intermédiaire	Plus élaborée
Nombre de bouton-c sur le corps cellulaire	Moins	Intermédiaire	Plus
Résistance membranaire	Plus grande	Intermédiaire	Plus petite
Comportement de décharge neuronale	Tonique	Intermédiaire	Phasique
Vélocité de la conduction axonale	Plus lente	Intermédiaire	Plus rapide
Ordre de recrutement	Plus tôt	Intermédiaire	Plus tard
Vitesse de contraction	Lente	Intermédiaire	Rapide
Résistance à la fatigue	Élevée	Intermédiaire	Basse
Grosseur de l'UM (ratio d'innervation)	Plus petite	Intermédiaire	Plus grande
Densité des vésicules synaptiques dans la terminaison axonale	Plus grande	Intermédiaire	Plus petite
Morphologie des JNMs	Plus petites, moins complexes	Intermédiaire	Plus grosses, plus complexes
Fibre musculaire cible	Lente (I)	Rapide (IIa)	Rapide (IIb/x)
Couleur de la fibre	Rouge	Rosée	Blanche
Capacité de phosphorylation oxydative	Élevée	Intermédiaire	Basse
Enzymes pour la glycolyse anaérobie	Basse	Intermédiaire	Élevée
Affectée dans le vieillissement normal et la SLA	Plus tard	Intermédiaire	Plus tôt

Il est important de mentionner que les propriétés morphologiques et électriques des MNs ainsi que les propriétés de contraction des fibres musculaires sont des facteurs qui influencent la taille, le seuil et l'ordre de recrutement des UMs (Burke et al., 1973) (Tableau 3.1). Par exemple, des MNs avec de petits corps cellulaires et de petits axones, qui requièrent moins d'activation, innervent un plus petit nombre de fibres musculaires et sont les premiers à être recrutés (principe de taille) (Henneman, 1957; Mendell, 2005). Ces petites UMs sont appelées lentes (slow: S), car les propriétés de contraction des fibres musculaires sont lentes et ces unités développent des forces relativement faibles. Cependant, ces UMs de type S sont très résistantes à la fatigue. Les gros MNs, innervant des fibres musculaires de plus gros calibre, développant une force plus élevée mais qui se fatiguent plus vite et sont généralement les dernières à être recrutées, sont appelées UMs rapides et fatigables (Fast-fatigable: FF). Un dernier type d'UMs se caractérise par des niveaux intermédiaires d'activation, de recrutement et de résistance à la fatigue et est nommé rapide et résistant à la fatigue (Fast-resistant: FR). Un muscle est normalement composé de plusieurs types d'UMs, mais contient, de manière générale, une plus grande proportion d'un type en particulier. Toutes les UMs d'un même muscle sont désignées sous le nom de groupe de MNs. Ainsi, la contraction d'un muscle entier résulte donc du travail de plusieurs groupes d'UMs où la force de contraction générée est dépendante de la fréquence de décharge des MNs ainsi que du nombre d'UMs recrutées.

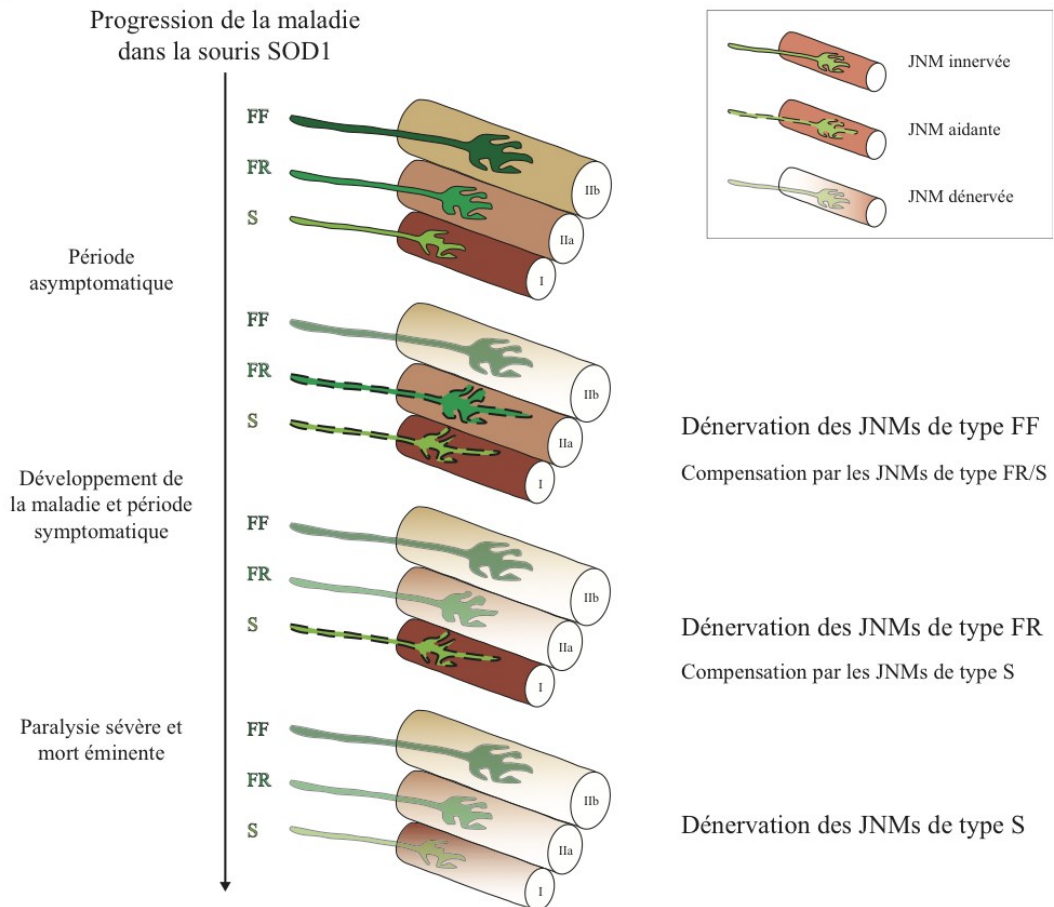
En résumé, afin de produire un large spectre de performances motrices, les MNs offrent une grande variété de grosseurs, d'excitabilité, de propriétés de décharge et de vitesses de conductibilité (Kanning et al., 2010). De manière correspondante, les fibres musculaires s'insèrent dans un continuum de force, de vitesse de contraction et d'endurance. Cet aspect de la diversité fonctionnelle des UMs est important, car ces différences fonctionnelles semblent corrélées avec une vulnérabilité différentielle à la maladie de la SLA.

Figure 3.1 Concept et vulnérabilité des UMs

A



B



A. Représentation schématique de deux UMs du muscle soleus où un petit MN de type S innerve quelques fibres musculaires ayant des propriétés contractiles lentes mais résistantes à la fatigue (couleur orangée) et où un MN plus gros, de type FR, innerve plusieurs fibres musculaires avec des propriétés de contraction plus rapides et fatigables (couleur beige). **B.** Décours temporel de la progression de la maladie en parallèle avec la vulnérabilité ainsi que la capacité de compensation des différentes UMs. Il faut noter que les JNMs de couleur foncé sont innervées (terminaisons axonales et fibres musculaires) alors que celles dénervées sont avec une opacité réduite. Pour ce qui est des JNMs démontrant des signes de compensation (ou JNMs aidantes), elles ont des terminaisons axonales plus longues et sont en pointillée.

La figure 3.1 a été inspirée de (Kanning et al., 2010).

3.1.2 Susceptibilité différentielle des UMs

Toutes les synapses neuromusculaires n'ont pas la même susceptibilité à perdre leur innervation (dénervation). En effet, dans des modèles de souris de SLA ($SOD1^{G93A}$ et $SOD1^{G85R}$), une analyse spatiotemporelle de la progression de la maladie démontre que la dénervation de la JNM survient d'abord sur des fibres à contraction rapide de type FF (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Hegedus et al., 2008; Pun et al., 2006). En accord avec cette notion, les racines ventrales subissent d'abord préférentiellement la perte des axones de plus gros calibre (Fischer et al., 2004). Étant donné que la dénervation de la JNM est un élément majeur de la pathologie, la prochaine section y sera dédiée.

À l'instar de la dénervation des JNMs, il a également été démontré que les UMs n'étaient pas uniformément affectées par la maladie et étaient perdues dans un ordre bien précis; les UMs de type FF étaient perdues de façon synchrone et rapide dans une période qui coïncide avec l'apparition des symptômes, ensuite les UMs de type FR sont perdues et celles de type S sont sensiblement préservées jusque dans les derniers stades de la maladie (Figure 3.1) (Pun et al., 2006). D'ailleurs, il a été suggéré que le rythme auquel étaient perdues les UMs de type S est corrélé avec la vitesse de progression de la maladie (Dadon-Nachum et al., 2011). Des enregistrements des propriétés contractiles de fibres uniques (Atkin et al., 2005),

des mesures de force de contraction isométrique de muscles et des marquages immunohistochimiques ont également corroboré la séquence de dénervation des différents muscles et de perte des UMs (Hegedus et al., 2007). En résumé, ces résultats, obtenus dans des modèles animaux murins de SLA, suggèrent que la susceptibilité à la maladie semble majoritairement tributaire du type d'UM.

Des résultats issus d'études réalisées chez des patients atteints de la SLA suggèrent que la vulnérabilité sélective des axones de types FF rapportée chez la souris est également observée chez l'humain. En effet, des suivis longitudinaux de patients combinés avec des mesures d'électromyogramme ont révélé que, non seulement il y avait des changements précoces dans le nombre d'UMs mais aussi que les UMs de types rapides, celles nécessitant le plus haut seuil d'activation, étaient affectées en premier (Dengler et al., 1990; Felice, 1997). Par conséquent, bien qu'il y ait des exceptions, l'ensemble de ces résultats suggère que les types d'UMs semblent être, d'une part, le reflet de leur susceptibilité et, d'autre part, un élément prédictif de la progression de la maladie de la SLA.

3.1.3 La JNM, un site primaire de vulnérabilité dans la SLA

La destruction de la JNM est un événement pathogénique précoce de la maladie. Plusieurs articles fondateurs ont fourni la preuve expérimentale que la dénervation de la JNM survient avant même la dégénérescence des axones moteurs et des MNs (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Pun et al., 2006). Cette dénervation, tel que mentionné précédemment, survient dans un ordre précis, où les JNMs de type FF, FR et S sont séquentiellement dénervés (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Hegedus et al., 2008; Pun et al., 2006) (Figure 3.1). De plus, des dysfonctions synaptiques à la JNM sont observables dans des stades asymptomatiques de la maladie, et ce, dans plusieurs modèles animaux de SLA (pour une revue sur le sujet, voir la section 7.4.1.3 de cette thèse). Il est intéressant de mentionner que des changements présymptomatiques de certains paramètres électrophysiologiques, comme les données d'amplitude du potentiel d'activité musculaire (de l'anglais, *compound muscle action potential*), possèdent une valeur prédictive du développement clinique de la maladie et de la survie des souris SOD1^{G93A} (Mancuso et al., 2014).

De manière encore plus importante, la dénervation de la JNM semble complètement dissociée de la survie des MNs. En effet, la prévention de l'activation des voies de l'apoptose dans les corps cellulaires des MNs n'a pas été suffisante pour prévenir la dénervation de la JNM (Dewil et al., 2007; Gould et al., 2006; Kostic et al., 1997). Dans le même ordre d'idées, bien qu'un apport supplémentaire de facteurs neurotrophiques dans la moelle épinière ait suffi à significativement augmenter le nombre de MNs survivants, cet apport n'a cependant pas prévenu la dénervation des synapses neuromusculaires (Suzuki et al., 2007). L'ensemble de ces résultats suggère que la JNM serait un site particulièrement vulnérable à la toxicité conférée par la maladie. Il est possible de penser que des altérations touchant chacune des composantes de la JNM pourraient jouer un rôle majeur dans ce phénomène de toxicité et, par conséquent, de dénervation. L'identification des facteurs conférant cette toxicité spécifique est donc primordiale pour mieux comprendre la pathogénèse et la progression de la maladie.

3.1.4 Mécanismes compensatoires à la JNM

Bien que la JNM de mammifère soit une entité anatomique très stable à l'âge adulte (Kang et al., 2003; O'Malley et al., 1999; Zuo et al., 2004), face à l'adversité, elle fait aussi preuve d'une très grande plasticité. Par exemple, lors d'une lésion (dénervation complète) ou d'un écrasement du nerf sciatique (dénervation partielle), les composantes de la JNM changent et s'adaptent afin de favoriser la réinnervation des JNMs dénervées (Kang et al., 2003; O'Malley et al., 1999). De plus amples détails concernant ces modifications feront l'objet de la section 3.3.1.4. En gros, cette plasticité anatomique est principalement due à la capacité des JNMs dénervées à être réinnervées par les JNMs innervées (dénervation partielle) ou de favoriser le retour de l'innervation (dénervation complète).

Dans des conditions pathologiques de SLA, il a été suggéré que la vulnérabilité des JNMs à la dénervation était justement corrélée avec une capacité réduite d'adaptation anatomique (Frey et al., 2000). Plus précisément, cette plasticité anatomique est fortement corrélée avec la distribution des sous-types des fibres musculaires, où les JNMs de type S sont celles étant partiellement résistantes à la maladie et ayant la capacité de compenser pour la dénervation des autres JNMs (De Winter et al., 2006; Frey et al., 2000). Sans oublier de

mentionner qu'au sein d'un même groupe de MNs, il semble y avoir des différences marquantes dans cette capacité de remodelage synaptique (Schaefer et al., 2005). Malheureusement, dans un contexte de SLA, ces mécanismes de compensation sont non seulement altérés mais finissent également par ne plus être capables de compenser pour la dénervation des JNMs, qui continue à progresser (Gordon et al., 2004). Les mécanismes sous-jacents pouvant expliquer cette différence de susceptibilité à la dénervation et réinnervation sont encore peu connus (brièvement discutés dans les sections 7.4.1.4 et 7.4.1.5). Ces phénomènes pourraient dépendre, entre autres, des propriétés spécifiques de chacune des composantes de la JNM.

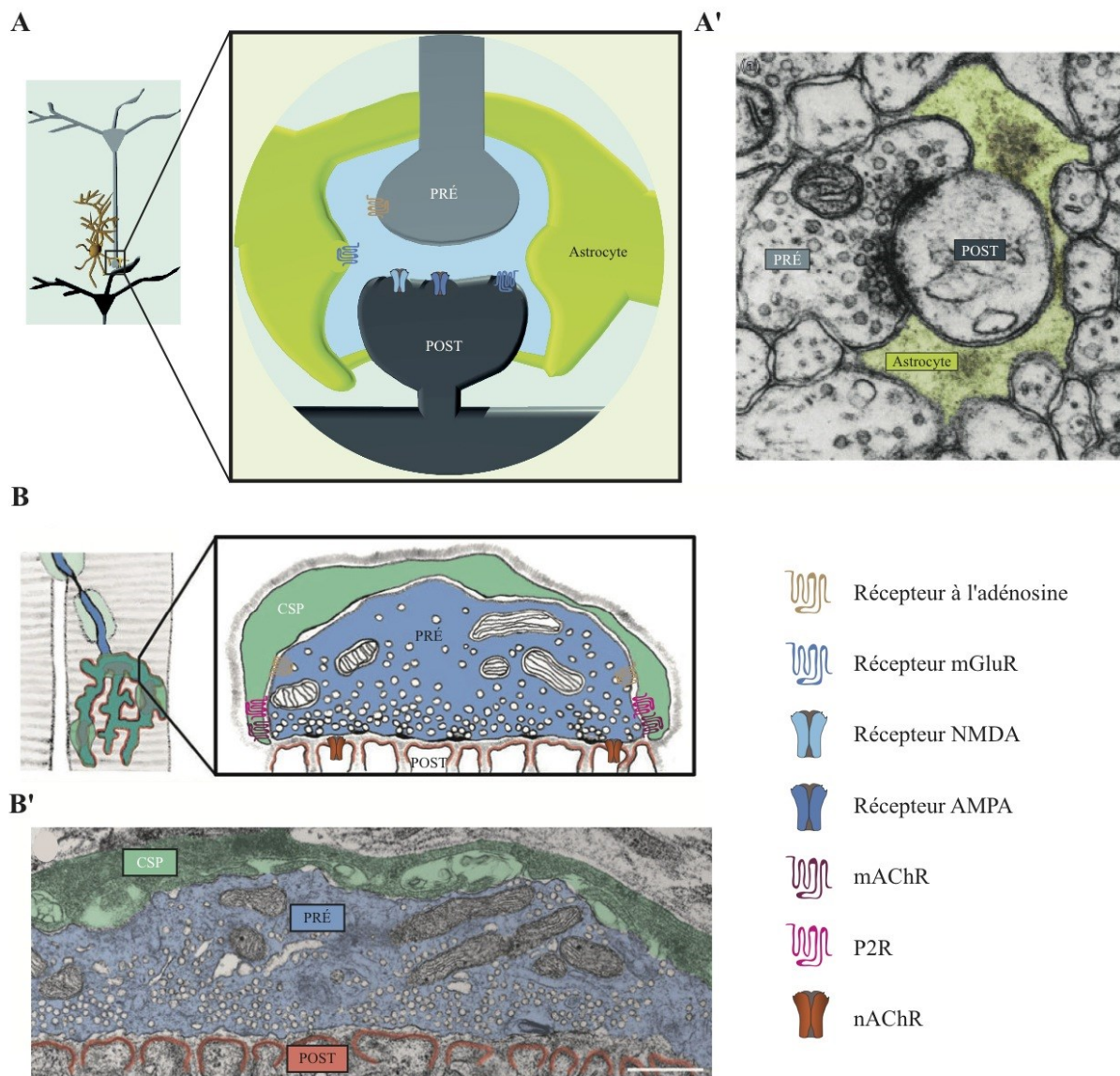
3.2 Structure et fonction de la JNM

La JNM est une synapse chimique du SNP ayant pour fonction d'assumer l'activation et le contrôle volontaire des mouvements. Effectivement, cette synapse représente l'interface de communication entre le système nerveux et les muscles squelettiques. C'est une zone de communication synaptique isolée de grande taille, d'organisation simple, d'une déconcertante accessibilité et partageant une multitude de similarités avec les synapses chimiques du SNC. Toutes ces raisons ont d'ailleurs favorisé l'utilisation de la JNM comme modèle expérimental afin de mieux comprendre le développement et le fonctionnement synaptique, les phénomènes de plasticité synaptique ainsi que les interactions neurone-glie du système nerveux (Del Castillo and Katz, 1954; Jahromi et al., 1992; Reist and Smith, 1992; Richards et al., 2000; Robitaille, 1998; Todd et al., 2010).

La communication synaptique à la JNM est donc caractérisée par les mêmes étapes que celles d'une synapse chimique du SNC. D'abord, elle débute par la synthèse des NTs et leur entreposage subséquent à l'intérieur de vésicules synaptiques dans l'élément présynaptique. Par la suite, l'arrivée d'un potentiel d'action induira une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire qui, à son tour, provoquera la relâche du contenu des vésicules dans la fente synaptique. Si suffisamment de NTs libérés se lient avec les récepteurs cibles de l'élément postsynaptique, ceci favorisera une grande dépolarisation de la membrane et un potentiel d'action sera émis. Ce potentiel mènera par la suite à la contraction de la fibre musculaire. La cessation de la

libération de NTs, leur diffusion passive, leur recapture et/ou leur dégradation mettra fin à la communication synaptique. Il est important de mentionner que cette synapse du SNP, tout comme la plupart de celles du SNC, est également une synapse tripartite, c'est-à-dire que son bon fonctionnement est tributaire du travail dynamique, coordonné et réciproque de trois éléments synaptiques (Figure 3.2).

Figure 3.2 Concept de la synapse tripartite



A. Représentation schématique d'une synapse tripartite du SNC. Cette synapse est composée d'un neurone présynaptique (gris) et postsynaptique (noir) ainsi qu'un astrocyte (jaune). L'encadré représente une vue un peu plus rapprochée de cette synapse illustrant une terminaison axonale (PRÉ, gris) qui est en contact avec un bouton postsynaptique (POST; noir). Cette synapse est également englobée par un renflement du prolongement de l'astrocyte, aussi appelé compartiment astrocytaire (Astrocyte; vert). Il est à noter que chaque élément synaptique possède des récepteurs spécifiques contribuant à la communication entre chacun de ces éléments. **A'**. Image obtenue par microscopie

électronique illustrant l'organisation de la synapse tripartite dans le SNC ainsi que la proximité de chacun des éléments la composant. **B**. Représentation schématique d'une synapse tripartite à la JNM. Cette synapse est composée d'une terminaison axonale du MN (PRÉ; bleu), d'une fibre musculaire comme élément postsynaptique (POST; rouge) et d'une cellule gliale, la CSP (CSP; vert). Une vue rapprochée de la JNM nous permet d'identifier à nouveau la terminaison axonale du MN (bleu), les récepteurs postsynaptiques situés sur la fibre musculaire (rouge) ainsi que les prolongements de la CSP qui viennent à proximité de la fente synaptique (vert). Notons encore une fois la présence de récepteurs sur toutes les composantes de cette synapse tripartite. **B'**. Image obtenue par microscopie électronique illustrant l'organisation de la synapse tripartite dans le SNP ainsi que la proximité de chacun des éléments la composant.

La figure 3.2A a été modifiée de (Panatier and Robitaille, 2012). La figure 3.2A' a été modifiée de (Halassa et al., 2007) et les figures de 3.2B et de 3.2B' ont été modifiées de (Zuo and Bishop, 2008).

3.2.1 Concept de la synapse tripartite

Au cours des 25 dernières années, le travail de plusieurs groupes de recherche a permis l'émergence du concept de la synapse tripartite, où le troisième élément synaptique, de nature glial, est intimement impliqué dans le contrôle actif de l'activité neuronale (première revue suggérant le terme de synapse tripartite : (Araque et al., 1999). Ainsi, suivant ce nouveau modèle, les éléments suivants doivent être ajoutés à la séquence d'évènements caractérisant la communication synaptique ci-haut mentionnée (sujets plus précisément appliqués à la cellule gliale à la JNM et traités dans les sections 3.3.1.2. et 3.3.1.3):

- la libération de NTs active également les récepteurs gliaux
- l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire dans la cellule gliale est un bon indicateur de leur excitabilité, de leur capacité de détection et du décodage de l'activité neuronale
- la cellule gliale relâche des gliotTs qui peuvent, à leur tour, influencer l'issue de la communication synaptique

Ainsi, en plus de tous les autres rôles qu'on leur attribue, l'élément synaptique glial travaille de concert avec les éléments pré- et postsynaptiques afin d'assurer la fidélité de la communication synaptique. Il n'est donc pas surprenant que plusieurs chercheurs suspectent que ces cellules multifonctionnelles du SNC soient aussi impliquées dans l'apparition et la progression de plusieurs autres maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington (Lobsiger and Cleveland, 2007). Les différentes propriétés des éléments, tant synaptiques (pré et post) que gliales, caractérisant la JNM seront discutées dans les prochaines sections.

3.2.2 Description des éléments pré- et postsynaptiques

3.2.2.1 La terminaison axonale du neurone moteur

3.2.2.1.1 Organisation de la terminaison axonale

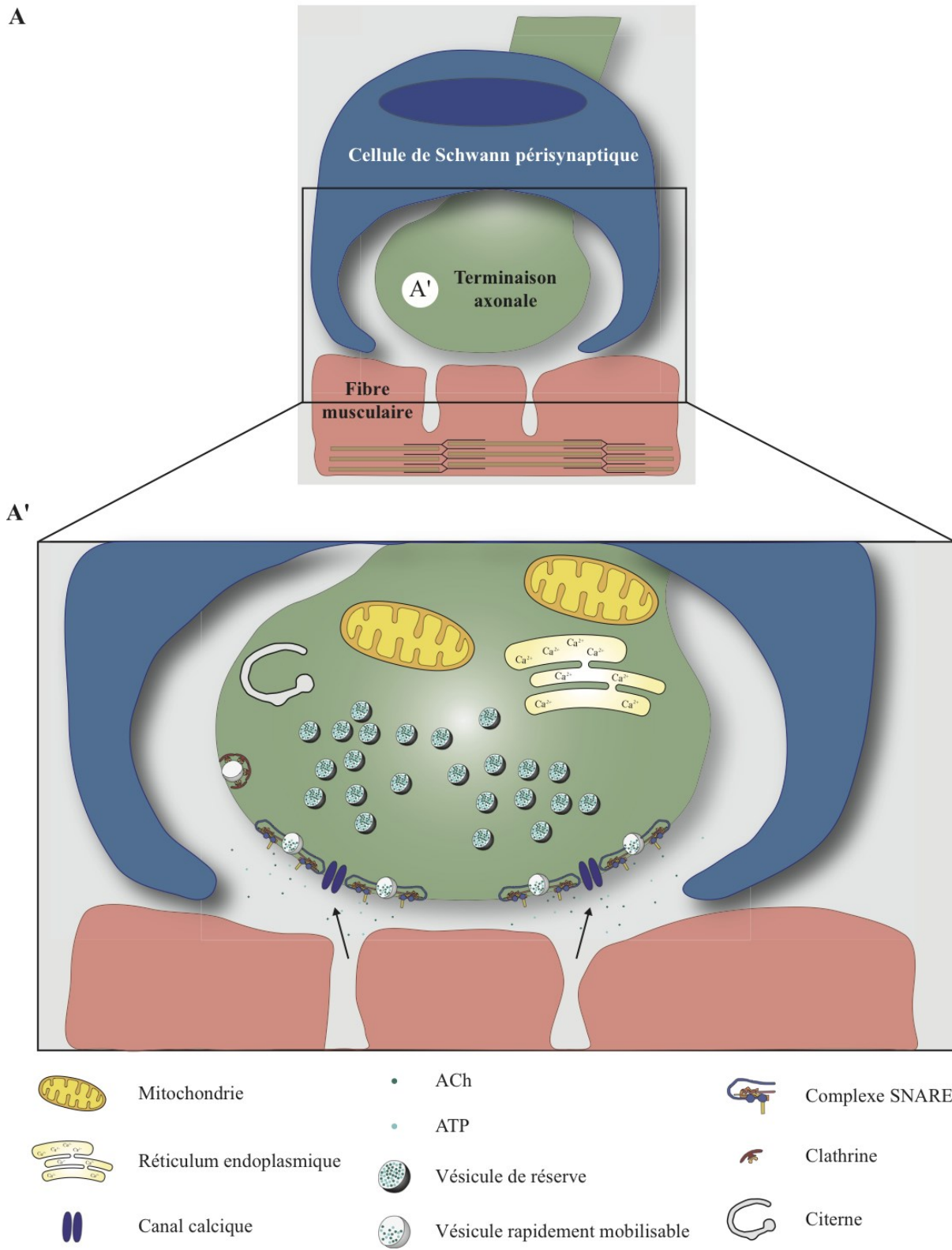
L'élément présynaptique de la JNM consiste en la terminaison axonale des MNs. Elles émergent des collatérales émises par les axones des MNs et font contact avec une seule fibre musculaire. Au contact de la fibre musculaire, la terminaison axonale se caractérise notamment par la perte de la gaine de myéline et se ramifie en plusieurs branches. Chaque terminaison axonale se singularise par le niveau de branchement qu'elle élabore, qui correspond précisément à la forme de la plaque motrice, elle-même délimitée par la distribution et la forte densité des récepteurs postsynaptiques. Il est important de noter que les terminaisons axonales contiennent toutes les enzymes nécessaires à la biosynthèse des NTs, de même que tous les transporteurs et les pompes requis pour leur emmagasinage dans les vésicules synaptiques et leur recapture (Purves, 2005). De plus, la machinerie requise pour la libération de ces NTs est également présente.

Les terminaisons axonales possèdent des zones de spécialisation structurelles et fonctionnelles bien particulières. D'après des observations réalisées en outre grâce à la technique de microscopie électronique, elles s'organisent en deux compartiments subcellulaires bien distincts (Siksou et al., 2009). Un premier compartiment, plutôt en retrait des sites de libération, contient une quantité substantielle de mitochondries (Marques and

Santo Neto, 1998) ainsi qu'un réseau de RE (Ahn et al., 1998). Leurs rôles seraient de fournir les éléments essentiels aux processus métaboliques et de transmission synaptique, dont notamment, de produire l'ATP nécessaire et de tamponner le Ca^{2+} de la terminaison (Alnaes and Rahamimoff, 1975). Leur présence à la terminaison axonale témoigne de leur importance à la JNM et laisse présager que toute altération touchant ces deux organites pourraient avoir des conséquences considérables sur la fidélité et la qualité de la transmission synaptique à cette synapse distale (David and Barrett, 2003). Tel que discuté précédemment (sections 1.4.1 et 1.4.3), ces deux organites sont grandement affectés dans la SLA.

Le second site spécialisé des terminaisons axonales est celui des zones actives, sites de prédilection pour la libération des NTs. Dans une même terminaison axonale, on y retrouve plusieurs zones actives dispersées et caractérisées par des regroupements de vésicules synaptiques (Figure 3.3). Le contenu de ces vésicules est relâché dans la fente synaptique suite à une succession d'évènements ayant lieu au sein de la terminaison axonale. Plus spécifiquement, suivant l'arrivée d'un influx nerveux dans la terminaison axonale et la dépolarisation de la membrane consécutive, il y a ouverture des canaux calciques qui sont dépendants du voltage (principalement de type P/Q à la JNM de souris) (Katz et al., 1996). L'entrée subséquente du Ca^{2+} dans la terminaison axonale, conformément à son gradient électrochimique, provoque la relâche de vésicules synaptiques par exocytose. Le Ca^{2+} , pénétrant à l'intérieur de la terminaison axonale, se lie à des protéines complémentaires, majoritairement transmembranaires, associées à chacune des membranes qui, en s'assemblant, permettent la fusion membranaire et la relâche vésiculaire. Le complexe protéique SNARE (de l'anglais, *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*) se retrouve parmi les complexes les plus étudiés impliqués dans la relâche vésiculaire des NTs (Rizo et al., 2006). Plusieurs protéines font partie de ce complexe dont principalement les protéines vésiculaires synaptobrevine et synaptotagmine, cette dernière étant l'élément sensible au Ca^{2+} . Ces protéines vésiculaires interagissent avec des protéines associées à la membrane de la terminaison axonale, dont la syntaxine et la SNAP-25 (Rizo et al., 2006). Ce complexe assure donc le lien entre le potentiel d'action, l'entrée du Ca^{2+} et la libération du contenu des vésicules synaptiques. Il est à noter que plusieurs autres complexes protéiques sont responsables du transport et de l'amorçage de ces vésicules (Purves, 2005).

Figure 3.3 Organisation structurale de la terminaison axonale



A. Représentation schématique des trois éléments synaptiques de la JNM, où un agrandissement de l'élément présynaptique est représenté en A'. A'. La terminaison axonale du MN peut être divisée en 2 zones de spécialisation structurales et fonctionnelles. Un premier compartiment comporte des mitochondries ainsi qu'une portion du RE. Le second compartiment est celui des zones actives (flèches) où l'on retrouve les vésicules synaptiques (ronds). Ces vésicules sont elles-mêmes divisées en deux groupes distincts : le premier est celui des vésicules rapidement mobilisables (ronds gris), déjà arrimées à la membrane plasmique. Suite à l'arrivée d'un potentiel d'action, la dépolarisation de la membrane entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant (violet). Le Ca^{2+} entrant se lie avec un complexe de protéines (complexe SNARE, de différentes couleurs) qui permet la fusion membranaire et l'exocytose des deux neurotransmetteurs de la JNM, l'ACh (petit point vert) et de l'ATP (petit point cyan). Le deuxième groupe de vésicules est celui des vésicules de réserve (ronds noirs) et est recruté lors d'activité neuronale soutenue. La récupération de ces vésicules se fait par des voies distinctes où chaque vésicule réintègre son bassin d'origine via des mécanismes dépendant de la clathrine (pour les vésicules rapidement mobilisables, en rouge et beige) et des formations de citerne (pour les vésicules de réserve, en blanc).

La fusion des membranes présynaptique et vésiculaire est un phénomène d'exocytose hautement régulé. En effet, plusieurs mécanismes sont responsables du contrôle de la relâche de NTs dont la distribution et la ségrégation spatiale des canaux calciques et des vésicules elles-mêmes. Par exemple, les canaux calciques sont maintenus à proximité des zones actives par des protéines d'échafaudage, telle que Bassoon et Piccolo (Cases-Langhoff et al., 1996; Chen et al., 2011; Juranek et al., 2006; tom Dieck et al., 1998). Parallèlement, les vésicules synaptiques semblent être divisées en deux ensembles fonctionnels distincts, mais non exclusifs (Rizzoli and Betz, 2005). Bien qu'une terminaison axonale puisse contenir plusieurs milliers de vésicules synaptiques, seulement quelques-unes (~ 2 à chaque zone active de JNM de souris) sont arrimées directement à la membrane présynaptique et prêtes à fusionner (Nagwaney et al., 2009; Ruiz et al., 2011). Ce petit amas de vésicules constituerait les vésicules rapidement mobilisables (de l'anglais, *readily releasable pool*) et seraient parmi les premières à être libérées lors d'une stimulation nerveuse (Richards et al., 2000; Rizzoli and

Betz, 2005; Ruiz et al., 2011). Les vésicules restantes, constituant la plus grande proportion des vésicules (~ 80-90%), seraient un groupe plutôt homogène regroupé dans la terminaison axonale (Rizzoli and Betz, 2005). La mobilisation de ces vésicules, dites de réserve (de l'anglais, *reserve pool*), surviendrait principalement lors d'une activité neuronale élevée et soutenue (Richards et al., 2000).

La mobilité des vésicules ainsi que les voies d'endocytose seraient deux autres éléments distinguant ces deux ensembles de vésicules synaptiques. À titre d'exemple, la mobilité des vésicules de réserve serait nettement plus réduite comparativement à celles rapidement mobilisables (Gaffield et al., 2006). En ce qui concerne les voies de récupération des vésicules, chacun des groupes retournerait sélectivement à son bassin d'origine, mais par des voies différentes. Les vésicules rapidement mobilisables seraient individuellement récupérées par endocytose à la membrane plasmique, grâce à des mécanismes d'endocytose dépendants de la clathrine, alors que les vésicules de réserve seraient englobées en vrac via la formation de citernes, grâce à une invagination de la membrane plasmique (Heuser and Reese, 1973; Richards et al., 2000; Richards et al., 2003). Par la suite, les vésicules de réserve bourgeonneraient à partir de cette citerne avant de rejoindre leur ensemble d'origine. Le processus de récupération des vésicules de réserve serait donc beaucoup plus lent que celui des vésicules rapidement mobilisables (Richards et al., 2000).

En somme, la structure de la terminaison axonale est hautement spécialisée avec des compartiments fonctionnels bien distincts au sein desquels on retrouve notamment différentes réserves de vésicules synaptiques afin de répondre aux différentes intensités d'activité synaptique. Bien que la localisation et la gestion de ces contenants apparaissent comme des éléments importants, il semble bien que ce soit leur contenu qui importe davantage, puisque la densité des vésicules ne semble pas être corrélée avec l'efficacité de la synapse (Reid et al., 1999).

3.2.2.1.2 Relâche de NTs à la JNM

L'acétylcholine (ACh) et l'ATP sont les deux NTs synthétisés et libérés par la terminaison axonale (Redman and Silinsky, 1994). L'ACh est présente dans les vésicules

synaptiques à une concentration très élevée (100 mM). Compte tenu du diamètre d'une vésicule synaptique (~ 50 nm), cette concentration représente approximativement 10 000 molécules de NTs par vésicule (Purves, 2005). Cette quantité est amplement suffisante, même supérieure à celle requise pour induire un potentiel d'action postsynaptique, ou potentiel de plaque motrice (PPM). Ce facteur de sécurité s'élèverait entre 4,6 et 5,8 à la JNM de soleus (SOL) de souris (Wood and Slater, 2001). Ce facteur de sécurité assure donc l'efficacité, la fiabilité et la fidélité de la communication synaptique à la JNM.

La libération de NTs à la JNM fut une des premières à être bien caractérisée. On fait désormais référence à l'appellation de « quantum » la libération d'ACh contenu dans une seule vésicule synaptique. La libération d'ACh en quantité unitaire correspond donc à la libération du contenu d'une seule vésicule et est appelée libération quantique de NTs. La libération spontanée du contenu de vésicules uniques peut survenir à des taux considérablement élevés (allant de plusieurs par minute à plusieurs par seconde), et ce, en l'absence de toute stimulation de la terminaison axonale. Cette activité spontanée provoque de petites dépolarisations de la membrane de la fibre musculaire (d'une amplitude inférieure à 1 mV) et se nomme potentiel de plaque motrice miniature (PPMm) (Fatt and Katz, 1952). On observe également qu'à l'arrivée d'un potentiel d'action dans la terminaison axonale, il y a libération synchronisée de plusieurs vésicules et, donc, de plusieurs quanta de NTs. Cette libération évoquée induit la production d'une plus grande dépolarisation de la membrane postsynaptique (de l'ordre de 40 à 50 mV) qu'on appelle PPM (Fatt and Katz, 1951). Il est intéressant de mentionner que les incréments de l'amplitude de la réponse évoquée se font par échelons unitaires correspondant à la sommation, en nombre variable, de l'amplitude moyenne de PPMm isolés. Les PPMs représentent donc la libération simultanée de multiples unités de type PPMm.

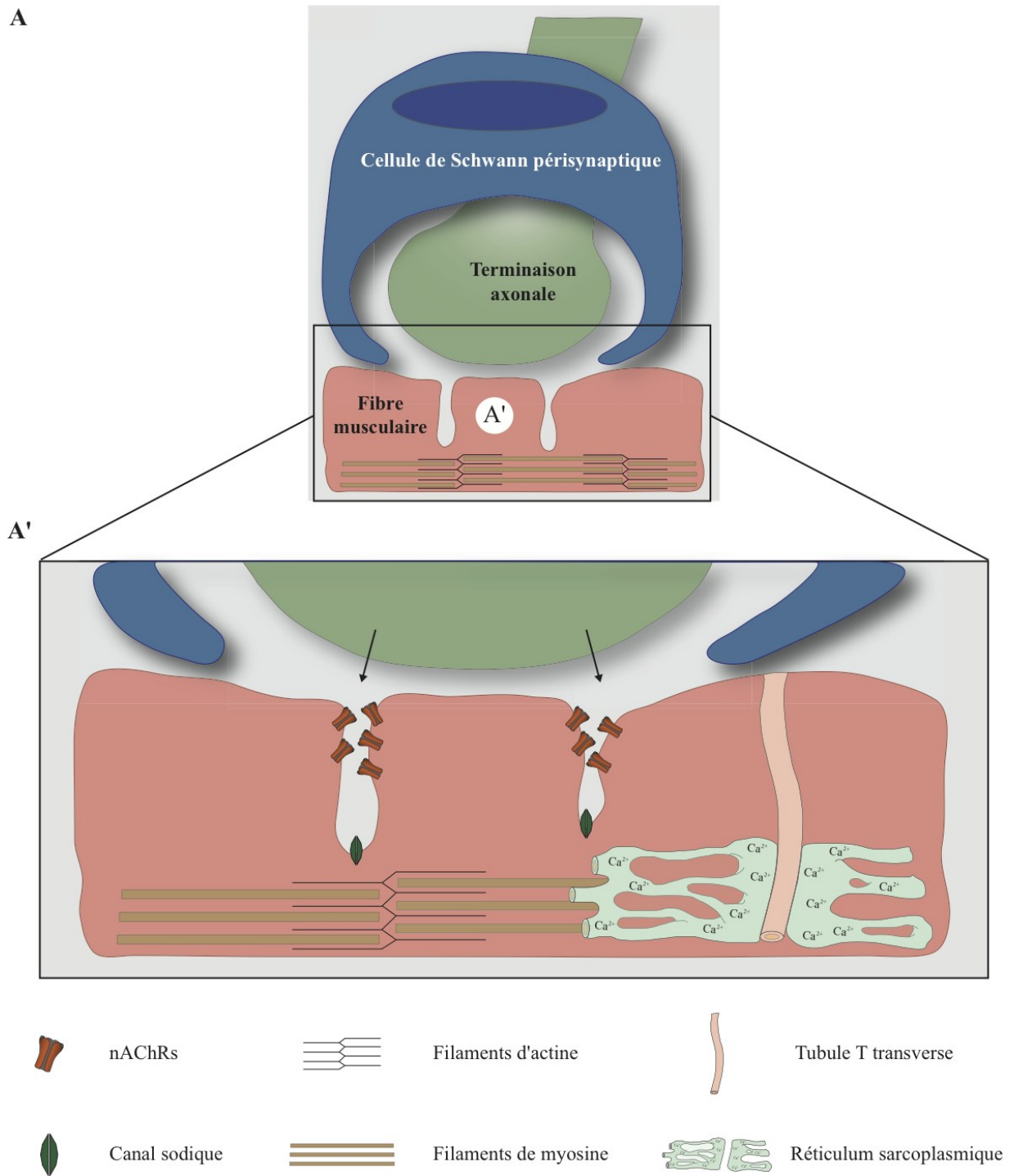
Le nombre de quanta libérés par un influx nerveux à une JNM donnée correspond au contenu quantique de cette synapse. Le contenu quantique varie d'une espèce à l'autre et s'échelonne entre 20 et plusieurs centaines de quanta (Wood and Slater, 2001). L'efficacité d'une synapse, ou sa probabilité de libération de NTs, est d'ailleurs déterminée à partir du contenu quantique. De nombreux facteurs présynaptiques peuvent déterminer l'efficacité d'une synapse, tels que la taille de la terminaison axonale, l'ultrastructure des zones actives, le

contenu en ACh des vésicules synaptiques, la densité des mitochondries et l'homéostasie du Ca^{2+} . Cependant, il ne faut pas oublier de prendre en considération les différents éléments intervenant dans la réponse induite au niveau de la composante postsynaptique.

3.2.2.2 Les récepteurs nicotiques de la fibre musculaire

Tout comme la terminaison axonale, la fibre musculaire possède une structure anatomique spécialisée à la synapse. Cette spécialisation est située dans une petite dépression de la membrane musculaire et se caractérise par la présence de nombreux replis, avec différents niveaux de profondeur, où l'on observe une grande densité de récepteurs cholinergiques nicotiques (nAChRs) (Figure 3.4). Ces récepteurs postsynaptiques sont situés sur les crêtes des replis et font directement face aux zones actives de la terminaison axonale. L'alignement très précis des zones actives et des replis garantit donc que l'ACh rencontre une forte concentration de nAChRs après avoir été libérée, facilitant ainsi la transmission synaptique à la JNM. L'activation des nAChRs laisse entrer sélectivement des cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) et déclenche une dépolarisation transitoire de la membrane et un PPM est généré. Si ce potentiel dépasse un certain seuil, il y aura ouverture des canaux Na^+ dépendants du voltage, situés au fond des replis de la fibre musculaire, et un potentiel d'action postsynaptique sera alors généré. Ce potentiel d'action se propagera dans les deux directions, sur toute la longueur et la profondeur de la fibre musculaire, à travers un réseau de tubules transverses, ou tubules T (Squire, 2003). Ces tubules sont en fait des invaginations de la membrane plasmique qui traversent la fibre de part en part. Ainsi, la propagation de l'influx nerveux dans les tubules T entraînera l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage du réticulum sarcoplasmique et la sortie de Ca^{2+} de ce dernier. Le Ca^{2+} s'accumulera dans le cytoplasme de la fibre et provoquera le rapprochement des filaments fins d'actine et des filaments épais de myosine (Squire, 2003). Le glissement de ces filaments vers le centre du sarcomère, unité contractile des cellules musculaires, engendrera le raccourcissement de ce dernier et résultera en la contraction de la fibre musculaire.

Figure 3.4 Organisation structurale de l'élément postsynaptique



A. Représentation schématique des trois éléments synaptiques de la JNM, où un agrandissement de l'élément postsynaptique est représenté en A'. A'. La fibre musculaire contient également une zone de spécialisation située tout près des sites préférentiels d'exocytose (flèches). Elle se caractérise par des invaginations de la membrane (les replis postsynaptiques) où l'on retrouve une grande densité de récepteurs postsynaptiques (nAChRs, orange) sur les crêtes de ces replis. Des canaux Na^+ voltage-dépendants (vert) sont présents au fond de ces mêmes replis et leur ouverture provoque la propagation d'un potentiel de plaque motrice à travers la fibre musculaire via un réseau de tubules T transverses (rose). Suite à la propagation de l'influx nerveux dans ces tubules, le Ca^{2+} quittera le réticulum sarcoplasmique (vert pâle) pour s'accumuler dans le cytoplasme de la fibre musculaire. Cette entrée massive de Ca^{2+} dans le cytoplasme provoquera le glissement des filaments d'actine (noir) et de myosine (olive) l'un sur l'autre, entraînant la contraction musculaire.

En résumé, une autre séquence d'événements cellulaires survient dans l'élément postsynaptique afin d'assurer et d'optimiser, ultimement, les performances motrices. Divers mécanismes sont d'ailleurs présents afin de contrôler l'action de l'ACh ou de réduire sa diffusion dans la fente synaptique, dont la présence dans la lame basale de l'acétylcholinestérase, une enzyme responsable de l'hydrolyse de l'ACh en choline et en acide acétique. Parmi les autres mécanismes de contrôle ou de modulation de la transmission synaptique, citons l'élément glial de la JNM, la cellule de Schwann pérисynaptique.

3.3 Cellules de Schwann pérисynaptiques

3.3.1 Description et rôles

Les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs), ou également cellules de Schwann terminales, sont des cellules de Schwann non myélinisantes qui originent de la crête neurale (Sugiura and Lin, 2011). Durant le développement embryonnaire, les cellules immatures migrent le long des axones moteurs pour se différencier par la suite en fonction de leur environnement synaptique, en cellules de Schwann axonales myélinisantes ou terminales non

myélinisantes (Darabid et al., 2014). Les axones moteurs seront myélinisés tout le long de leur parcours dans les nerfs périphériques, et ce, jusqu'aux fibres musculaires, où leurs terminaisons axonales sont couvertes par un petit nombre de CSPs. Ce nombre de CSPs est d'ailleurs positivement corrélé avec l'aire couverte par la terminaison axonale et la plaque motrice qu'elles recouvrent (Love and Thompson, 1998; Lubischer and Bebinger, 1999). À titre d'exemple, une moyenne de 4 à 5 CSPs se dénombre sur une JNM adulte de SOL de souris (Love and Thompson, 1998). L'empreinte territoriale des prolongements des CSPs est similaire à celle de la terminaison axonale et des récepteurs postsynaptiques (Kang et al., 2003; Love and Thompson, 1998; O'Malley et al., 1999; Zuo et al., 2004). En plus de l'apposition entre les prolongements des CSPs et la terminaison axonale du MN qui est de très courte distance (10-20 nm), les CSPs sont intimement associées à l'élément présynaptique puisqu'aucune lame basale ne se retrouve entre les deux entités (Griffin and Thompson, 2008). Contrairement à la JNM de grenouille, les prolongements des CSPs à la JNM de souris n'envahissent pas la fente synaptique mais sont plutôt situés à proximité des zones actives (Zuo and Bishop, 2008). Les CSPs sont donc dans une position anatomique idéale pour assurer plusieurs fonctions essentielles à la JNM, soit le développement, la maintenance et la réparation (en cas de blessure) de cette connexion synaptique, et même détecter et moduler la transmission synaptique.

3.3.1.1 Développement de la JNM

Une des premières étapes du développement de la JNM consiste en la navigation initiale des axones moteurs en direction de leurs muscles cibles. Ce contact est possible dans un modèle de culture sans la présence des CSPs (Chow and Poo, 1985). De plus, dans des modèles de souris mutantes où l'on ne retrouve aucune cellule de Schwann dans les nerfs périphériques (délétion génétique ou mutation des récepteurs ErbB2 et ErbB3), ce contact initial est également formé, bien que seulement transitoirement (Lin et al., 2000; Riethmacher et al., 1997). En fait, à cette étape du développement, les cellules de Schwann sont dépendantes de la relâche présynaptique de neuréguline (NRG) pour leur survie. D'ailleurs, une dénervation en bas âge provoque l'apoptose des CSPs, phénomène pouvant être renversé

par l'application exogène de NRG-1 ou par l'expression du récepteur ErbB2 constitutivement activé dans les cellules de Schwann (Hayworth et al., 2006; Trachtenberg and Thompson, 1996). Les CSPs ne semblent donc pas indispensables à l'établissement du contact axone-muscle. Or, elles jouent un rôle majeur dans toutes les autres étapes du développement normal de la JNM. Par exemple, les CSPs semblent relâcher une grande diversité de molécules susceptibles d'influencer le guidage de la terminaison axonale, la croissance et la maturation de la JNM. Notamment, citons l'agrine, les ligands WNT, des métalloprotéases ainsi que des facteurs neurotrophiques (pour une revue complète sur le développement de la JNM (voir (Darabid et al., 2014))).

Durant le développement de la JNM, on observe également un nombre surnuméraire de terminaisons axonales entrant en contact avec une fibre musculaire individuelle, phénomène nommé poly-innervation. La poly-innervation donne inévitablement lieu à une compétition synaptique entre les différents axones moteurs afin qu'un seul soit éventuellement conservé (Walsh and Lichtman, 2003). D'ailleurs, les CSPs jouent des rôles importants dans l'élimination des synapses surnuméraires. En effet, l'élimination synaptique semble s'effectuer d'abord selon l'activité phagocitaire aléatoire des CSPs et ensuite en fonction de l'activité synaptique des différentes terminaisons axonales, où celle ayant la plus grande force synaptique est la plus susceptible de « gagner » la compétition (Buffelli et al., 2003; Smith et al., 2013; Song et al., 2008). Puisque la CSP semble capable de détecter les forces synaptiques de deux terminaisons axonales distinctes, elles sont donc dans une position favorable pour sceller l'issue finale de la compétition et ne conserver que la plus forte des deux terminaisons axonales (voir l'annexe I : (Darabid et al., 2013)). De plus, des observations *in vivo* répétées combinées à une technique d'ablation, tirant avantage de la lyse des CSPs induite par le complément, ont révélé des perturbations morphologiques majeures de la JNM de grenouille en développement ainsi qu'une perte des JNMs à long terme suite à l'ablation des CSPs (Reddy et al., 2003). Par conséquent, les CSPs jouent un rôle essentiel pour le développement et le maintien subséquent de la JNM.

3.3.1.2 Maintien fonctionnel et morphologique de la JNM

Le maintien tant fonctionnel que morphologique de la JNM est assuré, en grande partie, par la CSP. Peu de temps après l'ablation *in vivo* des CSP à la JNM adulte de grenouille (5 jours), aucune modification anatomique ainsi qu'aucun changement synaptique significatif n'ont été observés (Reddy et al., 2003). Toutefois, une diminution d'environ 50% de la transmission synaptique a été enregistrée une semaine suivant l'ablation des CSPs. Cette réduction a particulièrement affecté les paramètres électrophysiologiques associés à la terminaison axonale, tels que l'amplitude des PPMs, le contenu quantique ainsi que la fréquence des événements miniatures (mPPMs). De plus, la morphologie de la JNM a grandement été affectée puisqu'une rétraction partielle et même parfois totale de la terminaison axonale a été observée sur les JNMs complètement dépourvues de CSPs (Reddy et al., 2003). Il faut noter que la rétraction de l'élément présynaptique ne semblait pas résulter de la dégénérescence du nerf, car aucune dégénérescence wallérienne n'a été rapportée (Reddy et al., 2003). L'implication des CSPs dans le maintien à plus long terme demeure toujours matière à investigation.

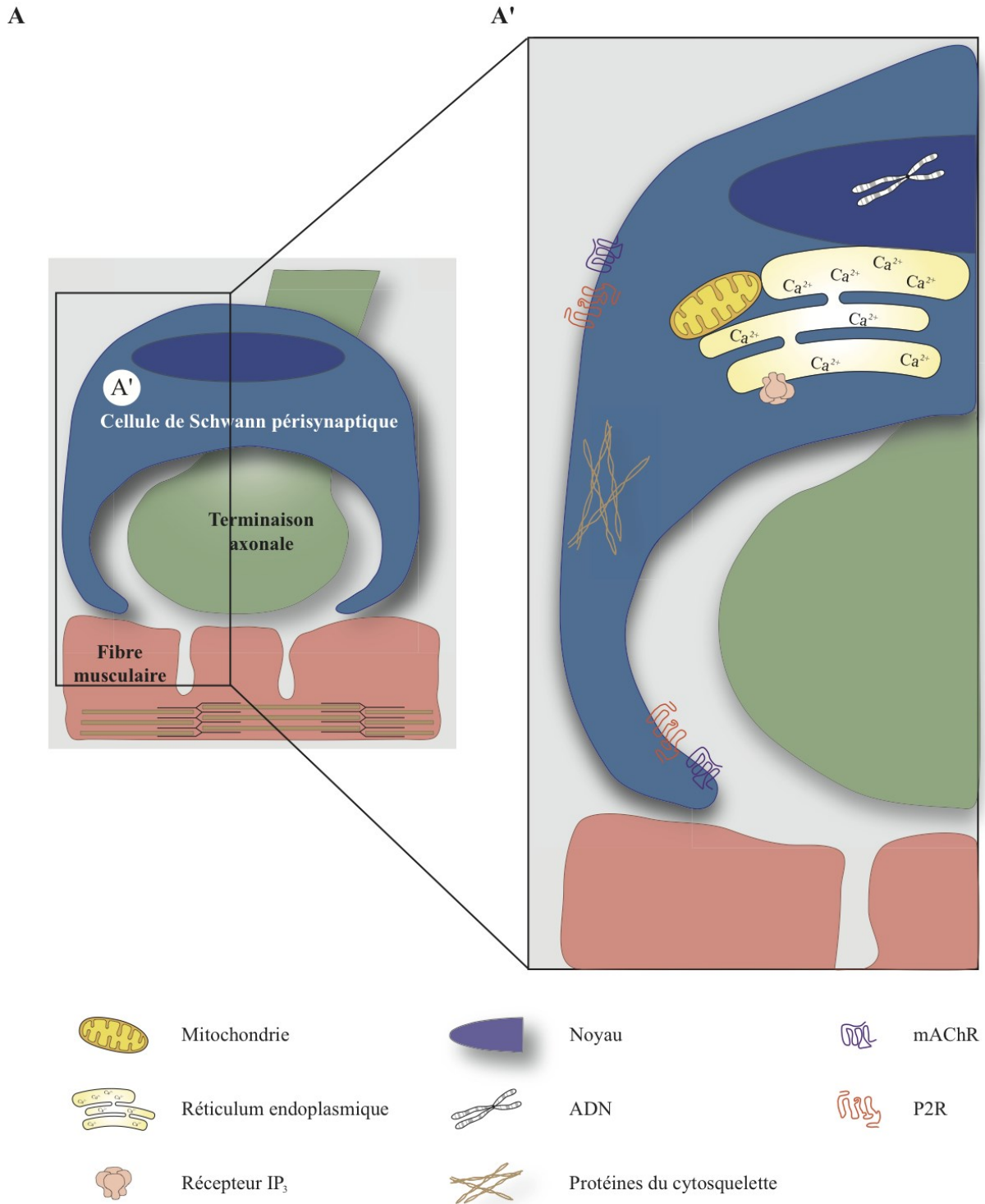
3.3.1.2 Détection de la transmission synaptique

L'excitabilité des cellules gliales n'est pas comparable à celle observée chez les neurones, car elle dépend plutôt d'élévation de Ca^{2+} intracellulaire (Castonguay and Robitaille, 2001). En effet, durant la stimulation répétée du nerf moteur, aucun changement significatif de potentiel de membrane n'a été enregistré dans les CSPs présentes à la JNM de grenouille (Robitaille, 1998), alors qu'une stimulation à haute fréquence du nerf moteur provoque une élévation transitoire de Ca^{2+} à l'intérieur des CSPs (Jahromi et al., 1992; Reist and Smith, 1992). Cette élévation de Ca^{2+} est induite par la relâche de NTs, et non de façon secondaire à l'accumulation de potassium extracellulaire, puisque celle-ci a été presque complètement abolie par l'utilisation de diverses ω -conotoxines, toxines bloquant les canaux calciques présynaptiques (de types P/Q et N) impliqués dans l'exocytose des vésicules synaptiques (Jahromi et al., 1992; Rochon et al., 2001). De plus, il est peu probable que cette élévation calcique soit dépendante de l'activation de la fibre musculaire, car elle ne semble pas être

affectée par l'utilisation d'antagonistes aux récepteurs postsynaptiques nicotiniques (Reist and Smith, 1992; Rochon et al., 2001). Également, l'application locale de différents NTs, tels que l'ACh, l'ATP et l'adénosine, provoque une élévation de Ca^{2+} intracellulaire similaire à celle induite lors de la stimulation du nerf moteur (Jahromi et al., 1992; Rochon et al., 2001). Mis ensemble, ces résultats suggèrent que les CSPs sont sensibles à la relâche de NTs à la JNM.

La détection de la transmission synaptique par les CSPs se caractérise par trois grands aspects. Premièrement, les CSPs possèdent les récepteurs adéquats pour accomplir cette tâche. En effet, à la JNM de souris, elles possèdent des récepteurs muscariniques (mAChRs : M1, M3 et M5) (Wright et al., 2009) et purinergiques (P2Rs), dont des récepteurs pour l'adénosine (A1) (Rochon et al., 2001) (Figure 3.5). D'ailleurs, l'usage additif de divers antagonistes, ciblant ces deux types de récepteurs, affecte grandement la capacité des CSPs à produire une réponse calcique (Rochon et al., 2001). La majorité de ces récepteurs sont couplés à des protéines G, qui transmettent le signal (cascade de second messenger) par la relâche de Ca^{2+} intracellulaire via l'activation du récepteur IP_3 du RE (Castonguay and Robitaille, 2001; Robitaille, 1998). Ce sont ces deux mêmes grandes familles de récepteurs ci-haut mentionnées qui sont activées par la transmission synaptique tout au long des étapes de la vie de la JNM de grenouille et de mammifère (Castonguay and Robitaille, 2001; Colomar and Robitaille, 2004; Darabid et al., 2013; Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997; Rochon et al., 2001). Bien que leur contribution s'adapte selon l'état de la JNM (sujet détaillé dans la section 3.3.1.5), le recrutement de ces récepteurs se veut être un mécanisme conservé à la fois à travers les espèces de vertébrés et également au sein d'un même individu tout au long de son existence.

Figure 3.5 Organisation structurale de l'élément glial périssynaptique



A. Représentation schématique des trois éléments synaptiques de la JNM, où un agrandissement de l'élément glial pérисynaptique (la CSP) est représenté en A'. A'. La CSP possède des récepteurs pouvant être activés par les neurotransmetteurs libérés par la terminaison axonale; l'ACh et l'ATP activent respectivement les mAChRs (mauve) et les P2Rs (orange). Ces récepteurs sont couplés à des protéines G et leur activation provoque la relâche de Ca^{2+} via l'activation du récepteur IP_3 du RE. Selon le niveau d'activation des mAChRs, il y a transcription de différents gènes (ADN en forme de Y), se trouvant dans le noyau (violet) pouvant influencer des protéines du cytosquelette (filaments entremêlés de couleur beige). On note également la présence de mitochondries (jaune) dans les CSPs.

Deuxièmement, les différentes propriétés synaptiques semblent être décodées par les CSPs. Lorsqu'une CSP est associée avec deux terminaisons axonales lors du développement de la JNM, celle-ci est capable de détecter la force synaptique de chacune d'entre elles. Plus spécifiquement, la stimulation de la terminaison axonale avec le plus petit contenu quantique évoquera systématiquement une amplitude calcique plus petite que la stimulation de celle ayant un plus grand contenu quantique (Darabid et al., 2013). Dans un même ordre d'idées, l'amplitude maximale des réponses calciques des CSPs ainsi que le nombre de cellules gliales répondant à la stimulation du nerf moteur se distinguent d'un muscle à l'autre. Par exemple, aux JNMs de SOL, muscle innervé par des UMs de type S et FR et déchargeant à de basses fréquences et de façon tonique, un plus petit nombre de CSPs détectent la communication synaptique. De plus, les CSPs répondant à la stimulation génèrent des réponses calciques de plus petite amplitude comparativement à un muscle de l'oreille, le Levator auris longus (LAL) (Rousse et al., 2010), majoritairement innervé par des UMs de type FF et déchargeant à des fréquences plus élevées et de manière phasique (Hennig and Lomo, 1985; Rousse et al., 2010). Ainsi, il semble que les propriétés de détection semblent corrélées avec les propriétés synaptiques de la JNM puisque le contenu quantique du SOL est beaucoup plus petit que celui du LAL (Reid et al., 1999).

Il est cependant important de mentionner que l'excitabilité gliale n'est pas uniquement et passivement tributaire des propriétés synaptiques; elle répond également à des propriétés gliales intrinsèques. Afin d'illustrer ce propos, notons que l'augmentation à court terme de la

force synaptique des JNMs du SOL, par l'emploi aigu de TEA, un bloqueur des canaux potassiques neuronaux, n'est pas suffisante pour modifier les caractéristiques des amplitudes calciques gliales (Darabid et al., 2013; Rousse et al., 2010). Pour finir, les caractéristiques (cinétique et amplitude) du signal calcique généré par la CSP ne seront pas les mêmes selon le patron d'activité moteur. À titre d'exemple, une stimulation en continu évoque une réponse monophasique avec un seul pic calcique alors qu'un train de stimulations provoque une série d'oscillations calciques irrégulières (Todd et al., 2010). Par conséquent, les propriétés des CSPs semblent être en phase avec les caractéristiques de la JNM avec laquelle elles sont associées.

Troisièmement, pour être totalement en phase avec leur synapse, les propriétés des CSPs doivent également pouvoir s'adapter au gré des changements de l'activité synaptique. En effet, suite à des altérations à long terme *in vivo* de la transmission synaptique à la JNM de grenouille, la sensibilité des mAChRs et P2Rs des CSPs ainsi que les cinétiques des réponses calciques ont été modifiées (Belair et al., 2010). De manière cohérente avec ces derniers résultats, l'activation répétée à court terme de ces mêmes récepteurs gliaux entraîne une diminution marquée de la réponse calcique générée (Georgiou et al., 1999; Jahromi et al., 1992; Rochon et al., 2001). Il est à noter qu'une régulation autocrine de certains récepteurs est également possible suite à un changement d'innervation (Carroll et al., 1997; Hayworth et al., 2006). Ainsi, comme pour les neurones, l'excitabilité ainsi que la sensibilité des récepteurs des CSPs peuvent être dynamiquement modulées soit par la transmission synaptique ou l'état d'innervation de la JNM.

3.3.1.3 Modulation de la transmission synaptique

Le fait que la CSP soit capable de détecter et de décoder l'activité synaptique la place dans une position favorable pour jouer un rôle majeur dans la modulation de la communication synaptique à la JNM. Une étude fondamentale, publiée en 1998, a utilisé une technique d'injection par iontophorèse très innovatrice afin de spécifiquement introduire des molécules pharmacologiques dans le but de moduler l'activité des protéines G d'une seule CSP à la JNM de grenouille (Robitaille, 1998). L'injection de GTP- γ S dans le corps cellulaire d'une CSP, un

analogue non hydrolysable du GTP maintenant les protéines G dans un état actif, a induit une diminution de l'amplitude des PPMs (Robitaille, 1998). Ceci suggère que les CSPs ont la capacité de réduire la transmission synaptique. L'emploi de GTP- γ S n'a toutefois pas modifié l'amplitude des mPPMs. Cette observation pointerait donc vers une modulation gliale présynaptique de la relâche de NTs. Mais est-ce que les CSPs ont la capacité de réguler l'activité synaptique endogène? L'injection de GDP- β S, analogue non hydrolysable du GDP maintenant les protéines G dans un état inactif, a prévenu l'expression d'une grande proportion d'une dépression synaptique normalement induite lors de la même stimulation du nerf moteur en condition normale (Robitaille, 1998). L'ensemble de ces résultats suggère que la CSP, via l'activation des protéines G, est impliquée dans la plasticité synaptique à court terme à la JNM.

Une autre étude ayant utilisé cette fois-ci une approche priorisant la modulation du Ca^{2+} glial, est également parvenue à la conclusion que les CSPs sont impliquées dans la modulation synaptique. En effet, une injection d' IP_3 , afin d'induire une élévation de Ca^{2+} intracellulaire, et d'un chélateur de Ca^{2+} (BAPTA), ont respectivement provoqué une augmentation de la relâche de NTs et une augmentation de la dépression synaptique (Castonguay and Robitaille, 2001). Les CSPs peuvent donc moduler, au besoin, à la hausse ou à la baisse la transmission synaptique. Il est également important de mentionner que les réponses calciques des CSPs, et l'activité des mAChRs et P2Rs qu'elles sous-tendent, peuvent être modulées par différents facteurs neurotrophiques, tels que le BDNF, NT3 et la substance P (Bourque and Robitaille, 1998; Todd et al., 2007). Ces résultats fournissent donc une démonstration directe des interactions neurone-glie bidirectionnelles et dynamiques qui se produisent à la JNM et soulignent, en outre, que les CSPs sont des partenaires synaptiques actifs à cette synapse tripartite.

L'environnement synaptique dans lequel évoluent ces interactions neurone-glie est primordial. Il est donc essentiel que la CSP puisse non seulement décoder le contexte synaptique mais également ajuster sa modulation en fonction de ce dernier. Lorsque deux patrons de stimulation différents sont appliqués sur le nerf moteur (en continu ou en train), la CSP est capable de les décoder en générant deux élévations calciques complètement distinctes (un pic unique ou des oscillations irrégulières) (Todd et al., 2010). D'ailleurs, ces deux patrons

de stimulation ont induit deux formes complètement opposées de plasticité synaptique; la stimulation en continu a induit une potentiation alors que la stimulation en train a plutôt généré une dépression synaptique. La modulation du Ca^{2+} glial, via l'usage de molécules encagées ou de BAPTA, a démontré que ces différentes formes de Ca^{2+} étaient suffisantes et nécessaires à la production de ces différentes formes de plasticité synaptique (Todd et al., 2010). En résumé, les CSPs semblent décoder les fluctuations de la communication synaptique à la JNM et libérer des glioTs conséquents dans le but de produire une réponse adaptée au contexte synaptique.

Dans la plupart des exemples cités précédemment, le Ca^{2+} glial semble être au cœur des phénomènes entourant la régulation des fonctions des CSPs. En effet, en plus d'être un excellent outil rapporteur de leur excitabilité et de l'activité des récepteurs des CSPs, il est également d'une importance capitale pour le décodage et la modulation subséquente de la transmission synaptique (Araque et al., 2014; Castonguay and Robitaille, 2001; Darabid et al., 2013; Rousse et al., 2010; Todd et al., 2010). Cependant, un monde à part entière semble dicter les règles entourant la régulation de ce dernier, où sa cinétique, son évolution dans le temps, son amplitude, sa compartimentation, sa dispersion ainsi que sa propagation dans le temps et l'espace semblent tous être des caractéristiques absolument indissociables de la conséquence produite sur la transmission synaptique (Araque et al., 2014).

Un dernier élément à rajouter concernant les mécanismes de modulation de la transmission synaptique est le fait que d'autres molécules, comme le glutamate (Pinard et al., 2003), l'oxyde nitrique (Descarries et al., 1998; Thomas and Robitaille, 2001) et les prostaglandines (Lindgren et al., 2013), ont également été identifiées comme étant des glioTs à la JNM de grenouille ou de lézard. Ces données s'additionnent aux résultats précédents et témoignent du fait que les CSPs à la JNM sont des cellules gliales faisant preuve d'une grande capacité d'adaptation en fonction de l'environnement et du contexte synaptiques.

3.3.1.4 Réparation de la JNM

Lorsqu'une JNM est détruite, soit par une blessure ou soit par vieillissement normal ou pathologique, des changements majeurs s'opèrent dans les CSPs. En réponse à une

dénervation ou à une interruption de la transmission synaptique, elles vont changer drastiquement leur expression génique en surexprimant des molécules telles que la GFAP (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994) et la nestine (Kang et al., 2007), deux protéines structurales impliquées dans la modification du cytosquelette de la cellule; GAP-43 (de l'anglais, *growth-associated protein-43*) (Hassan et al., 1994; Woolf et al., 1992) et p75 (de l'anglais, *low-affinity nerve growth factor receptors p75*) (Hassan et al., 1994), deux molécules associées à des processus de plasticité; CD44 (Gorlewicz et al., 2009), une molécule impliquée dans la stabilisation de la synapse; MAC-2 (Reichert et al., 1994), un marqueur de macrophage et un facteur de transcription à doigt de zinc (de l'anglais, *transcription factor zinc-finger proliferation-1*) (Ellerton et al., 2008), ayant un rôle potentiel dans le changement de phénotype glial. Ces changements d'expression génique renforcent la notion que les CSPs sont, d'une part, très sensibles et, d'autre part, réactives au changement de l'état d'innervation de la JNM.

Ces changements d'expression génique sous-tendent également des changements de fonctions afin de favoriser la réparation de la JNM. Parmi les changements de fonctions observés dans les CSPs, notons l'acquisition de propriétés de phagocytose. En effet, à la JNM adulte de souris, suite à une dégénérescence de la terminaison axonale due à l'emploi de neurotoxines ou à un écrasement du nerf, les CSPs acquièrent des activités similaires à celles des macrophages qui contribuent à l'élimination des débris de cellules nerveuses et facilitent la réinnervation (Duregotti et al., 2015; Kang and Lichtman, 2013). D'ailleurs, tel que discuté dans la section 3.3.1.1, ces propriétés de phagocytose sont une des caractéristiques des CSPs immatures durant le développement (Smith et al., 2013; Song et al., 2008). La facilitation de cette étape est un évènement majeur contribuant grandement à l'efficacité de la réinnervation (Kang and Lichtman, 2013).

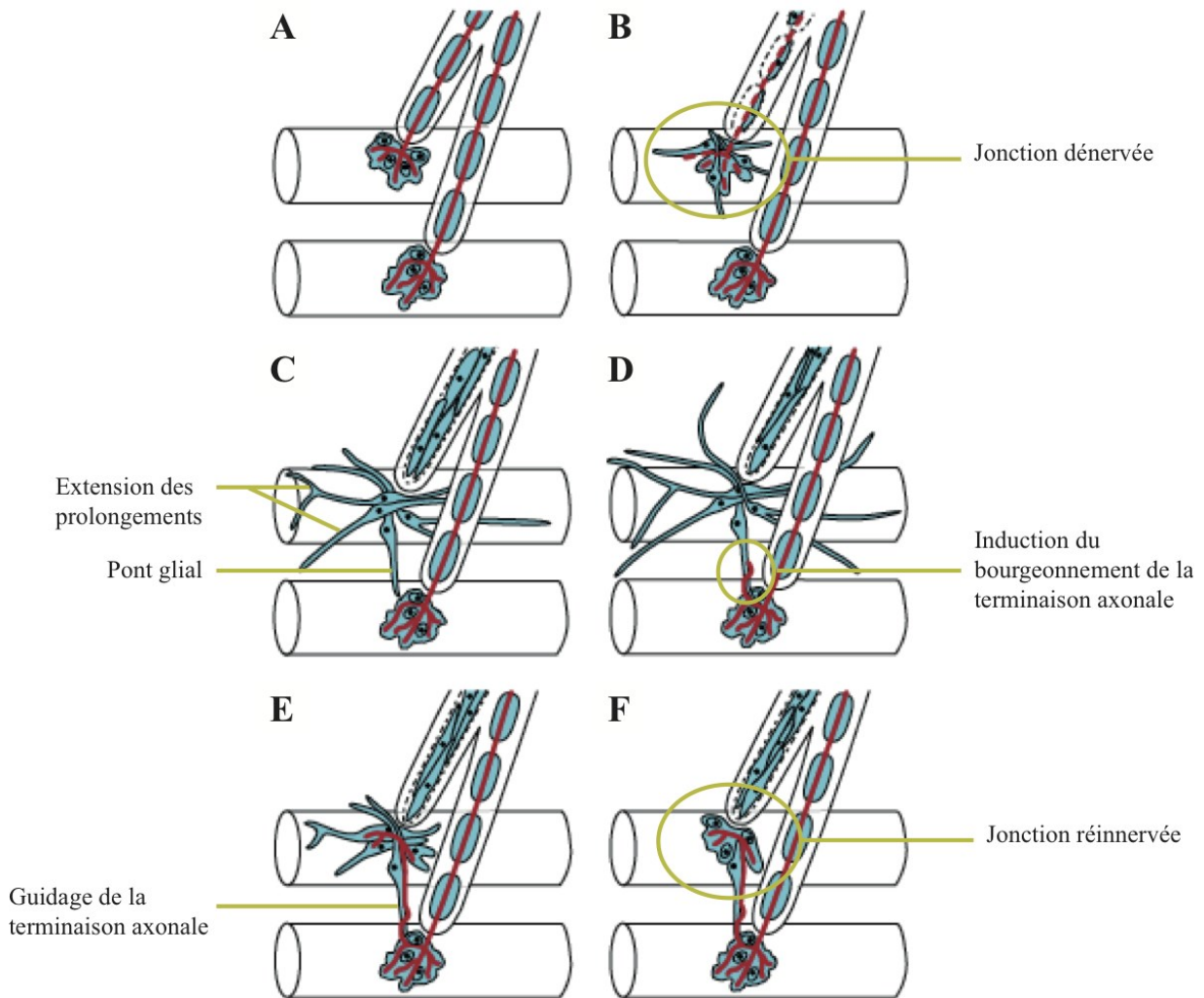
La relation particulière qu'entretient la CSP avec l'élément présynaptique a un impact majeur sur les processus de réparation et de réinnervation de la JNM. Cette relation dynamique passe notamment par des changements morphologiques substantiels des CSPs après une dénervation partielle ou totale (Kang et al., 2003; O'Malley et al., 1999; Zuo et al., 2004). Dans le cas d'une dénervation partielle, les CSPs ont la capacité d'étendre leurs fins prolongements au delà de la JNM dénervée, à laquelle elles sont associées, afin d'établir des

contacts avec d'autres CSPs de JNMs innervées (Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995a, b). Ce contact, aussi appelé pont glial, initiera l'induction d'un bourgeonnement de la terminaison axonale (de l'anglais, *sprouting*). Par la suite, les CSPs dirigeront et guideront cette terminaison en direction de la JNM dénervée (Son and Thompson, 1995a, b). En d'autres mots, ces ponts gliaux sont de véritables routes pour une terminaison axonale servant à promouvoir la réinnervation et la réparation d'une JNM dénervée (Figure 3.6). La réinnervation de la JNM dépend donc essentiellement des CSPs, car leur absence entraîne de sévères altérations dans les processus de bourgeonnement des terminaisons axonales et le rétablissement de la fonction musculaire après une dénervation (Lubischer and Thompson, 1999; Trachtenberg and Thompson, 1996).

Le comportement des CSPs durant les processus de réparation de la JNM peut également influencer l'élément postsynaptique. En effet, durant le processus de réinnervation, le recouvrement de la plaque motrice dénervée par les prolongements des CSPs influencera non seulement le patron d'innervation de la terminaison axonale qui arrivera mais, également, les récepteurs postsynaptiques qui seront soit conservés, soit éliminés ou ajoutés (Kang et al., 2014). L'abandon d'une certaine portion de la plaque motrice dépend notamment de la durée du processus de réinnervation (Kang et al., 2014). Les résultats de cette dernière étude soulèvent néanmoins de nombreuses questions concernant les raisons pouvant expliquer l'abandon des sites synaptiques initiaux occupés par les CSPs (Zainul, 2014) ainsi que les mécanismes qui pourraient conduire à un ralentissement de la réinnervation.

En résumé, l'ensemble de ces résultats suggère que la réparation de la JNM est grandement tributaire du comportement des CSPs. Il est important de mentionner que les processus en lien avec la réparation de la JNM semblent soit insuffisants ou altérés dans la SLA (Gordon et al., 2004; Gurney, 1984; Hegedus et al., 2007; Tallon et al., 2015). Il serait donc raisonnable de penser que les propriétés fonctionnelles gliales, telles que leur capacité de détection et l'activation de leurs récepteurs, soient également altérées et pourraient contribuer à ce manque de plasticité.

Figure 3.6 Réparation de la JNM



A. Deux axones myélinisés (rouge) innervent deux fibres musculaires différentes. Les CSPs (bleu, sur la plaque motrice) recouvrent chacune des JNMs. **B.** Les CSPs associées à la JNM dénervée (celle du haut) vont étendre leurs prolongements afin de trouver et contacter des CSPs associées à une JNM innervée (**C**, celle du bas). Ce contact de prolongement glial, entre une JNM dénervée et innervée, est appelé pont glial. **D.** Ce contact induira le bourgeonnement de la terminaison axonale de la JNM innervée. **E.** Les prolongements gliaux permettent de guider la terminaison axonale jusqu'à la JNM dénervée afin de favoriser sa réinnervation (**F**).

La figure 3.6 a été modifiée de (Son et al., 1996).

3.3.1.5 Activation différentielle des récepteurs des CSPs selon l'état d'innervation

L'activation des récepteurs des CSPs peut être évaluée en regardant soit la contribution ou la sensibilité de ces derniers. La contribution des récepteurs représente la proportion des récepteurs des deux familles recrutée durant la communication synaptique endogène et contribuant à la réponse calcique des CSPs. Seuls les récepteurs synaptiques sont donc sollicités durant ce processus. Pour ce qui est de la sensibilité des récepteurs, elle correspond au recrutement des récepteurs synaptiques et extra-synaptiques suite à une activation exogène des récepteurs, lors d'une application locale d'agoniste par exemple. Contrairement à la contribution des récepteurs, qui ne peut être évaluée que sur des JNMs innervées, la sensibilité des récepteurs, elle, peut être évaluée sur des synapses autant innervées que dénervées.

Ces deux mesures d'activation des récepteurs nous fournissent des indices fonctionnels concernant l'état de la JNM et de la CSP. En effet, selon l'état d'innervation de la JNM de souris, la contribution/sensibilité des deux familles de récepteurs gliaux varie. Par exemple, lors de la communication synaptique au cours du développement, seuls les P2Rs sont activés à la JNM de souriceaux (Darabid et al., 2013). Lors de la maturation de la JNM, la dominance de l'activation des P2Rs lors de la communication synaptique laisse progressivement place à celle des mAChRs (Darabid et al., 2013; Perez-Gonzalez, 2016). À la JNM de souris adulte, c'est l'activation des mAChRs qui contribue majoritairement aux réponses calciques des CSPs (Robitaille, 1995; Robitaille et al., 1997; Rochon et al., 2001). À la JNM de souris adulte ayant subi soit une lésion (dénervation totale) ou un écrasement du nerf sciatique (dénervation partielle), le phénomène inverse se produit; la sensibilité des mAChRs diminue alors que celle des P2Rs augmente (Perez-Gonzalez, 2016). Suite à une blessure, le retour de l'innervation favorisera le retour à la hausse de la contribution et de la sensibilité des mAChRs. Ces mêmes observations ont d'ailleurs été effectuées lors du vieillissement normal où un retour vers un phénotype glial plus immature a été observé (réduction de la contribution et de la sensibilité des mAChRs) (Krief, 2016). Ces deux grandes familles de récepteurs semblent donc agir en synergie; c'est-à-dire que lorsque la contribution ou la sensibilité d'une composante est augmentée, l'autre est diminuée (Tableau 3.2). Par conséquent, la balance entre les mAChRs et P2Rs semble être primordiale pour l'ajustement du phénotype des CSPs en réponse aux différents états d'innervation et face aux besoins de la JNM.

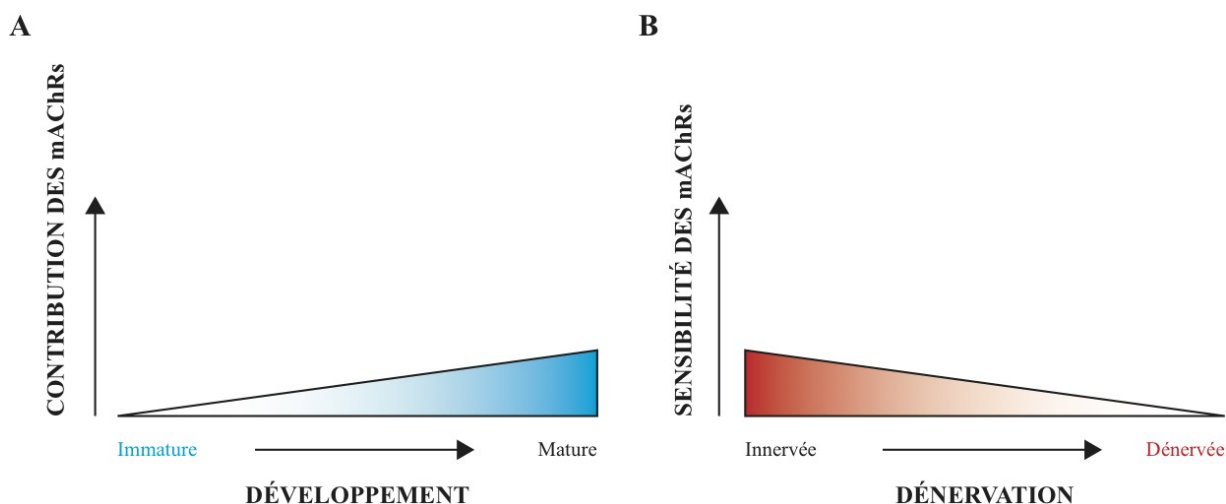
Tableau 3.2 Contribution et sensibilité des mAChRs et des P2Rs en fonction de l'âge et de l'état d'innervation

Âge et état d'innervation	mAChRs	P2Rs
Développement – poly-innervation ¹	↓	↑
Maturité – innervée ²	↑	↓
Maturité – dénervée ³	↓	↑
Âgée – innervée ⁴	↓	↑
SLA – innervée	?	?
SLA – dénervée	?	?

¹ : (Darabid et al., 2013), ² : (Perez-Gonzalez, 2016; Rochon et al., 2001), ³ : (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994; Perez-Gonzalez, 2016; Robitaille et al., 1997), ⁴ : (Krief, 2016)

Une autre observation peut être tirée des résultats ci-haut mentionnés : lorsque la JNM fait face à des changements morphologiques ou lorsqu'une certaine plasticité morphologique est requise, le phénotype glial approprié semble être celui correspondant à une faible contribution/sensibilité des mAChRs (Figure 3.7). Suivant cette logique, les CSPs qui feront face à de la dénervation dans un contexte de SLA se doivent de faire preuve de plasticité phénotypique et d'adaptabilité en procédant justement à ces changements de sensibilité/contribution de récepteurs afin d'assurer le destin de la JNM et, plus particulièrement, une réduction de l'activation des récepteurs mAChRs.

Figure 3.7 Contribution et sensibilité des mAChRs en fonction du statut d'innervation.



A. Évolution de la contribution des mAChRs au cours du développement de la JNM. Lorsque la JNM est immature, la contribution des mAChRs lors de la communication synaptique est nulle alors qu'elle augmente graduellement avec la maturation de la JNM. Ainsi, le changement de statut d'innervation, soit le passage de l'état poly-innervé à mono-innervé, entraîne des changements importants dans la contribution des mAChRs de la CSP. **B.** Évolution de la sensibilité des mAChRs au cours du processus de dénervation de la JNM. Lorsque la JNM passe de l'état d'innervée à dénervée, la sensibilité des mAChRs des CSPs diminue de manière importante.

La figure 3.7 a été inspirée de (Perez-Gonzalez, 2016).

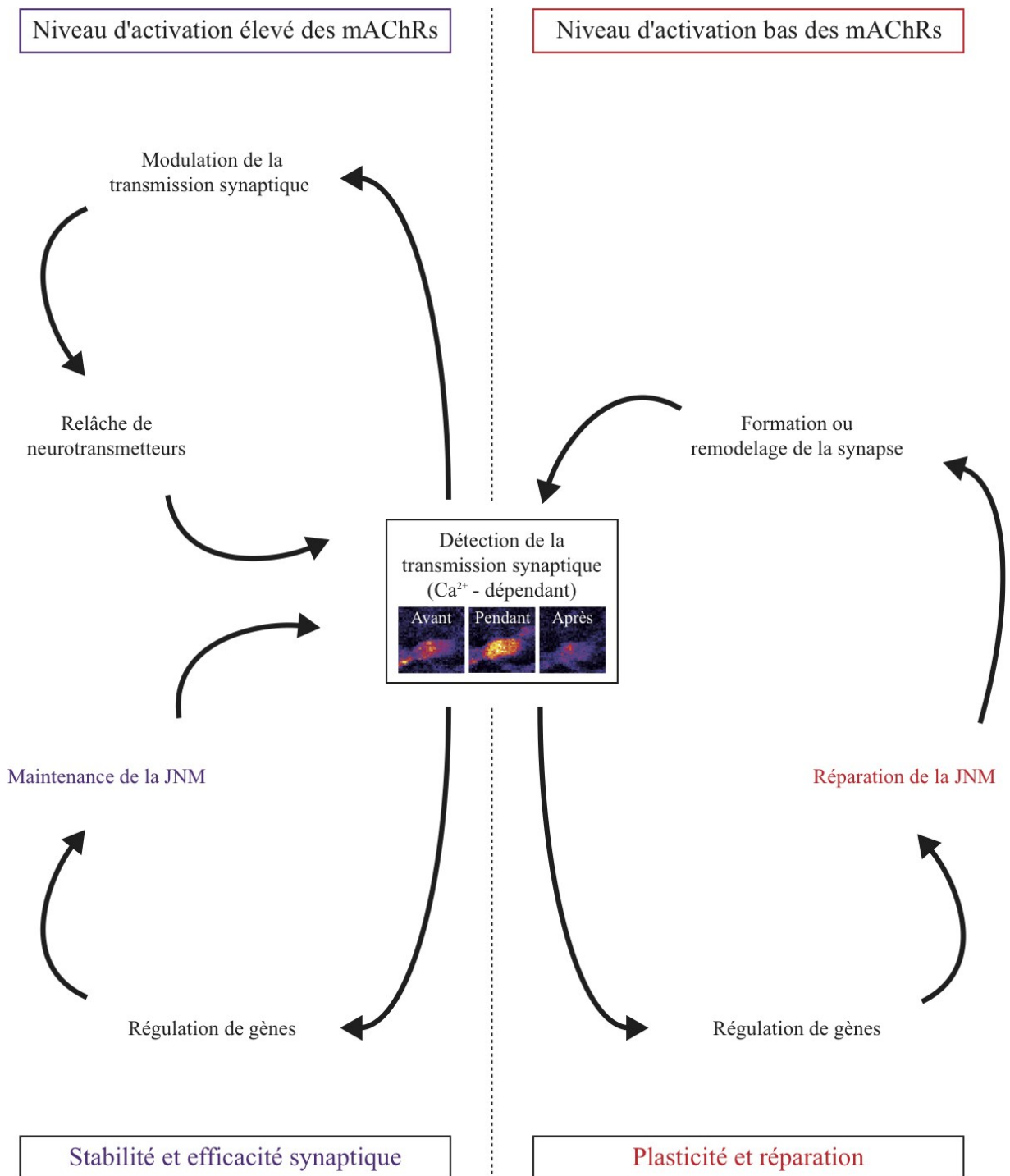
3.3.1.6 Les mAChRs, une plaque tournante pour les fonctions des CSPs

À la JNM mature, les deux grandes fonctions assumées par les CSPs, c'est-à-dire d'être responsable de la maintenance/efficacité synaptique ou de la réparation/plasticité morphologique, peuvent paraître comme étant deux fonctions indépendantes mais sont, en réalité, interreliées. Plus précisément, ces deux fonctions semblent totalement dépendantes de l'activation des mAChRs. En effet, à la JNM adulte de mammifère, ce sont les mAChRs qui

sont majoritairement activés lors de la communication synaptique (Rochon et al., 2001). Dans un même ordre d'idées, suite à une interruption de la communication synaptique, une activation des mAChRs peut prévenir la régulation de l'expression de la GFAP dans les CSPs (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994). D'une manière similaire, l'utilisation de molécules bloquant soit la transcription ou la traduction ont également suffi à prévenir ce changement d'expression génique (Georgiou et al., 1994). Inversement, l'activation des P2Rs ou la simple génération d'une élévation calcique ne sont pas suffisantes pour prévenir l'augmentation de l'expression de la GFAP (Georgiou et al., 1999). Puisque ce sont les mAChRs qui sont responsables de la détection de la transmission synaptique et de l'expression de gènes impliqués dans leur réponse aux blessures, le niveau d'activation de ces dits récepteurs semble donc l'élément critique qui gouverne le mode dans lequel seront les CSPs.

La CSP se caractérise par deux modes fonctionnels distincts, soit un mode de maintenance ou de réparation, correspondant respectivement à une JNM innervée et dénervée. En effet, une activation soutenue des mAChRs, via la relâche d'ACh par la terminaison axonale, ferait la promotion d'un phénotype glial priorisant la stabilité de la JNM et l'efficacité synaptique de cette dernière. Alors qu'une diminution de la relâche d'ACh, subséquente à une dénervation, causerait une diminution de l'activation des mAChRs, entraînant des changements d'expression génique et morphologiques dans la CSP et favorisant la réparation de la JNM (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994; Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995a, b). Suivant cette logique, une étude, relatant l'application de divers antagonistes des mAChRs sur un muscle de l'oreille de souris, a démontré que les CSPs arboraient des comportements similaires à ceux observés dans des cas de dénervation partielle (Wright et al., 2009). Donc, tel qu'initialement proposé par Ko et Robitaille (2015), la capacité de détection, et plus particulièrement le niveau d'activation des mAChRs des CSPs, semble jouer un rôle clé pour le destin de la JNM (maintenance vs réparation) (Figure 3.8) (Ko and Robitaille, 2015). Par conséquent, une augmentation de l'activation des mAChRs dans un contexte de SLA pourrait empêcher la CSP de détecter l'état de dénervation, d'entrer dans un mode fonctionnel favorisant la plasticité morphologique et limiter la réparation de la JNM.

Figure 3.8 Modèle du niveau d'activation des mAChRs des CSPs et du destin de la JNM



Les CSPs détectent la transmission synaptique à la JNM d'une façon dépendante du Ca^{2+} (encadré au centre témoignant de l'élévation calcique transitoire dans les CSPs induite par la libération endogène de NTs suite à une stimulation répétée du nerf moteur; avant, pendant et après). Tout dépendant du niveau d'activation des mAChRs, la CSP entrera dans un mode de maintenance (boucles de gauche) ou de réparation de la JNM (boucles de droite). Lorsque les mAChRs sont suffisamment activés (gauche), la génération d'évènements dépendants du Ca^{2+} entraînera la modulation de la transmission synaptique via la modification de la relâche de NTs. Parallèlement, cette même activation des mAChRs entraînera également la régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans la maintenance et la stabilité de la JNM. Cette séquence d'activation va donc promouvoir la stabilité et l'efficacité synaptique de la JNM. Cependant, suivant un dérèglement de la transmission synaptique ou une blessure (ex. dénervation), il y aura une diminution du niveau d'activation des mAChRs (droite). Ce niveau d'activation bas engendrera des changements substantiels d'expression génique au sein de la CSP qui mèneront à la réparation de la JNM. Également, des modifications morphologiques (ex. extension des prolongements) et fonctionnelles (ex. phagocytose de débris) s'opèreront au sein de la CSP en mode de réparation. En résumé, la capacité de détection, et plus particulièrement le niveau d'activation des mAChRs, semble être non seulement le lien unissant les différentes fonctions assumées par la CSP mais également une étape déterminante pour le destin de la JNM (maintenance vs réparation).

La figure 3.8 a été inspirée de (Ko and Robitaille, 2015).

4. Hypothèse et buts de la thèse

La SLA est une maladie principalement caractérisée par la dégénérescence des MNs et de leur effecteur (de l'anglais, *output*), la JNM. La destruction de la JNM est un événement pathogénique précoce (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Gould et al., 2006; Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008; Pun et al., 2006) et excessivement limitant pour la qualité de vie des patients. C'est également une maladie où la contribution des cellules gliales joue un grand rôle dans son développement et sa progression (Boillee et al., 2006; Clement et al., 2003; Kang et al., 2013; Yamanaka et al., 2008b). Pourtant, les cellules gliales à la JNM, les CSPs, n'ont reçu aucune attention particulière de la communauté scientifique du domaine, et ce, malgré le fait qu'elles assurent une multitude de fonctions essentielles au bon fonctionnement et à la réparation de la JNM (Ko and Robitaille, 2015). D'ailleurs, l'activation des mAChRs des CSPs est un événement clé de la détection de l'état d'innervation de cette synapse tripartite. Plus précisément, cette activation muscarinique consiste en la première étape qui détermine le mode fonctionnel de la CSP et le destin de la JNM vers un phénotype de maintenance/efficacité synaptique ou de réparation/plasticité morphologique. Puisque les mécanismes de compensation et de réparation ainsi que les phénomènes de plasticité morphologique sont limités dans la SLA (Gordon et al., 2004), nous proposons l'hypothèse générale suivante :

L'activation des mAChRs des CSPs est augmentée dans la SLA; ce qui empêche la CSP de convenablement détecter l'état d'innervation de la JNM et de procéder à sa réparation.

L'activation à la hausse des mAChRs des CSPs dans la SLA pourrait confiner la CSP dans un phénotype inapproprié et, ainsi, diminuer les chances de réinnervation et de réparation de la JNM. La figure 4.1 illustre les hypothèses testées dans cette thèse alors que les objectifs particuliers de cette dernière sont présentés sous formes de questions abordées afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse générale.

Section 5. Premier article de recherche

Early and Persistent Abnormal Decoding by Glial Cells at the Neuromuscular Junction in an ALS Model

- Est-ce que la capacité de détection et de décodage des CSPs est altérée à différents stades de la maladie?
- Quelle est la contribution des mAChRs des CSPs lors de la communication synaptique ainsi que la sensibilité de ces derniers?
- Quelles sont les caractéristiques fonctionnelles et morphologiques des autres éléments synaptiques de la JNM dans ce modèle murin de SLA?

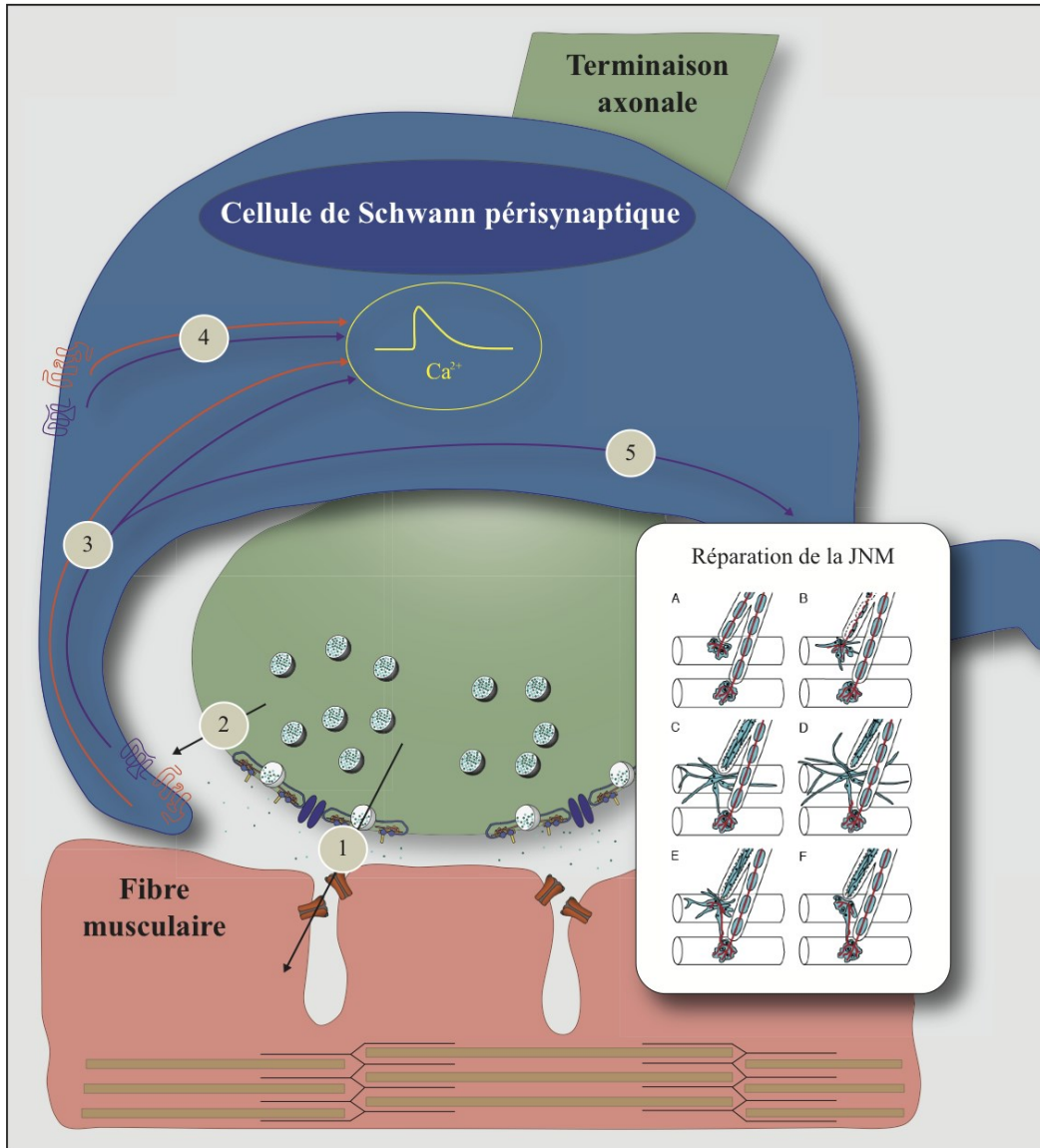
Section 6. Deuxième article de recherche

Chronic *in vivo* Dampening of Glial Excitability Fosters Neuromuscular Junction Repair in ALS

- Est-ce que la sensibilité des mAChRs demeure élevée aux JNMs dénervées?
- Est-ce que les mécanismes de réparation en lien avec les CSPs sont altérés à un stade symptomatique de la maladie?
- Est-ce que la diminution de l'activation des mAChRS des CSPs permet, d'une part, de restaurer l'excitabilité des CSPs et, d'autre part, de favoriser la restauration des mécanismes de réparation?

Une combinaison de différentes techniques a été utilisée afin d'évaluer l'excitabilité des CSPs (imagerie calcique) ainsi que les propriétés synaptiques (enregistrements électrophysiologiques) et morphologiques (immunohistochimie) de la JNM. Également, l'activation des mAChRs des CSPs a été spécifiquement diminuée *in situ* et *in vivo* grâce au recours d'une technique adaptée d'injection intermusculaire (Wright et al., 2009). Cette méthode d'injection locale nous a permis de recueillir des données morphologiques associées à la réparation de la JNM dans le muscle SOL de deux différentes souches de souris SOD1 (G37R et G93A).

Figure 4.1 Hypothèses de l'activation des mAChRs et la régulation de la réparation par les CSPs à la JNM de souris SLA



1. Les JNMs de souris $SOD1^{G37R}$ devraient avoir une libération différentielle de NTs.
2. La capacité de détection des CSPs devrait être altérée.
3. La contribution des mAChRs devrait être augmentée lors de la communication synaptique.
4. La sensibilité des mAChRs devrait être augmentée.
5. L'hyper-activation des mAChRs devrait empêcher les CSPs d'entrer dans un mode de réparation lorsque la JNM fera face à de la dénervation.

Les résultats de cette thèse montrent que les JNMs issues du muscle SOL de souris SOD1^{G37R} libèrent davantage de NTs. Bien que les CSPs détectent la libération de NTs, les amplitudes calciques induites par la communication synaptique sont beaucoup plus élevées que celles des souris sauvages. Plus précisément, l'activation des mAChRs des CSPs est anormalement élevée à des stades asymptomatiques de la maladie. Cette suractivation persiste également lorsque les JNMs font face à de la dénervation; ce qui empêche les CSPs d'entrer dans un mode de réparation. Ainsi, la diminution de l'activation des mAChRs favorise les comportements gliaux synonymes de réinnervation.

Ces résultats démontrent pour la première fois des altérations gliales précoces et persistantes à la JNM de souris atteintes de SLA. Également, les résultats de ces deux études suggèrent que le niveau d'activation des mAChRs des CSPs représente un élément clé qui détermine le mode des CSPs ainsi que le destin de la JNM (maintenance/efficacité synaptique vs réparation/plasticité morphologique). Il y aurait donc une certaine pertinence physiologique à réduire globalement l'activité de tous les mAChRs des CSPs dans un contexte de SLA afin de favoriser les mécanismes de compensation et de prévenir la destruction de la JNM et, par conséquent, maintenir les fonctions musculaires des patients plus longtemps.

5. Premier article de recherche

5.1 Introduction au premier article de recherche

Tel que mentionné dans l'introduction, la SLA provoque la dégénérescence des MNs et la dénervation des JNMs. Bien qu'on ne puisse toujours pas expliquer l'origine de la dénervation de la JNM, il est cependant bien établi qu'elle survient dans un ordre bien précis d'UMs (FF → FR → S). De plus, le fait qu'il semble y avoir une dissociation complète du corps cellulaire des MNs et de leurs NMJs suggère que des mécanismes spécifiques de toxicité pourraient survenir dans l'environnement synaptique de la JNM. Malgré tout, aucune caractérisation morphologique et fonctionnelle des trois éléments synaptiques de la JNM n'a été faite à ce jour.

Un élément indéniable pouvant contribuer à la dégénérescence des MNs dans le SNC est la contribution des cellules gliales. Pourtant, aucune étude n'a encore exploré les propriétés fonctionnelles des CSPs à la JNM. Ces cellules gliales assument de multiples rôles essentiels dont le maintien et la réparation de la JNM. Sachant que la dénervation est un événement précoce de la maladie, il semble encore plus urgent d'étudier ces partenaires actifs à la JNM. Plus particulièrement, leur capacité à détecter la communication synaptique ainsi que la contribution/sensibilité de leurs mAChRs. Cette activation muscarinique est un déterminant majeur au mode fonctionnel des CSPs et au destin de la JNM (maintenance vs réparation).

Nous avons donc procédé à une analyse détaillée (morphologie et fonction) de la JNM et plus spécifiquement des propriétés des CSPs de souris SOD1^{G37R} dans des stades asymptomatiques de la maladie. Nous avons combiné l'imagerie calcique des CSPs, un rapporteur fiable de l'activation de leurs récepteurs, avec des enregistrements synaptiques et de l'immunohistochimie. La technique d'immunohistochimie a notamment servi à corrélérer les altérations fonctionnelles observées, tant synaptiques que gliales, avec le type d'UM (FR ou S dans le SOL). Cette étude révèle que les altérations synaptiques observées demeurent relativement stables tout au long du stade asymptomatique de la maladie alors que les altérations gliales sont non seulement précoces et persistantes mais reflètent davantage la vulnérabilité des différentes UMs présentes au sein du muscle utilisé. Plus précisément, le

niveau d'activation élevé des mAChRs suggère que la capacité de détection des CSPs est altérée dans un contexte de SLA. Par conséquent, le passage d'un mode de maintenance à celui de réparation pourrait être compromis lorsque la dénervation survient.

Dans cet article, j'ai participé à l'élaboration des expériences, j'ai procédé à toutes les expériences impliquant les techniques d'imagerie calcique, d'immunohistochimie et certaines expériences d'électrophysiologie. J'ai analysé et interprété les résultats, j'ai monté les figures et j'ai écrit le manuscrit. Elsa Tremblay a conduit des expériences d'électrophysiologie et analysé les résultats (Figures 5.3 et 5.7). Éric Martineau a fait l'analyse des marquages d'immunohistochimie (Figure 5.1, Tableaux 5.1 et 5.2). Dr. Jean-Pierre Julien nous a fourni les souris SOD1^{WT}, un contrôle nécessaire à la plupart des expériences de cet article. Dr. Richard Robitaille a participé à l'élaboration des expériences, a analysé les résultats et a écrit le manuscrit. Tous les auteurs ont approuvé la version finale du manuscrit.

Les pages suivantes présentent les résultats publiés de l'article:

Arbour D, Tremblay E, Martineau É, Julien JP, Robitaille R. (2015) *Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model*. Journal of Neuroscience. 35 (2): 688-706.

5.2 EARLY AND PERSISTENT ABNORMAL DECODING BY GLIAL CELLS AT THE NEUROMUSCULAR JUNCTION IN AN ALS MODEL

Abbreviated title: Altered glial properties at NMJ in ALS

Arbour Danielle^{1,2}, Tremblay Elsa^{1,2}, Martineau Éric^{1,2}, Julien Jean-Pierre³, Robitaille
Richard^{1,2*}

¹ : Département de neurosciences, Université de Montréal

² : Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal, PO box 6128,
Station centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

³ : Département de psychiatrie et de neurosciences, Université Laval, Québec, Canada, G1V
0A6

* To whom correspondence should be addressed: richard.robaille@umontreal.ca

Received April 2, 2014; revised Nov. 14, 2014; accepted Nov. 14, 2014.

Number of pages: 55

Number of figures: 10

Number of tables: 2

Numbers of words: Abstract 244, Introduction 489, Discussion 1492

5.2.1 ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a late-onset neuromuscular disease characterized by progressive loss of motor neurons (MNs) preceded by neuromuscular junction (NMJ) denervation. Despite the importance of NMJ denervation in ALS, the mechanisms involved remain unexplored and ill defined. The contribution of glial cells in the disease has been highlighted, including axonal Schwann cell activation that precedes the decline of motor function and the onset of hindlimb paralysis. Because NMJ denervation occurs early in the process and that perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the NMJ, regulate morphological stability, integrity, and repair of the NMJ, one could predict that PSC functions would be altered even before denervation, contributing to NMJ malfunctions. We tested this possibility using a slowly progressive model of ALS (SOD1^{G37R} mice). We observed a normal NMJ organization at a presymptomatic stage of ALS (120 d), but PSC detection of endogenous synaptic activity revealed by intracellular Ca²⁺ changes was enhanced compared with their wild-type littermates. This inappropriate PSC decoding ability was associated with an increased level of neurotransmitter release and dependent on intrinsic glial properties related to enhanced muscarinic receptor activation. The alteration of PSC muscarinic receptor functions also persists during the preonset stage of the disease and became dependent on MN vulnerability with age. Together, these results suggest that PSC properties are altered in the disease process in a manner that would be detrimental for NMJ repair. The impairments of PSC functions may contribute to NMJ dysfunction and ALS pathogenesis.

5.2.2 INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of upper and lower motor neurons (MNs). One of the primary pathogenic events that occur in ALS is the denervation and destruction of neuromuscular junctions (NMJs) (Frey et al., 2000; Fischer et al., 2004; Pun et al., 2006; Dupuis and Loeffler, 2009). An important distinction has been shown whereby fast-fatigable MNs are known to be affected first, whereas the slow-type MNs are partially resistant, purportedly attempting to reinnervate previously denervated muscle fibers (Frey et al., 2000; Atkin et al., 2005; Schaefer et al., 2005; Pun et al., 2006; Hegedus et al., 2007, 2008).

ALS is a non-cell-autonomous disease, involving glial cells (astrocytes, microglia, and oligodendrocytes) in pathogenesis and progression (Clement et al., 2003; Boillée et al., 2006; Yamanaka et al., 2008; Wang et al., 2011; Kang et al., 2013). Also, it was shown that activation of axonal Schwann cells (myelinating and nonmyelinating) precedes the decline of motor function and the onset of hindlimb paralysis (Keller et al., 2009). However, while the impact of the mutation in axonal Schwann cells was tested (Lobsiger et al., 2009; Turner et al., 2010; Wang et al., 2012), the contribution of perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the NMJ, remains unknown.

Interestingly, PSCs may have an important contribution in NMJ dysfunction in ALS because they are essential for the maintenance of synaptic structure and function and govern the induction and guidance of nerve terminal sprouting during reinnervation (Reynolds and Woolf, 1992; Son et al., 1996; O'Malley et al., 1999; Reddy et al., 2003; Feng and Ko, 2008). They decode synaptic transmission and regulate it in a Ca^{2+} -dependent manner (Reist and Smith, 1992; Robitaille, 1998; Rochon et al., 2001; Colomar and Robitaille, 2004; Rouse et al., 2010; Todd et al., 2010; Darabid et al., 2013). Importantly, this decoding ability determines the fate of the NMJ because it controls PSC response to injury and regulates gene expression in PSCs via muscarinic receptors (mAChRs) (Reynolds and Woolf, 1992; Georgiou et al., 1994, 1999; Son et al., 1996). These data indicate that mAChR activation maintains PSCs in a state of maintenance, preventing gene expression required for NMJ repair. Hence, an altered PSC decoding ability with abnormal mAChRs activation would deter on PSC functions of maintenance and repair.

Because of their role as synaptic modulators and their involvement in NMJ maintenance and repair, we postulate that the decoding ability of PSCs is altered at a very early stage of disease and persist in time. To evaluate this, we used the SOD1^{G37R} mouse model (line 29), which features a late-onset and slowly progressing phenotype (Wong et al., 1995). We report that the ability of PSCs to decode synaptic transmission is altered in SOD1^{G37R} mice, elicited by higher muscarinic activation. Because enhanced muscarinic activation would not favor NMJ repair, this suggests that PSCs could play an important role to the onset and/or progression of the disease.

5.2.3 MATERIALS AND METHODS

Animals

Soleus (SOL) muscles and their innervation were dissected from three animal groups: (1) transgenic mice expressing the human SOD1 gene carrying the G37R mutation (Gly → Arg) (line 29) (SOD1^{G37R}) where a moderate (4-fold to 5-fold) increase in mutated SOD1 level in brain and spinal cord was reported (Wong et al., 1995); (2) their age-matched wild-type (WT) littermates; and (3) hSOD1 transgenic mice (SOD1^{WT}), which overexpress the WT human SOD1 gene, were used as age-matched controls. The SOD1^{G37R} were purchased from The Jackson Laboratory and maintained in a C57BL/6 genetic background. The transgenic mice were genotyped by PCR amplification for the human SOD1 gene performed on tail biopsy samples taken at the time of the weaning (~21 d of age). The SOD1^{G37R} transgenic mice develop symptoms and pathology resembling human ALS, with paralysis in one or more limbs attributable to the eventual loss of MN from the spinal cord. SOD1^{WT} have not been reported to develop ALS-like disease. SOD1^{WT} express three times the normal level of SOD1 in the blood, brain, and fibroblasts (Audet et al., 2010).

To avoid ambiguity associated with gender-related differences, only male mice were used in the present study. Presymptomatic animals were used at postnatal day 107–130 (P120), and preonset animals were used at P357-P404 (P380). A smaller cohort of animals was used at P60. An autopsy was performed on every preonset animal. They were discarded if any sign of abnormal anatomical features of abdominal organs were observed. As proposed earlier, we refer to the onset of the disease by the peak of the body weight curve (Boillée et al., 2006). This age also coincides with initial axonal retraction from the neuromuscular synapses in the SOL (data not shown). Therefore, the disease onset was carefully monitored and assessed every week with animal weight and behavioral performances, including the presence of tremors and lack of hindlimb extension reflex (median age of onset = 426 d). No animal that passed the onset point was used in this study. The fragility and the state of the nerve-muscle preparations after the onset of the disease prevented us from performing electrophysiological recordings and calcium imaging experiments with a sufficient success rate.

All experiments were performed in accordance with the guidelines for maintenance and care of animals of the Canadian Council of Animal Care and Université de Montréal.

Nerve-muscle preparations

SOL nerve-muscle preparations were pinned in a Sylgard-coated experimental chamber filled with normal Rees' Ringer's saline solution containing the following (in mM): 110 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 11 glucose, 0.3 glutamate, 0.4 glutamine, 5 BES (C₆H₁₅NO₅S), 4.34×10^{-7} cocarboxylase, and 0.036 choline chloride. Experiments were performed at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ under continuous perfusion of oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) saline solution. The pH of oxygenated solution was at 7.3.

Electrophysiological recordings of synaptic transmission

Stimulation of the tibial nerve was performed using a suction electrode filled with extracellular saline. Endplate potentials (EPPs) were recorded using glass microelectrodes (1.0 mm OD; WPI) pulled to 40–70 m Ω (filled with 3 mM KCl) with a Brown–Flaming micropipette puller (Sutter Instruments). Synaptic responses were amplified by an AM Systems 1600 amplifier and further amplified (100 \times) and filtered (2 kHz) by a Warner Instruments DC amplifier. The recordings were digitized using a national Instruments BNC 2110 board and subsequently acquired with WinWCP software (John Dempster, Strathclyde University, Strathclyde, UK).

Synaptic strength of recorded NMJs was determined by measuring the paired-pulse facilitation (PPF) and the quantal content (m). These were obtained using a low Ca²⁺ (1 mM) and high Mg²⁺ (6.4 mM) Ringer's solution. PPF was obtained using two stimuli of 0.1 ms duration at 10 ms interval, elicited at 0.2 Hz. PPF was calculated as the mean amplitude of the second EPPs divided by the mean amplitude of the first EPPs, including failures. Quantal content (m) was determined using the amplitude of the miniature endplate potentials (MEPPs), as described previously (Del Castillo and Katz, 1954): $m = (\text{mean amplitude of EPPs}/\text{mean amplitude of the MEPPS})$. MEPP amplitude and frequency were determined using 5–10 min of recordings without motor nerve stimulation. A minimum of 100 MEPPs were used to calculate m for each NMJ. Recordings with an initial membrane potential depolarized > -65 mV or with > 5 mV variation from holding potential were not included for analysis. Muscle

fibers were impaled ~50–100 μm from the NMJ to be studied, avoiding mechanical distortion of the NMJ, yet providing a morphological landmark for finding the NMJ for post hoc morphological analysis.

Calcium imaging of PSCs

Nerve-muscle preparations were incubated for 90 min (2×45 min) in a preoxygenated Ringer's saline solution containing 10 μM fluo-4 AM (Invitrogen) and 0.02% pluronic acid (Invitrogen) at $26 \pm 1^\circ\text{C}$. This method is known to preferentially load PSCs at NMJs (Georgiou et al., 1999; Rousse et al., 2010; Todd et al., 2010). PSCs were easily identified on surface NMJs with transmitted light microscopy. Excitation of the Ca^{2+} indicator (fluo-4) was achieved using the 488 nm line of the argon ion laser of an FV1000 Olympus confocal microscope and a 20 \times or a 60 \times water-immersion objective (respectively, 0.95 NA, XLUMPlanFI; and 0.90 NA, Olympus). Emitted fluorescence was detected using a bandpass filter (500–545 nm). Basal level of fluorescence was always set within the same range of arbitrary units, using the same software and hardware settings. Changes in fluorescence were measured by subtracting the background fluorescence from the neighboring muscle fiber, and changes in fluorescence were measured over PSC soma and expressed as follows: $\% \Delta F/F = (F - F_{\text{rest}})/F_{\text{rest}} \times 100$. Experiments were discarded when focus drift occurred.

Calcium responses evoked in PSCs by endogenous release of neurotransmitter were obtained by stimulating the tibial nerve at 50 Hz during 5 s using a suction electrode. To prevent muscle contractions, postsynaptic cholinergic receptors were blocked with d-tubocurarine chloride (2.2–2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma), which does not affect PSC excitability (Reist and Smith, 1992; Todd et al., 2010). Preparations were allowed to stabilize with constant bath perfusion for at least 20 min before attempting motor nerve stimulation and Ca^{2+} imaging. In certain experiments, PSC Ca^{2+} responses were elicited by local application of agonists using a brief, small pulse of positive pressure (20–40 PSI, 150–200 ms) generated by a Picospritzer II (Parker Instruments) applied on a glass pipette (5 $\text{m}\Omega$, ~2-mm-tip diameter) positioned in proximity of the cells. Adenosine 5'-triphosphate (ATP), muscarine, or acetylcholine (10 μM , Sigma) was dissolved in the same Ringer's solution used for the experiment. One NMJ per muscle was imaged when motor nerve stimulation was applied to the preparation, but PSCs at several NMJs were imaged per muscle with agonist applications. A recovery of at least 20 min

was allowed between each application when several applications were performed on the same cells.

Antagonist applications

In some experiments, antagonists were bath applied for at least 45 min before the start of experiments. P2_Y antagonists (Reactive Blue 2 or RB2, 20 μ M, Alexis), large-spectrum P2 antagonists (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid, 20, 60, and 100 μ M, and suramin, 100 μ M, Sigma) and mAChRs antagonist (atropine, 5–20 μ M, Sigma) were diluted in the same extracellular saline solution.

TEA application

Neurotransmitter released by either WT or SOD1^{G37R} nerve terminals was increased using a K⁺ channel blocker, tetraethyl ammonium (TEA, 0.2 mM, Sigma). TEA was bath applied for 30 min, and synaptic activity was monitored (frequency of stimulation = 0.2 Hz). Then, nerve-muscle preparations (now potentiated by TEA) were stimulated at high frequency (50 Hz for 5 s), and the corresponding PSC Ca²⁺ responses were recorded. In some control experiments, agonists (ATP, 10 μ M) were locally applied in the presence of TEA by micro-pressure as indicated above.

Immunohistochemistry and confocal imaging

Labeling of synaptic compartments: Immunohistochemical labeling of the three synaptic components at the NMJ was done according to the method previously described (Todd et al., 2010; Darabid et al., 2013). SOL muscles were dissected in oxygenated Rees' Ringer's solution and pinned in a Sylguard-coated 10 mm Petri dish. Muscles were then fixed for 10 min in 4% formaldehyde diluted in PBS buffer (in mM as follows: 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 2 KH₂PO₄) at room temperature and permeabilized in 100% cold-methanol at –20°C for 6 min. Nonspecific labeling was blocked by incubating muscles with 10% normal donkey serum in PBS containing 0.01% Triton X-100 for 20 min at room temperature. First, Schwann cells were labeled with a rabbit anti-S100 β antibody (1:250, Dako) for 2 h, and then axons (chicken anti-neurofilament M [NF-M], 1:2000, Rockland Immunochemicals) and nerve terminals (mouse IgG1 anti-synaptic vesicular protein 2, 1:2000; Developmental Studies

Hybridoma Bank) were labeled for 90–120 min. After washing, muscles were incubated with secondary antibodies, goat anti-mouse IgG1 Alexa-488, donkey anti-chicken Alexa-448, and donkey anti-rabbit Alexa-647 (all 1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 1 h. Postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) were labeled with Alexa-594-conjugated- α -bungarotoxin (1.33–2.0 μ g/ml, Invitrogen) for 30–45 min. All antibody incubations were performed in PBS containing 0.01% Triton X-100 and 2% normal donkey serum at room temperature. After each step (except blocking), muscles were rinsed three times in PBS containing 0.01% Triton X-100 for 5 min. Muscles were then mounted in Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen). Observations were done on an Olympus FV1000 (WT, SOD1^{WT}, and SOD1^{G37R} groups) or a Zeiss LSM 510 (C57BL/6 controls) confocal microscope. No image manipulations were performed after acquisition.

Labeling of muscle fiber type: Muscle fiber types were determined at the end of all physiological experiments. Muscles were fixed in 4% formaldehyde at room temperature for 10 min and rinsed with PBS (3 \times 5 min). Muscles were then permeabilized in 100% cold methanol for 6 min at -20°C and incubated in a solution of 10% normal donkey serum and 0.01% Triton X-100 for 20 min to minimize nonspecific labeling. Muscles were washed in PBS containing 0.01% Triton X-100 (3 times, 5 min each) after each of the following steps. Muscles were incubated with a mouse anti-Type I myosin heavy chain IgGIIb and anti-Type IIa myosin heavy chain IgG1 (1:100–200, SC-71-c and 1:75–100, BA-D5-c, Developmental Studies Hybridoma Bank, respectively) for 120 min at room temperature. After rinsing in PBS (3 \times 5 min), preparations were incubated with CY5 or Alexa 647 anti-mouse IgGIIb (1:500) secondary antibodies for 60 min and then incubated with Alexa-488 anti-mouse IgG1 (1:1000) for 60 min at room temperature. Finally, muscles were incubated with α -bungarotoxin (Alexa-594, 1.33–2.0 μ g/ml) for 45 min. Preparations were then mounted in Prolong Gold antifade reagent and all labels observed simultaneously using a Zeiss LSM 510 confocal microscope or the spectral detection feature of an Olympus FV1000. No further manipulations of the images were performed after acquisition.

Histological analysis

Seven criteria similar to those described in previous studies (Wright et al., 2009; Valdez et al., 2012) were used to analyze NMJ morphology and are detailed in Table 1. We

did not evaluate receptor fragmentation as this was observed on NMJs from P120 C57BL/6 controls animals (data not shown) and reported in detail previously (Wright et al., 2009; Valdez et al., 2012). Axonal diameter was not evaluated as changes in the labeling could be due to changes in NF-M expression in the disease or switch to another isoform (neurofilament heavy). Also, the NF-M antibody did not penetrate the tissue very well such that labeling axons located under the first two layers of muscle fibers was unreliable.

The following procedure was used to ensure that the muscle fiber typing was performed on the same NMJs on which physiological measurements were performed. First, we captured an image at low magnification (20×) to determine its position within the field of view in the microscope relative to the surrounding NMJs and the position of the main nerve entry by counting the number of fibers between them. Sometimes, the position of the nerve entry into the junction could be used as an additional criterion. Second, after electrophysiological recordings, we performed deliberate perforation of the surrounding muscle fibers with a glass pipette. The map was then used in the subsequent imaging sessions to locate the junction of interest. Third, we labeled the nAChRs with α -bungarotoxin (Alexa-594, 10 μ g/ml, 20 min) for each Ca^{2+} imaging experiment. This toxin does not affect PSC excitability (Rochon et al., 2001). The unique “pretzel-like” pattern of the bungarotoxin-labeled nAChRs of an NMJ and of the surrounding ones served as selective markers. Also, this staining allowed us to generate a 3D reconstruction of the endplate to further detail its organization.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. N represents the number of animals, and n refers to the number of NMJs or PSCs. Paired t tests were performed when comparing synaptic responses induced by the motor nerve stimulation during the same experiment. Unpaired t tests were performed to compare two different conditions from different experiments. One-way Kruskal–Wallis ANOVA test with Dunn's Multiple-Comparison post-test was used to compare three groups or more. Two-way ANOVA test with Bonferroni's Multiple Comparison post-test were used when there were more than one independent variable and multiple observations for each independent variable. All tests were used at a confidence level of 95% ($\alpha = 0.05$).

5.2.4 RESULTS

The decoding ability of PSCs with mAChR activation represents a central element for appropriate PSC responses in the regulation of NMJ morphology and stability. Thus, we hypothesized that PSC properties could be altered at an early presymptomatic period in an ALS mouse model in which predictable NMJ destruction will occur. In this work, we investigated two fundamental PSC properties that are essential for their normal function: the regulation of morphological organization and the decoding of synaptic activity.

NMJ morphology is unchanged at a presymptomatic stage

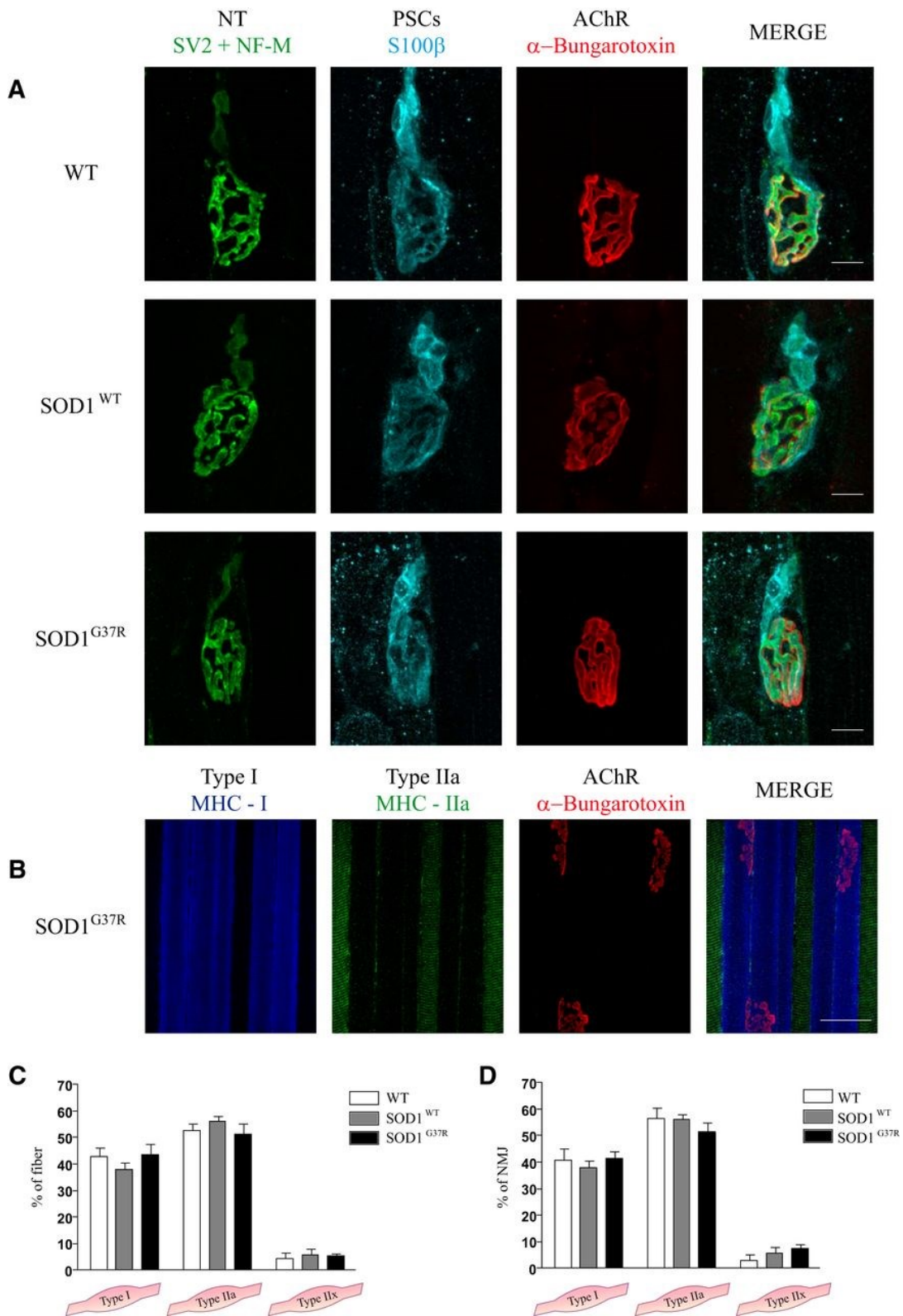
PSCs actively participate in the maintenance and repair of neuromuscular synapses (Reynolds and Woolf, 1992; Son et al., 1996; Georgiou et al., 1999; O'Malley et al., 1999; Reddy et al., 2003; Feng and Ko, 2008). Hence, any sign of PSC morphological disorganization coupled to NMJ morphological alteration would be a clear and sensitive sign of PSCs' inability to maintain NMJ integrity.

To distinguish between the impacts of the mutated SOD1 protein and the overexpression of the human WT SOD1 protein, we analyzed the NMJ morphology at an asymptomatic stage of the disease (P120) using immunohistological labeling of PSCs, presynaptic and postsynaptic elements from WT, SOD1^{WT}, and SOD1^{G37R} animals (Fig. 5.1A). Seven previously documented NMJ-related alterations (Table 5.1) were quantified from images, such as those shown in Figure 5.1A (described in Experimental procedures). Only 12% of NMJs of WT, 19% of NMJs of SOD1^{WT}, and 11% of NMJs of SOD1^{G37R} exhibited one or two of the seven criteria (Table 5.2; no statistical difference between any of these criteria in the different groups). For instance, the presynaptic terminal branch morphology or postsynaptic receptor appearance was unaltered, and all NMJs of each group were innervated (Fig. 5.1A; Table 5.2). Consistent with O'Malley et al. (1999), we found that PSC somata and processes were precisely aligned with nerve terminal branches and postsynaptic ACh receptors (O'Malley et al., 1999) (Fig. 5.1A; Table 5.2). Hence, these results reveal that NMJs from SOD1^{G37R} were indistinguishable from WT and SOD1^{WT} at P120.

Tableau 5.1 Definition and example of criteria used in the morphological analysis of NMJs

	Criteria	Definition
Presynaptic	(1) Denervation	<i>Partial</i> : when part of the end-plate is not recovered by the presynaptic nerve terminal. <i>Complete</i> : when the presynaptic element is absent from the end-plate.
	(2) Terminal sprouting	When the presynaptic element, originating from the end-plate, extends at least 20 µm away in any direction or contacts another NMJ. Only sprouts on NMJs fully innervated by a myelinated axon were counted as originating from that NMJ.
	(3) Polyinnervation	When at least two distinct axons or sprouts were seen entering a single postsynaptic site. Sprouts from unknown origin on partially denervated NMJs or NMJs without a visible large myelinated axon were automatically counted as a source of innervation rather than a sprout originating from that end-plate.
Postsynaptic	(4) Ectopic AChR	When two nAChR clusters of at least 3µm of diameter belonging to the same endplate were at least separated by 5 µm. nAChR are considered as belonging to the same endplate if they are on the same muscle fiber as evaluated by background fluorescence or transmitted light images.
	(5) Faint clustered nAChR	When the postsynaptic site was noticeably faint, clustered and had a lack of organisation reminiscent of an immature NMJ (Darabid et al., 2013).
Glia	(6) Incomplete glial coverage	When glial cells were not fully covering the presynaptic element. Only en-face NMJs were analysed due to the limited penetration of the S100β antibody in the tissue.
	(7) Glial sprouting	<i>Sprouting</i> : When PSCs extended a process associated with a presynaptic sprout. <i>Bridge</i> : When at least one PSC extended a process at least 20 µm away or contacting another NMJ without being associated with a presynaptic element.

Figure 5.1 Morphology is unaltered at presymptomatic stage of the disease



A, Confocal images of NMJs from controls (WT and SOD1^{WT}) and an ALS mouse model (SOD1^{G37R}). P120 soleus NMJs were labeled for the nerve terminals (NT) (synaptic vesicular protein 2 and NF-M, green), PSC (S100 β , cyan), and postsynaptic nAChRs (α -bungarotoxin, red). Note the similar staining patterns between each animal group. **B**, Confocal images of soleus muscle from an SOD1^{G37R} mouse. Muscle fibers were stained using anti-myosin heavy chain (MHC) monoclonal antibodies: Type I fibers (MHC-I; blue), Type IIa fibers (MHC-IIa; green), and α -bungarotoxin (red) to identify the localization of the endplates. Note the alternation of slow- and fast-twitch fibers in the soleus muscle. **C**, Histogram of the percentage of surface fibers in the soleus of each animal group. **D**, Histogram of the percentage of surface NMJs per fiber type in the soleus of each animal groups. Histograms in C and D represent mean \pm SEM. Scale bars: A, 10 μ m; B, 50 μ m.

Tableau 5.2 Percentage of NMJs that meet criteria used in the morphological analysis for each animal group

	Criteria	WT	SOD1 ^{WT}	SOD1 ^{G37R}	P value
Presynaptic	(1) Denervation	0	1.3 ± 1.3	0	0.4053
	(2) Terminal sprouting	1.0 ± 1.0	2.3 ± 2.3	0	0.5589
	(3) Polyinnervation	0	3.0 ± 1.8	0	0.1007
Postsynaptic	(4) Ectopic AChR	0	11.4 ± 3.7	2.5 ± 1.4	0.3939
	(5) Faint clustered nAChR	9.2 ± 3.4	11.4 ± 3.7	6.4 ± 2.6	0.5648
Glial	(6) Incomplete glial coverage	0	0	0	N/A
	(7) Glial sprouting	2.8 ± 1.7	2.8 ± 2.8	3.2 ± 1.9	0.9871

We next examined whether the proportion of Type I and Type IIa fibers was different at this age. This was tested using specific antibodies against MHC isoform Types I and IIa, corresponding to the slow and fast fatigue-resistant muscle fibers, respectively, present in the SOL muscle (Fig. 5.1B). All unlabeled fibers were identified as fiber IIX, the remaining fiber subtype in the SOL (Valdez et al., 2012). However, as shown in Figure 5.1C and as previously reported in a young adult C57BL/6 mouse (Valdez et al., 2012) and SOD1^{WT} mice (Hegedus et al., 2007), we found no difference in the proportion of fiber types (WT: N = 5 muscles, n = 295 fibers; SOD1^{WT}: N = 4 muscles, n = 220 fibers; SOD1^{G37R}: N = 5 muscles, n = 295 fibers;

Fig. 5.1C, two-way ANOVA, $F = 0.83$, $p = 0.5158$). Finally, there was no significant difference in the percentage of NMJs per muscle associated with each fiber type (WT: $N = 5$ muscles, $n = 176$ NMJs; SOD1^{WT}: $N = 4$ muscles, $n = 147$ NMJs; SOD1^{G37R}: $N = 5$ muscles, $n = 154$ NMJs; Fig. 5.1D, two-way ANOVA, $F = 1.61$, $p = 0.1951$).

Thus, neither the overall number of NMJs according to the fiber type nor the morphology was altered at P120 of WT, SOD1^{WT}, and SOD1^{G37R} mice. This suggests that PSC properties that ensure the stability of the neuromuscular synapse were normal at this early age and stage of the disease.

Excitability of PSCs is altered early at P120

PSCs regulate morphological stability and integrity and actively participate in the reinnervation of the NMJ, events that are under the influence of synaptic communication. Indeed, in healthy conditions, interruption of synaptic communication between PSCs and presynaptic nerve terminals leads to changes in PSCs phenotype that facilitate NMJ plasticity and reinnervation (Reynolds and Woolf, 1992; Son et al., 1996; O'Malley et al., 1999). Importantly, the PSC switch from maintenance mode to repair mode is regulated by their ability to detect synaptic transmission (Georgiou et al., 1994, 1999), suggesting that their role as synaptic modulators is tightly linked to synaptic maintenance and repair.

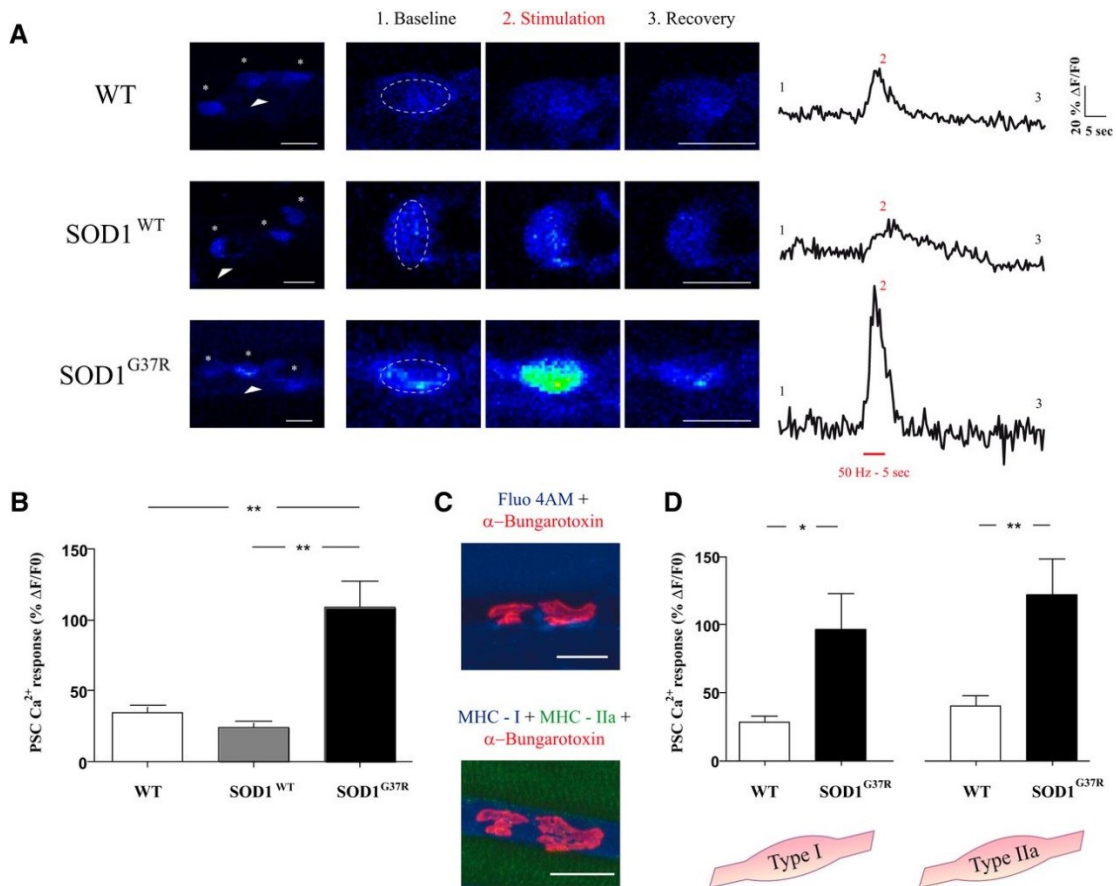
Thus, we examined the ability of PSCs to respond to synaptic activity elicited by motor nerve stimulation. Stimulation was performed at 50 Hz for 5 s, a frequency reported for firing of motor neurons innervating adult SOL muscle (Chipman et al., 2010) and for PSC responsiveness (Todd et al., 2007; Rousse et al., 2010). PSC activity was assessed by monitoring changes in intracellular Ca²⁺ levels, which is a well-known and reliable reporter of their level of excitation and responsiveness (Robitaille, 1998; Rochon et al., 2001; Rousse et al., 2010; Darabid et al., 2013).

As shown in Figure 5.2A, synaptic activity evoked by stimulation of the motor nerve induced Ca²⁺ responses in PSCs. As indicated by the number of cells activated, the propensity of PSCs to respond to synaptic activity was similar for NMJs from both control groups (WT: 58%, 22 PSCs activated out of 38; SOD1^{WT}: 47%, 8 PSCs activated out of 17) and the SOD1^{G37R} mice (58%, 22 activated PSCs out of 38). However, and somewhat surprisingly, the amplitude of PSC Ca²⁺ responses was larger in SOD1^{G37R} mice. Indeed, the average amplitude

of PSC Ca^{2+} responses from WT mice and SOD1^{WT} was $34.3 \pm 4.3\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ and $24.1 \pm 2.8\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$, respectively, whereas it was $108.9 \pm 18.1\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ from $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice (Fig. 5.2B; $N = 10$, $n = 22$ for WT, $N = 5$, $n = 8$ for SOD1^{WT} and $N = 9$, $n = 22$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, one-way ANOVA, $p = 0.0004$). However, this difference was not observed at an earlier age (P60) (data not shown; $N = 5$, $n = 9$ for WT and $N = 4$, $n = 10$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.3065$). These results indicate that the PSCs at NMJs of an ALS mouse model at P120 detected transmitter release but with an enhanced excitability.

We next tested whether PSC excitability reflected MN properties because MNs differ not only in their physiological properties but also in their anatomical plasticity and susceptibility to loss of neuromuscular connectivity. This was tested by performing immunohistological staining of MHC isoforms after each Ca^{2+} imaging experiment (Fig. 5.2C). Because PSC Ca^{2+} responses from WT and SOD1^{WT} mice were indistinguishable, we compared only the WT and the $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ groups for these experiments. As shown in Figure 5.2D, Ca^{2+} response amplitude from $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ was 3.0- to 3.5-fold larger than WT for each fiber type (MHC-I: $N = 4$, $n = 8$ for WT and $N = 4$, $n = 9$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.0279$) (MHC-IIa: $N = 7$, $n = 12$ and for WT and $N = 4$, $n = 8$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.0021$). Together, these results suggest that alterations in PSC Ca^{2+} responses do not correlate with the predicted and specific vulnerability of MNs at this presymptomatic stage of the disease. These alterations are expressed at least 4 months before the earliest signs of sensorimotor and cognitive dysfunctions in this $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ transgenic mouse model of ALS (Filali et al., 2011).

Figure 5.2 Altered PSC excitability at presymptomatic stage of the disease



A, False color images of PSCs (*) loaded with fluorescent Ca²⁺ indicator Fluo-4 AM, before (baseline), during (stimulation), and after (recovery) motor nerve stimulation at NMJs of WT, SOD1^{WT}, and SOD1^{G37R}. Representative changes in fluorescence are illustrated on the right for the PSCs indicated by the arrowhead. **B**, Histogram depicting the mean ± SEM of the amplitude of the Ca²⁺ responses elicited in PSCs by transmitter release evoked by motor nerve stimulation (50 Hz, 5 s). PSCs at NMJs from SOD1^{G37R} mice had larger Ca²⁺ responses (one-way ANOVA, $p = 0.0004$). **C**, Examples of an NMJ imaged during Ca²⁺ imaging experiment (top) and the same NMJ imaged after MHC and BTX staining (bottom). This NMJ was associated with a fiber Type I (MHC-I, blue) and not a fiber Type IIa (MHC-IIa, green). **D**, Histogram illustrating the mean ± SEM of the amplitude of the Ca²⁺ responses elicited in PSCs by motor nerve stimulation as a function of each fiber type. The altered PSC excitability did not correlate with motor neuron vulnerability at a presymptomatic stage of the disease. Scale bars: A, 10 μm; C, 20 μm. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Neurotransmitter release is increased in the soleus muscle of an ALS mouse model at P120

Next, we tested the hypothesis that the synaptic strength from SOD1^{G37R} mice might be altered. This would be consistent with the early alterations in MN excitability (Pieri et al., 2003; Kuo et al., 2004; Amendola et al., 2007; Bories et al., 2007) that seems to diminish toward the symptomatic stage of the disease (Delestrée et al., 2014) and with the properties of PSCs at immature and mature NMJs, which decode different levels of synaptic activity by producing different Ca²⁺ responses (Rousse et al., 2010; Todd et al., 2010; Darabid et al., 2013). To this end, we performed intracellular recordings from WT, SOD1^{WT}, and SOD1^{G37R} NMJs. Synaptic strength was determined using the quantal content (m) and PPF.

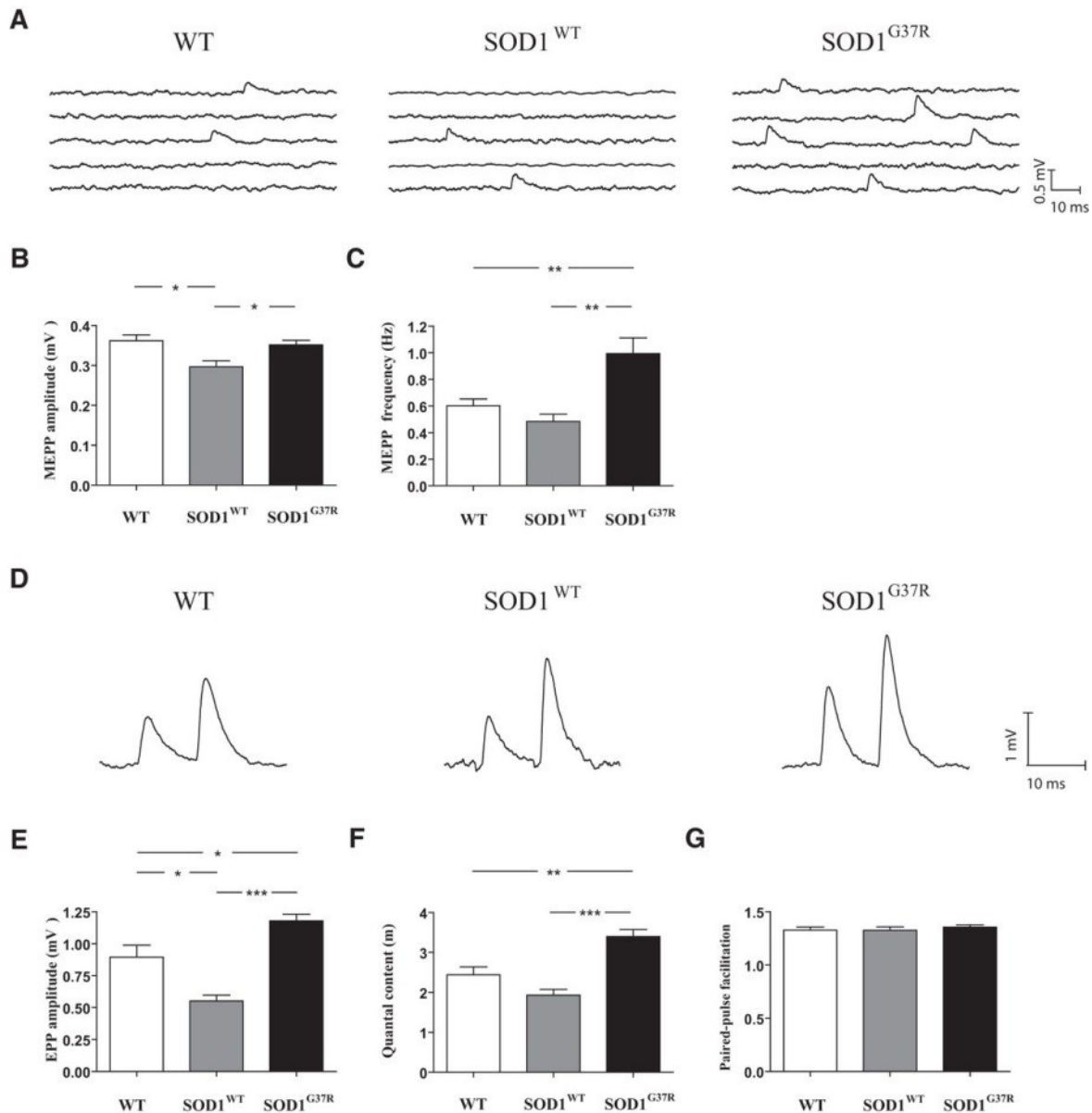
First, we evaluated the spontaneous activity of the NMJs. No difference in MEPP amplitude was observed between WT and SOD1^{G37R} mice (WT, 0.36 ± 0.01 mV, N = 9, n = 15; SOD1^{WT}, 0.30 ± 0.02 mV, N = 6, n = 8; SOD1^{G37R}, 0.35 ± 0.01 mV, N = 9, n = 14; one-way ANOVA, p = 0.0145; Fig. 5.3A,B). Surprisingly, MEPP amplitude from SOD1^{WT} mice was slightly but significantly smaller than the WT and the SOD1^{G37R} mice (Fig. 5.3A,B). Importantly, however, MEPP frequency was significantly increased in the SOL muscle of the SOD1^{G37R} mice (Fig. 5.3A) where it was 0.60 ± 0.05 Hz for the WT mice, 0.48 ± 0.05 Hz for the SOD1^{WT} mice, and 0.99 ± 0.12 Hz for the SOD1^{G37R} mice (Fig. 5.3C; N = 8, n = 16 for WT, N = 6, n = 8 for SOD1^{WT} and N = 8, n = 14 for SOD1^{G37R}, one-way ANOVA, p = 0.0008). Importantly, a difference in MEPP frequency was observed between WT and SOD1^{G37R} mice in Type I fibers (data not shown; N = 4, n = 8, 0.50 ± 0.04 Hz for WT and N = 5, n = 6, 0.66 ± 0.06 Hz for SOD1^{G37R}, unpaired t test, p = 0.0475) and Type IIa fibers (N = 5, n = 7, 0.72 ± 0.09 Hz for WT and N = 5, n = 7, 1.27 ± 0.13 Hz for SOD1^{G37R}, unpaired t test, p = 0.0045). These results are consistent with changes of the presynaptic mechanisms of transmitter release.

Second, we evaluated the nerve-evoked activity of the NMJs. Amplitude of nerve-evoked EPPs (Fig. 5.3D; stimulation at 0.2 Hz) in the SOD1^{G37R} (1.18 ± 0.05 mV, N = 9, n = 14) was significantly larger than WT (0.89 ± 0.09 mV, N = 9, n = 15) and SOD1^{WT} (0.55 ± 0.05 mV, N = 5, n = 8) (Fig. 5.3D,E; one-way ANOVA, p < 0.0001). Again, data from SOD1^{WT} mice was significantly smaller than the WT and the SOD1^{G37R} mice.

Third, and consistent with these observations, quantal content of NMJs from SOD1^{G37R} mice (3.40 ± 0.18 , and $N = 9$, $n = 14$) was significantly higher compared with WT (2.44 ± 0.20 , $N = 9$, $n = 15$) and SOD1^{WT} mice (1.93 ± 0.14 , $N = 5$, $n = 8$) (Fig. 5.3F; one-way ANOVA, $p < 0.0001$). Moreover, the quantal content in Type I fibers for the SOD1^{G37R} was significantly higher than the WT mice (data not shown; $N = 5$, $n = 9$, 2.41 ± 0.28 for WT and $N = 5$, $n = 6$, 3.35 ± 0.19 for SOD1^{G37R}, unpaired t test, $p = 0.0269$) but not in Type IIa fibers ($N = 5$, $n = 5$, 2.71 ± 0.27 for WT and $N = 5$, $n = 7$, 3.43 ± 0.32 for SOD1^{G37R}, unpaired t test, $p = 0.1363$). Interestingly, these alterations in synaptic properties did not follow the typical prediction that stronger synapses should present smaller PPF (Mallart and Martin, 1968). Indeed, the SOD1^{G37R} NMJs had a PPF value similar to the two control groups (Fig. 5.3G; WT, 1.33 ± 0.03 , $N = 9$, $n = 15$; SOD1^{WT}, 1.33 ± 0.03 , $N = 5$, $n = 8$; SOD1^{G37R}, 1.36 ± 0.02 , $N = 9$, $n = 14$; one-way ANOVA, $p = 0.6966$).

As a whole, this detailed synaptic analysis suggests that complex presynaptic alterations result in an enhancement of neurotransmitter release in SOD1^{G37R} mutants, primarily in Type I fibers.

Figure 5.3 Enhanced synaptic transmission at NMJs from SOD1^{G37} mice at presymptomatic stage of the disease



A, Examples of spontaneous MEPP recordings from WT, SOD1^{WT}, and SOD1^{G37R} NMJs. Histogram showing the mean \pm SEM of the amplitude (**B**) and the frequency (**C**) of the MEPP. **D**, Examples of EPPs evoked by paired-pulse stimulation of the motor nerve (10 ms interval) from WT, SOD1^{WT}, and SOD1^{G37R} NMJs. **E**, Histogram showing the mean \pm SEM of the amplitude of the first EPP. **F**, Calculated quantal content obtained from electrophysiological recordings of synaptic transmission and

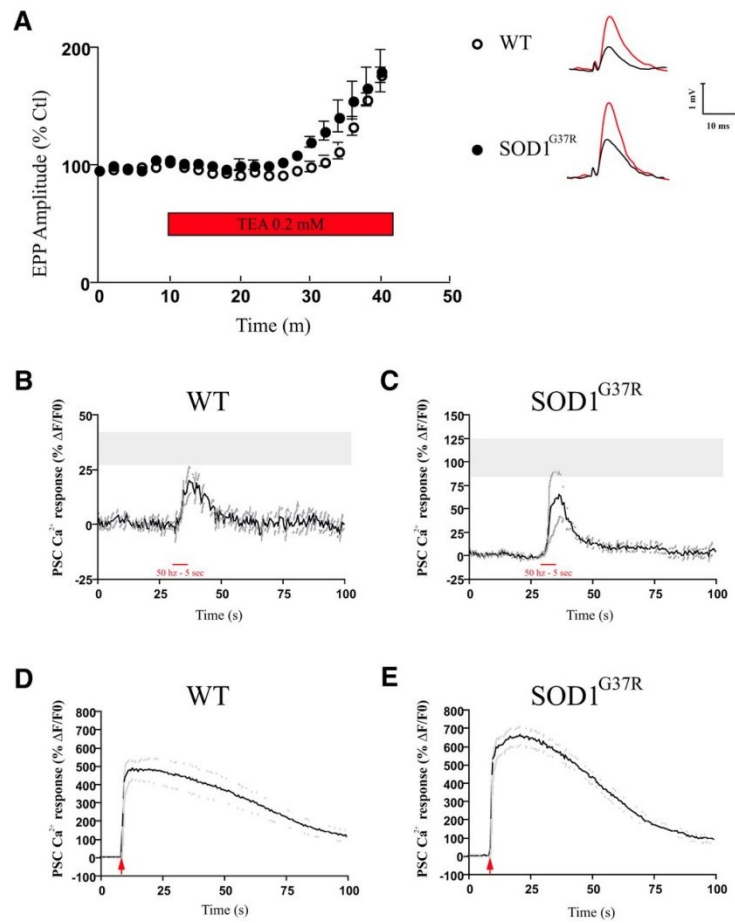
determined as EPP amplitude/mEPP amplitude. NMJs from SOD1^{G37R} mice had higher quantal content. **G**, Calculated PPF obtained from electrophysiological recordings of synaptic transmission and determined as the mean amplitude of the second EPPs divided by the mean amplitude of the first EPPs. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Decoding ability also relies on PSC intrinsic properties at P120

Because PSCs are sensitive to transmitter release, one could argue that large Ca²⁺ response amplitude in SOD1^{G37R} may be due to a larger level of transmitter release at these NMJs. However, it has been demonstrated, at immature and adult NMJs, that the decoding ability of PSCs also relies on their intrinsic properties (Rousse et al., 2010; Darabid et al., 2013). Hence, we examined whether the increase in transmitter release could be sufficient to explain the level of PSCs excitability or if their intrinsic properties are at play.

To discriminate between these two possibilities, we argued that, if the difference in PSCs activity between WT and SOD1^{G37R} was solely dependent on the level of transmitter release, increasing transmitter release should result in a direct change in the amplitude of PSC Ca²⁺ responses. Because quantal content from WT and SOD1^{WT} mice was not significantly different (Fig. 5.3F), we compared SOD1^{G37R} mice with WT littermates for these experiments. We monitored nerve-evoked Ca²⁺ responses in PSCs while potentiating transmitter release using a K⁺ channel blocker (TEA, 0.2 mM), which does not directly affect PSCs (Rousse et al., 2010; Darabid et al., 2013). As shown in Figure 5.4A, TEA significantly increased EPP amplitude approximately twofold, as expected, in WT (Ctrl, 0.79 ± 0.01, TEA, 1.51 ± 0.02, N = 4; paired t test p < 0.0001) and in SOD1^{G37R} (Ctrl, 1.08 ± 0.02, TEA 1.95 ± 0.02, N = 4; paired t test p < 0.0001). PSC excitability appears unaltered by TEA because Ca²⁺ responses elicited by local application of agonists were unaffected (data not shown).

Figure 5.4 PSC decoding ability is unaffected by an increase in transmitter release



A, Changes of EPP amplitude before and during (red bar) bath application of TEA (0.2 mM). Insets, Examples of EPPs (black) before and 30 min after TEA application (red). TEA increased synaptic transmission of both WT and SOD1^{G37R} nerve terminals. Effect of TEA (0.2 mM) bath application on corresponding PSC Ca²⁺ responses induced by synaptic activity (50 Hz, 5 s) from WT (**B**) and SOD1^{G37R} (**C**) animals. Gray zones represent the mean \pm SEM of the amplitude of the Ca²⁺ responses elicited by motor nerve stimulation in control (without TEA). PSC Ca²⁺ responses elicited by potentiated WT nerve terminals remain smaller than those triggered by the SOD1^{G37R} and were not significantly different from the ones without TEA (unpaired t test, $p > 0.05$). Ca²⁺ responses elicited in PSCs by local applications of ATP in WT (**D**) and SOD1^{G37R} NMJs (**E**). The ability of PSCs to produce larger Ca²⁺ responses was not affected by TEA because local application of ATP (red arrow) elicited larger Ca²⁺ responses in PSC from WT and SOD1^{G37R} mice. In B–E, black and grey traces represent the mean and SEM, respectively.

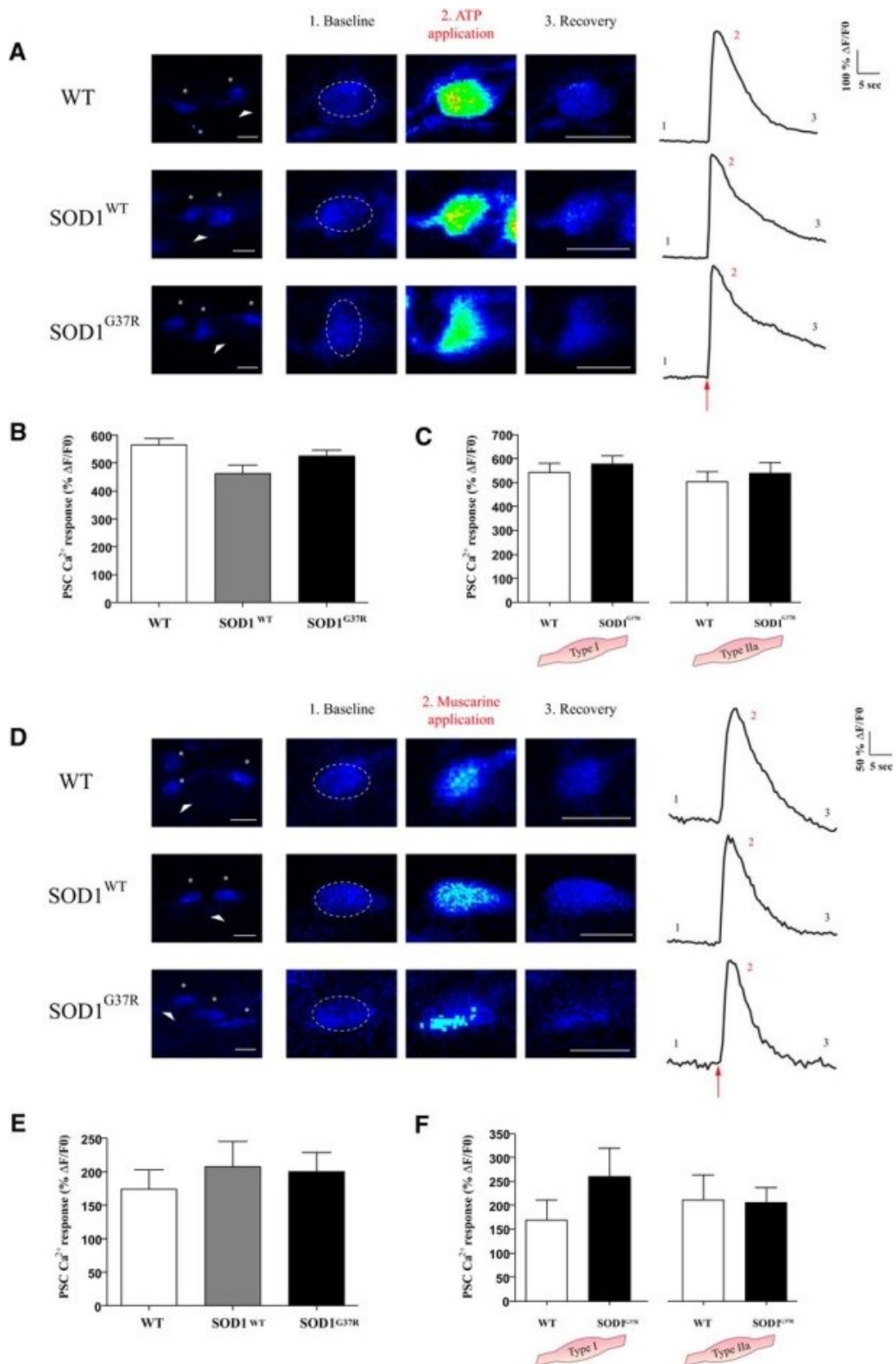
Interestingly, even though transmitter release was doubled, bath application of TEA had no effect on the average amplitude of PSC Ca^{2+} responses on WT synapses induced by nerve stimulation (50 Hz for 5 s) (Fig. 5.4B; $26.2 \pm 5.2\% \Delta\text{F}/\text{F}$, $N = 4$, $n = 6$, unpaired t test, $p = 0.3650$). Similar results were obtained when potentiating the $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ synapses (Fig. 5.4C; $77.6 \pm 29.9\% \Delta\text{F}/\text{F}$, $N = 4$, $n = 9$, unpaired t test, $p = 0.3666$). In addition, the percentage of responsive cells remained unchanged in WT and $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$. Importantly, this cannot be explained by a saturation of the Ca^{2+} signal or the inability of PSCs to produce larger Ca^{2+} responses because larger Ca^{2+} responses were elicited when ATP was applied locally on the cells monitored following nerve-evoked stimulation (Fig. 5.4D; WT: $521.4 \pm 56.3\% \Delta\text{F}/\text{F}$, $N = 4$, $n = 10$; Fig. 5.4E; $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$: $680.2 \pm 51.8\% \Delta\text{F}/\text{F}$, $N = 4$, $n = 6$). These results are consistent with previous observations (Rousse et al., 2010; Darabid et al., 2013) and indicate that an acute increase of neurotransmitter release cannot explain PSC properties in $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice. This strongly suggests that PSC decoding of synaptic activity in an ALS mouse model relies on their intrinsic properties.

PSC ability to detect purinergic and muscarinic signals is unaltered at P120

At adult mammalian NMJ, ACh and ATP released during synaptic activity activate PSC purinergic and muscarinic receptors to elicit Ca^{2+} responses (Rochon et al., 2001). Hence, one possible mechanism that might explain the difference in the decoding ability of PSCs of WT and $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ to nerve terminal stimulation is that PSC detection of these neurotransmitters may be altered. In this scenario, one would predict that Ca^{2+} responses elicited by local application of agonists for these receptors should also be altered in $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$.

The ability of PSCs to detect ATP applied locally was examined first. Local application of ATP (10 μM) induced Ca^{2+} responses in 100% of PSCs with a mean of $564.0 \pm 25.8\% \Delta\text{F}/\text{F}$ ($N = 6$, $n = 49$) for the WT, $463.7 \pm 27.8\% \Delta\text{F}/\text{F}$ ($N = 4$, $n = 33$) for SOD1^{WT} , and $525.4 \pm 22.3\% \Delta\text{F}/\text{F}$ ($N = 6$, $n = 55$) for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ (Fig. 5.5A). There was no significant differences between these amplitudes (Fig. 5.5B; one-way ANOVA, $p = 0.0917$). Also, we found no significant difference in Ca^{2+} responses associated with Type I fibers (Fig. 5.5C; $N = 4$, $n = 27$ for WT and $N = 3$, $n = 13$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.5544$) or Type IIa fibers ($N = 3$, $n = 12$ for WT and $N = 4$, $n = 21$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.6259$).

Figure 5.5 PSC Ca^{2+} responses to local application of ATP and muscarine



A, False color confocal images of PSCs (*) loaded with fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-4 AM, before (baseline), during (ATP application), and after (recovery) local ATP applications at NMJs of WT, SOD1^{WT} , and $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$. Representative changes in fluorescence are illustrated on the right for the PSCs indicated by the arrowhead. Higher magnification of PSCs marked with the arrowhead in left are illustrated on the three other images for each group. **B**, Histogram depicting the mean \pm SEM of the amplitude of the Ca^{2+} responses elicited in PSC by ATP application. **C**, Histograms depicting the mean \pm SEM of the amplitude of the Ca^{2+} responses elicited in PSC by ATP application as a function of fiber type. **D–F**, Similar representation as in A–C, but illustrating the muscarine application. There was no statistical difference between the different animal groups either for the ATP or the muscarine application (one-way ANOVA, $p > 0.05$). Scale bar, 10 μm .

We next investigated the ability of a muscarinic agonist to evoke Ca^{2+} responses (Fig. 5.5D–F). Muscarine (10 μM) induced Ca^{2+} responses in 67.9% of PSCs of WT (36 of 53 PSCs), 48.9% of PSCs for SOD1^{WT} (23 of 47 PSCs), and 50.8% of PSCs for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ (31 of 61 PSCs). Local application of muscarine induced Ca^{2+} responses with a mean of $173.5 \pm 29.5\% \Delta\text{F}/\text{F}$ ($N = 9$, $n = 36$) for the WT, $208.1 \pm 36.8\% \Delta\text{F}/\text{F}$ ($N = 4$, $n = 23$) for SOD1^{WT} , and $200.8 \pm 28.0\% \Delta\text{F}/\text{F}$ ($N = 8$, $n = 31$) for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ (Fig. 5.5D). These responses were not statistically different (Fig. 5.5E; one-way ANOVA, $p = 0.6294$). Similar results were obtained when ACh was locally applied (data not shown). We also tested whether PSC detection reflected MN properties. Similar to our observation using ATP local applications, we found no significant difference between Ca^{2+} response amplitude from PSCs associated with Type I fibers for WT and $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice (Fig. 5.5F; $N = 5$, $n = 19$ for WT and $N = 5$, $n = 11$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.2081$) and Type IIa fibers (Fig. 5.5F; $N = 5$, $n = 13$ for WT and $N = 4$, $n = 14$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.9285$).

Together, these results indicate that PSC receptors are present and functional in this ALS mouse model at P120. Moreover, the PSC detection of local application of agonist appears normal, and this cannot explain the difference in PSC Ca^{2+} response evoked by synaptic activity.

PSC muscarinic detection of synaptic transmission is enhanced in mutant SOD1 mice at P120

The lack of difference in Ca^{2+} responses of WT and SOD1^{G37R} mice could be explained by the fact that local applications of agonist activated PSC synaptic and extrasynaptic receptors, whereas nerve-evoked Ca^{2+} responses were induced by a subset of receptors during synaptic communication. This mechanism is at play to allow PSCs to distinguish two competing terminals at poly-innervated NMJs (Darabid et al., 2013). If this was the case, selective antagonism of each type of receptor should differentially alter PSC nerve-evoked Ca^{2+} responses of SOD1^{G37R} compared with WT. Because of the rundown of Ca^{2+} responses (Jahromi et al., 1992; Rochon et al., 2001), each preparation was stimulated once and amplitude of Ca^{2+} responses elicited by nerve stimulation presented in Figure 5.2B was used as control.

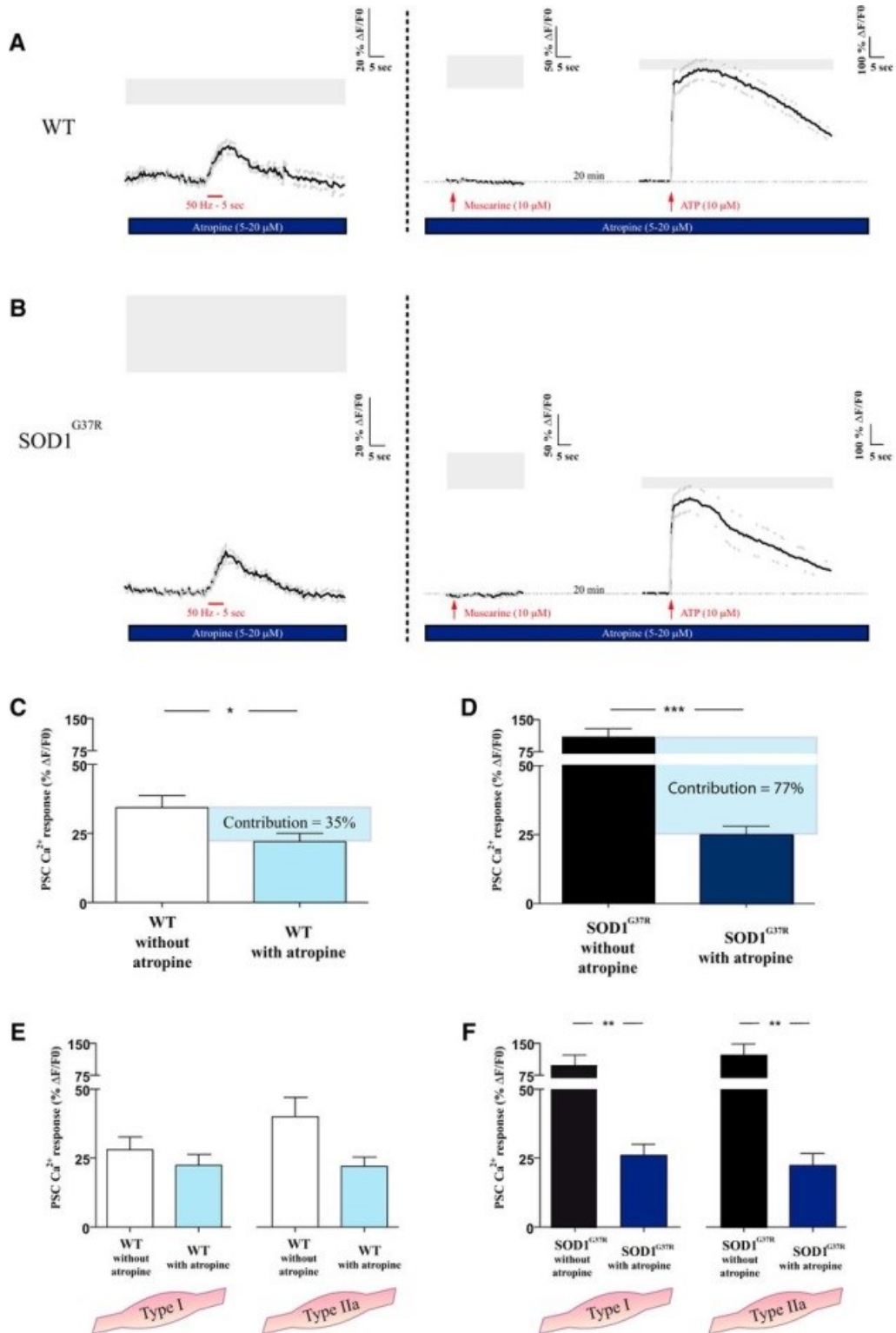
First, we examined the impact of purinergic receptor blockade using broad-spectrum P2 receptor antagonists (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid and suramin) and RB2 as a general P2_Y receptor antagonist. Consistent with our previous observations (Rochon et al., 2001), there were no clear purinergic mechanisms that were identified in PSCs of either WT or SOD1^{G37R} NMJs (data not shown). This suggests that, in the experimental conditions tested, activation of PSC purinergic contribution would be produced by other ATP-dependent mechanisms that still remain unidentified (Rochon et al., 2001).

Second, we examined the impact of mAChR blockade on nerve-evoked Ca^{2+} responses because they are the main receptor system through which PSCs are activated in adult NMJs (Rochon et al., 2001). Before testing the contribution of the PSC mAChR during synaptic transmission, we performed local application of agonists on PSC soma in the presence of the general mAChR antagonist atropine (5-20 μM) applied in the bath. As shown in Figure 5.6A, B, the presence of atropine completely abolished Ca^{2+} responses elicited by muscarine in all cells tested (N = 4, n = 10 for WT mice and N = 4, n = 8 for SOD1^{G37R} mice) but did not prevent PSC Ca^{2+} responses elicited by local application of ATP on the same cells. This suggests that atropine was specific for PSC mAChRs and did not interfere with the ability of PSCs to produce large Ca^{2+} responses. This blockage was reversible because Ca^{2+} responses were elicited by muscarine application following 45 min of washout (data not shown; N = 3, n = 3).

Activation of PSCs during synaptic transmission is known to be blocked by atropine (Rochon et al., 2001). As shown in Figure 5.6A, C, PSC Ca^{2+} responses of WT mice were significantly smaller in the presence of atropine ($22.2 \pm 2.8\% \Delta\text{F}/\text{F}$ in atropine, $N = 10$, $n = 15$ vs $34.3 \pm 4.3\% \Delta\text{F}/\text{F}$ in control, $N = 10$, $n = 22$; unpaired t test, $p = 0.0433$). This represented a 35% contribution of the muscarinic signaling pathway during synaptic transmission. From all tested NMJs, 50% of PSCs responded to motor nerve-evoked release of neurotransmitters in the presence of atropine (15 of 30 PSCs). No significant difference was found in PSC Ca^{2+} responses in WT mice in association with Type I and Type IIa fiber types (Fig. 5.6E; MHC-I: $N = 4$, $n = 8$ for WT without atropine and $N = 6$, $n = 9$ for WT with atropine, unpaired t test, $p = 0.3661$; MHC-IIa: $N = 7$, $n = 12$ for WT without atropine and $N = 4$, $n = 6$ for WT with atropine, unpaired t test, $p = 0.1075$).

Similar to WT NMJs, blockage of mAChR with atropine on $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ NMJs also reduced the amplitude of Ca^{2+} responses induced by nerve-evoked transmitter release (Fig. 5.6B). However, this reduction was much more pronounced than in the WT (atropine, $24.9 \pm 3.0\% \Delta\text{F}/\text{F}$, $N = 11$, $n = 25$; control, $108.9 \pm 18.1\% \Delta\text{F}/\text{F}$, $N = 9$, $n = 22$; unpaired t test, $p < 0.0001$). This represented a 77% contribution of muscarinic signaling during synaptic transmission. From all tested NMJs, 78% of PSCs responded to neurotransmitter release in the presence of atropine (25 of 32 PSCs). Interestingly, the remaining amplitude of PSCs Ca^{2+} responses in the presence of atropine was comparable for WT and $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ (Fig. 5.6C,D). Furthermore, because NMJ associated with fast fatigue-resistant MN and Type IIa fiber will degenerate first in the SOL during disease progression and PSC mAChR inactivation is required to repair the synapse, one would expect that PSC muscarinic contribution in these fibers to be lower than the one from fiber Type I. However, we found a significant difference between the average PSCs Ca^{2+} responses from $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice with and without atropine associated with fiber Type I (3.7-fold) and fiber Type IIa (5.5-fold) (Fig. 5.6F; MHC-I: $N = 4$, $n = 9$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ without atropine and $N = 7$, $n = 17$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ with atropine, unpaired t test, $p = 0.0013$; MHC-IIa: $N = 4$, $n = 8$ and for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ with atropine and $N = 5$, $n = 8$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ with atropine, unpaired t test, $p = 0.0022$).

Figure 5.6 Larger contribution of mAChR activation of PSCs during synaptic transmission in SOD1^{G37R} mice



PSC Ca^{2+} responses evoked by motor nerve stimulation in the presence of atropine (5-20 μM) for WT (A) and SOD1^{G37R} (B) mice. No Ca^{2+} responses were elicited in PSCs by local application of muscarine in the presence of atropine while responses were still elicited by local application of ATP. Dark trace represents the average of PSC Ca^{2+} responses. Dotted line indicates the SEM. Gray boxes represent the mean \pm SEM of the amplitude of the Ca^{2+} responses elicited by nerve stimulation or agonist application without atropine. Histogram depicting the mean \pm SEM of the amplitude of the Ca^{2+} responses elicited in PSCs by transmitter release evoked by motor nerve stimulation (50 Hz, 5 s) during bath application of mAChR antagonist (atropine, 5-20 μM) for WT (C) and SOD1^{G37R} (D) mice. Histogram depicting the mean \pm SEM of the amplitude of the Ca^{2+} responses elicited in PSC by motor nerve stimulation in presence of atropine as a function of each fiber type for WT (E) and SOD1^{G37R} (F) mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

As a whole, our data show that major synaptic alterations are already observed at an early stage of the disease (P120), particularly in Type I fibers, whereas PSCs show a muscarinic hyperactivation in both Type I and Type IIa fibers. Hence, these results reveal a larger contribution of PSC mAChR during synaptic communication in SOD1^{G37R} mice that is independent of MN vulnerability at a presymptomatic stage of the disease. All these functional changes took place without any NMJ morphological alterations. These data suggest that ALS-associated events start long before symptom onset and involve several elements at the NMJ.

Enhanced neurotransmitter release in SOD1^{G37R} mutants in the soleus muscle at P380

To determine whether the observed alterations progress in the course of the disease or are simply transient, we further examined the properties of NMJ at an age close to the disease onset.

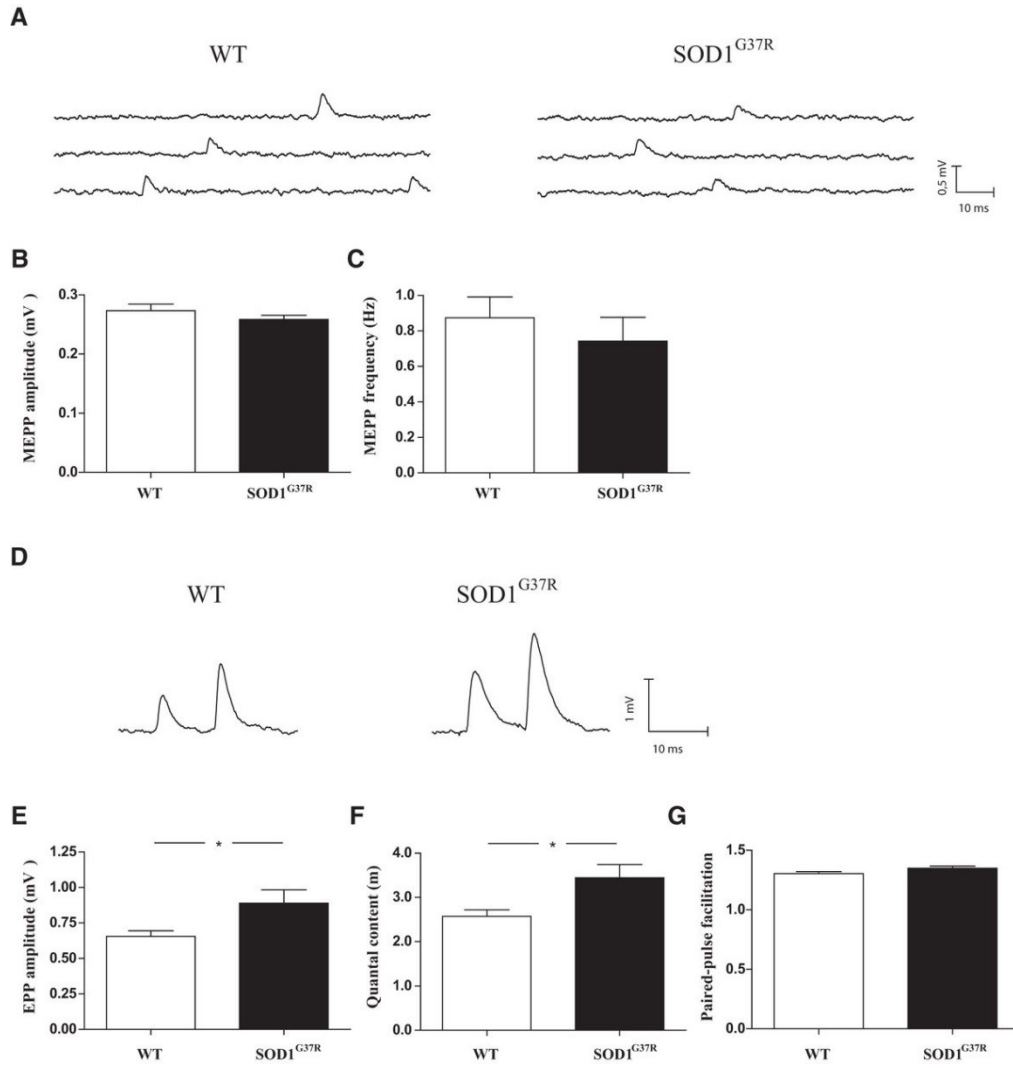
First, we evaluated the synaptic properties of SOD1^{G37R} mice at P380. We observed no difference in MEPP amplitude between WT and SOD1^{G37R} mice (WT, 0.27 ± 0.01 mV, $N = 7$, $n = 21$; SOD1^{G37R}, 0.26 ± 0.01 mV, $N = 8$, $n = 22$; unpaired t test, $p = 0.2672$; Fig. 5.7A,B). Surprisingly, unlike P120, no difference in MEPP frequency was observed in the SOL muscle

of the SOD1^{G37R} mice at P380 where it was 0.88 ± 0.12 Hz for the WT mice and 0.74 ± 0.13 Hz for the SOD1^{G37R} mice (Fig. 5.7A,C; N = 6, n = 17 for WT and N = 7, n = 15 for SOD1^{G37R}, unpaired t test, p = 0.4601). Importantly, no difference in MEPP frequency and amplitude was observed between WT and SOD1^{G37R} mice in Type I fibers and Type IIa fibers (data not shown).

The properties of nerve-evoked synaptic activity of NMJs from mice at P380 were similar to the ones at P120 (stimulation at 0.2 Hz) where amplitude of nerve-evoked EPPs in the SOD1^{G37R} (0.89 ± 0.09 mV, N = 8, n = 23) was significantly larger than WT (0.66 ± 0.04 mV, N = 9, n = 28) (Fig. 5.7D,E; unpaired t test, p = 0.0184). Importantly, a difference in EPP amplitude was observed between WT and SOD1^{G37R} mice in Type I fibers (data not shown; N = 5, n = 11, 0.68 ± 0.07 Hz for WT and N = 5, n = 9, 1.05 ± 0.08 Hz for SOD1^{G37R}, unpaired t test, p = 0.0017) but not in Type IIa fibers (N = 5, n = 10, 0.63 ± 0.05 Hz for WT and N = 5, n = 6, 0.62 ± 0.03 Hz for SOD1^{G37R}, unpaired t test, p = 0.8234).

Third, and consistent with these observations, quantal content of NMJs from SOD1^{G37R} mice (3.45 ± 0.29 , N = 8, n = 22) was significantly higher compared with WT (2.57 ± 0.15 , N = 7, n = 21) (Fig. 5.7F; unpaired t test, p = 0.0092). Although the quantal content in Type I fibers was significantly higher in the SOD1^{G37R} than in the WT mice (data not shown; N = 5, n = 9, 2.85 ± 0.20 for WT and N = 5, n = 9, 3.97 ± 0.31 for SOD1^{G37R}, unpaired t test, p = 0.0084), no difference was observed in Type IIa fibers (data not shown; N = 5, n = 9, 2.40 ± 0.25 for WT and N = 5, n = 6, 2.51 ± 0.12 for SOD1^{G37R}, unpaired t test, p = 0.7260). Again, similar to the P120 data, the SOD1^{G37R} NMJs had a PPF value similar to the control group (Fig. 5.7G; WT, 1.31 ± 0.02 , N = 9, n = 28; SOD1^{G37R}, 1.35 ± 0.02 , N = 8, n = 23; unpaired t test, p = 0.073).

Figure 5.7 Enhanced synaptic transmission at NMJs from SOD1^{G37} mice at preonset stage of the disease



A, Traces of spontaneous activity (MEPPs) recorded from WT and SOD1^{G37R} NMJs. Histogram showing the mean \pm SEM of the amplitude (**B**) and the frequency (**C**) of MEPP events. **D**, Examples of EPPs evoked by paired-pulse stimulation (10 ms interval) from WT and SOD1^{G37R} NMJs. **E**, Histogram showing the mean \pm SEM of the amplitude of the first EPP. **F**, Histogram showing the quantal content determined as the ratio of EPP amplitude/mEPP amplitude. NMJs from SOD1^{G37R} mice had a larger quantal content. **G**, Histogram showing the PPF determined as the mean amplitude of the second EPPs divided by the mean amplitude of the first EPPs. * $p < 0.05$.

As a whole, electrophysiological data at a preonset age (P380) indicate that most synaptic properties observed very early on in the disease process were maintained throughout the nonsymptomatic phase of the disease.

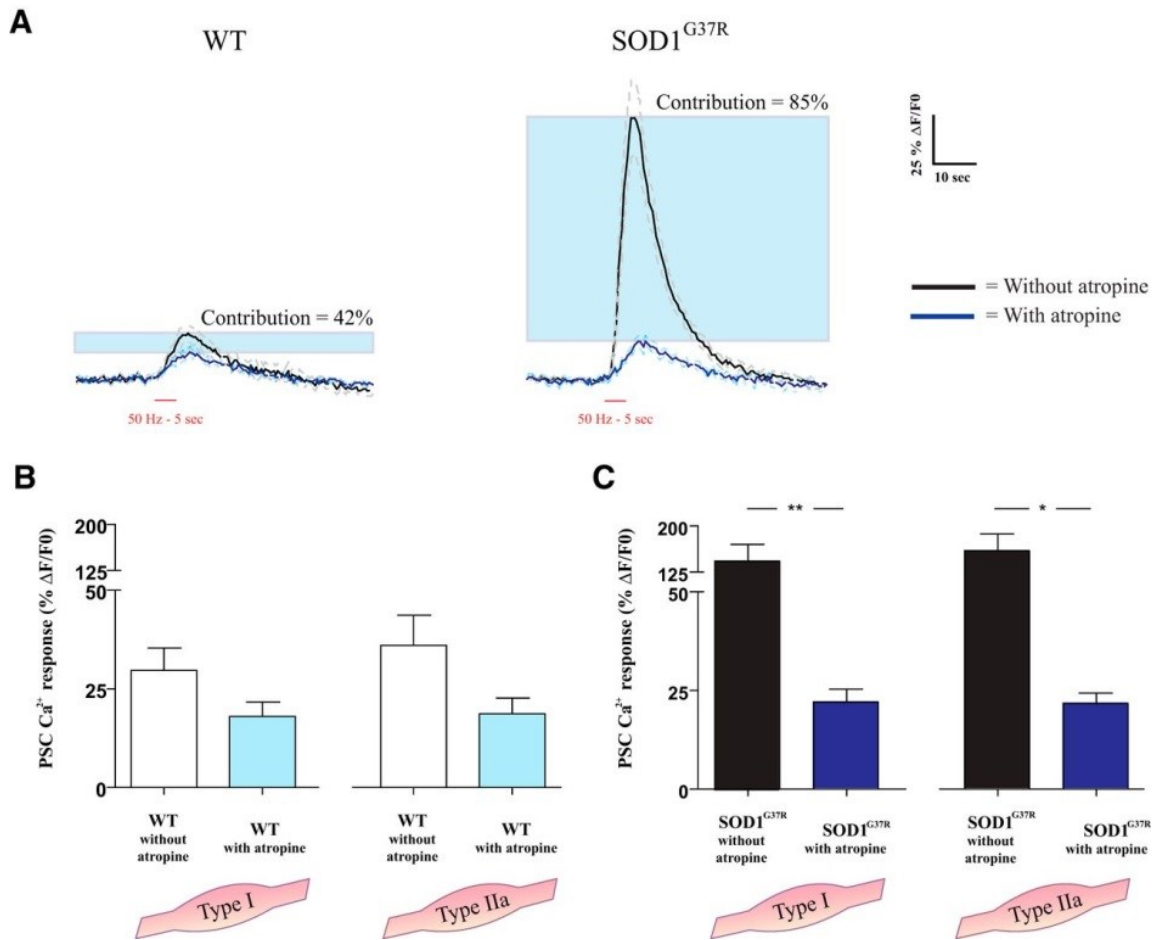
Excitability of PSCs remains altered just before the onset of the disease

The ability of PSCs to detect and decode synaptic transmission is critical for their proper role in modulating synaptic function and maintenance (Ko and Robitaille, 2014). Hence, we evaluated whether the ability of PSCs to decode synaptic activity were altered at the preonset stage of the disease.

Using the same motor nerve stimulation (50 Hz for 5 s), we observed that endogenous release of neurotransmitter induced Ca^{2+} responses in PSCs at NMJs of $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice ($145.4 \pm 19.3\% \Delta\text{F}/\text{F}$) that were significantly larger than in WT ($31.3 \pm 4.1\% \Delta\text{F}/\text{F}$) (Fig. 5.8A; $N = 10$, $n = 15$ for WT and $N = 17$, $n = 39$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.0006$). These results indicate that PSCs at NMJs of an ALS mouse model still detected transmitter release at a preonset stage of the disease but with a persistent enhanced excitability and propensity to respond to synaptic activity (WT: 31%, 15 of 48 PSCs activated; $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$: 51%, 39 of 76 activated PSCs). PSC Ca^{2+} responses of WT and SOD1 mice were not different from the ones observed at P120 (unpaired t test: for WT, $p = 0.6320$ and for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, $p = 0.2155$).

We next tested whether PSC excitability reflected MN properties. As shown in Figure 5.8B, C, Ca^{2+} response amplitude from $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ was 4.4- to 4.8-fold larger than WT for each fiber type (MHC-I: $N = 6$, $n = 9$ for WT and $N = 5$, $n = 17$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.0098$) (MHC-IIa: $N = 4$, $n = 5$ for WT and $N = 12$, $n = 20$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.0413$). Together, again, these results suggest that alterations in PSC Ca^{2+} responses do not correlate with the predicted and specific vulnerability of MNs before the onset of the disease.

Figure 5.8 Altered PSC excitability at preonset stage of the disease



A, Dark traces represent the mean \pm SEM of the Ca²⁺ responses elicited in PSCs by transmitter release evoked by motor nerve stimulation (50 Hz, 5 s) at NMJs of WT and SOD1^{G37R}. Larger Ca²⁺ responses were elicited in PSCs of NMJs from SOD1^{G37R} mice (unpaired t test, $p = 0.0006$). Blue traces represent the mean \pm SEM of the PSC nerve-evoked (50 Hz, 5 s) Ca²⁺ responses in presence of atropine (20 μ M) for WT and SOD1^{G37R} mice. PSC Ca²⁺ responses of WT (unpaired t test, $p = 0.0129$) and SOD1 mice (unpaired t test, $p = 0.0016$) were significantly smaller in the presence of atropine; this represents a 42% and 85% contribution of muscarinic signaling during synaptic transmission, respectively. **B**, Histograms depicting the mean \pm SEM of the amplitude of the Ca²⁺ responses elicited in PSCs by motor nerve stimulation in the presence of atropine depending of each type of fiber for WT and SOD1^{G37R} (**C**) mice. The altered PSC-detecting ability did not correlate with MN vulnerability at a preonset stage of the disease. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Persistent alteration of the PSC muscarinic detection in mutant SOD1 mice.

Results described above showed that the muscarinic activation of PSCs was higher at NMJs of SOD1 mutant mice at an early stage of the disease. We wondered whether PSCs retained that property at preonset, a time when synaptic denervation becomes more prominent.

As shown in Figure 5.8A, PSC Ca^{2+} responses of WT mice were significantly smaller in the presence of atropine ($18.3 \pm 2.6\% \Delta\text{F}/\text{F}$ in atropine, $N = 11$, $n = 15$ vs $31.3 \pm 4.1\% \Delta\text{F}/\text{F}$ in control, $N = 10$, $n = 15$; unpaired t test, $p = 0.0129$). This represents a 42% contribution of the muscarinic signaling pathway during synaptic transmission. From all tested NMJs, 37% of PSCs responded to motor nerve-evoked release of neurotransmitters in the presence of atropine (15 of 41 PSCs). No significant difference was found in PSC Ca^{2+} responses in WT mice in association with Type I and Type IIa fiber types (Fig. 5.8B; MHC-I: $N = 6$, $n = 9$ for WT without atropine and $N = 7$, $n = 8$ for WT with atropine, unpaired t test, $p = 0.0998$; MHC-IIa: $N = 4$, $n = 5$ for WT without atropine and $N = 5$, $n = 7$ for WT with atropine, unpaired t test, $p = 0.0561$).

Similar to WT NMJs, blockage of mAChR with atropine on SOD1^{G37R} NMJs also reduced the amplitude of Ca^{2+} responses induced by nerve-evoked transmitter release (Fig. 5.8A). However, this reduction was much more pronounced than in the WT (atropine, $21.9 \pm 2.2\% \Delta\text{F}/\text{F}$, $N = 10$, $n = 15$; control, $145.4 \pm 19.3\% \Delta\text{F}/\text{F}$, $N = 17$, $n = 39$; unpaired t test, $p = 0.0016$). This represents a 85% contribution of muscarinic signaling during synaptic transmission. From all tested NMJs, 36% of PSCs responded to neurotransmitter release in the presence of atropine (15 of 42 PSCs). Again, we found a significant difference between the average PSC Ca^{2+} responses from SOD1^{G37R} mice with and without atropine associated with fiber Type I (6.4-fold) and fiber Type IIa (7.4-fold) (Fig. 5.8C; MHC-I: $N = 5$, $n = 17$ for SOD1^{G37R} without atropine and $N = 6$, $n = 9$ for SOD1^{G37R} with atropine, unpaired t test, $p = 0.0061$; MHC-IIa: $N = 12$, $n = 20$ for SOD1^{G37R} without atropine and $N = 5$, $n = 6$ for SOD1^{G37R} with atropine, unpaired t test, $p = 0.0139$).

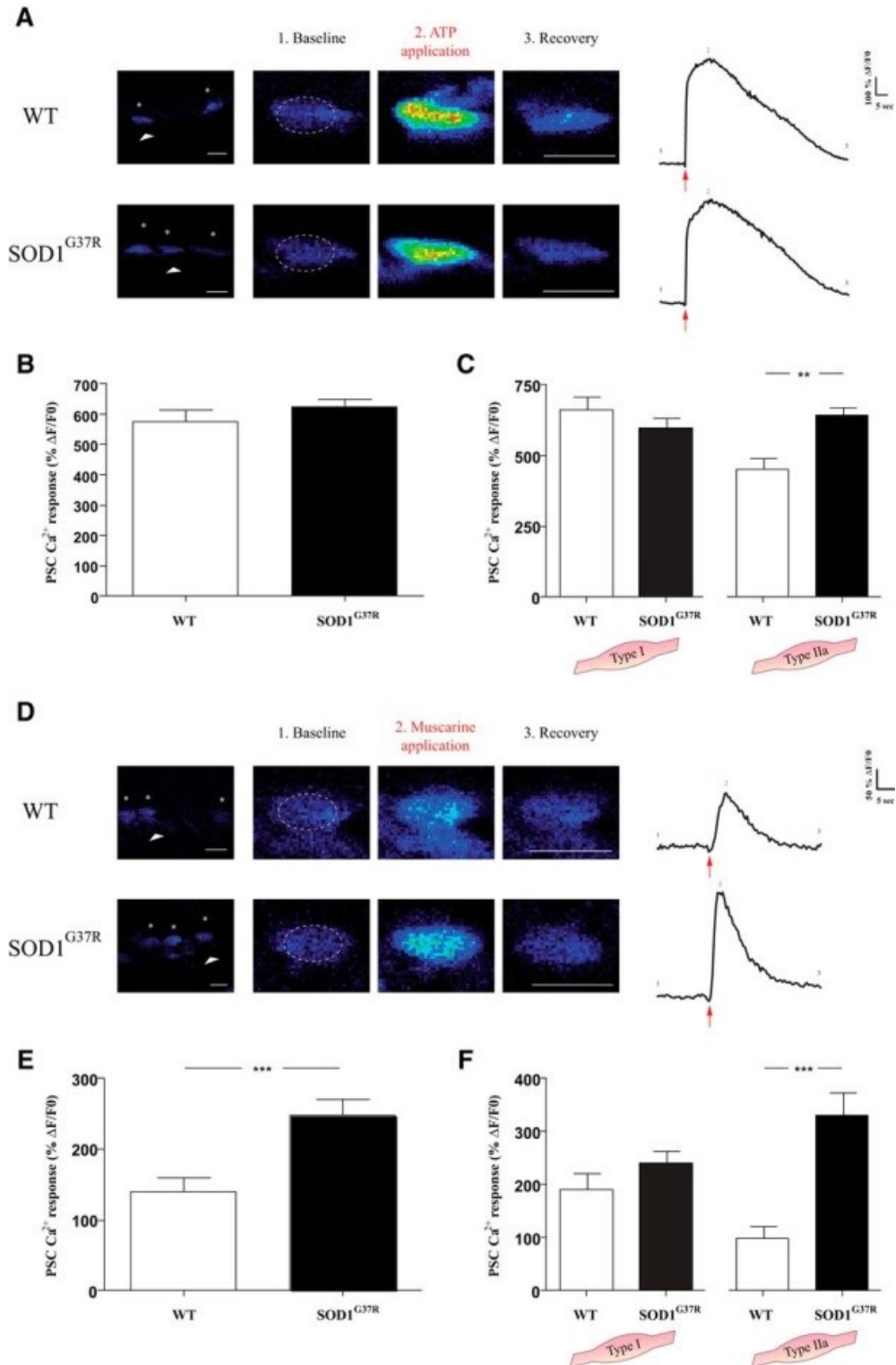
As a whole, these results reveal a larger contribution of PSC mAChR during synaptic communication in SOD1^{G37R} mice at P380, which remains independent of the known MN vulnerability.

PSC ability to detect muscarinic signals is altered at P380

PSC sensitivity to direct application of muscarinic and purinergic agonists was unaltered at P120. However, a fundamental prerequisite for PSCs to adapt their phenotype to the state of the NMJ (i.e., innervated vs denervated or mature vs immature) is to increase the sensitivity of the purinergic receptor signaling and lower the ones of the mAChRs (Darabid et al., 2013). We performed local applications of ATP and muscarine to test whether PSC sensitivity may be altered at a preonset period of the disease.

Local application of ATP (10 μ M) induced Ca^{2+} responses in 100% of PSCs with a mean of $576.1 \pm 38.7\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ (N = 8, n = 22) for the WT and $625.2 \pm 24.1\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$ (N = 6, n = 29) for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ (Fig. 5.9A,B; no significant difference, unpaired t test, p = 0.2649). Also, we found no significant difference in Ca^{2+} responses associated with Type I fibers (Fig. 5.9C; N = 4, n = 13 for WT and N = 4, n = 11 for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, p = 0.3097). Interestingly, we did find an increased Ca^{2+} responses in association with Type IIa fibers (N = 5, n = 9 for WT and N = 5, n = 18 for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, p = 0.0012).

Figure 5.9 PSC Ca^{2+} responses to local application of ATP and muscarine at preonset stage of the disease



A, False color confocal images of PSCs (*) loaded with fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-4 AM, before (baseline), during (ATP application), and after (recovery) local ATP applications at NMJs of WT and $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$. Representative changes in fluorescence are illustrated on the right for the PSCs indicated by the arrowhead. Higher magnification of PSCs marked with the arrowhead in left are illustrated on the three other images for each group. **B**, Histogram depicting the mean \pm SEM of the amplitude of the Ca^{2+} responses elicited in PSCs by ATP application. **C**, Histograms depicting the mean \pm SEM of the amplitude of the Ca^{2+} responses elicited in PSC by ATP as a function of each fiber type. **D-F**, Similar representation as in A-C, but for muscarine application. Note the statistical difference between the different animal groups for the muscarine application and for the PSC Ca^{2+} responses associated with fiber Type IIa for ATP and muscarine application. Scale bar, 10 μm . *** $p < 0.001$.

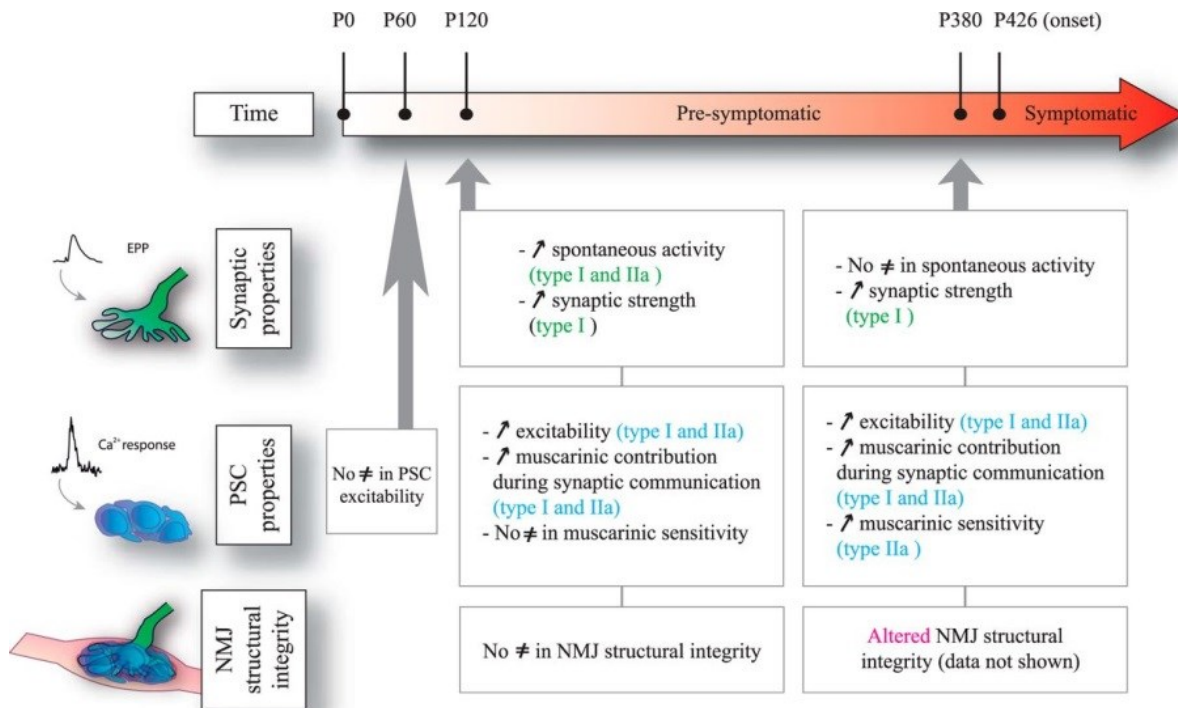
We next investigated the ability of a muscarinic agonist to evoke Ca^{2+} responses (Fig. 5.9D-F). Local application of muscarine (10 μM) induced Ca^{2+} responses in 69.6% of PSCs of WT (32 of 46 PSCs) and 56.5% of PSCs for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ (52 of 92 PSCs). Average of Ca^{2+} responses was $139.5 \pm 20.0\% \Delta\text{F}/\text{F}$ ($N = 9$, $n = 32$) for the WT and $248.6 \pm 21.5\% \Delta\text{F}/\text{F}$ ($N = 10$, $n = 52$) for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ (Fig. 5.9D). These responses were statistically different (Fig. 5.9E; unpaired t test, $p = 0.0009$). Finally, we tested whether PSC detection reflected MN vulnerability. Similar to our observation with ATP activation, we found no significant difference between Ca^{2+} response amplitude from PSCs associated with Type I fibers for WT and $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice (Fig. 5.9F; $N = 7$, $n = 15$ for WT and $N = 7$, $n = 36$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p = 0.2339$). However, we observed a significant increase in the amplitude of Ca^{2+} responses from PSCs associated with Type IIa fibers (Fig. 5.9F; $N = 6$, $n = 14$ for WT and $N = 5$, $n = 12$ for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$, unpaired t test, $p < 0.0001$).

Together, our results show that, close to symptom onset, NMJ synapses undergo persistent alterations of the synaptic functions whereby synaptic strength remains elevated only in Type I fibers, although spontaneous events are no longer enhanced. However, not only the glial alterations are maintained until the preonset in both fiber types, but an additional enhanced muscarinic sensitivity appeared in PSCs of Type IIa fibers.

As summarized in Figure 5.10, our results show that altered synaptic properties are maintained from an early, nonsymptomatic period, up to a preonset period. However, the glial

alterations seem to correlate more with the disease progression. Indeed, PSC decoding abilities were unaltered at P60, whereas PSC excitability was enhanced at P120 through enhanced muscarinic activation. These features were maintained at P380, but an additional enhanced muscarinic contribution was unraveled only in Type IIa fibers, the ones that are more vulnerable to denervation.

Figure 5.10 Timeline of changes in NMJ structure and function at presymptomatic stages of the disease in SOL muscle



Summary of the changes in the presynaptic properties (top), PSC properties (middle), and the morphological features (bottom) is presented as a function of the age of the animals. It shows that synaptic properties are observed early and only in Type I fibers and maintained throughout. However, PSC properties are altered in both fiber types and further evolve at a presymptomatic stage. Morphological features are normal at P120 but altered at the presymptomatic stage. \uparrow indicates a significant increase in SOD1 compared with WT, and “No \neq ” indicates that there was no statistical difference.

5.2.5 DISCUSSION

Using SOD1^{G37R} mice, we report an inappropriate PSC decoding ability based on enhanced activation of mAChRs present early in the disease process (P120) and progressed until the preonset period of the disease (P380). Alteration of PSC mAChR functions is of particular importance because of their regulation of NMJ stability and repair. Our data suggest that the phenotype of PSCs is inconsistent with NMJ plasticity and repair, a condition that NMJs will necessarily undergo in ALS. To our knowledge, this is the earliest, persistent change reported in this mouse model (Ezzi et al., 2010; Filali et al., 2011).

Differential alteration of presynaptic and glial properties in ALS

The abnormal nerve-evoked synaptic properties remained throughout the adulthood life of the animal, which is particularly striking considering that SOL has a delayed degeneration in ALS (Frey et al., 2000; Atkin et al., 2005; Pun et al., 2006; Hegedus et al., 2007; Valdez et al., 2012). The abnormalities in the presynaptic functions in SOD1^{G37R} mice described here are consistent with the ones of the diaphragm preparation from SOD1^{G93A} mice at a presymptomatic stage of the disease (Rocha et al., 2013), a muscle with the same fiber composition as the SOL (Zardini and Parry, 1994; Gregorevic et al., 2008). Interestingly, others found that synaptic transmission was reduced at NMJs of fast twitch muscles of larval zebrafish carrying TDP-43 or FUS mutations (Armstrong and Drapeau, 2013a, b). Hence, it would be important to determine the properties of PSCs in a fast-twitch muscle knowing that PSCs at NMJs of different muscles have different properties (Rousse et al., 2010).

Similar to the hyperexcitability of mutant SOD1^{G93A} spinal MN in culture and from organotypic slices (Pieri et al., 2003; Kuo et al., 2004), we observed an enhanced excitability and synaptic strength of the nerve terminal of SOD1^{G37R}. Interestingly, recent data suggest that the higher resilience to the disease of fast fatigue-resistant and slow MNs is related to higher MN excitability (Saxena et al., 2013). Our results support this possibility because the quantal content of the slow MN alone (the more disease-resistant ones) was significantly higher in the SOD1^{G37R} mice. Furthermore, increased MEPP frequency at P120 has been observed in motor endplate disease, a hereditary disorder of NMJs caused by a progressive failure of neurotransmission (without denervation), muscle inactivity, and atrophy (Duchen and Stefani,

1971). Our data are also consistent with increased MEPP frequency (Uchitel et al., 1988; Appel et al., 1991) and quantal content at the mouse NMJ (O'Shaughnessy et al., 1998) induced by immunoglobulins from ALS patients. A common mechanism may be related to presynaptic Ca^{2+} -dependent regulation (Uchitel et al., 1988; Appel et al., 1991; O'Shaughnessy et al., 1998; Armstrong and Drapeau, 2013a; Rocha et al., 2013) because of the larger Ca^{2+} accumulation in motor nerve terminals from ALS patients (Siklós et al., 1996) and the greater Ca^{2+} influx in nerve terminals that release more neurotransmitters (Pawson and Grinnell, 1990). However, the normal MEPP frequency observed at P380 is not consistent with this possibility, pointing to another molecular mechanism of exocytosis.

Unlike the abnormal synaptic properties, changes in PSC properties were first observed at P120 and evolved during the course of the disease. Indeed, PSC muscarinic and purinergic sensitivity increased with age in an MN vulnerability-dependent manner. Interestingly, similar to neurons, PSCs undergo plastic changes following an alteration of synaptic activity (Bélair et al., 2010), resulting in changes of receptor contribution and sensitivity. For instance, PSC purinergic receptor contribution is increased and the muscarinic one decreased in conditions when morphological plasticity is required, such as NMJ maturation (Darabid et al., 2013) and after nerve injury (Georgiou et al., 1999, 1994, Perez and Robitaille, personal communication).

Interestingly, there is an important mismatch between the synaptic and the PSC properties of NMJs on Type I and Type IIa MNs. Indeed, although synaptic output was only higher for Type I MNs, PSCs muscarinic excitability was high in both types. Although this glial feature would help maintain NMJs during ALS pathogenesis and be consistent with the stability of the Type I NMJs, it appears detrimental for the Type IIa. Indeed, permissiveness of PSCs for NMJ repair requires a reduced muscarinic receptor activity (Darabid et al., 2014). However, although Type IIa MNs are targeted before Type I, PSCs at these NMJs still present a high muscarinic sensitivity close to the disease onset. Hence, this imbalance of PSC receptors appears as a limiting factor for NMJ repair in ALS.

Overall, our data indicate that the synaptic properties alterations are present early and appear maintained until the disease onset, whereas PSC properties gradually evolve and worsen toward disease onset. In addition, our data indicate that functional changes in synaptic and glial activities are more sensitive indicators of the state of NMJ functions in ALS than are

the morphological characteristics, the former appearing several months before the latter. Hence, it would be important to develop tools to measure these properties, providing a more sensitive readout of the NMJ functions and an earlier detection of NMJ dysfunctions.

Impact of PSC abnormalities in ALS

The roles of axonal Schwann cells in ALS were studied using selective expression or knock-out of mutant SOD1 in these cells (Lobsiger et al., 2009; Turner et al., 2010; Wang et al., 2012). However, these studies were not designed to specifically assess PSC contributions in ALS pathogenesis. This is important considering that PSCs are quite different from axonal Schwann cells based on their properties and functions at the NMJ (Auld and Robitaille, 2003).

Implication of glial cells at the NMJ in ALS remains ill-defined, although the involvement of glial cells in MN death has received strong support and selective rescue of MN death only modestly delayed denervation and improved lifespan (Gould et al., 2006). An interesting possibility is that the adverse relationship between glial cells and MNs in the spinal cord in ALS may be replicated at the NMJ (Carrasco et al., 2010). Indeed, using whole-muscle transplants in SOD1^{G93A} mice, Carrasco et al. (2010) hypothesized that the properties of nerve terminal and PSCs, and not the muscle transplant, were determinant for the degenerative changes observed at the NMJ. This suggests that interactions between PSCs and motor nerve terminal are crucial to understand how the degenerative changes begin and progress at NMJs in ALS.

Detrimental consequences for the stability and repair of the NMJ in ALS may emerge from the altered PSC decoding ability and mAChR sensitivity. For instance, the larger activation of PSC mAChR during synaptic transmission at P120 and P380 in SOD1 mutants implies that their detection threshold is decreased, which could maintain their muscarinic activation even in conditions of reduced synaptic activity. This would maintain gene expression compatible with NMJ maintenance, preventing PSCs to switch to the repair phenotype needed when denervation occurs. One possibility is that the formation and/or extension of PSC processes may be altered. However, our observations and those of others (Frey et al., 2000; Gould et al., 2006) argue against this suggestion because PSC processes have been observed in ALS mouse models. Another interesting possibility is that the guidance of the motor nerve terminal and the remodeling/stabilization of the new synapse may be

altered (Kang et al., 2014). An altered propensity to repair and reform NMJs following nerve injury in ALS models supports this possibility (Gordon et al., 2004). Furthermore, the clearance of debris (Kang and Lichtman, 2013) and lack of metabolic support can also be involved (Moloney et al., 2014). Hence, we postulate that the inadequate muscarinic activation of PSCs leads to an improper repair of NMJ structure and function during the course of the disease.

Potential mechanisms underlying an increased muscarinic excitability

The inadequate mAChR activation of PSC may have several origins. The distribution and density of the mAChRs on PSC processes close to active zones and/or changes in the functionality of the receptor *per se* can be altered. Other mechanisms may include changes in the receptor subtypes on PSC (M1, M3 and M5) (Wright et al., 2009; Darabid et al., 2013), affinity, insertion, and recycling or their association with internal molecular machinery activating different downstream signaling pathways.

Another interesting mechanism is that the soluble SOD1^{G37R} protein impacts on mAChR functionality. Indeed, it was suggested that soluble SOD1 protein interacts with cellular membrane and alter muscarinic receptor activation of phospholipase C pathway (Damiano et al., 2013).

5.2.6 CONCLUSION

In conclusion, because of their roles in regulating the balance between synaptic efficacy, maintenance, and repair following injury, the enhanced mAChR activation of PSCs would impinge the quality and reliability of NMJ repair during ALS progression. Future demonstration of this PSC malfunction as a potential contributor to ALS and also in other ALS models (e.g., TDP-43 and/or FUS) will highlight the importance and broad implication of such mechanisms. Our study is the first direct evidence of glial alteration at the NMJ despite the importance of NMJ malfunction and the reported involvement of other glial cells in ALS. The intrinsic PSC properties could represent a very important and novel therapeutic target in ALS.

5.2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Canadian Institutes for Health Research Grants MOP-14137, MOP-111070, a Bernice Ramsay Discovery grant from ALS Society of Canada, Canadian Foundation of Innovation to R.R., and Fonds Recherche Quebec-Santé Leader Opportunity Fund to the Groupe de recherche sur le Système Nerveux Central infrastructure grant. D.A. held a studentship from National Science Engineering Research Council of Canada. E.T. and É.M. each held a Fonds Recherche Quebec-Santé studentship. We thank Dr. Jannic Boehm for comments over the course of this work; Dr. Christine Vande Velde for her constant support, stimulating discussions, and for reading and commenting on the manuscript; and Joanne Vallée and Julie Pépin for technical support. The authors declare no competing financial interests.

5.2.8 REFERENCES

Amendola J, Gueritaud JP, Lamotte d'Incamps B, Bories C, Liabeuf S, Allene C, Pambo-Pambo A, Durand J (2007) Postnatal electrical and morphological abnormalities in lumbar motoneurons from transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol* 145:311–323, pmid:18075124.

Appel SH, Engelhardt JI, García J, Stefani E (1991) Immunoglobulins from animal models of motor neuron disease and from human amyotrophic lateral sclerosis patients passively transfer physiological abnormalities to the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:647–651, doi:10.1073/pnas.88.2.647, pmid:1988960.

Armstrong GA, Drapeau P (2013a) Calcium channel agonists protect against neuromuscular dysfunction in a genetic model of TDP-43 mutation in ALS. *J Neurosci* 33:1741–1752, doi:10.1523/JNEUROSCI.4003-12.2013, pmid:23345247.

Armstrong GA, Drapeau P (2013b) Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS. *Hum Mol Genet* 22:4282–4292, doi:10.1093/hmg/ddt278, pmid:23771027.

Atkin JD, Scott RL, West JM, Lopes E, Quah AK, Cheema SS (2005) Properties of slow- and fast-twitch muscle fibres in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord* 15:377–388, doi:10.1016/j.nmd.2005.02.005, pmid:15833433.

Audet JN, Gowing G, Julien JP (2010) Wild-type human SOD1 overexpression does not accelerate motor neuron disease in mice expressing murine Sod1 G86R. *Neurobiol Dis* 40:245–250, doi:10.1016/j.nbd.2010.05.031, pmid:20573565.

Auld DS, Robitaille R (2003) Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *Neuroscientist* 9:144–157, doi:10.1177/1073858403252229, pmid:12708618.

Bélaïr EL, Vallée J, Robitaille R (2010) In vivo long-term synaptic plasticity of glial cells. *J Physiol* 588:1039–1056, doi:10.1113/jphysiol.2009.178988, pmid:20142269.

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, doi:10.1126/science.1123511, pmid:16741123.

Bories C, Amendola J, Lamotte d'Incamps B, Durand J (2007) Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 25:451–459, doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05306.x, pmid:17284186.

Carrasco DI, Bichler EK, Seburn KL, Pinter MJ (2010) Nerve terminal degeneration is independent of muscle fiber genotype in SOD1 mice. *PLoS One* 5:e9802, doi:10.1371/journal.pone.0009802, pmid:20339550.

Chipman PH, Franz CK, Nelson A, Schachner M, Rafuse VF (2010) Neural cell adhesion molecule is required for stability of reinnervated neuromuscular junctions. *Eur J Neurosci* 31:238–249, doi:10.1111/j.1460-9568.2009.07049.x, pmid:20074227.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr., Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113–117, doi:10.1126/science.1086071, pmid:14526083.

Colomar A, Robitaille R (2004) Glial modulation of synaptic transmission at the neuromuscular junction. *Glia* 47:284–289, doi:10.1002/glia.20086, pmid:15252818.

Damiano S, Petrozziello T, Ucci V, Amente S, Santillo M, Mondola P (2013) Cu-Zn superoxide dismutase activates muscarinic acetylcholine M1 receptor pathway in neuroblastoma cells. *Mol Cell Neurosci* 52:31–37, doi:10.1016/j.mcn.2012.11.001, pmid:23147108.

Darabid H, Arbour D, Robitaille R (2013) Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 33:1297–1313, doi:10.1523/JNEUROSCI.2935-12.2013, pmid:23345206.

Darabid H, Perez-Gonzalez AP, Robitaille R (2014) Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nat Rev Neurosci* doi:10.1038/nrn3821, Advanced online publication. Retrieved Oct. 1, 2014.

Del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560–573, pmid:13175199.

Delestrée N, Manuel M, Iglesias C, Elbasiouny SM, Heckman CJ, Zytnicki D (2014) Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 592:1687–1703, doi:10.1113/jphysiol.2013.265843, pmid:24445319.

Duchen LW, Stefani E (1971) Electrophysiological studies of neuromuscular transmission in hereditary ‘motor end-plate disease’ of the mouse. *J Physiol* 212:535–548, pmid:4323310.

Dupuis L, Loeffler JP (2009) Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr Opin Pharmacol* 9:341–346, doi:10.1016/j.coph.2009.03.007, pmid:19386549.

Ezzi SA, Larivière R, Urushitani M, Julien JP (2010) Neuronal over-expression of chromogranin A accelerates disease onset in a mouse model of ALS. *J Neurochem* 115:1102–1111, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06979.x, pmid:20807312.

Feng Z, Ko CP (2008) The role of glial cells in the formation and maintenance of the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* 1132:19–28, doi:10.1196/annals.1405.016, pmid:18567850.

Filali M, Lalonde R, Rivest S (2011) Sensorimotor and cognitive functions in a SOD1(G37R) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Behav Brain Res* 225:215–221, doi:10.1016/j.bbr.2011.07.034, pmid:21816178.

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. *Exp Neurol* 185:232–240, doi:10.1016/j.expneurol.2003.10.004, pmid:14736504.

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, pmid:10729333.

Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP (1994) Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12:443–455, doi:10.1016/0896-6273(94)90284-4, pmid:7906531.

Georgiou J, Robitaille R, Charlton MP (1999) Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci* 19:3836–3846, pmid:10234016.

Gordon T, Hegedus J, Tam SL (2004) Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease. *Neurol Res* 26:174–185, doi:10.1179/016164104225013806, pmid:15072637.

Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevet D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW (2006) Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26:8774–8786, doi:10.1523/JNEUROSCI.2315-06.2006, pmid:16928866.

Gregorevic P, Meznarich NA, Blankinship MJ, Crawford RW, Chamberlain JS (2008) Fluorophore-labeled myosin-specific antibodies simplify muscle-fiber phenotyping. *Muscle Nerve* 37:104–106, doi:10.1002/mus.20877, pmid:17691104.

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, doi:10.1016/j.nbd.2007.07.003, pmid:17766128.

Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T (2008) Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 586:3337–3351, doi:10.1113/jphysiol.2007.149286, pmid:18467368.

Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069–1077, doi:10.1016/0896-6273(92)90128-Z, pmid:1351731.

Kang H, Lichtman JW (2013) Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young adult and aged animals. *J Neurosci* 33:19480–19491, doi:10.1523/JNEUROSCI.4067-13.2013, pmid:24336714.

Kang H, Tian L, Mikesch M, Lichtman JW, Thompson WJ (2014) Terminal Schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury. *J Neurosci* 34:6323–6333, doi:10.1523/JNEUROSCI.4673-13.2014, pmid:24790203.

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, doi:10.1038/nn.3357, pmid:23542689.

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, doi:10.1002/glia.20836, pmid:19115383.

Ko CP, Robitaille R (2015) in *Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular synapse: adaptable, multitasking glial cells*, eds Barres, Freeman, Stevens (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY).

Kuo JJ, Schonewille M, Siddique T, Schults AN, Fu R, Bär PR, Anelli R, Heckman CJ, Kroese AB (2004) Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J Neurophysiol* 91:571–575, doi:10.1152/jn.00665.2003, pmid:14523070.

Lobsiger CS, Boillée 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, doi:10.1073/pnas.0813339106, pmid:19251638.

Mallart A, Martin AR (1968) The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 196:593–604, pmid:4298821.

Moloney EB, de Winter F, Verhaagen J (2014) ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Front Neurosci* 8:252, doi:10.3389/fnins.2014.00252, pmid:25177267.

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, doi:10.1002/(SICI)1097-4695(19990205)38:2<270::AID-NEU9>3.0.CO%3B2-F, pmid:10022572.

O'Shaughnessy TJ, Yan H, Kim J, Middlekauff EH, Lee KW, Phillips LH, Kim J, Kim YI (1998) Amyotrophic lateral sclerosis: serum factors enhance spontaneous and evoked

transmitter release at the neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 21:81–90, doi:10.1002/(SICI)1097-4598(199801)21:1<81::AID-MUS11>3.0.CO%3B2-3, pmid:9427227.

Pawson PA, Grinnell AD (1990) Physiological differences between strong and weak frog neuromuscular junctions: a study involving tetanic and posttetanic potentiation. *J Neurosci* 10:1769–1778, pmid:2113085.

Pieri M, Albo F, Gaetti C, Spalloni A, Bengtson CP, Longone P, Cavalcanti S, Zona C (2003) Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 351:153–156, doi:10.1016/j.neulet.2003.07.010, pmid:14623129.

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, doi:10.1038/nn1653, pmid:16474388.

Reddy LV, Koirala S, Sugiura Y, Herrera AA, Ko CP (2003) Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron* 40:563–580, doi:10.1016/S0896-6273(03)00682-2, pmid:14642280.

Reist NE, Smith SJ (1992) Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7625–7629, doi:10.1073/pnas.89.16.7625, pmid:1502174.

Reynolds ML, Woolf CJ (1992) Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol* 21:50–66, doi:10.1007/BF01206897, pmid:1346630.

Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847–855, doi:10.1016/S0896-6273(00)80600-5, pmid:9808470.

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. *PLoS One* 8:e73846, doi:10.1371/journal.pone.0073846, pmid:24040091.

Rochon D, Rousse I, Robitaille R (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21:3819–3829, pmid:11356870.

Rousse I, St-Amour A, Darabid H, Robitaille R (2010) Synapse-glia interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties. *Neuroscience* 167:621–632, doi:10.1016/j.neuroscience.2010.02.036, pmid:20188148.

Saxena S, Roselli F, Singh K, Leptien K, Julien JP, 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, doi:10.1016/j.neuron.2013.07.027, pmid:24094105.

Schaefer AM, Sanes JR, Lichtman JW (2005) A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* 490:209–219, doi:10.1002/cne.20620, pmid:16082680.

Siklós L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joó F, Appel SH (1996) Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39:203–216, doi:10.1002/ana.410390210, pmid:8967752.

Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ (1996) Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci* 19:280–285, doi:10.1016/S0166-2236(96)10032-1, pmid:8799973.

Todd KJ, Auld DS, Robitaille R (2007) Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci* 25:1287–1296, doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05385.x, pmid:17355253.

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, doi:10.1523/JNEUROSCI.3165-10.2010, pmid:20810906.

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, doi:10.1093/hmg/ddp550, pmid:20008901.

Uchitel OD, Appel SH, Crawford F, Sczcupak L (1988) Immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients enhance spontaneous transmitter release from motor-nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7371–7374, doi:10.1073/pnas.85.19.7371, pmid:2902629.

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, doi:10.1371/journal.pone.0034640, pmid:22485182.

Wang L, Gutmann DH, Roos RP (2011) Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Hum Mol Genet* 20:286–293, doi:10.1093/hmg/ddq463, pmid:20962037.

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, doi:10.1016/j.nbd.2012.05.014, pmid:22668777.

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, doi:10.1016/0896-6273(95)90259-7, pmid:7605627.

Wright MC, Potluri S, Wang X, Dentcheva E, Gautam D, Tessler A, Wess J, Rich MM, Son YJ (2009) Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses. *J Neurosci* 29:14942–14955, doi:10.1523/JNEUROSCI.2276-09.2009, pmid:19940190.

Yamanaka K, Chun SJ, Boillée 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, doi:10.1038/nn2047, pmid:18246065.

Zardini DM, Parry DJ (1994) Identification, distribution, and myosin subunit composition of Type IIX fibers in mouse muscles. *Muscle Nerve* 17:1308–1316, doi:10.1002/mus.880171110, pmid:7935553.

6. Deuxième article de recherche

6.1 Introduction au deuxième article de recherche

Dans la première étude, nous avons montré que les CSPs ne décodent pas convenablement la communication synaptique à la JNM de souris SOD1. De manière plus importante, l'activation de leurs mAChRs est beaucoup trop élevée par rapport à celle des souris sauvages. Ces résultats suggèrent, d'une part, que la CSP ne serait pas en phase avec la JNM qu'elle innerve et, d'autre part, que les fonctions normalement assurées par ces dernières pourraient être altérées.

Ce mauvais décodage glial, dû à une suractivation muscarinique, pourrait mener à une mauvaise évaluation de l'état d'innervation de la JNM et ainsi confiner la CSP dans un mode fonctionnel inapproprié, limitant ainsi les mécanismes de réparation dépendants des CSPs (extension des prolongements, présence de bourgeonnement de la terminaison axonale, poly-innervation). Ceci est d'un intérêt majeur puisqu'il est connu que les processus de réparation et de compensation sont limités dans la SLA.

Nous avons donc procédé à l'évaluation de la sensibilité des mAChRs sur des JNMs dénervées. Cette expérience clé nous a permis de valider que la sensibilité des mAChRs des CSPs ne s'ajuste pas à l'état d'innervation de la JNM. De plus, nous avons procédé à une analyse morphologique complète des JNMs en se concentrant particulièrement sur les processus de réparation en lien avec les CSPs à un stade symptomatique de la maladie. Bien que la dénervation était déjà présente dans les souris SOD1^{G37R}, nous avons confirmé que le nombre de JNMs associées à ces processus de réparation était similaire à celui des souris sauvages. Puisque ce déficit de réparation est corrélé avec un niveau élevé de sensibilité des mAChRs gliaux, ces résultats suggèrent, d'une part, que les mécanismes de compensation sont altérés dans la SLA et, d'autre part, que de diminuer l'activation des mAChRs des CSPs pourrait avoir un impact bénéfique. Finalement, nous avons mis au point une toute nouvelle technique d'injection intermusculaire afin de réduire *in vivo* l'activation des mAChRs des CSPs. L'évaluation des propriétés synaptiques et gliales a été faite en utilisant à nouveau les techniques d'imagerie calcique, d'enregistrements synaptiques et d'immunohistochimie. Nos

résultats démontrent qu'une diminution spécifique des mAChRs gliaux promeut les mécanismes de réparation dans deux modèles de souris SOD1 (G37R et G93A). Par conséquent, cette étude représente une preuve de concept démontrant que de cibler les propriétés des CSPs pourrait être une option thérapeutique valable afin de favoriser les mécanismes de réparation de la JNM dans un contexte de SLA.

Il est important de mentionner que cet article de recherche est en cours de réalisation. En effet, les expériences ayant un nombre insuffisant d'animaux seront complétées dans les prochains mois. De nouvelles données de forces musculaires et neuromusculaires (via l'utilisation d'un transducteur de force) seront également collectées. Ces dernières données contribueront à donner un impact substantiel à l'étude puisqu'elles feront état d'une valeur fonctionnelle et s'ajouteront aux données morphologiques et physiologiques rapportées.

Dans cet article, j'ai participé à l'élaboration des expériences, j'ai procédé à toutes les expériences impliquant la technique d'imagerie calcique, les marquages d'immunohistochimie et la plupart des expériences d'électrophysiologie. J'ai analysé et interprété les résultats, j'ai fait la grande majorité des injections *in vivo*, j'ai monté les figures et j'ai écrit le manuscrit. Éric Martineau et moi avons fait l'analyse des marquages d'immunohistochimie (Figures 6.2, 6.6, 6.7, S6.3, S6.6, S6.7 et S6.8). Elsa Tremblay a effectué certaines expériences d'électrophysiologie et analysé les résultats (Figure 6.5). Joanne Vallée a effectué quelques injections *in vivo*. Richard Robitaille a participé à l'élaboration des expériences, a analysé les résultats et a écrit le manuscrit. Tous les auteurs ont approuvé la version finale du manuscrit.

Les pages suivantes présentent les résultats tirés d'un article qui sera soumis sous peu :

Arbour D, Martineau É, Tremblay E, Vallée J, Robitaille R. (2017) *Chronic in vivo dampening of glial excitability fosters neuromuscular junction repair in ALS.*

6.2 CHRONIC *IN VIVO* DAMPENING OF GLIAL EXCITABILITY FOSTERS NEUROMUSCULAR JUNCTION REPAIR IN ALS.

Running title: Harnessing glial cells to rescue NMJ in ALS

Arbour Danielle^{1,2}, Martineau Éric^{1,2}, Tremblay Elsa^{1,2}, Vallée Joanne^{1,2}, and Robitaille
Richard^{1,2*}

¹ : Département de neurosciences, Université de Montréal

² : Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal, PO box 6128,
Station centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

*Contact information: richard.robaille@umontreal.ca

Additional footnotes:

Number of pages: 52

Number of figures: 8 + 9 Suppl.

Number of tables: 0

Numbers of characters (whole document, no spaces): 70,675

Word counts: Summary = 151, Intro = 562, Results = 4082, Discussion = 1536, Conclusion =
124, Experimental Procedures = 2279, Legends = 2772

6.2.1 ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a non-cell autonomous disease characterized by the progressive loss of motor neurons and destruction of the neuromuscular junction (NMJ). Perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the NMJ, influence synaptic activity, structural integrity and repair of the NMJ. In contrast to the reduction of PSCs muscarinic signaling known to promote NMJ plasticity and repair, here we show an enhancement of this signaling at denervated NMJs in a SOD1 mouse model. Chronic *in vivo* blockade of PSC muscarinic receptors (mAChRs) by intermuscular injection of a muscarinic antagonist, pirenzepine, restored PSCs mAChRs activation, leaving the presynaptic properties untouched. Importantly, this restored PSCs ability to repair NMJs structural integrity as suggested by the increased number of PSCs process extensions, sprouting events and poly-innervated NMJs. Taken together, these results suggest that reducing PSCs mAChRs activation is beneficial and that targeting PSCs functions may represent a novel therapeutic target in ALS.

6.2.2 INTRODUCTION

ALS is a multifactorial disease characterized by the progressive loss of motor neurons (MN). Hallmarks of the disease include the destruction of the neuromuscular junction (NMJ) and the contribution of glial cells in the disease pathogenesis and progression (for review see (Philips and Rothstein, 2014)). A recent study using the SOD1^{G37R} mouse model revealed an abnormal excitability of Perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the NMJ, a property that became associated with MN vulnerability with age (Arbour et al., 2015). These abnormal features may contribute to NMJ malfunction in ALS since PSCs are instrumental for NMJ establishment, maintenance, synaptic efficacy and repair (for review see (Ko and Robitaille, 2015)).

PSCs responsiveness to injury is essential for NMJ repair upon re-innervation. They extend processes from denervated endplates in the direction of innervated ones to induce sprouting and guidance of the presynaptic nerve terminal towards the denervated endplate (Love and Thompson, 1999; O'Malley et al., 1999; Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995a, b). Importantly, *in vivo* blockade of mAChRs induced the same modifications in PSCs phenotype that facilitate NMJ re-innervation (i.e PSCs process extensions and sprouting) (Wright et al., 2009). Interestingly, in ALS, there is a striking inverse relationship between susceptibility to NMJ loss and competence for synaptic sprouting (Frey et al., 2000). Indeed, this anatomical plasticity is a compensatory mechanism which can transiently prolong motor function by promoting the re-innervation of previously denervated NMJs (Frey et al., 2000; Schaefer et al., 2005). Moreover, this compensatory process appears confined to distinct populations of MN within a given motor pool (Schaefer et al., 2005), suggesting that apart from MN-intrinsic factors, this anatomical plasticity could be attributable to differential regulation by the local environment at the NMJ (De Winter et al., 2006; Frey et al., 2000). However, this compensatory process eventually fails to keep pace with the denervation rate suggesting that the critical adaptive process of NMJ repair may be altered in ALS (Gordon et al., 2004).

PSCs regulation of synaptic functions at the NMJ relies on purinergic and muscarinic receptors activity (mAChRs) (Darabid et al., 2013; Rochon et al., 2001). Interestingly, PSCs regulation of synaptic efficacy and repair at the NMJ are complementary and activation of

their mAChRs represents a central element for appropriate PSC responses (Ko and Robitaille, 2015). Indeed, the fate of the NMJ (maintenance or repair mode) is tributary of the ability of PSCs to detect synaptic transmission through activation of their mAChRs. For instance, activation of PSCs mAChRs fosters NMJ stability and efficacy, preventing the expression of the genetic program required for NMJ plasticity and repair (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994). Changes in gene expression and dynamic cytoskeletal modifications of PSCs occur when synaptic communication between presynaptic nerve terminals and PSCs is interrupted or following a decreased activation of the PSCs mAChRs (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994; Wright et al., 2009). These observations suggest that the enhanced muscarinic function of PSCs observed at innervated NMJs in ALS (Arbour et al., 2015) could prevent them from entering the repair mode and limit NMJ re-innervation.

Here we tested whether the chronic *in vivo* blockade of PSCs mAChRs improved NMJ repair process in ALS. While presynaptic properties were unaltered by the chronic injection of a mAChRs antagonist in an ALS mouse model (SOD1^{G37R}), the treatment restored PSCs properties and fostered NMJ repair and re-innervation.

6.2.3 RESULTS

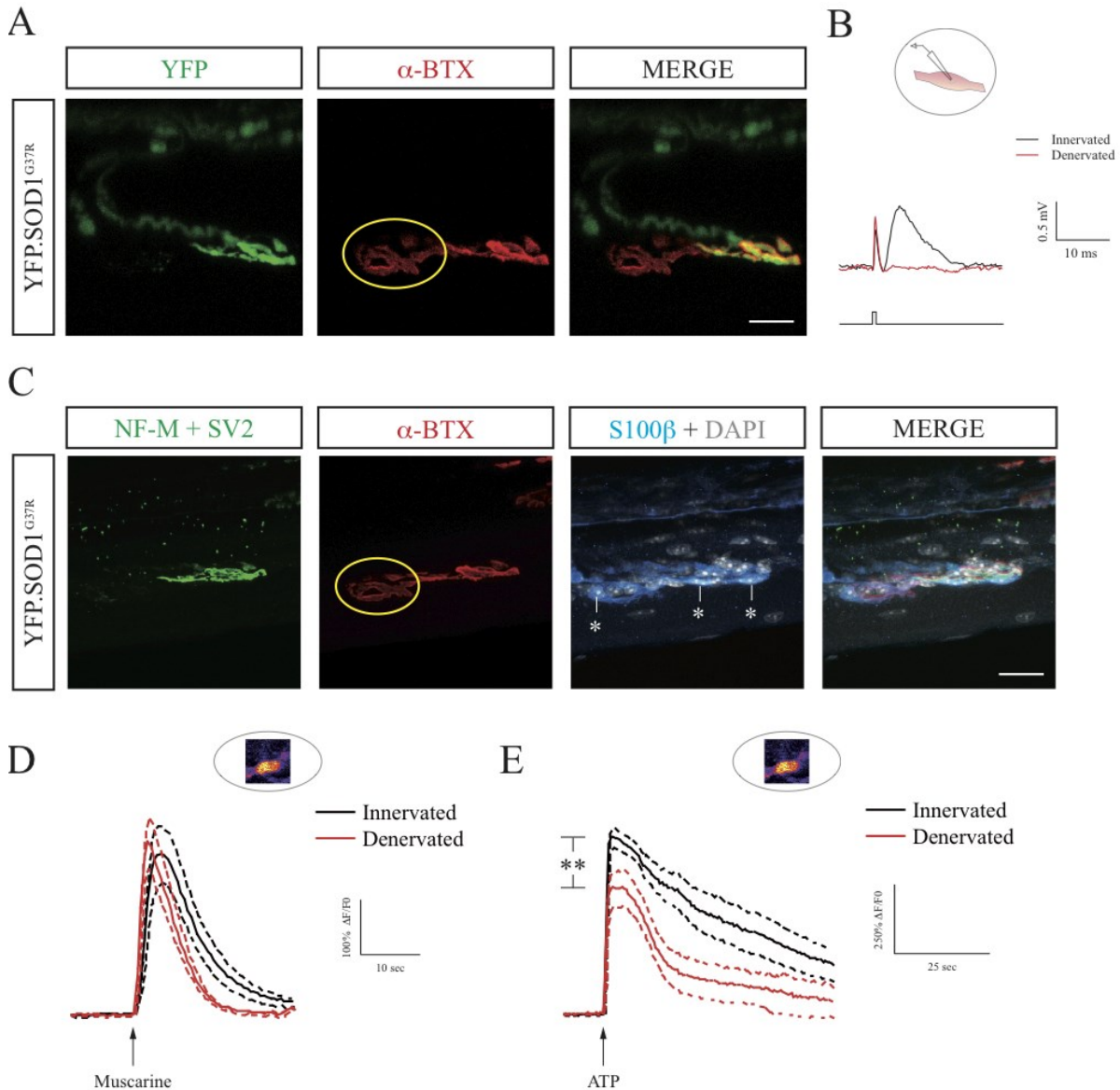
The level of mAChR activation of PSCs is a deterministic element to stabilise or foster NMJ repair. We hypothesized that PSCs at innervated and denervated NMJs in an ALS mouse model are less amenable to NMJ plasticity and repair owing to their altered properties. In this work, we investigated whether dampening PSCs mAChRs activity could restore NMJ repair in ALS.

PSC mAChR sensitivity at denervated NMJs

We recently reported at innervated NMJs from SOD1^{G37R} mice that PSCs had enhanced mAChRs sensitivity during the pre-onset stage of the disease which was dependent of MN vulnerability (Arbour et al., 2015). We first tested whether this enhanced sensitivity persisted at denervated NMJs as it should normally be reduced to support the repair activity of the NMJ (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994).

In order to visualize the state of innervation of all NMJs *in situ*, we crossed Thy1-YFP and SOD1^{G37R} mice to generate YFP.SOD1^{G37R} mice which expressed yellow fluorescent protein in all MNs and MN nerve terminals (Feng et al., 2000). Denervated NMJs were identified by the lack of co-localization of the YFP signal with the α -bungarotoxin staining that labels the postsynaptic nicotinic receptors (Figure 6.1A and S6.1). The status of innervation was always further confirmed using electrophysiological recordings of synaptic events (Figure 6.1B) and/or by immunohistochemical labeling of the components of the recorded NMJs (Figure 6.1C). All NMJs identified as denervated, based on the lack of YFP signal, also showed no sign of synaptic activity (spontaneous and evoked) and/or no NF-M + SV2 staining. Finally, myosin heavy chain (MHC) immunolabelling to identify the motor unit types revealed that denervated NMJs were associated with type I and IIa (data not shown), suggesting that denervation affects both slow and fast-resistant NMJs at the SOL at this age (P460), in this ALS mouse model.

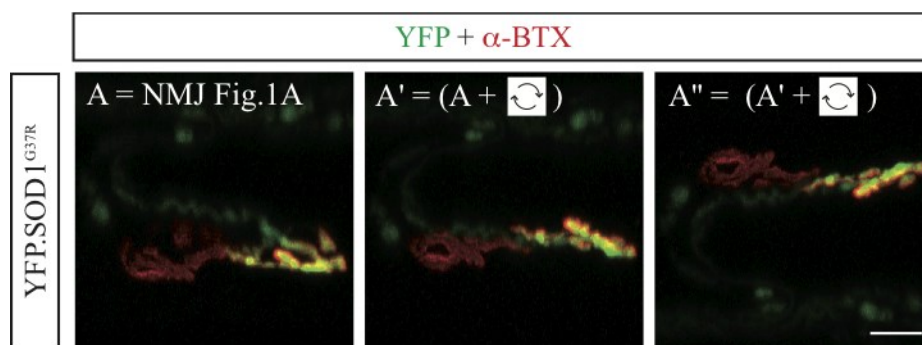
Figure 6.1 PSC mAChRs sensitivity is altered at denervated NMJs of YFP.SOD1^{G37R} animals



A, False color confocal images of two NMJs from YFP.SOD1^{G37R} animals (P460), expressing yellow fluorescent protein in all motor axons and nerve terminals (green). Postsynaptic nicotinic receptors (nAChRs) were labeled with α -bungarotoxin (α -BTX, red). Note that the NMJ on the left (yellow circle) was denervated as indicated by the absence of the YFP signal over the α -BTX staining and **B**,

the lack of evoked endplate potentials (EPP) (red trace, top trace; nerve stimulation, lower trace) recorded intracellularly (inset). **C**, Immunofluorescence staining of the same two NMJs shown in **A** was then performed with two presynaptic markers (NF-M+ SV2, in green) to further confirm the state of innervation. PSCs were labeled using S100 antibody (blue, asterisks) and nuclei with DAPI (gray). **D**, Mean Ca^{2+} - responses (solid line, inset) \pm SEM (dotted lines) induced by local application of muscarine in PSCs associated with innervated (black traces) or denervated (red traces) NMJs. **E**, Similar experiments on the same cells but with local applications of ATP (10 μM). Note that no significant difference was observed between the amplitude of Ca^{2+} responses elicited by muscarine in PSCs associated with innervated or denervated NMJs. Scale bars = 20 μm . ****** $p < 0.01$.

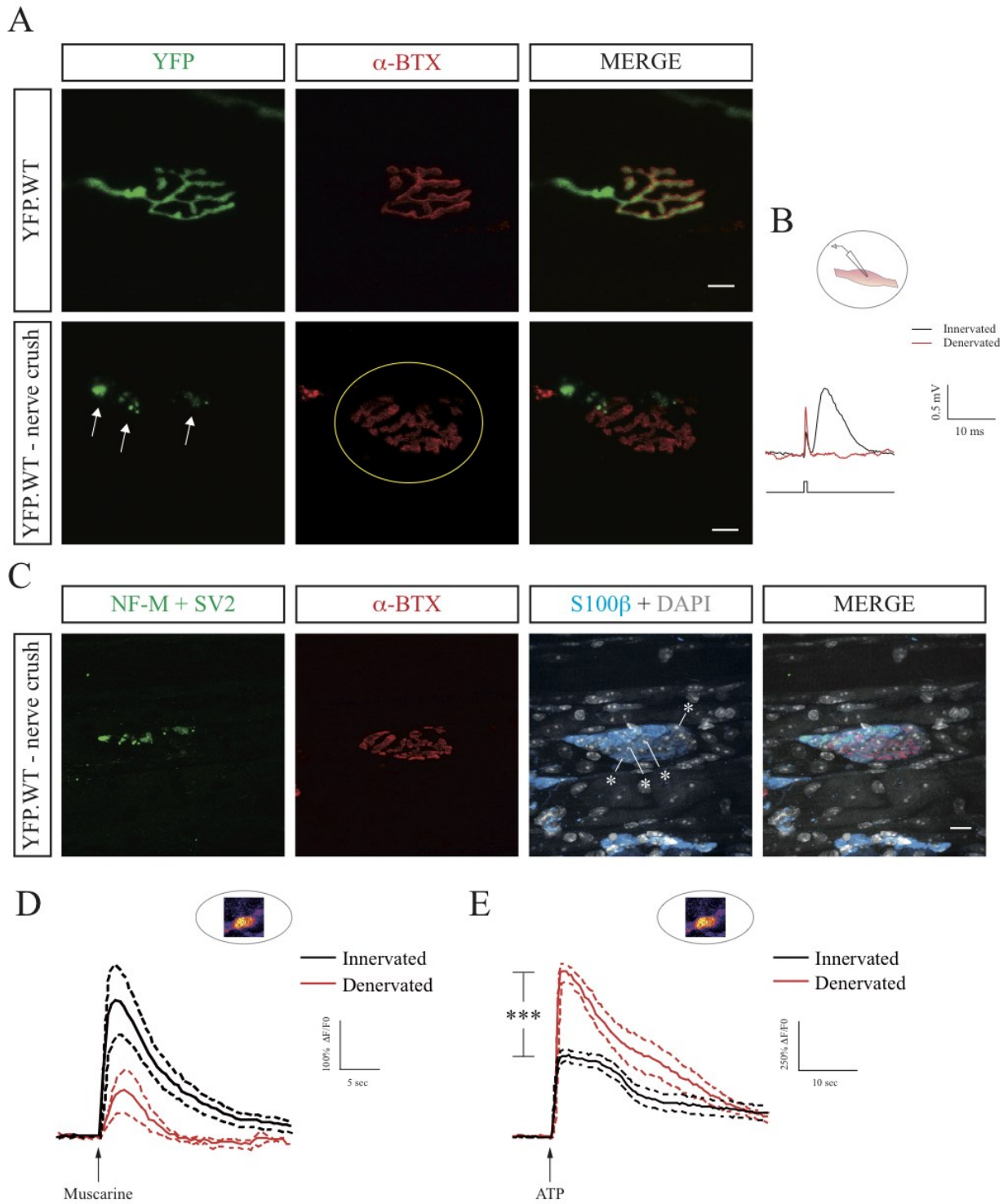
Figure S6.1 Validation of the denervated and innervated NMJs from YFP.SOD1^{G37R} animal



3D projection of the two NMJs showed in Figure 1A rotated along the x axis. Note that the endplate of the denervated NMJ (asterisk, with no YFP signal) is oriented in the opposite direction that the innervated one (YFP signal over the α -BTX staining), suggesting that the two NMJs are located on two different muscle fibers. Scale = 20 μ m.

Muscarinic sensitivity was tested by local application of muscarine on PSCs soma and monitoring PSCs Ca^{2+} responses. Unlike expected from PSCs reaction to deprivation of neuronal activity (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994), we found no statistical difference between the amplitude of Ca^{2+} responses evoked in PSCs associated with denervated and innervated NMJs in the YFP.SOD1^{G37R} mice ($347.1 \pm 54.6\% \Delta F/F$ at innervated NMJs vs $316.9 \pm 46.7\% \Delta F/F$ at denervated NMJs; Figure 6.1D; N = 6, n = 10 for innervated NMJs, N = 5, n = 8 for denervated NMJs; *unpaired t-test*, $p = 0.6890$). Consistent with prior reports (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994; Robitaille et al., 1997; Wright et al., 2009), amplitude of muscarine-elicited Ca^{2+} responses in PSCs were reduced at denervated NMJs from aged-matched YFP.WT animals two days following nerve injury (Figure S6.2; N = 1, n = 6 for YFP.WT, N = 1, n = 4 for YFP.WT with a nerve crush; N to be completed).

Figure S6.2 PSC mAChRs sensitivity at denervated NMJs of YFP.WT animals



A, False color confocal images of NMJs from an aged-matched (upper panel) and a nerve-injury (lower panel) YFP.WT animals (P460) expressing yellow fluorescent protein in all motor axons and nerve terminals (green). Postsynaptic nicotinic receptors (nAChRs) were labeled with α -bungarotoxin (α -BTX, red). Note the presence of nerve terminal debris (arrows) at denervated NMJs (yellow circle) from YFP.WT following a nerve crush injury, as indicated by the lack of YFP signal over the endplate area (α -BTX staining) and **B**, the lack of evoked endplate potential (EPP) (red trace). EPPs were evoked by nerve stimulation (lower trace) and recorded intracellularly (inset). **C**, Immunofluorescence staining of the same denervated NMJ shown in **A** was performed to further confirm the state of innervation of the NMJ. Presynaptic terminals were labeled with NF-M and SV2 antibodies (green), PSCs (asterisks) with S100 β (blue) and nuclei with DAPI staining (gray). **D**, Mean (solid traces) +/- SEM (dotted traces) of all Ca²⁺- responses (inset) induced by local application of muscarine in PSCs associated with innervated (black traces) or denervated (red traces) NMJs. **E**, Similar results but following ATP (10 μ M) local applications. Note the smaller muscarine-induced Ca²⁺ responses, while ATP-induced responses were larger. Scale bars = 10 μ m. *** $p < 0.001$.

PSC mAChRs and purinergic receptors are known to act synergistically in NMJ functions (Ko and Robitaille, 2015). Therefore, we next tested the sensitivity of PSC Ca²⁺ responses evoked by local applications of ATP on the same PSCs. Amplitude of PSC Ca²⁺ responses was reduced by 28% at denervated NMJs in the YFP.SOD1^{G37R} mice (Figure 6.1E; *unpaired t-test*, $p = 0.0150$) while it was enhanced by 98% at aged-matched denervated NMJs from YFP.WT animals after a nerve-crush (see Figure S6.2; *unpaired t-test*, $p < 0.0001$). These results indicate that PSCs respond inadequately to denervation in ALS, suggesting that they would not develop the proper phenotype for NMJ repair following denervation.

PSC ability to repair the NMJ is altered in symptomatic SOD1^{G37R} mice.

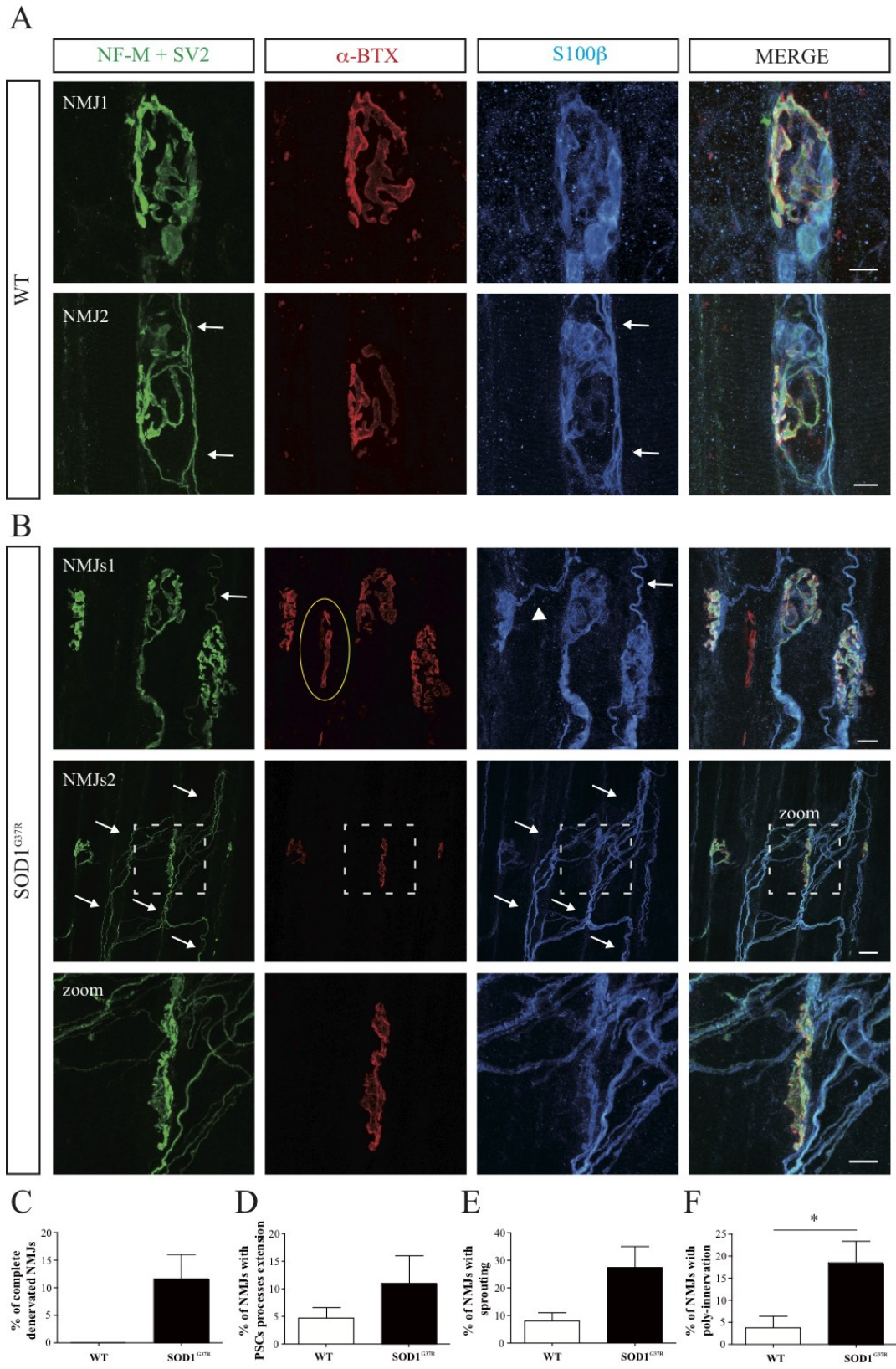
The responsiveness of PSCs to denervation was first tested by monitoring their process extension as these contribute to the repair and re-innervation process by promoting nerve terminal sprouting (O'Malley et al., 1999; Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995a, b; Tam and Gordon, 2003). Despite the fact that the presence of PSC process extensions and sprouting have been observed by others in an ALS mouse model (Frey et al.,

2000; Gould et al., 2006), their prevalence and relationship with NMJ repair have not been determined. We hypothesized that NMJ repair would be altered in ALS since the required reduced PSC muscarinic activity (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994; Wright et al., 2009) was not observed.

We quantified morphological alterations in NMJs of symptomatic SOD1^{G37R} mice (see Experimental Procedures for the complete list), focussing on PSC process extensions and sprouting events in relation with the state of innervation of NMJs. Analysis of the immunostaining of the pre- and postsynaptic components of the NMJ revealing any sign of NMJ denervation will be analyzed with the signs of PSCs responsiveness to injury (described above). A total of 232 surface NMJs were analyzed (WT: N = 4, n = 81 NMJs; SOD1^{G37R}: N = 6, n = 151 NMJs). As expected, analysis of NMJs from SOD1^{G37R} mice revealed more completely denervated NMJs in comparison to their WT littermates (11.57% ± 4.47% for the SOD1^{G37R} mice; absent in WT; Figure 6.2A-C).

We should expect a significant increase of PSC processes extension in SOD1^{G37R} mice since these occur at a much higher frequency in the presence of nearby innervated NMJs at partially denervated muscles (Love and Thompson, 1999). However, the percentage of process extensions elaborated by PSCs was similar in the SOD1^{G37R} mice and in their aged-matched WT littermate (Figure 6.2D: *unpaired t-test*, $p = 0.3530$), suggesting that an important PSC-dependent step to re-innervation is deficient.

Figure 6.2 PSCs ability to repair NMJs is altered in symptomatic SOD1^{G37R} mouse model



A, False color confocal images of NMJs from WT (2 examples, NMJ1 and NMJ2) and **B**, symptomatic SOD1^{G37R} mice (NMJs1 and NMJs2). Soleus NMJs (P450) were labeled for the nerve terminals (NF-M + SV2, green), postsynaptic nAChRs (α -BTX, red), and Schwann cells (S100 β , blue). Denervated NMJs were only observed in the SOD1^{G37R} animals (yellow circle). Note the presence of PSCs process extensions (arrow head) and sprouting (arrows). The sprouting events were particularly erratic and off target in the SOD1^{G37R} animals as represented in the zoom of the NMJs2 (see the third row which represents the higher magnification of the dotted square in the second row). **C-F**, Histograms showing the mean \pm SEM of complete denervated NMJs (**C**), NMJs associated with either PSCs process extensions (**D**) or sprouting (**E**) or poly-innervated NMJs (**F**) from WT and symptomatic SOD1^{G37R} animals. Scale bars = 10 μ m.

Another important feature of PSC during NMJ repair is to induce the formation of nerve terminal sprouts and guide them back to denervated NMJs (Kang et al., 2003; O'Malley et al., 1999; Son and Thompson, 1995a, b). However, only a tendency was observed in the prevalence of nerve terminal sprouting events in the SOD1^{G37R} mice compared to the WT animals (Figure 6.2E; *unpaired t-test*, $p = 0.0798$). In addition, these PSC processes and nerve terminal sprouting should be targeted between denervated and innervated NMJs (Son and Thompson, 1995a) (Love et al., 2003; Love and Thompson, 1999) and mainly grow along the axis of the muscle fibers rather than across the fibers (Son and Thompson, 1995a). However, and consistent with the results by (Tallon et al., 2015), $45.14 \pm 18.52\%$ of the sprouting events from SOD1 mice were notably off target, long and erratic (see second and third row of Figure 6.2B). For instance, nerve terminals often sprouted beyond or around NMJs, suggesting a possible lack of « stop or stabilization » signals. Moreover, 77% of denervated NMJs showed no PSC process extensions or sprouting events, which further suggests that PSCs do not respond normally to denervation (Carrasco et al., 2016b) and do not promote NMJ repair in ALS.

Finally, this dynamic relationship between PSC and regenerating nerve terminals frequently leads to poly-innervated NMJs, a sign of active repair of NMJs. Poly-innervated NMJs may originate from PSC-dependent or -independent mechanisms (Magill et al., 2007;

Son and Thompson, 1995b). A statistical difference was observed in poly-innervation in the SOD1^{G37R} mice in comparison with WT littermates at P450 (Figure 6.2F; *unpaired t-test*, $p = 0.05$).

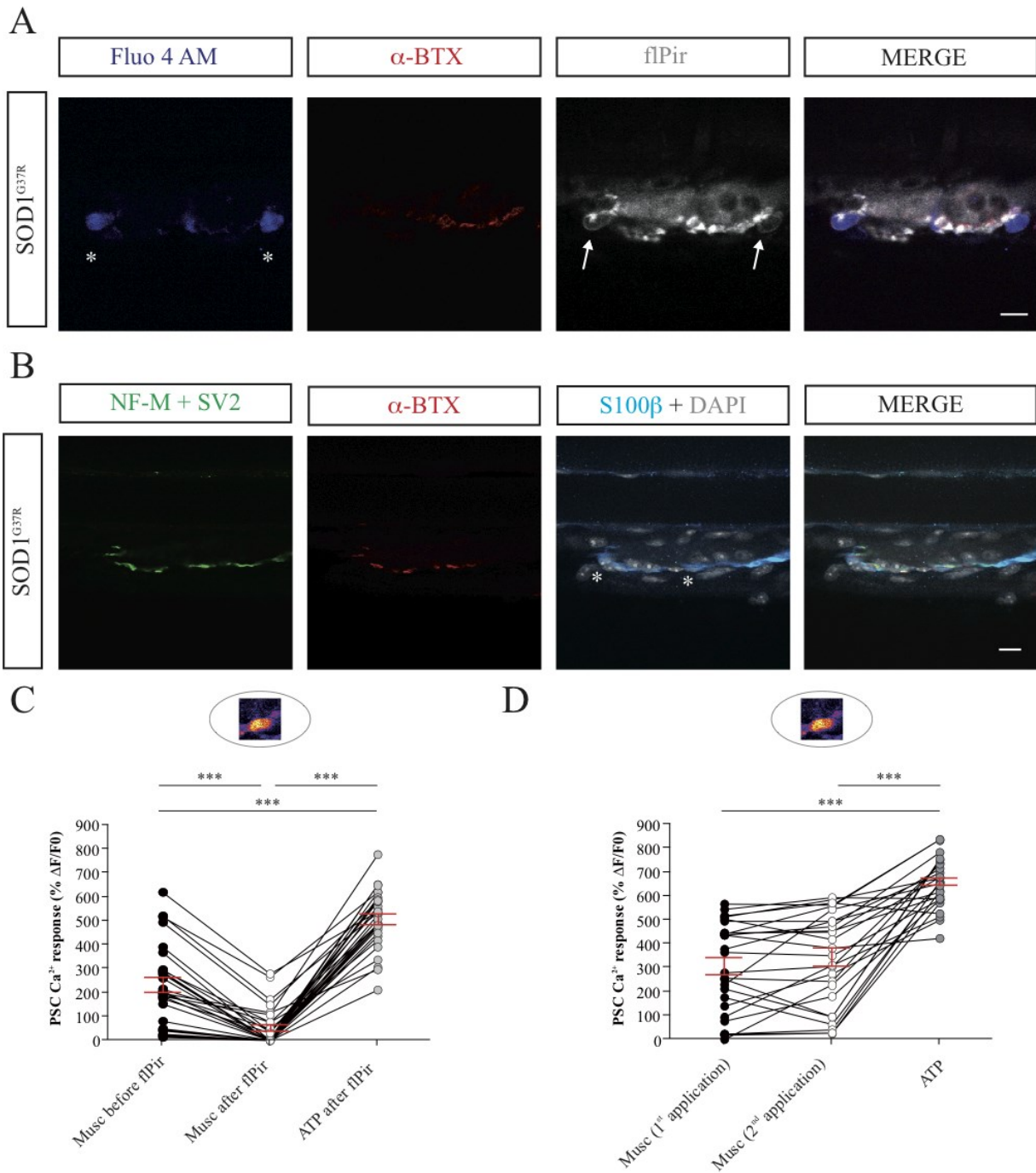
In summary, NMJs in symptomatic SOD1^{G37R} animals failed to show clear and marked PSC-driven events of repair which strongly suggests that PSCs did not adopt the proper phenotype for NMJ repair in this ALS mouse model.

Targeting PSCs by blockade of muscarine-induced Ca²⁺ responses

The high muscarinic excitability of PSCs correlates well with the lack of several PSC-dependent signs of NMJ repair, suggesting that PSCs mAChR functions may deter NMJ repair and remodelling in ALS. Hence, we hypothesized that a chronic *in vivo* dampening of PSC mAChRs activity should restore the state of NMJ repair in ALS and allow glial rescue to proceed.

To this end, we used a fluorescent analogue of the muscarinic antagonist, pirenzepine (flPir), to target PSC mAChRs. flPir is specific for the subtypes of mAChRs present on PSCs (Darabid et al., 2013; Wright et al., 2009), with a preferential action on M3 receptors subtypes (M3 > M5 > M1; Abcam). As illustrated in Figure 6.3A, *in situ* bath application of flPir labeled specifically PSCs somata of NMJs in SOD1^{G37R} animals. Immunostaining further validated that the flPir labeling was on PSCs (confirmed by S100 β and DAPI staining) (Figure 6.3B).

Figure 6.3 *In situ* Pirenzepine selectively decreased PSCs Ca^{2+} responses induced by muscarine



A, False color confocal images of a single plane showing two PSCs (asterisks) loaded with the Ca^{2+} indicator Fluo4-AM (blue), the nAChRs (α -BTX, red) and the fluorescent pirenzepine (fIPir, gray), a

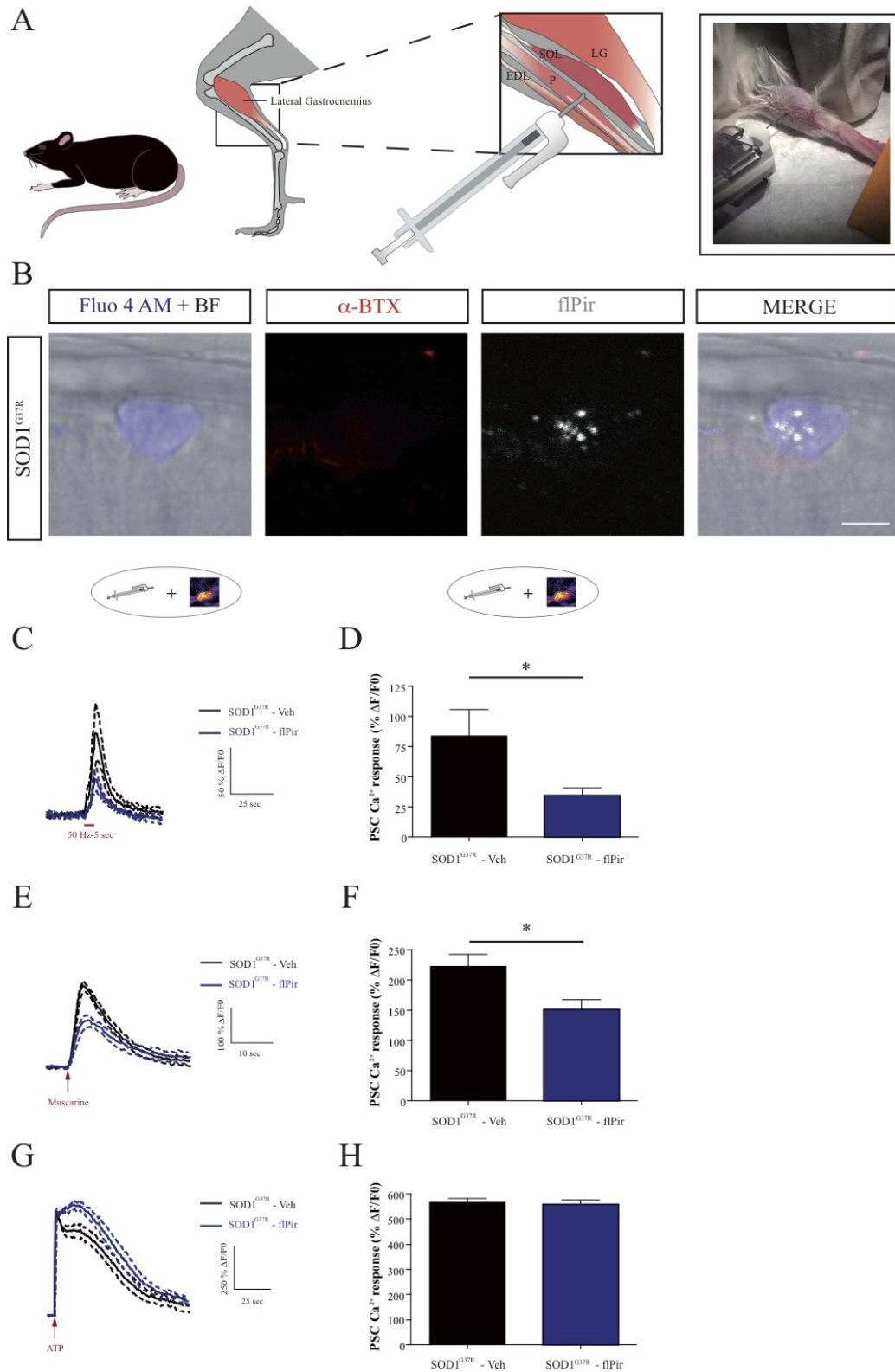
mAChRs antagonist. Note that the flPir staining specifically labeled the two PSCs somata (arrows) and did not colocalize with the α -BTX staining. **B**, Immunofluorescence staining of the same NMJ shown in A was performed to further confirm the localisation of the flPir staining. Nerve terminal were labeled with NF-M+ SV2 (green), the endplate with α -BTX (red), PSCs (asterisks) with (S100 β , blue) and nuclei with DAPI (gray). **C**, Plot of PSCs Ca²⁺- responses (inset) induced by local application of muscarine before and after flPir bath application. Mean \pm SEM are represented in red. Note that the response to local application of ATP was not affected by flPir. Each connected dot represents the amplitude of the Ca²⁺- response induced in the same PSC. **D**, Plot of PSCs Ca²⁺- responses (inset) induced by local application of a first and a second application of muscarine followed by an ATP application. Mean \pm SEM are represented in red. Each connected dot represents the amplitude of the Ca²⁺- response induced in the same PSC. Although variable, there were on average no difference between 1st and 2nd. Also, note that local application of ATP induced larger Ca²⁺ responses. Scale bars = 10 μ m. *** $p < 0.001$.

Importantly, PSC Ca²⁺ responses elicited by local muscarine applications were significantly reduced following flPir application (1 μ M; 228.7 \pm 30.88% Δ F/F before vs 48.22 \pm 14.73% Δ F/F after flPir bath application; Figure 6.3C; N = 4, n = 29; *one-way ANOVA for repeated measures*, $p < 0.0001$; *Post hoc Bonferroni comparison*, $p < 0.001$). This cannot be explained by the rundown of PSC Ca²⁺ responses known to occur upon repetitive applications of muscarine (Georgiou et al., 1999; Rochon et al., 2001) since PSC Ca²⁺ responses evoked by two applications of muscarine (at least 45 min apart but without flPir bath application) were not different in the SOD1^{G37R} mice (303.1 \pm 36.92% Δ F/F for the first application vs 339.9 \pm 38.33% Δ F/F for the second application; Figure 6.3D; N = 4, n = 26; *one-way ANOVA for repeated measures*, $p < 0.0001$; *Post hoc Bonferroni comparison*, $p > 0.05$). In addition, Ca²⁺ responses evoked by ATP in the same PSCs at the end of each experiment were not blocked by flPir (504.8 \pm 22.44% Δ F/F; Figure 6.3C; *Post hoc Bonferroni comparison*, $p < 0.001$). Hence, these results suggest that bath application of flPir was specific for PSC mAChRs and did not interfere with their ability to generate large Ca²⁺ responses.

Chronic *in vivo* intermuscular injections of flPir target PSCs

We then performed chronic *in vivo* injection of flPir (Figure 6.4A) followed by *in situ* analysis of the staining at the NMJ of SOL muscles of SOD1^{G37R} mice 4h after a single *in vivo* injection of flPir. We observed flPir labeling within PSCs identified in transmitted light microscopy and co-localized with the Fluo-4 AM profiles known to be PSCs (Rochon et al., 2001; Todd et al., 2010) (Figure 6.4B). No labeling was observed in association with postsynaptic staining or the myelinated axon (data not shown). Hence, similarly to the *in situ* assay (Figure 6.3), these observations suggest that *in vivo* flPir injections targeted selectively PSCs.

Figure 6.4 Chronic *in vivo* mAChRs blockade restored PSCs excitability

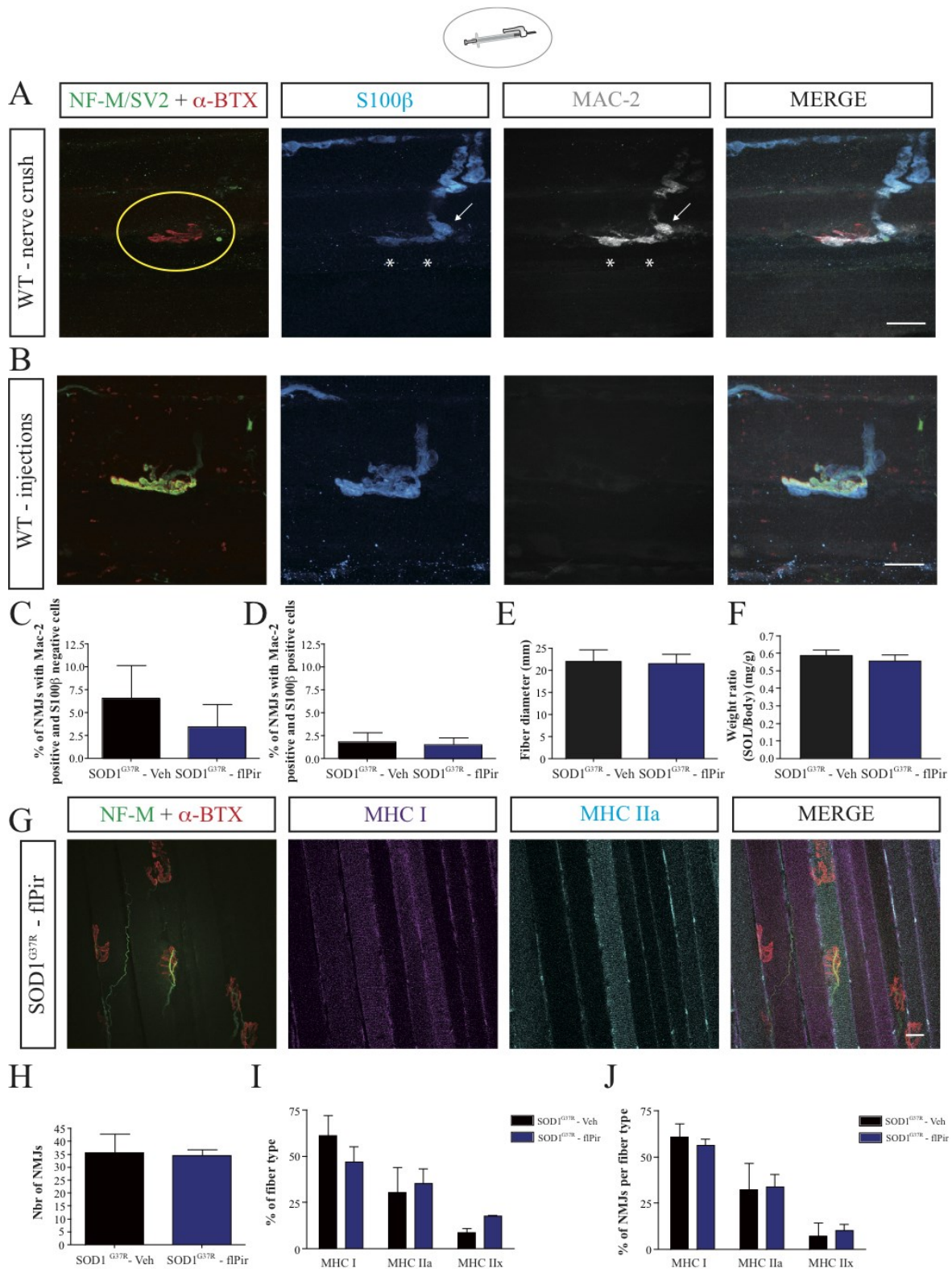


A, Schematic representation of intermuscular injection of flPir. Image of an actual injection manoeuvre in a mouse leg (right panel). Three injections per week were performed in SOD1^{G37R} mice from P280 until P380. **B**, False color confocal image of a single plane focusing on the top of the NMJ showing one PSC with the transmitted light (bright field, BF) loaded labeled with the Ca²⁺ indicator Fluo4-AM (blue), the nAChRs (α -BTX, red) and the fluorescent pirenzepine (flPir, gray). This staining was obtained 4h after a single injection of flPir. Note the flPir staining within the PSCs soma. **C, E and G**, Traces show an average of five Ca²⁺- responses \pm SEM (dotted lines) induced in PSCs in chronically injected SOD1^{G37R} animals with either a saline (Veh, black traces) or the muscarinic antagonist (flPir; blue traces) solution (inset). **D, F and H**, Histogram illustrating the mean \pm SEM of the amplitude of the Ca²⁺ responses elicited in PSCs by motor nerve stimulation (**D**), muscarine (**F**) or ATP application (**G**) in the SOD1^{G37R} animals of the Veh or the flPir group. Scale bar = 5 μ m. * $p < 0.05$.

Importantly, repeated *in vivo* injection of flPir did not induce detectable inflammation reaction or visible mechanical damage to the muscle fibers (data not shown). In addition, Mac-2 (Galectin-3) which is displayed by mature murine macrophages (Nibbering et al., 1987) was also used as a reporter of PSCs response to injury (Reichert et al., 1994) (Figure S6.3A-B). Very few NMJs were associated with Mac-2-positive PSCs (an average of less than 2%) after 16 weeks of injections (Figure S6.3C-D; *unpaired t-test*, $p = 0.8157$), consistent with the absence of injury-induced phenotype and indicating that PSCs did not develop macrophage-like behaviors (Duregotti et al., 2015; Lee et al., 2016).

We also measured muscle fiber diameter and muscle weight since repeated M5 antagonist injections caused muscle fiber atrophy (Wright et al., 2009). We found no difference in the muscle fiber diameter and in the weight ratio (SOL muscle/ body weight; Figure S6.3E-F; *unpaired t-test*, $p < 0.05$). In addition, the number of surface NMJs, the proportion of muscle fiber types (slow vs fast-resistant) and the number of surface NMJs per muscle fiber type did not change (Figure S6.3G-J; N = 2; N to be completed). Similar results were obtained for the WT animals (data not shown).

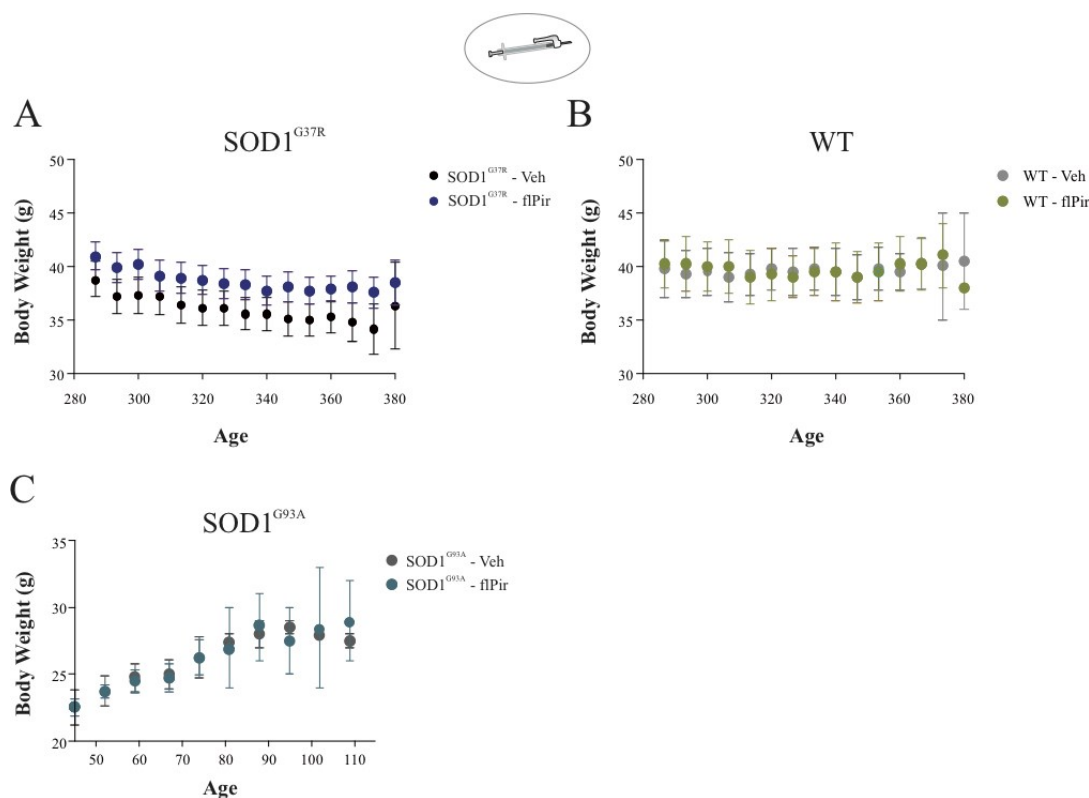
Figure S6.3 Controls of chronic *in vivo* injections



A, False color confocal images of NMJs from WT animals with a nerve crush injury (denervated NMJs = yellow circle) or **B**, which received 16 weeks of saline (Veh) injection (inset). Soleus NMJs were labeled for the nerve terminals (NF-M + SV2, green) and postsynaptic nAChRs (α -BTX, red), Schwann cells (S100 β , blue) and MAC-2, that labels macrophages and is an indicator of PSCs macrophage-like behavior (MAC-2). Note the presence of S100 β and MAC-2 positive cells at denervated NMJs in WT animals following nerve crush injury. Denervation was confirmed by the lack of nerve terminal (no YFP signal) over the BTX staining. These S100 β and MAC-2 positive cells were present in the last myelinating Schwann cell in the nerve branch (arrow) and PSCs associated with the endplate area (asterisks). Note the absence of the MAC-2 staining in PSCs associated with innervated NMJs from control, injected WT animals. **C**, Histograms showing the mean \pm SEM of the number of Mac-2 positive and S100 β negative cells and **D**, Mac-2 positive and S100 β positive cells in the SOD1^{G37R} animals that received either a saline (Veh) or pirenzepine treatment (flPir). **E**, Histograms showing the mean \pm SEM of muscle fiber diameter and **F**, the SOL/mouse weight ratio from chronically injected SOD1^{G37R} animals. **G**, Confocal images of Soleus muscle from a SOD1^{G37R} mouse. Nerve terminals and postsynaptic nAChRs were stained using antibodies for NF-M + SV2 (green) and α -BTX (red), while muscle fibers were stained using anti-myosin heavy chain (MHC) monoclonal antibodies: type I fibres (MHC – I; purple) and type IIa fibers (MHC – IIa; cyan). **H-J**, Histograms showing the mean \pm SEM of numbers of surface NMJs (**H**), percentage of surface fibers (**I**) and percentage of surface NMJs per fiber type (**J**) in SOD1^{G37R} animals from Veh and flPir group. Scale bars = 20 μ m.

Finally, body weight of all mice treated was not affected, suggesting that the overall treatment (multiple injections over few weeks in both legs and the consequent repeated anesthesia) was well tolerated by all animals from all experimental groups (Figure S6.4). Taken together, these data suggest that the procedure has no aversive effects, is reliable and suitable for investigating PSC mAChRs contribution to the repair of the NMJs in ALS.

Figure S6.4 Chronic *in vivo* injections did not affect animal body weight



A-C, Animal body weight over time of SOD1^{G37R} (A), WT (B) and SOD1^{G93A} mice (C). Note that the treatment (repeated injection and anesthesia, inset) over time was well tolerated and did not affect animal body weight in any group (Veh or flPir).

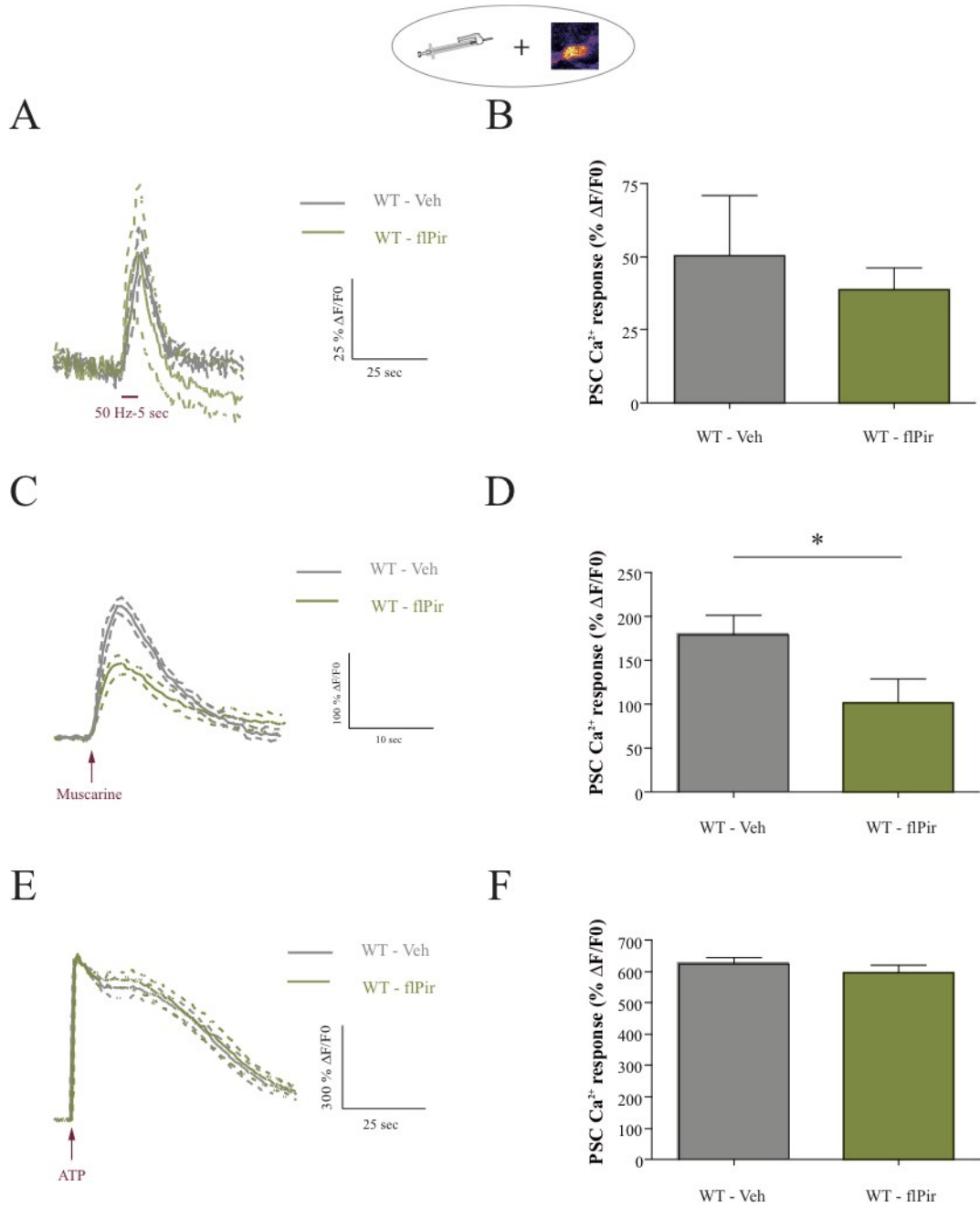
Chronic *in vivo* intermuscular injections of flPir restore PSC mAChRs function in SOD1^{G37R} mice

We next determined if chronic *in vivo* flPir injections restored PSCs muscarinic functions. We monitored PSCs activity using Ca²⁺ imaging in muscles from WT and SOD1^{G37R} mice treated either with a saline (Veh group) or flPir solution (flPir group). We used similar experimental protocols (motor nerve stimulation at 50 Hz - 5 sec and local agonist applications) and animals at P380, as previously characterized (Arbour et al., 2015).

After three months of chronic *in vivo* injection (from P280 to P380), the amplitude of PSC Ca²⁺ responses evoked by motor nerve stimulation *in situ* in SOD1^{G37R} mice treated with flPir were 59% smaller than the ones from the saline treated-mice (84.12 ± 21.38% ΔF/F for Veh group vs 34.28 ± 6.467% ΔF/F for flPir group; Figure 6.4C-D; N = 10, n = 14 for Veh group, N = 8, n = 15 for flPir group; *unpaired t-test*, *p* = 0.0295). There was no difference in the amplitude of nerve-evoked PSC Ca²⁺ responses between WT mice from Veh and flPir group (38.56 ± 7.452% ΔF/F for Veh group vs 50.27 ± 20.85% ΔF/F for flPir group; Figure S6.5A-B; N = 3, n = 5 for Veh group, N = 4, n = 5 for flPir group; *unpaired t-test*, *p* = 0.6114). This is consistent with the contribution of the PSC mAChRs during synaptic communication in WT animals and at mammalian adult NMJs (Arbour et al., 2015; Rochon et al., 2001). Interestingly, the remaining amplitude of PSCs Ca²⁺ responses in SOD1^{G37R} mice from the flPir group was comparable with the one of the WT (Veh and flPir group).

Next, we monitored PSC Ca²⁺ responses elicited by local application of muscarine. As expected, Ca²⁺ responses elicited in PSCs by muscarine were significantly smaller in the flPir group than the Veh group in the mutant animals (222.7 ± 20.52% ΔF/F for Veh group vs 151.7 ± 15.70% ΔF/F for flPir group; Figure 6.4E-F; N = 10, n = 73 for Veh group, N = 11, n = 89 for flPir group; *unpaired t-test*, *p* = 0.0058). Similar results were obtained for the flPir treated-mice from WT animals compared to the saline-treated WT but the reduction was much less pronounced than the mutant mice (32% in SOD1^{G37R} Vs 23% in WT) (178.7 ± 22.60% ΔF/F for Veh group vs 102.0 ± 27.05% ΔF/F for flPir group; Figure S6.5C-D; N = 4, n = 21 for Veh group, N = 4, n = 17 for flPir group; *unpaired t-test*, *p* = 0.0348). Again, the remaining amplitude of PSCs Ca²⁺ responses in SOD1^{G37R} mice treated with flPir was comparable with the ones of the WT treated with a saline solution. PSC purinergic receptors sensitivity was tested to further evaluate if flPir treatment was specific for PSC mAChRs. No difference was observed in the amplitude of ATP-induced PSCs Ca²⁺ responses in mutant animal with flPir and saline treatment (567.9 ± 14.69% ΔF/F for Veh group vs 559.9 ± 17.77% ΔF/F for flPir group; Figure 6.4G-H; N = 10, n = 123 for Veh group, N = 9, n = 91 for flPir group; *unpaired t-test*, *p* = 0.7270) and neither in WT animals (623.1 ± 20.87% ΔF/F for Veh group vs 595.9 ± 25.69% ΔF/F for flPir group; Figure S6.5E-F; N = 4, n = 42 for Veh group, N = 4, n = 29 for flPir group; *unpaired t-test*, *p* = 0.4126).

Figure S6.5 Chronic *in vivo* mAChRs blockade solely changed PSCs excitability to muscarine application in WT animals



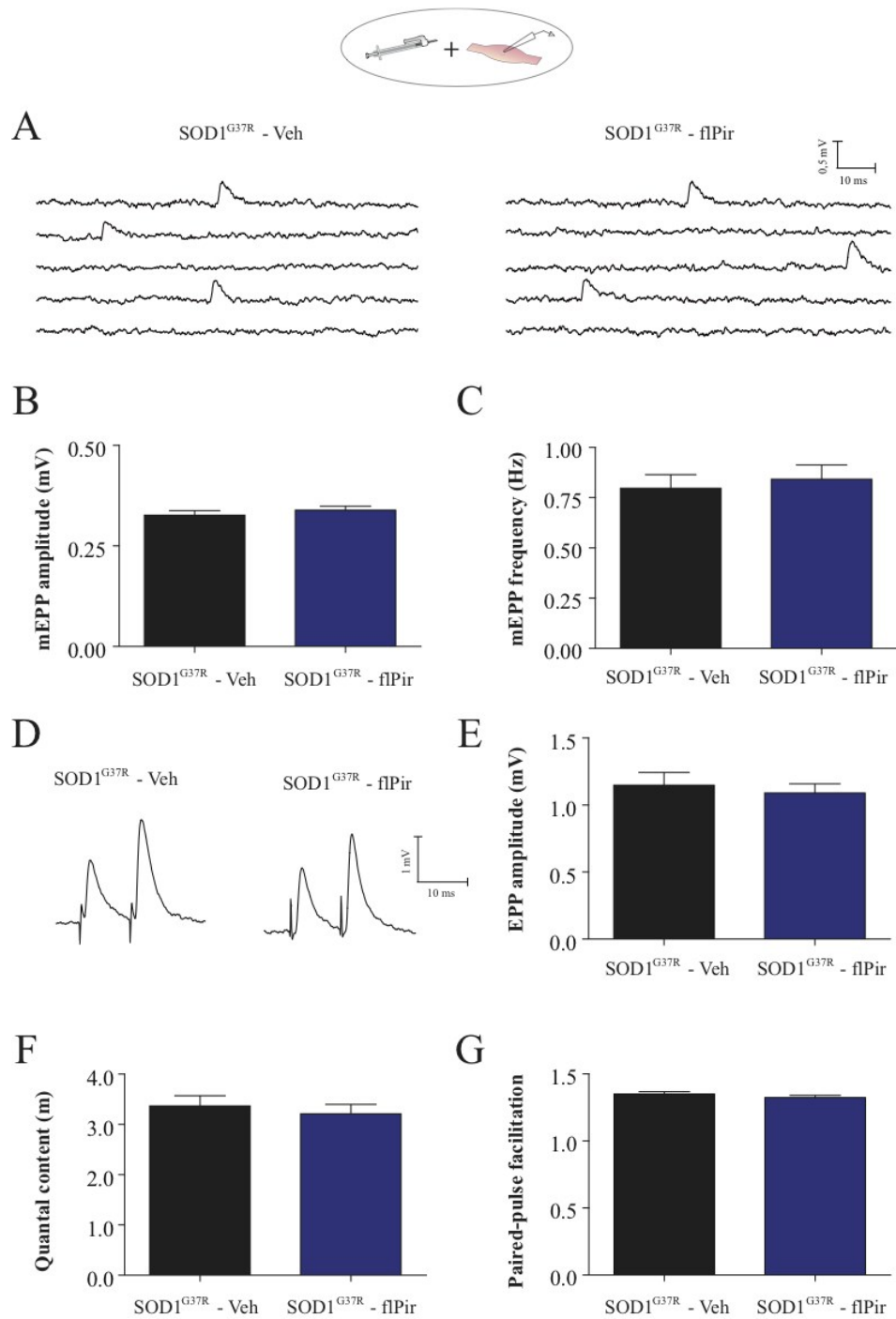
A, C and E, Traces show an average (solid traces) of five Ca^{2+} - responses \pm SEM (dotted traces) induced in PSCs in chronically injected WT animals with either a saline (Veh) or a drug (flPir) solution (inset). **B, D and F**, Histograms illustrating the mean \pm SEM of the amplitude of Ca^{2+} responses elicited in PSCs by motor nerve stimulation (**B**), muscarine (**D**) or ATP application (**F**) in the WT animals of the Veh or the flPir group. * $p < 0.05$.

We next determined the impact of the flPir treatment on synaptic transmission at the NMJs in mutant $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice using intracellular electrophysiological postsynaptic recordings (Figure 6.5). Consistent with our previous published observations (Arbour et al., 2015), the properties of nerve evoked synaptic activity of mutants NMJs from Veh-treated $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice showed elevated EPP amplitude and quantal content. Indeed, amplitude of nerve evoked EPPs from flPir-treated animals was 1.09 ± 0.07 mV ($N = 7$, $n = 34$), which was not significantly different from the saline-treated animals (1.15 ± 0.09 mV ($N = 9$, $n = 36$); Figure 6.5D and E; *unpaired t-test*, $p = 0.6230$). Consistent with these observations, quantal content of NMJs from $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice treated with flPir (3.21 ± 0.19 , $N = 7$, $n = 31$) was not different than the ones treated with the saline solution (3.37 ± 0.20 , $N = 9$, $n = 33$) (Figure 6.5D and F; *unpaired t-test*, $p = 0.5682$).

The overall signature of the synaptic properties at the NMJs (i.e. MEPP frequency and amplitude, EPP amplitude, quantal content and paired-pulse facilitation) was not affected by flPir treatment in $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice (Figure 6.5). Similar to our observations in the mutant mice, we found no significant difference between synaptic properties at NMJs from WT animals treated with saline or flPir (data not shown). This indicates that flPir treatment did not affect synaptic properties at the NMJ in WT and mutant $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice.

As a whole, PSC Ca^{2+} imaging and synaptic properties data at P380 are consistent with our previous observations (Arbour et al., 2015) and indicate that flPir treatment restored PSC Ca^{2+} muscarinic responsiveness without affecting synaptic properties.

Figure 6.5 Chronic *in vivo* mAChRs blockade did not affect synaptic properties



A, Examples of mEPP recordings and **D**, EPPs evoked by paired-pulse stimulation of the motor nerve (10 ms interval) from SOD1^{G37R} NMJs that received either the saline (Veh) or the pirenzepine

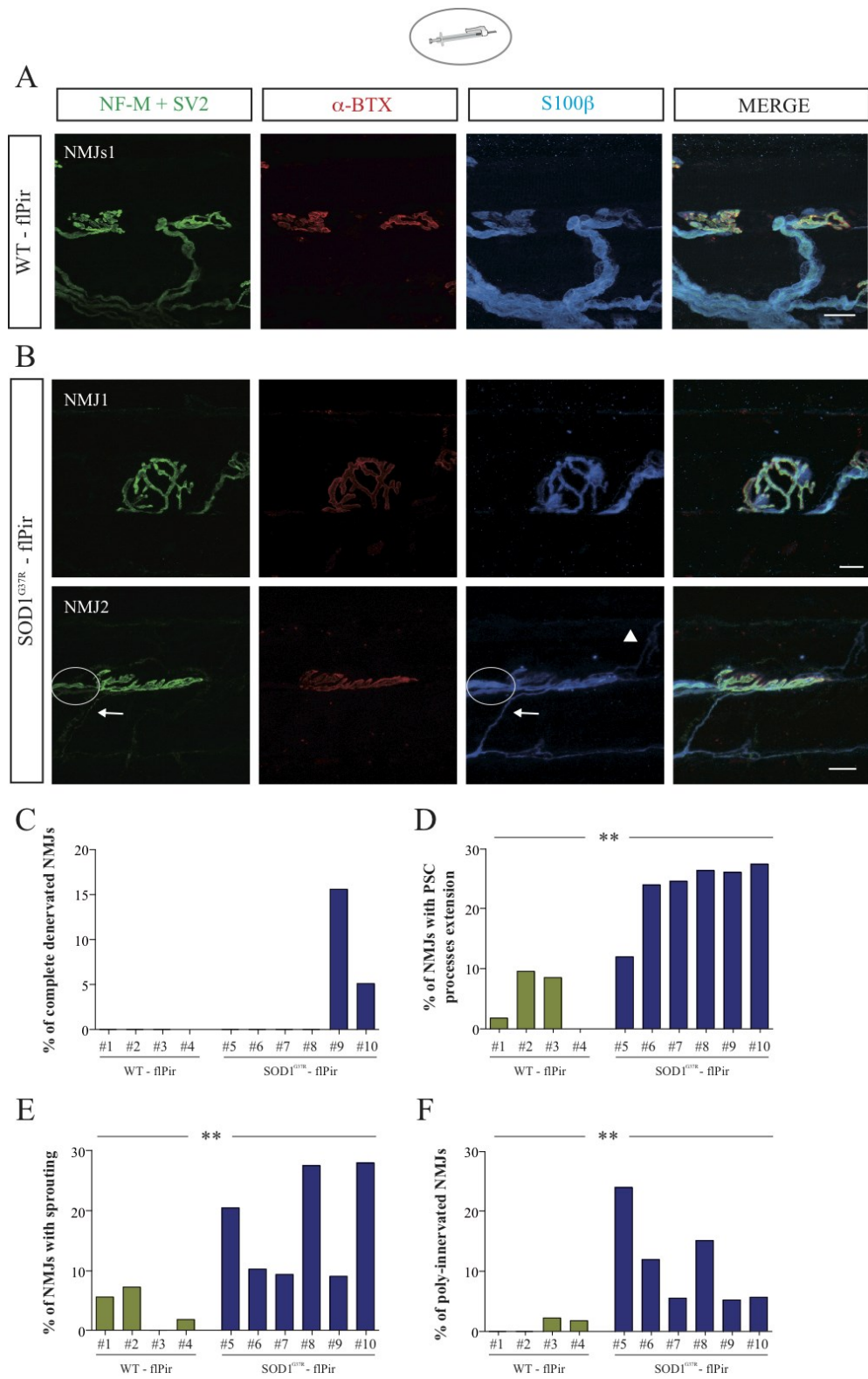
treatment (flPir) (inset). **B-C** Histogram showing the mean \pm SEM of the amplitude (**B**) and the frequency of the mEPP (**C**). **E-G**, amplitude of the first EPP evoked by PPF (**E**), the calculated quantal content determined as EPP amplitude/mEPP amplitude (**F**) and the calculated PPF determined as the mean amplitude of the second EPPs divided by the mean amplitude of the first EPPs (**G**). Note that the pirenzepine treatment did not affect synaptic properties. In addition, NMJs from SOD1^{G37R} mice (Veh and flPir group) had higher EPP amplitude and quantal content than the WT animals (data not shown).

Chronic *in vivo* injections of flPir restored NMJ repair in SOD1^{G37R} mice

We next tested whether *in vivo* down regulation of PSCs mAChRs restored NMJ morphology. Owing to the enhanced muscarinic activity of PSCs from the SOD1^{G37R} animals and their altered decoding ability (Arbour et al., 2015), we hypothesized that PSCs ability to enter into a repair mode would be impinged when ALS-related denervation occurs. Since denervation was already present at P380 (Figure 6.6C) and *in vivo* flPir treatment restored PSC decoding ability (Figure 6.4), we would predict that a downregulation of PSCs mAChRs would be beneficial for NMJ repair in this ALS model. In addition, a downregulation of PSC mAChRs should have minimal consequences on NMJ morphology in the WT animals.

We analyzed NMJ morphology using confocal microscopy of immunolabeling of PSCs, presynaptic and postsynaptic elements from WT and SOD1^{G37R} mice treated with either flPir or saline (Figure 6.6A-B and Figure S6.6A-B). Evaluation of the NMJs was performed by two experimenters blind to the experimental conditions. A total of 957 NMJs were analyzed (SOD1^{G37R} – Veh: N = 6, n = 238 NMJs; SOD1^{G37R} – flPir : N = 6, n = 311 NMJs; WT – Veh : N = 4, n = 208 NMJs; WT – flPir : N = 4, n = 200 NMJs).

Figure 6.6 Chronic *in vivo* mAChRs blockade promotes NMJ repair in SOD1^{G37R} mice

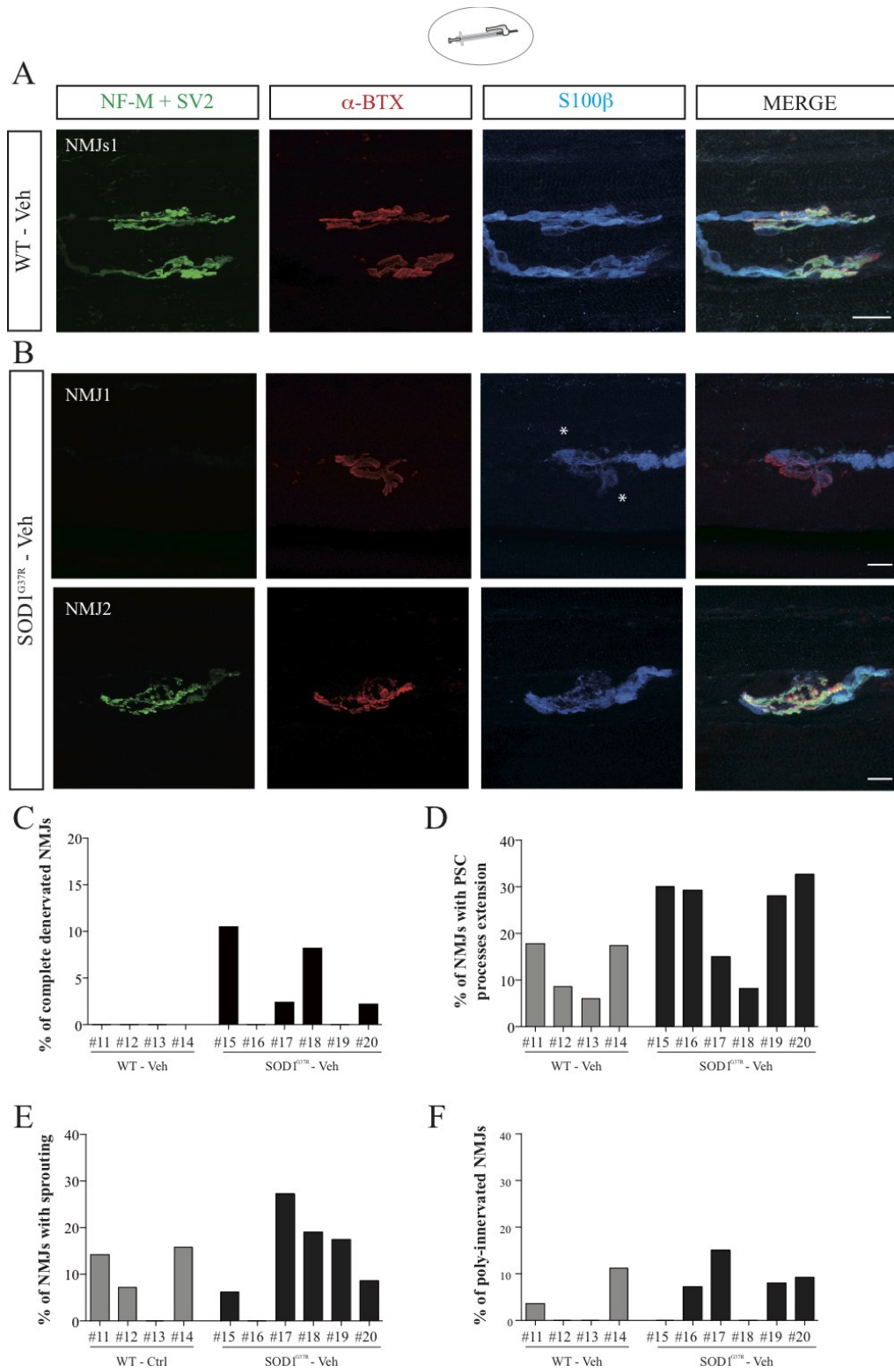


A, False color confocal images of NMJs from WT (NMJs1) and **B**, SOD1^{G37R} animals (2 examples, NMJ1 and NMJ2) which received 16 weeks of flPir injection (inset). Soleus NMJs (P380) were labeled for the nerve terminals (NF-M + SV2, green), postsynaptic nAChRs (α -BTX, red), and Schwann cells (S100 β , blue). Note the presence of PSCs process extensions (arrow head), sprouting (arrow) and poly-innervated NMJs (gray circle). Note also the healthy appearance of NMJs in the flPir-treated SOD1^{G37R} mice (first row). **C-F**, Histograms of each WT and SOD1^{G37R} animal that received the flPir injection where each bar graph represents an individual. Mean \pm SEM of complete denervated NMJs (**C**), NMJs associated with either PSCs process extensions (**D**), sprouting (**E**) or poly-innervation (**F**). Note the presence of 4 SOD1^{G37R} animals that showed no denervation (animals #5 to 8) and an animal (#9) that was not responsive to the flPir treatment. **A**: Scale bars = 20 μ m and **B**: Scale = 10 μ m. ** $p < 0.01$.

The percentage of NMJs associated with PSC-dependent events of NMJ repair (PSCs process extensions, sprouting and poly-innervated NMJs) was not different between WT and SOD1^{G37R} animals that received saline injections (Figure S6.6: *Mann-Whitney test*, $p > 0.05$). This suggests that events of PSC-dependent NMJ repair were already altered in SOD1^{G37R} from Veh group at this age (P380), consistent with our observations at P450 (Figure 6.2). However, flPir treatment influenced the innervation of NMJs such that NMJs with complete denervation were only observed in 2 SOD1^{G37R} mice out of 6 that received the flPir treatment (Figure 6.6C; *Mann-Whitney test*, $U = 8$, $p = 0.467$), while denervated NMJs were observed in 4 animals out of 6 in the saline-treated SOD1^{G37R} (Figure S6.6C; *Mann-Whitney test*, $U = 4$, $p = 0.105$).

In addition, the extent of denervation was also evaluated, considering partial innervation of NMJs (< 40% occupancy and > 40% occupancy; see Experimental Procedures). The percentage of partially denervated NMJs (> 40%) in SOD1^{G37R} mice were not different from their WT littermates (*Mann-Whitney test*, $U = 4$, $p = 0.105$) but the flPir treatment did change the level of partial innervation (< 40%) (*Mann-Whitney test*, $U = 1$, $p = 0.019$) (data not shown).

Figure S6.6 Saline injections do not alter NMJs from WT and SOD1^{G37R} animals

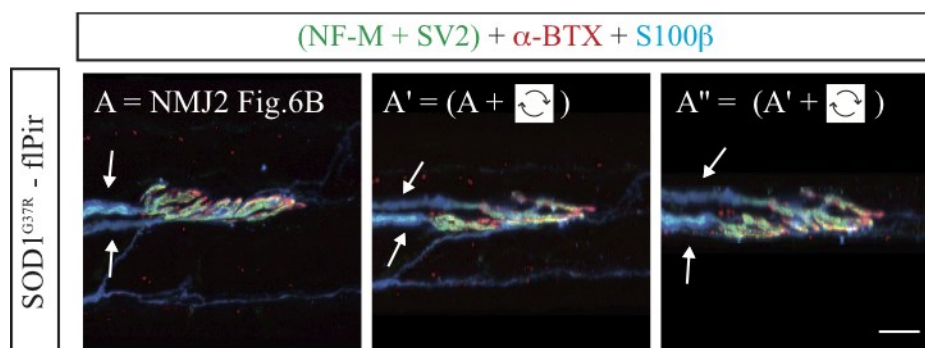


A, False color confocal images of NMJs from WT (NMJs1) and **B**, SOD1^{G37R} animals (2 examples; NMJ1 and NMJ2) that received 16 weeks of saline injection (Veh, inset). Presynaptic nerve terminals were labeled with NF-M and SV2 antibodies (green), postsynaptic nAChRs with α -BTX (red) and Schwann cells with S100 β (blue) (P380). Note the presence of complete (NMJ1) and partial (<40%) denervated NMJs (NMJ2) in the SOD1 mice. Note also the quiescent or inactive PSC associated with these affected NMJs (asterisks). **C-F**, Histograms showing the mean \pm SEM of complete denervated NMJs (**C**), NMJs associated with either PSCs process extensions (**D**) or sprouting (**E**) or poly-innervated NMJs (**F**) from WT and SOD1^{G37R} animals that received the saline injection. Each bar graph represents an individual. **A**: Scale = 20 μ m and **B**: Scale bars = 10 μ m.

Next, we evaluated the percentage of NMJs associated with PSC process extensions (Love et al., 2003; Son and Thompson, 1995a, b). Treatment with the flPir enhanced by 4.7 fold the mean of NMJs associated with PSC process extensions in SOD1^{G37R} mice compared to WT (Figure 6.6D; *Mann-Whitney test*, $U = 0$, $p = 0.010$). This suggests that a major PSC-dependent step to NMJ repair was promoted by the flPir treatment. Moreover, and consistent with the increase of PSC process extensions, we observed a significant difference in the percentage of NMJs associated with nerve terminal sprouting events between WT and SOD1^{G37R} mice (Figure 6.6E; *Mann-Whitney test*, $U = 0$, $p = 0.010$). Indeed, on average, association of NMJs from SOD1^{G37R} - flPir group with sprouting was 4.7 fold larger than NMJs from the WT - flPir group. Sprouting events also appeared more targeted (from a denervated NMJ towards an innervated one) and less erratic (navigating along the muscle fibers, less circular), indicating a more efficient re-innervation.

As a critical step toward re-innervation, the level of poly-innervation is also a criterion of NMJ repair activity. As shown in Figure 6.6B and F and S6.7, an 11 fold mean increase in poly-innervation was observed following flPir treatment (*Mann-Whitney test*, $U = 0$, $p = 0.010$), events rarely observed in hundreds of NMJs in the WT animals. This suggests that successful re-innervation were achieved in SOD1^{G37R} treated with flPir.

Figure S6.7 Validation of a poly-innervated NMJ from a SOD1^{G37R} animal



3D projection of the NMJ2 showed in Figure 6B rotated along the x axis. Note the presence of two distinct myelinated axons (arrows; NF-M /SV2 staining in green and S100β staining in blue) innervating the same endplate (α-BTX in red), suggesting that this NMJ was poly-innervated. Also, additional images were taken at lower magnification to further confirm that the two axons did not originate from the same one (data not shown). Scale = 10 μm.

The individualised perspective of all animals is presented in Figure 6.6 (C- F). Importantly, the improvements of NMJs morphology and structure by the flPir treatment described above were so prominent that the blinded experimenters were able to predict the group composition for almost all SOD1^{G37R} preparations (18 out of 22 muscles of SOD1^{G37R} animals). Interestingly, the single SOD1^{G37R} animal that misled the experimenters (2 muscles) was the same that did not respond to flPir treatment (Figure 6.6C-F, animal #9). Animal #9 showed the greatest level of denervated NMJs and the lowest level of sprouting and poly-innervated NMJs. These characteristics were also observed in a SOD1^{G37R} animal in the Veh-group (Figure S6.6; animal # 15). In contrast, others SOD1^{G37R} animals treated with the flPir treatment were very responsive as they displayed no denervated NMJs and high level of sprouting and poly-innervation (Figure 6.6E and F; animals # 5 and 8).

In summary, these data suggest that a down regulation of PSC mAChRs in ALS promotes an active NMJ plasticity and repair.

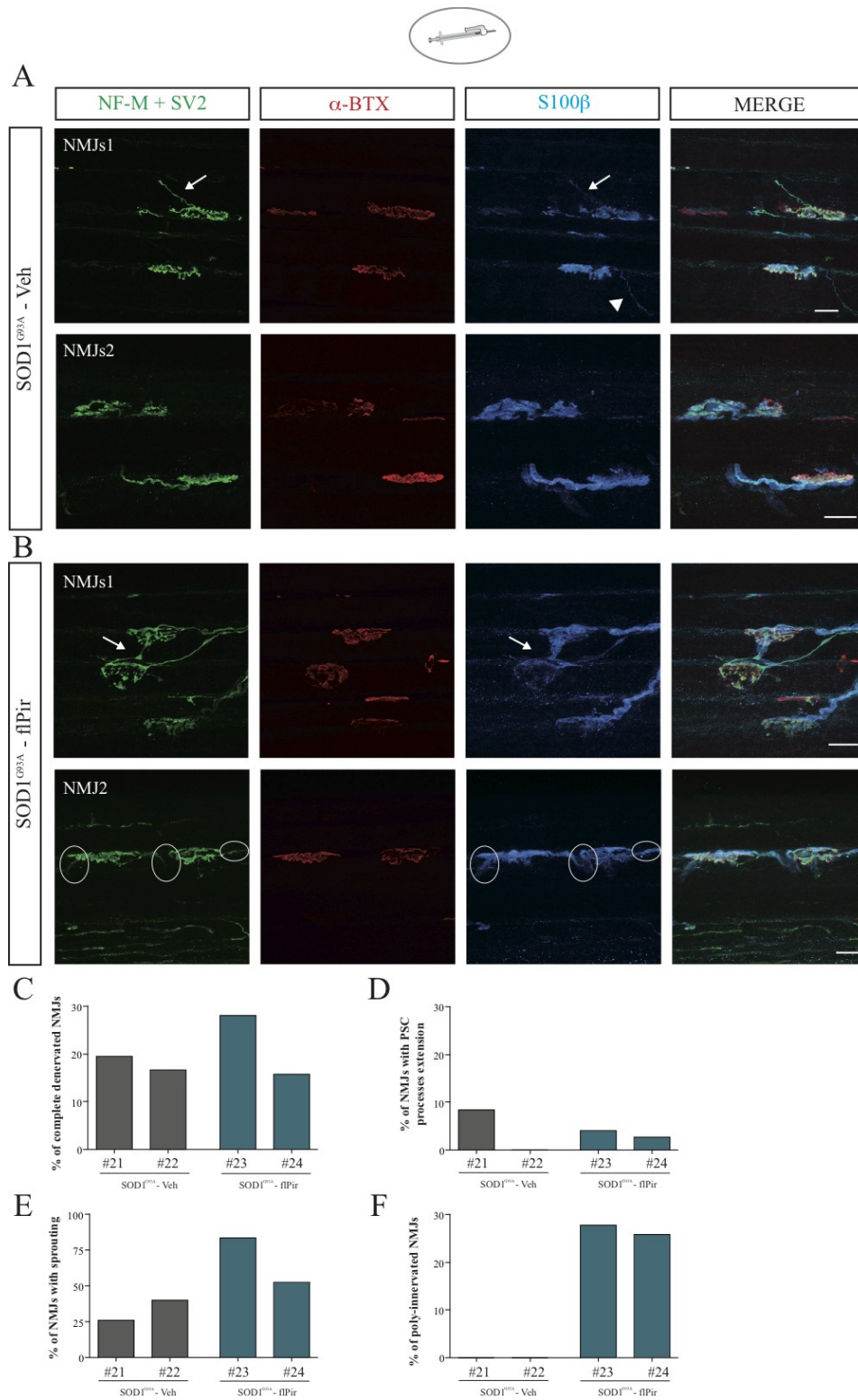
Chronic *in vivo* injections of pirenzepine promote poly-innervated NMJs in SOD1^{G93A} mice

We next applied the same flPir treatment to the well characterised SOD1 mice model carrying the G93A mutation. A total of 110 NMJs were analyzed in blinded fashion (SOD1^{G93A} – Veh: N = 2, n = 48 NMJs; SOD1^{G93A} – flPir: N = 2, n = 62 NMJs).

The SOD1^{G93A} mice showed a more aggressive and invasive form of the disease than the SOD1^{G37R} (Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995), with the presence of multiple denervated NMJs (complete, partially < 40% and partially > 40%, Figure 6.7A-C). Importantly, as shown in Figure 6.7B and F and S6.8, a striking increase of poly-innervated NMJs was observed in SOD1^{G93A}-flPir treated mice (26% of poly-innervated NMJs in the flPir-treated group vs none in the Veh-treated group). However, we saw no change in the percentage of NMJs associated with PSCs process extensions or sprouting (Figure 6.7A-B and D-E). Hence, these results suggest that a down regulation of PSC muscarinic signaling enhanced the interconnection between nearby NMJs and promoted poly-innervation in the SOD1^{G93A} mice.

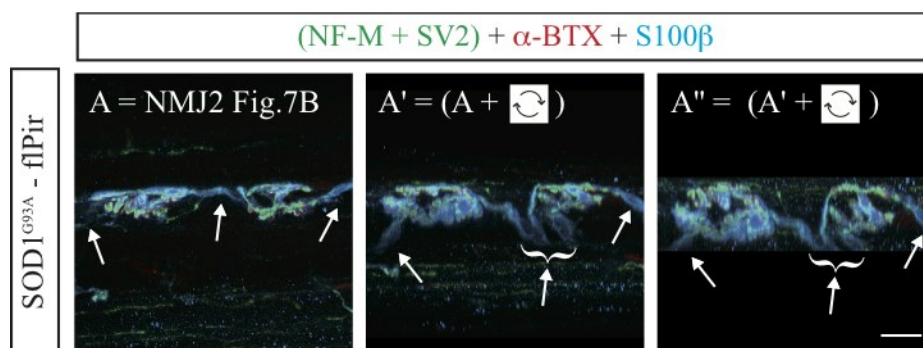
Similar to our observations with the SOD1^{G37R} animals, the morphology and structure of NMJs from SOD1^{G93A} flPir-treated animals were so typical that the experimenters accurately predicted the appropriate group (7 out of 7 muscles of SOD1^{G93A} animals).

Figure 6.7 Chronic *in vivo* mAChRs blockade promotes poly-innervated NMJs in SOD1^{G93A} mice



A, False color confocal images of NMJs from SOD1^{G93A} animals which received 10 weeks of saline (Veh; 2 examples, NMJs1 and NMJs2) or **B**, pirenzepine (flPir; 2 examples, NMJs1 and NMJ2) injection (inset). Soleus NMJs (P110) were labeled for the nerve terminals (NF-M + SV2, green), postsynaptic nAChRs (α -BTX, red), and Schwann cells (S100 β , blue). Note the presence of complete and partially denervated NMJs, PSCs process extensions (arrow head), sprouting (arrows) and poly-innervated NMJs (gray circles). **C-F**, Histograms showing the mean \pm SEM of complete denervated NMJs (**C**), NMJs associated with either PSCs process extensions (**D**), or sprouting (**E**), or poly-innervated NMJs (**F**) from SOD1^{G93A} animals that received the saline or the flPir injection. Each bar graph represents an individual. Scale bars = 20 μ m.

Figure S6.8 Validation of a poly-innervated NMJ from a SOD1^{G93A} animal



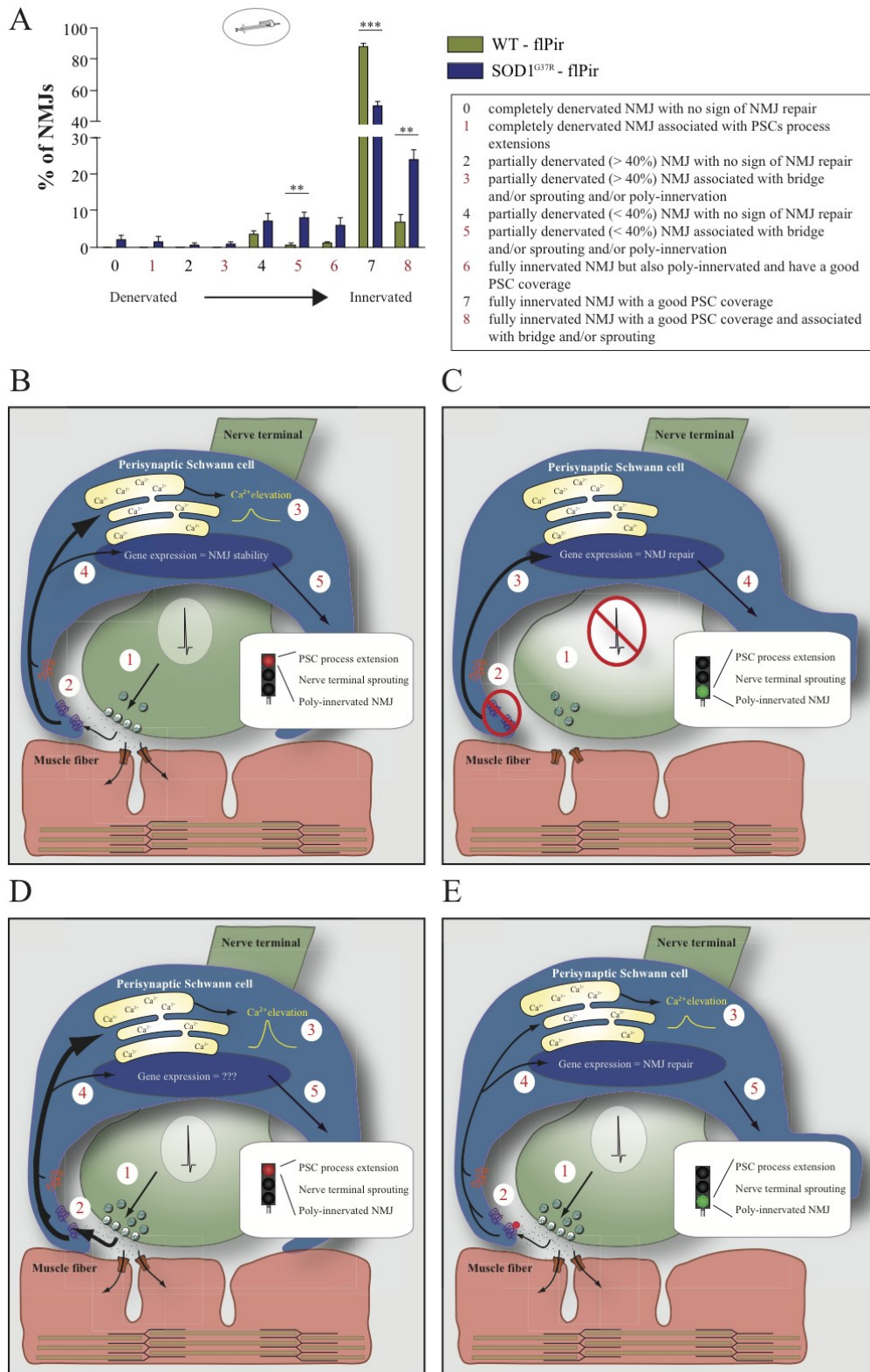
3D projection of the NMJ2 showed in Figure 7B rotated along the x axis. Note the presence of distinct myelinated axons (arrows; NF-M /SV2 staining in green and S100 β staining in blue) innervating the same endplate (α -BTX in red; two receptors islets), suggesting that this NMJ was poly-innervated. Also, additional images were taken at lower magnification to further confirmed that three distinct axons were present at this NMJ (data not shown). Scale = 10 μ m.

Chronic *in vivo* injections of pirenzepine promote better NMJ repair

The detailed analysis performed above reveal a complex process of denervation/re-innervation that reflects a continuum of NMJ stability and plasticity. It further reveals that an analysis of NMJ morphology on the sole basis of its innervation is insufficient to assess the state of an NMJ. To reflect this complexity and continuity, we built an NMJ Health Index (NHI) that reflects the quality of the innervation according to the efficacy of repair mechanisms (Figure 6.8A). All NMJs were given a health-rank (from 0 to 8), based on the status of innervation (where 0 indicates a complete denervation and 8 a full innervation) and sign(s) of glial repair (See Experimental Procedures). As shown in Figure 6.8, fIPir treatment improved the quality of innervation and structural repair properties as suggested by the shift towards categories of 5 and above. More specifically, significant differences were observed in the categories 5 (*unpaired t-test*, $p = 0.010$) and 8 (*unpaired t-test*, $p = 0.010$). Interestingly, no difference was observed in any category for the WT and the SOD1^{G37R} animals that

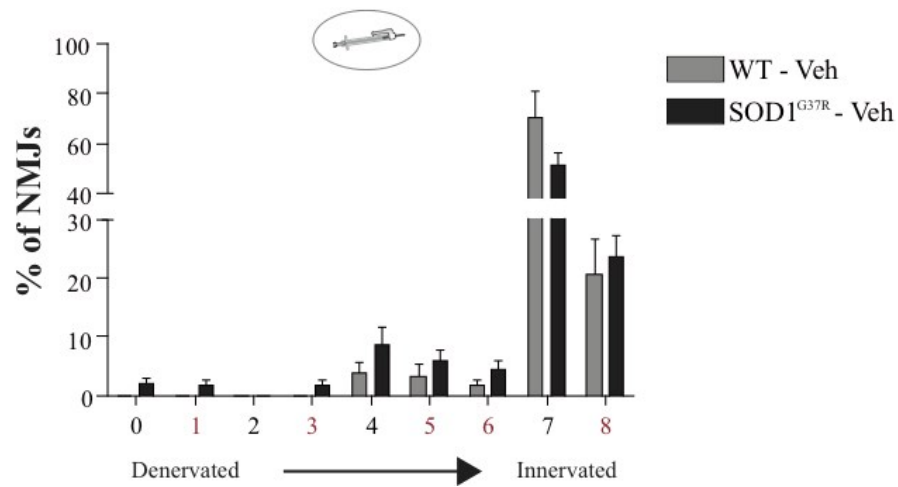
received the saline injection (Figure S6.9; *unpaired t-test*, $p > 0.05$). These results suggest that flPir treatment not only promote NMJs re-innervation and repair, but also improves the quality of innervation in SOD1^{G37R} animals.

Figure 6.8 Chronic *in vivo* mAChRs blockade promotes a broader diversity of NMJs and a better NMJ repair



A, An NMJ Health Index (NHI) was built to reflect the continuum of stability and plasticity of the NMJ according to the status of innervation and the efficacy of repair mechanisms. NMJs analyzed in **Figure 6** are distributed in the different categories (right rectangle). Categories associated with sign(s) of glial repair are in green. The gradual shift towards high rating categories reveals that the flPir treatment promotes NMJ re-innervation and repair and improves the quality of innervation in SOD1^{G37R} animals. **B-E**, Schematic representation of the main cellular events at the NMJ in normal conditions in WT animal (**B**) at denervated NMJ in WT animal (**C**), in the SOD1^{G37R} mouse model (**D**) and in the SOD1^{G37R} mouse model treated with the flPir solution (**E**). **B**, When an action potential reaches the nerve terminal, it triggers the release of neurotransmitters (1), activating PSC mAChRs (purple) and purinergic receptors (orange) (2). PSC receptor activation leads to an intracellular cascade and the release of Ca²⁺ from intracellular stores (3). PSC mAChRs activation will specifically prevent gene expression that fosters NMJ plasticity and repair (4) and PSC signs of NMJ repair will be suppressed (PSC process extension, sprouting and poly-innervated NMJ) (5). **C**, When synaptic communication is interrupted (1), a decreased activation of PSC mAChRs (2) will lead to changes in gene expression (3) and promote PSC signs of NMJ repair (4). **D**, In the SOD1^{G37R} mouse model, enhanced synaptic strength (1, thicker arrow) as well as enhanced muscarinic activation of PSC (2, thicker arrow) is observed during synaptic communication at innervated NMJ. This leads to an increased amplitude of PSC Ca²⁺ response (3) and a potentially altered gene expression profile (4), preventing PSCs from entering into a repair mode when denervation occurs (5). **E**, When SOD1^{G37R} mice are treated with flPir (pink circle), synaptic properties remain unaltered (1, thicker arrow) but PSC mAChRs activation is dampened (2). This proper PSC detection of synaptic communication leads to a normal Ca²⁺ response (3) and promotes NMJ repair (5) via a gene expression profile purportedly restored (4), hence amenable to appropriate responses in case of denervation. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure S6.9 Saline-treated WT and SOD1^{G37R} animals share similitudes in the type of NMJs



NMJs analyzed at the Figure S6.6 are distributed in the different categories of the NHI (see Experimental Procedures). Categories associated with sign(s) of glial repair are in green. Note that the saline treated (inset) WT and SOD1^{G37R} animals have the same proportion of NMJs in the categories 4 to 8.

6.2.4 DISCUSSION

We report a persistent alteration of PSCs muscarinic signaling at denervated NMJs and altered NMJ repair in a mouse model of ALS. Chronic *in vivo* dampening of PSCs mAChRs promotes NMJ repair in SOD1^{G37R} and SOD1^{G93A} mice. To our knowledge, this is the first attempt to successfully foster NMJ re-innervation in ALS by modifying PSCs phenotype.

Implication of PSCs mAChRs on NMJ repair in ALS

Detection and decoding of synaptic transmission by PSCs (Rochon et al., 2001) and the regulation of their gene expression (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994) are regulated by the same set of receptors (mAChRs and purinergics receptors) (Figure 6.8B). The level of activation of these receptors is central for a switch from maintenance to repair mode by PSCs (Ko and Robitaille, 2015). In particular, PSC mAChRs provide a fundamental pathway that orchestrates the activity-dependent maintenance and repair of the NMJ (Figure 6.8C) (Ko and Robitaille, 2015).

We previously reported an enhanced contribution of PSC mAChRs in a SOD1^{G37R} mouse model of ALS (Arbour et al., 2015) similar to what is observed at denervated NMJs (Figure 6.1). The enhanced mAChRs activation implies that PSCs should not be in a state amenable for NMJ repair (Figure 6.2, S6.6 and 6.8D). By dampening activation of PSC mAChRs with the flPir treatment, PSC mAChRs activation returned to WT level (Figure 6.4 and S6.5), presumably allowing PSCs to decode the state of innervation of the NMJ and enter into a repair mode if needed (Figure 6.8E). This conclusion is supported by the enhancement of PSC-dependent signs of NMJ repair (Figure 6.6 and 6.7).

Total blockade of PSC mAChRs had to be avoided since this could have resulted in complete withdrawal of nerve terminals (Wright et al., 2009), hence worsening the ALS symptoms. Moreover, with a total blockade of mAChRs, despite their loss of axonal contact, PSCs remained abnormally quiescent (no processes extension) (Wright et al., 2009). Interestingly, quiescent PSCs were also observed at denervated NMJs in SOD1^{G37R} animals treated with the saline solution (Figure S6.6), where PSC mAChRs are overactivated (Figure 6.4) (Arbour et al., 2015). This further reinforces the notion that the appropriate level of PSC mAChRs activation is necessary for the proper balance of maintenance and repair of the NMJ.

The extent of the effects of the flPir treatment was different in the SOD1^{G93A} and the SOD1^{G37R} mice. The treatment had a more generalised and global effect in the SOD1^{G37R} mice while it primarily increased the percentage of poly-innervated NMJs in SOD1^{G93A} mice. This could be explained in part by differences in the development of pathological changes, complicating direct comparisons between the two strains for the beginning and the end of flPir treatment. In addition, the effect of the flPir may require time to revert PSCs phenotype, which SOD1^{G93A} mice do not allow owing to the fast progression of the phenotype. Finally, converting PSCs phenotype in the SOD1^{G93A} mice may also be more difficult than in the SOD1^{G37R} mice. For instance, even at P35 (10 days before the beginning of the treatment), PSCs associated with NMJs of FF MU already express chemorepellant substances that may limit NMJ repair (De Winter et al., 2006). As a whole, our data reveal an important role for PSCs in two different SOD1 models, however, functional differences need to be taken into consideration to determine the full potential of the approach.

Sole targeting of PSCs to modify NMJ structural integrity

Another important observation of this study is that the flPir treatment did not alter synaptic transmission (Figure 6.5). Indeed, the synaptic properties after the flPir treatment were identical to those previously described (Arbour et al., 2015). This suggests that the altered synaptic properties of the nerve terminal were not a major contributor and a limiting factor to the poor NMJ repair and re-innervation observed in ALS. Thus, although the poor re-innervation in ALS could be attributed to intrinsic MN factors, differential regulation by the local environment at the NMJ also appears to be important for NMJ stability and repair (De Winter et al., 2006; Frey et al., 2000; Schaefer et al., 2005). In addition, this further supports the notion that targeting PSC phenotype can be both necessary and sufficient to restore NMJ structural integrity.

Other observations confirmed that NMJ structural integrity can be modified by targeting PSCs without affecting the presynaptic component. For instance, modifying PSC properties can mimic the response to muscle denervation/re-innervation by constitutively activating neuregulin receptor (ErbB2), causing PSC process extensions, nerve terminal sprouting and upregulation of a marker associated with PSCs response to axonal loss of contact (Hayworth et al., 2006). Interestingly, a subtype of neuregulin receptors (ErbB3) is

expressed in PSCs and interacts with CD44, a cell surface glycoprotein that regulates cell-cell and cell-matrix interactions (Gorlewicz et al., 2009). This could influence NMJ stability and plasticity. As a whole, our data and these observations highlight the fundamental roles of PSCs in NMJ preservation in ALS.

Others factors contributing to a limited re-innervation in ALS

The limited NMJ repair seen in ALS may also be related to other PSC alterations. First, it may be related to the macrophage-like behavior that PSCs acquire following nerve injury (Duregotti et al., 2015; Kang and Lichtman, 2013). Indeed, since facilitating debris clearance may accelerate the rate of re-innervation (Kang and Lichtman, 2013), one could argue that PSC-dependent debris clearance could be altered in ALS. Second, it may be related to the remodeling re-innervated NMJs (removal or addition of postsynaptic receptor sites). Interestingly, the degree of this remodeling is proportional to the duration of denervation (Kang et al., 2014), suggesting that accelerating the process of re-innervation may prevent the retraction of PSC coverage from endplate areas they previously occupied. Third, limited NMJ repair may be related to abnormal PSCs guidance of presynaptic sprouts since those observed at symptomatic SOD1^{G37R} animals were not targeted and appeared erratic (Figure 6.2B). In addition, PSCs may influence the stabilization, the re-establishment and the quality of synaptic function of the newly reformed synapse since they are necessary for NMJ establishment (Darabid et al., 2014; Reddy et al., 2003). However, evidence for these mechanisms remains to be determined and the link with PSC mAChRs remains unclear.

Other evidence suggests that PSC might slow or inhibit re-innervation by abnormally responding to disease-related denervation. Indeed, several observations on muscles from SOD1^{G93A} mice (Carrasco et al., 2016b; Carrasco et al., 2016c; Keller et al., 2009; Liu et al., 2013), rat SOD1^{G93A} (Van Dyke et al., 2016) and ALS donors (Liu et al., 2013) demonstrated that PSCs exhibit altered expression of glial markers as ALS progresses (Figure 6.8D). Importantly, not only PSCs may fail to upregulate certain genes after denervation, they may also die (Carrasco et al., 2016b). This result is important considering the role normally played by PSCs in NMJ re-innervation. Hence, targeting PSCs may help create a favorable local environment for nerve terminal-endplate connections and accelerate the process of re-

innervation. This will have profound implications for understanding factors that influence NMJ denervation and re-innervation in ALS.

Functional implications of increasing NMJ repair in ALS

Enhanced PSCs process extensions and sprouting may promote a better re-innervation and help preserve muscle function (Sobotka and Mu, 2015). Importantly, fIPir treatment improves re-innervation by increasing the percentage of poly-innervated NMJs both in SOD1^{G37R} and SOD1^{G93A} mice (Figure 6.6D and 6.7D). Hence, optimizing re-innervation process can have profound functional impact such as a better preservation of muscle mass and a larger maximal muscle force generated (Sobotka and Mu, 2015). Even if the quality and the physiological relevance of the re-innervated NMJs after fIPir treatment remain to be evaluated, it appears that tapping into the intrinsic capacity of PSCs to promote NMJ repair should help alleviate some of the devastating symptoms of motor neurons diseases and improve quality of life for patients.

The next obvious step will be to export the treatment to a more global *in vivo* approach by targeting a larger percentage of PSCs on the body muscle mass. Then, it will be possible to evaluate timing of injections, muscle function, motor performances and disease onset and progression. The impact of a downregulation of the PSCs mAChRs on MNs and motor axons survival will need to be investigated since preserving NMJ functions may reduce retrograde stress signal and promote MN survival (Perlson et al., 2009). Understanding the mechanisms that influence MN and NMJ survival will have profound implications for understanding disease biology.

PSCs alterations in ALS: a predictive value of the outcome?

The selective vulnerability and the lack of anatomical plasticity observed at the NMJ are correlated with altered PSCs properties (Figures 6.1 and 6.2). Interestingly, a recent study reported that reduced PSC numbers and inappropriate coverage were observed prior to significant denervation and correlated with future disease-related denervation (Carrasco et al., 2016c). Furthermore, PSC mAChRs sensitivity observed in the SOL muscles at pre-onset stage of the disease is correlated with the subsequent vulnerability to denervation (Arbour et al., 2015). Since PSCs ablation at adult NMJs decreased presynaptic function and triggered

retraction of nerve terminals (Reddy et al., 2003), one could argue that any functional PSC alterations in ALS could have a predictive value of the outcome and then have significant impact on disease pathogenesis and progression.

6.2.5 CONCLUSION

This study shows that targeting PSC excitability fostered NMJ repair in ALS, reflecting their great adaptability (Ko and Robitaille, 2015). Future demonstration of PSCs alterations in other ALS models (e.g. TDP43, FUS and C9orf72) will highlight the importance and broad implication of such mechanisms.

Fostering NMJ repair by dampening PSC mAChRs activation may be a key step to reduce muscle atrophy and maintain a higher level of muscular functions in ALS. These data could provide the foundation for a new set of targets aiming at improving quality of life of patients and change disease onset and progression. One could envisage the use of combined therapeutic approaches target PSC functions and CNS-targeted to increase treatment efficacy that could prove useful for other motor neuron diseases.

6.2.6 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

The following mouse lines were obtained from The Jackson laboratories (Bar Harbor, ME, USA): transgenic mice heterozygote for the human *SOD1* gene carrying the mutation G37R (SOD1^{G37R}, line 29; [B6.Cg-Tg(SOD1*G37R)29Dpr/J]; stock number 008229) (Wong et al., 1995) or G93A (SOD1^{G93A}, [B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J], stock number 002726) (Gurney et al., 1994) and the transgenic mice homozygote for the jellyfish yellow fluorescent protein (Thy1-YFP, [B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J], stock number 003709) (Feng et al., 2000). To visualize MN axons and nerve terminals in the SOD1^{G37R} mice, we crossed mice expressing Thy1-YFP with SOD1^{G37R} mice (YFP.SOD1^{G37R}). SOD1^{G37R}, YFP.SOD1^{G37R} and their wild type littermates (WT and YFP.WT) were maintained in a C57BL/6 genetic background and were genotyped by PCR amplification for the human *SOD1* gene performed on tail biopsy samples taken at the time of weaning (mice weight > 10 gr).

Disease onset and progression were assessed weekly by monitoring animal weight (beginning at P290 maximum) and behavioural performances including the presence of tremors, lack of hind limb extension reflex and measurements of fore- and hind limb grip strength. We refer to the onset of the disease by the peak of the body weight curve and to the early disease as a 10% loss from the peak body weight. In our animal facilities, the median age of onset of the symptomatic SOD1^{G37R} animals used in this study was 426 days, while the median age of early disease was 499 days. The average duration of the early disease progression (from age of onset to early disease) was 56.3 ± 5.3 days. For the YFP.SOD1^{G37R}, ages were delayed (median age of onset = 491.5 days, median age of early disease = 580.5 days, and average duration of early disease progression = 56.8 ± 11.2 days).

Pre-symptomatic animals were used at postnatal day P365-392 (P380) for the SOD1^{G37R} mice, P445-479 (P460) for the YFP.SOD1^{G37R} mice and P113 (P110) for the SOD1^{G93A} mice. An autopsy was performed on every animal. Animals with either cancerous tissue or any sign of infection were discarded (~ 2-3%). Only males were used in the present study. All experiments were performed in accordance with the guidelines for maintenance and care of animals of the Canadian Council of Animal Care and Université de Montréal.

Sciatic nerve crush surgery

Animals were anesthetized in an induction chamber using isoflurane (2-3% in 97-98% O₂) and maintained using a breathing mask. Mice were placed in prone position, and the hind limb stretched and stabilized. The skin was shaved and cleaned with 70% alcohol and povidone iodine solution. The left sciatic nerve was exposed via a longitudinal incision through the skin made laterally at the hip level and by gently separating the *biceps femoris* and *gluteus maximus*. The nerve crush injury was performed by maximum pressure using a Moria microserrated curved forceps (MC31) for 15 seconds. Skin was sutured with 5-0 vicryl suture (CDMV) and mice were allowed to recover in a clean, warm and dry environment. Both motor and sensory dysfunction was evident following nerve crush injury. Mice were also administered Buprenorphine (3µg/10g of body weight; Temgesic) as an analgesic by subcutaneous injections twice a day for 24 hours.

In situ nerve-muscle preparations

Soleus (SOL) nerve-muscle preparations were pinned in a Sylgard-coated experimental chamber filled with normal Rees' Ringer's saline solution containing (in mM): 110 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 11 Glucose, 0,3 Glutamate, 0,4 Glutamine, 5 BES, 4,34 x 10⁻⁷ Cocarboxylase and 0,036 Choline Chloride. Experiments were performed at 27°C ± 2°C under continuous perfusion of oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) saline solution. The cut end of the nerve was stabilised by negative pressure in a suction stimulating electrode filled with the same perfusing physiological solution.

Calcium imaging of PSCs

Nerve-muscle preparations were incubated for 70-90 min (2 X 35-45 min) in a pre-oxygenated Ringer's saline solution containing 5 µM Rhod-3 AM (Thermo Fisher Scientific) or 10 µM Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific) and 0.02% pluronic acid (Thermo Fisher Scientific) at 26°C ± 1°C as previously described (Arbour et al., 2015; Todd et al., 2010). Excitation of the Ca²⁺ indicator was achieved using the 559 nm line of the diode laser (Rhod-3 AM) or the 488 nm line of the argon ion laser (Fluo-4 AM) of a FV1000 Olympus confocal microscope. Emitted fluorescence was detected with a 20X or a 60X water immersion objective (respectively 0.95 NA; XLUMPlanFl, Japan and 0.90 NA; Olympus, Tokyo, Japan)

and fed into either a spectral window detector (570 nm and above) or a bandpass filter (500 - 545 nm). Software and hardware settings were standardized to achieve a similar range of basal fluorescence within a range of arbitrary units (300 +/- 50). Changes in fluorescence were measured over PSCs soma using the ImageJ software and expressed as: $\% \Delta F/F = (F - F_{\text{rest}})/F_{\text{rest}} \times 100$. Changes in fluorescence were measured by subtracting the background fluorescence from the neighbouring muscle fiber. Experiments were discarded when baseline fluorescence was not stable or focus drift occurred. Ca^{2+} imaging experiments on saline or drug-treated animals were performed by an experimenter blinded to the group of the animals tested.

Preparations were allowed to stabilize with constant bath perfusion (2 ml/min) for at least 20 min before any experiment. PSC Ca^{2+} responses were evoked by endogenous release of neurotransmitter by stimulating the SOL nerve (50 Hz, 5 sec). PSC Ca^{2+} responses were also elicited by local applications of agonists (10 μM ; muscarine or adenosine 5'-triphosphate (ATP), Sigma) dissolved in the same Ringer solution used for the experiment. Local application of agonists was performed using a brief, small pulse of positive pressure (20-40 PSI, 150 ms) generated by a Picospritzer II (Parker Instruments) applied on a glass pipette (5 M Ω , ~ 2 mm tip diameter) positioned close to the PSC soma. Muscle contractions were prevented by blocking postsynaptic cholinergic receptors with d-tubocurarine chloride (1.8 - 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma). One NMJ per muscle was imaged when motor nerve stimulation was applied to the preparation but PSCs at several NMJs were imaged per muscle with agonist applications. A recovery of at least 20 min was allowed between each application when several applications were performed on the same cells.

In vivo injections

For intermuscular injections, we adapted a technique from Wright et al. (Wright et al., 2009). Mice were anesthetized with isoflurane and, under aseptic conditions, saline (Veh; 0.9%) or antagonist was administrated in both legs between the *gastrocnemius* and the *peroneus* to target the SOL muscle. We used sterile injection devices that contain a small volume (BD Safety Glide Insulin Syringe, 31G, 3/10 mL). Antagonists were dissolved in 50 μL of physiological saline (0.9%) to minimize pressure volume injury. Pirenzepine Fluorescent ligand (Red) (flPir; Abcam; 1 μM) was used as an antagonist of mAChRs, with

preferential affinity to M3 subtype. Animals were randomly assigned to the Veh or fIPir group in a blinded manner. Injections were performed three times a week for 10 weeks for the SOD1^{G93A} mice (from P45 until P110) and 16 weeks for the SOD1^{G37R} mice (from P280 until P380). This regime of injection was determined by performing Ca²⁺ imaging experiments at different time points after injection to control for the half-life of the drug effects on the amplitude of PSC Ca²⁺ responses evoked by nerve-stimulation, local application of muscarine and ATP (data not shown). Mice were weighted weekly to ensure a good follow-up of their overall health and of the disease progression.

Electrophysiological recordings of synaptic transmission

Electrophysiological recordings on Veh or fIPir-treated animals were performed by an experimenter blinded to the group of the animals tested and according to previously described methods (Arbour et al., 2015). Briefly, stimulation of the SOL nerve was performed using a suction electrode filled with extracellular saline. Endplate potentials (EPPs) were recorded using glass microelectrodes (1.0 mm OD; WPI) pulled to 40-70 M Ω (filled with 3 mM KCl) with a Brown-Flaming micropipette puller (Sutter Instruments). Synaptic responses were amplified by an AM Systems 1600 amplifier and further amplified (100x) and filtered (2 kHz) by a Warner Instruments DC amplifier. The recordings were digitized using a national Instruments BNC 2110 board and subsequently acquired with WinWCP software (John Dempster, Strathclyde University, Strathclyde, UK).

Synaptic strength of recorded NMJs was determined by measuring the paired-pulse facilitation (PPF) and the quantal content (m). These were obtained using a low Ca²⁺ (1 mM), high Mg²⁺ (6.4 mM) Ringer solution. PPF was obtained using two stimuli of 0.1 ms duration at 10 ms interval, elicited at 0.2 Hz. PPF was calculated as the mean amplitude of the second EPPs divided by the mean amplitude of the first EPPs, including failures. Quantal content (m) was determined using the amplitude of the miniature endplate potentials (MEPPs), as described elsewhere (Del Castillo and Katz, 1954): $m = (\text{mean amplitude of EPPs} / \text{mean amplitude of the MEPPS})$. MEPP amplitude and frequency were determined using five to ten minutes of recordings without motor nerve stimulation. A minimum of 100 MEPPs were used to calculate m for each NMJ. Recordings with an initial membrane potential depolarised above

-65 mV or with more than 5 mV variation from holding potential were not included for analysis.

Immunofluorescence and confocal imaging

Immunofluorescent labeling at the NMJ was performed according to the method previously described (Arbour et al., 2015). Briefly, mice were sacrificed by an overdose of isoflurane and SOL muscles were dissected in oxygenated Rees' Ringer's solution and pinned in a Sylgard coated petri dish. Muscles were then fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in PBS buffer (in mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 2 KH₂PO₄) at room temperature and permeabilized in 100% cold-methanol at -20°C for 6 min. Nonspecific labeling was blocked by incubating muscles with 10% normal donkey serum (NDS) in PBS containing 0.01 % Triton X-100 for 20 min at room temperature. Muscles were then incubated with different primary antibodies; one at a time for a maximum of 4 different antibodies incubated for 2h each (for axons, chicken anti-neurofilament M, NF-M, 1:2000, Rockland Immunochemicals Inc; for nerve terminals, mouse IgG1 anti-synaptic vesicular protein 2, SV2, 1:2000, Developmental Studies Hybridoma Bank; for Schwann cells, rabbit anti-S100 β , 1:250, Dako; for Mac-2, rat anti-Mac-2, 1:250; for fiber type I, mouse anti-type I myosin heavy chain IgGIIb, BA-D5-c, 1:100, Developmental Studies Hybridoma Bank; for fiber type IIa, anti-type IIa myosin heavy chain IgG1, SC-71-c, 1:100, Developmental Studies Hybridoma Bank). After washing, muscles were incubated with the appropriate secondary antibodies for 1h (goat anti-mouse IgG1 Alexa 488; donkey anti-chicken Alexa 405 or 448; donkey anti-rabbit Alexa 647; donkey anti-rat Alexa 405; goat anti-mouse IgGIIb Alexa 647; goat anti-mouse IgG1 Alexa 488; all 1:500, Jackson Immunoresearch). Postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) were labeled with Alexa 405, 594 or 647-conjugated- α -bungarotoxin (1.33 – 2.0 μ g/ml, Invitrogen) for 30-45 min. All antibody incubations were performed in PBS containing 0.01% Triton X-100 and 2% NDS at room temperature. After each step (except blocking) muscles were rinsed three times in PBS containing 0.01% Triton X-100 for 5 min. Muscles were then mounted in Prolong Gold or Diamond antifade reagent with or without DAPI (Invitrogen). All labels were observed simultaneously using the spectral detection feature of an Olympus FV1000. No further image manipulations were performed after acquisition.

Morphological analysis

Seven criteria were used to analyze all surfaces NMJ morphology and are detailed in (Arbour et al., 2015). Briefly, criteria for the presynaptic (partial < 40% Vs partial > 40% Vs complete denervation, terminal/axonal sprouting and poly-innervation), the postsynaptic (ectopic and faint clustered nAChRs) and the glial elements (terminal/axonal glial processes extension and PSC incomplete/over-coverage) were analyzed. Evaluation of the NMJ morphology was conducted by two blinded observers (or more in case of disagreement). In doubt or if the staining was not clear for one or several criteria, the NMJ was discarded for this/these particular criteria(s) or the entire muscle was discarded. Muscle fiber diameter was achieved by measuring the diameter of muscle fibers (n = 25 fibers/muscle) on fixed muscles with the transmitted light.

NMJ Health index

According to these criteria, NMJs were categorized as 0 when a completely denervated NMJ had no sign of NMJ repair; 1 when a complete denervated NMJ was associated with PSC process extensions; 2 when a partially denervated (> 40%) NMJ with no sign of NMJ repair; 3 when a partially denervated (> 40%) NMJ was associated with PSC process extensions and/or sprouting and/or was poly-innervated ; 4 when a partially denervated (< 40%) NMJ had no sign of NMJ repair; 5 when a partially denervated (< 40%) NMJ was associated with PSC process extensions and/or sprouting and/or poly-innervation; 6 when an NMJ was fully innervated but also poly-innervated by more than one myelinated axon and had a good PSC coverage; 7 when it was a fully innervated NMJ with a good PSC coverage and finally, 8 when it was a fully innervated NMJ with a good PSC coverage and also associated with PSC process extensions and/or sprouting.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM and were analyzed using the GraphPad Software. N represents the number of animals and n refers to the numbers of NMJs or PSCs. *Unpaired t-tests* were performed to compare two different conditions from different experiments. *Repeated measures one-way ANOVA test with Bonferroni's Multiple Comparison post-test* was used to compare Ca^{2+} responses at the same PSC induced by

different agonist applications during the same experiment. For morphological analysis of the SOD1^{G37R} mice was performed in consultation with the statistical consulting service of the Department of Mathematics and Statistic of Université de Montréal. Given the sample size, it was preferable to carry out non-parametric analyzes by setting treatments to compare the groups and fixing the groups to compare treatments (*Mann-Whitney test*). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

6.2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Christine Vande Velde for comments over the course of this work and for her constant support, stimulating discussions and for reading and commenting the manuscript. We also would like to thank Julie Pépin, Danielle Veilleux and François Auclair for technical support. This work was supported by a Bernice Ramsay Discovery grant (ALS Canada), grants from the Canadian Institutes for Health research to RR (MOP-14137 and MOP-111070), a Leader Opportunity Fund from the Canadian Foundation of Innovation and a grant from the Robert Packard Center for ALS Research at Johns Hopkins and an infrastructure grant from the Fonds Recherche Quebec-Santé (FRQ-S) to the Groupe de recherche sur le Système Nerveux Central. D.A. held a studentship from National Science Engineering Research Council of Canada. É.M. held a FRQ-S Master's Training Award and an ALS Canada Doctoral Research Award and E.T. held a FRQ-S Master's and an ALS Cycle of Hope Doctoral Research Award. The authors declare no competing financial interests.

6.2.8 REFERENCES

- Arbour, D., Tremblay, E., Martineau, E., Julien, J.P., and Robitaille, R. (2015). Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model. *J Neurosci* 35, 688-706.
- Carrasco, D.I., Bahr, B.A., Seburn, K.L., and Pinter, M.J. (2016a). Abnormal response of distal Schwann cells to denervation in a mouse model of motor neuron disease. *Exp Neurol*.
- Carrasco, D.I., Seburn, K.L., and Pinter, M.J. (2016b). Altered terminal Schwann cell morphology precedes denervation in SOD1 mice. *Exp Neurol* 275 Pt 1, 172-181.
- Darabid, H., Arbour, D., and Robitaille, R. (2013). Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 33, 1297-1313.
- Darabid, H., Perez-Gonzalez, A.P., and Robitaille, R. (2014). Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nat Rev Neurosci* 15, 703-718.
- De Winter, F., Vo, T., Stam, F.J., Wisman, L.A., Bar, P.R., Niclou, S.P., van Muiswinkel, F.L., and Verhaagen, J. (2006). The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci* 32, 102-117.
- Del Castillo, J., and Katz, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124, 560-573.
- Duregotti, E., Negro, S., Scorzeto, M., Zornetta, I., Dickinson, B.C., Chang, C.J., Montecucco, C., and Rigoni, M. (2015). Mitochondrial alarmins released by degenerating motor axon terminals activate perisynaptic Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E497-505.

Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41-51.

Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., and 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., and Charlton, M.P. (1999). Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci* 19, 3836-3846.

Georgiou, J., Robitaille, R., Trimble, W.S., and Charlton, M.P. (1994). Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12, 443-455.

Gordon, T., Hegedus, J., and Tam, S.L. (2004). Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease. *Neurol Res* 26, 174-185.

Gorlewicz, A., Wlodarczyk, J., Wilczek, E., Gawlak, M., Cabaj, A., Majczynski, H., Nestorowicz, K., Herbiak, M.A., Grieb, P., Slawinska, U., *et al.* (2009). CD44 is expressed in non-myelinating Schwann cells of the adult rat, and may play a role in neurodegeneration-induced glial plasticity at the neuromuscular junction. *Neurobiol Dis* 34, 245-258.

Gould, T.W., Buss, R.R., Vinsant, S., Prevet, D., Sun, W., Knudson, C.M., Milligan, C.E., and Oppenheim, R.W. (2006). Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26, 8774-8786.

Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., *et al.* (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.

Hayworth, C.R., Moody, S.E., Chodosh, L.A., Krieg, P., Rimer, M., and Thompson, W.J. (2006). Induction of neuregulin signaling in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation. *J Neurosci* 26, 6873-6884.

Kang, H., and Lichtman, J.W. (2013). Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young adult and aged animals. *J Neurosci* 33, 19480-19491.

Kang, H., Tian, L., Mikesch, M., Lichtman, J.W., and Thompson, W.J. (2014). Terminal Schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury. *J Neurosci* 34, 6323-6333.

Kang, H., Tian, L., and Thompson, W. (2003). Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *J Neurocytol* 32, 975-985.

Keller, A.F., Gravel, M., and 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.

Ko CP, Robitaille R (2015) in *Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular synapse: adaptable, multitasking glial cells*, eds Barres, Freeman, Stevens (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY).

Lee, Y.I., Li, Y., Mikesch, M., Smith, I., Nave, K.A., Schwab, M.H., and Thompson, W.J. (2016). Neuregulin1 displayed on motor axons regulates terminal Schwann cell-mediated synapse elimination at developing neuromuscular junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E479-487.

Liu, J.X., Brannstrom, T., Andersen, P.M., and Pedrosa-Domellof, F. (2013). Distinct changes in synaptic protein composition at neuromuscular junctions of extraocular muscles versus limb muscles of ALS donors. *PLoS One* 8, e57473.

Love, F.M., Son, Y.J., and Thompson, W.J. (2003). Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J Neurobiol* 54, 566-576.

Love, F.M., and Thompson, W.J. (1999). Glial cells promote muscle reinnervation by responding to activity-dependent postsynaptic signals. *J Neurosci* 19, 10390-10396.

Magill, C.K., Tong, A., Kawamura, D., Hayashi, A., Hunter, D.A., Parsadanian, A., Mackinnon, S.E., and Myckatyn, T.M. (2007). Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: a confocal microscopic study in transgenic mice. *Exp Neurol* 207, 64-74.

Nibbering, P.H., Leijh, P.C., and van Furth, R. (1987). Quantitative immunocytochemical characterization of mononuclear phagocytes. II. Monocytes and tissue macrophages. *Immunology* 62, 171-176.

O'Malley, J.P., Waran, M.T., and Balice-Gordon, R.J. (1999). In vivo observations of terminal Schwann cells at normal, denervated, and reinnervated mouse neuromuscular junctions. *J Neurobiol* 38, 270-286.

Perlson, E., Jeong, G.B., Ross, J.L., Dixit, R., Wallace, K.E., Kalb, R.G., and Holzbaaur, E.L. (2009). A switch in retrograde signaling from survival to stress in rapid-onset neurodegeneration. *J Neurosci* 29, 9903-9917.

Philips, T., and Rothstein, J.D. (2014). Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 262 Pt B, 111-120.

Reddy, L.V., Koirala, S., Sugiura, Y., Herrera, A.A., and Ko, C.P. (2003). Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron* 40, 563-580.

Reichert, F., Saada, A., and Rotshenker, S. (1994). Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *J Neurosci* *14*, 3231-3245.

Reynolds, M.L., and Woolf, C.J. (1992). Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol* *21*, 50-66.

Robitaille, R., Jahromi, B.S., and Charlton, M.P. (1997). Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol* *504 (Pt 2)*, 337-347.

Rochon, D., Rousse, I., and Robitaille, R. (2001). Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* *21*, 3819-3829.

Schaefer, A.M., Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2005). A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* *490*, 209-219.

Sobotka, S., and 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., and Thompson, W.J. (1995a). Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* *14*, 133-141.

Son, Y.J., and Thompson, W.J. (1995b). Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* *14*, 125-132.

Tallon, C., Russell, K.A., Sakhalkar, S., Andrapallayal, N., and Farah, M.H. (2015). Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice. *Neuroscience* *312*, 179-189.

Tam, S.L., and Gordon, T. (2003). Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *J Neurobiol* 57, 221-234.

Todd, K.J., Darabid, H., and Robitaille, R. (2010). Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 30, 11870-11882.

Van Dyke, J.M., Smit-Oistad, I.M., Macrander, C., Krakora, D., Meyer, M.G., and Suzuki, M. (2016). Macrophage-mediated inflammation and glial response in the skeletal muscle of a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Exp Neurol* 277, 275-282.

Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (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.

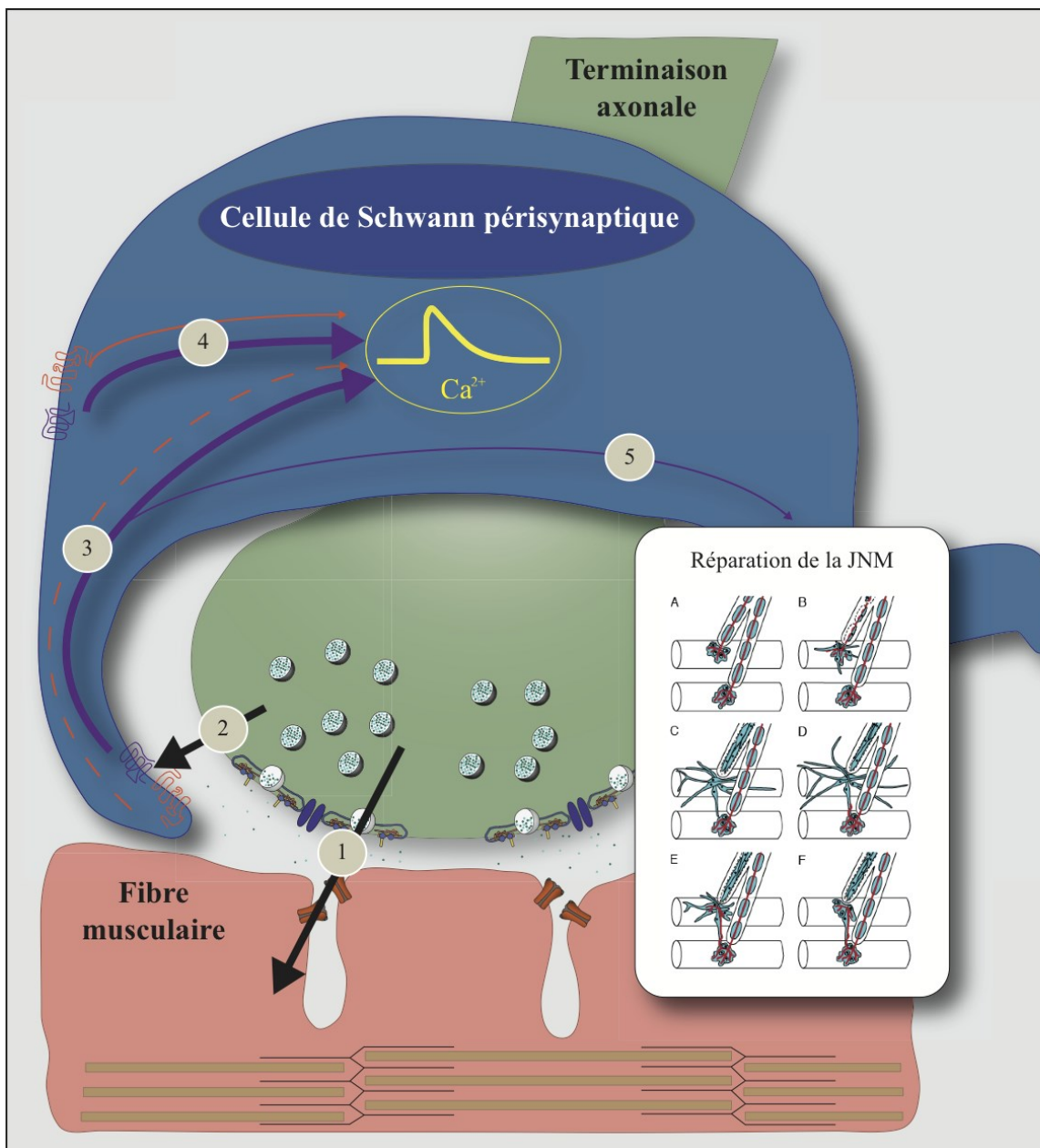
Wright, M.C., Potluri, S., Wang, X., Dentcheva, E., Gautam, D., Tessler, A., Wess, J., Rich, M.M., and Son, Y.J. (2009). Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses. *J Neurosci* 29, 14942-14955.

7. Discussion générale

Dans cette thèse, j'ai cherché à comprendre les altérations fonctionnelles des CSPs dans un contexte pathologique de SLA ainsi que la répercussion physiologique sous-jacente de celles-ci. Plus précisément, nous avons montré que : 1) les JNMs du muscle SOL de la souris SOD1^{G37R} libèrent davantage de NTs, 2) que les cellules gliales décodent anormalement la communication synaptique à la JNM via 3) une hyper-activation de leurs mAChRs et 4) que le rétablissement de cette capacité de détection, via une réduction de l'activation des mAChRs, restaure les signes de réparation de la JNM (Figure 7.1). Ceci confirme un mécanisme jusqu'à présent considéré hypothétique (modèle proposé en figure 3.8); c'est-à-dire qu'il y aurait un lien direct entre la capacité de détection, le niveau d'activation muscarinique des CSPs et les processus de réparation de la JNM. De plus, à ma connaissance, ces deux études mettent pour la première fois en lumière un type de cellule glial jusqu'ici négligé par la communauté scientifique de la SLA, les plaçant directement sur la liste des cibles thérapeutiques potentielles.

Les résultats de cette thèse peuvent avoir divers impacts tant au niveau de la recherche fondamentale portant sur les interactions neurone-glie qu'au niveau d'une application clinique pour l'élaboration d'un traitement thérapeutique combiné pour la SLA ou d'autres maladies neuromusculaires. Dès lors, cette section portera sur les implications de l'altération de la capacité de détection, et implicitement celles des mAChRs des CSPs, et sur les implications morphologiques et fonctionnelles de l'augmentation des mécanismes de réparation dans la SLA. Par la suite, une revue (publiée dans *The Journal of Physiology*) portant sur les perspectives des interactions neurone-glie à la JNM sera présentée. La discussion se poursuivra par une actualisation du modèle de la JNM et de la contribution gliale dans la SLA. Pour finir, les implications fondamentales et cliniques des résultats de cette thèse seront examinées.

Figure 7.1 Modèle des altérations synaptiques et gliales à la JNM de souris SOD1^{G37R}



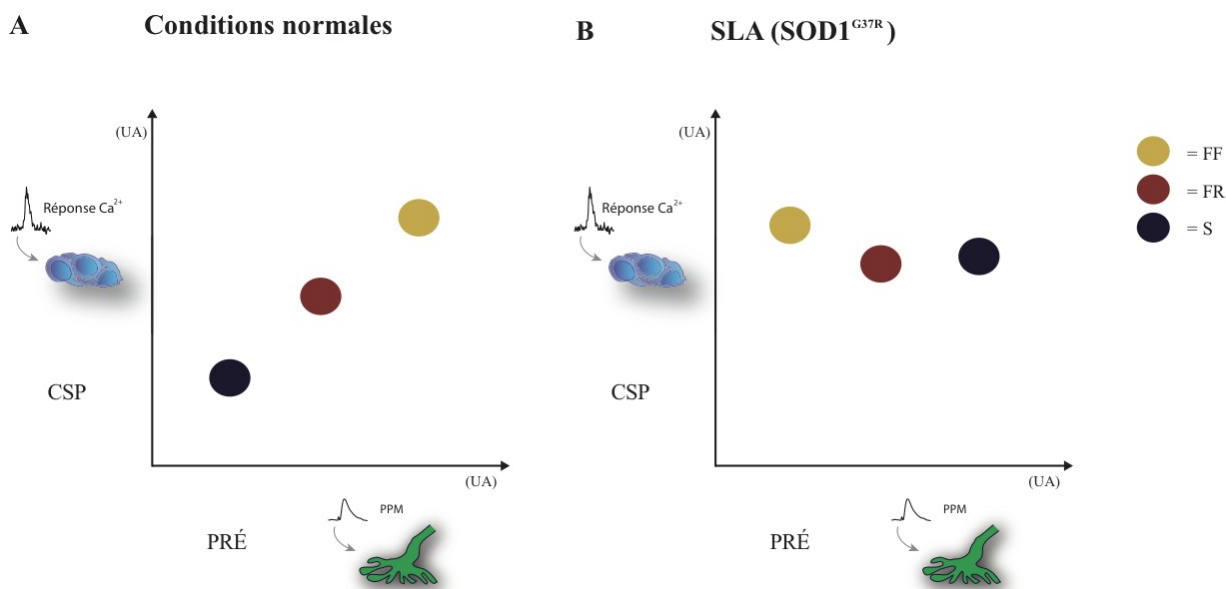
- 1- Les JNMs libèrent davantage de NTs.
- 2- La capacité de détection des CSPs est altérée.
- 3- La contribution des mAChRs est augmentée lors de la communication synaptique.
- 4- La sensibilité des mAChRs est augmentée et corrélée avec la vulnérabilité des UMs.
- 5- L'hyper-activation des mAChRs limite les mécanismes de réparation à la JNM.

7.1 Implications des altérations de la capacité de détection des CSPs

7.1.1 Altérations synaptiques à la JNM de SLA

L'une des premières constatations du premier article de cette thèse est le fait qu'il semble y avoir un étonnant dérèglement dans le patron des forces synaptiques des terminaisons axonales des différentes UMs (Premier article de recherche; Figures 5.3 et 5.7). En effet, les UMs de type S sont normalement celles ayant les plus petits contenus quantiques alors que ceux des UMs de type F sont plus élevés ($S < FR < FF$) (Reid et al., 1999). Toutefois, on observe un scénario complètement opposé aux JNMs de SOL de souris $SOD1^{G37R}$, où les JNMs de type S sont celles relâchant davantage de NTs. De plus, des données non publiées de notre laboratoire nous indiquent que le patron des contenus quantiques des terminaisons axonales des différentes UMs est altéré chez la souris $SOD1^{G37R}$ par rapport à celui des souris sauvages (Figure 7.2; $FF < FR < S$) (Martineau and Robitaille, 2017; Tremblay et al., 2017). Des études ayant aussi procédé à des enregistrements électrophysiologiques à la JNM de différents modèles animaux (murin et larve de poisson zébré) avec différentes mutations associées à la SLA ($SOD1^{G93A}$, FUS et TDP-43) confirment ce patron altéré (Armstrong and Drapeau, 2013a, b; Rocha et al., 2013). Ce nouveau patron de force synaptique des différentes UMs est inversement corrélé avec la vulnérabilité différentielle de ces dernières.

Figure 7.2 Patron de force synaptique en fonction des réponses calciques des CSPs



Représentation graphique de la force synaptique (PRÉ) en fonction des amplitudes des réponses calciques des CSPs (CSP) évoquées lors de la stimulation répétée du nerf moteur et enregistrées sur des JNMs de type S (bleu foncé), FR (rouge) et FF (jaune) dans des souris sauvages (A) et des souris exprimant le gène humain *SOD1* muté (B). Les échelles sont représentées ici sous forme d'unités arbitraires (UA). Il est important de noter que les données des amplitudes des réponses calciques des cellules gliales chez les souris sauvages sont fortement corrélées avec celles des forces synaptiques de l'élément présynaptique. Dans un contexte pathologique de SLA, le patron des amplitudes des réponses calciques des CSPs est complètement différent de celui des forces synaptiques. De plus, le patron des forces synaptiques est altéré par rapport à celui retrouvé chez des souris sauvages.

La figure 7.2 a été inspirée de (Tremblay et al., 2017).

Différents facteurs peuvent expliquer ce patron altéré. Premièrement, ce patron de force synaptique peut être dû à des mécanismes de compensation dans la SLA, où les UMs les plus résistantes compenseraient afin de maintenir la fidélité de la transmission synaptique à la

JNM (Saxena et al., 2013). Deuxièmement, bien que la force synaptique soit plutôt stable dans la vie d'une JNM mature, des variations du contenu quantique ont déjà été observées dans diverses conditions. Par exemple, des augmentations ont été rapportées lors du vieillissement normal (Banker et al., 1983) alors que des diminutions ont été enregistrées lors de changements de grosseur d'UM, notamment dans ces cas de dénervation partielle (Herrera and Grinnell, 1980; Jacob and Robbins, 1990b). Il est important de souligner que ces changements synaptiques ont tous été observés dans des conditions d'instabilité morphologique. Ces résultats suggèrent que les terminaisons axonales des MNs pourraient donc présenter un phénotype de dérèglement.

Ce phénotype de dérèglement présynaptique pourrait se traduire par des déficits de différentes origines. Notamment, des déficits de structure au niveau des zones actives, tel qu'observé à la JNM de drosophile exprimant une mutation du gène *FUS* (Shahidullah et al., 2013), ou des déficits au niveau des protéines d'adhésion pourraient expliquer ce phénotype. D'ailleurs, des diminutions de plusieurs isoformes de laminine, un constituant protéique majeur de la lame basale impliqué dans le maintien de la structure de l'élément présynaptique à la JNM (Samuel et al., 2012), ont été observées uniquement à des JNMs de muscles des membres postérieurs (vulnérables) et non à celles des muscles extra-oculaires (résistants) de patients et de souris SLA (Liu et al., 2011). Dans un même ordre d'idées, des altérations dans l'épissage de gènes impliqués dans les interactions cellule-matrice ont été observées dans des MNs isolés de moelle épinière de patients atteints de SLAs (Rabin et al., 2010). Il est important de souligner que, suite à une dénervation partielle, une JNM de SOL ayant un déficit neuronal de protéines d'adhésion peut démontrer non seulement des variations de sa force synaptique, mais également des problèmes de stabilisation lors de sa réinnervation (Chipman et al., 2014). Pour finir, il ne faudrait pas omettre d'y inclure la possible contribution des CSPs dans ce phénotype de dérèglement présynaptique puisqu'elles modulent l'activité synaptique et le maintien de la structure morphologique de la JNM (Reddy et al., 2003).

7.1.2 Altérations du décodage glial à la JNM de SLA

Une autre observation fondamentale du premier article est l'existence d'une disparité flagrante entre les amplitudes des réponses calciques des CSPs et les propriétés synaptiques des différentes UMs. En effet, les CSPs détectent la libération endogène de NTs des deux types d'UMs, mais ne semblent pourtant pas être capables de faire la distinction entre les terminaisons axonales de type FR et S, et ce, malgré une importante différence de force synaptique (Figure 7.2). Lorsque les CSPs sont en contact avec des terminaisons axonales de forces synaptiques différentes, elles sont normalement capables de générer des réponses calciques d'amplitudes différentes (Darabid et al., 2013; Rousse et al., 2010). Plus précisément, en réponse à des terminaisons axonales de forces synaptiques élevées, les CSPs génèrent des réponses calciques de grandes amplitudes, alors qu'en réponse à des terminaisons axonales de forces synaptiques basses, les CSPs génèrent des réponses calciques de petites amplitudes. Cependant, il est important de mentionner que les élévations calciques ne se caractérisent pas uniquement par des amplitudes petites ou grandes. Il semble plutôt que l'amplitude des réponses calciques des CSPs soit directement corrélée avec la différence de la force synaptique entre les terminaisons (Darabid et al., 2013). Ainsi, la genèse de réponses calciques avec différentes amplitudes par les CSPs semble être le reflet de la disparité entre l'activité synaptique des différentes terminaisons axonales. Puisque les amplitudes des réponses calciques enregistrées dans cette étude ne semblent pas être le reflet de cette disparité synaptique, ceci suggère que la CSP dans la SLA aurait perdu sa capacité de décoder cette disparité et ne serait donc plus en phase avec leur synapse. Ce manque de discernement pourrait occasionner de graves impairs dans la régulation de leurs fonctions en relation avec la modulation de la transmission synaptique et la stabilité morphologique de la JNM de souris SOD1. Ces deux éléments (impacts sur la modulation synaptique et la stabilité morphologique) seront traités séparément dans les prochaines sections.

7.1.2.1 Impact sur la modulation synaptique

L'activité calcique des cellules gliales est un code qui reflète non seulement les propriétés synaptiques, mais entraîne également une modulation de la neurotransmission

correspondant à l'état d'activation de la synapse. En effet, dans des conditions physiologiques, la CSP se doit de détecter les subtilités de l'activité présynaptique afin de produire une modulation synaptique adaptée. Par exemple, à la JNM de souris mature, la CSP est capable de décoder deux patrons différents d'activité présynaptique (tonique vs phasique) et de conséquemment produire deux sortes de plasticité synaptique totalement opposée (respectivement potentialisation vs dépression) (Todd et al., 2010). Dans la présente étude, les CSPs étaient incapables de discerner le premier niveau de sophistication de l'activité présynaptique, soit plus ou moins de NTs libérés. Sachant que les terminaisons axonales des différentes UMs déchargent à différentes fréquences (basse vs élevée) et selon des modes de décharge différents (phasique vs tonique) (Hennig and Lomo, 1985), on peut donc facilement présager que ces autres niveaux de sophistication ne seront probablement pas détectés pour les CSPs. Puisque les réponses calciques générées par les CSPs sont d'amplitudes similaires, ceci pourrait donc entraîner une uniformisation des phénomènes de plasticité à la JNM dans un contexte de SLA. Il est possible que les événements de plasticité synaptique à la JNM, issus de la diversité fonctionnelle des MNs (différents patrons de fréquence et de décharge neuronale) (Kanning et al., 2010), soient tout aussi essentiels pour générer un contrôle moteur coordonné. Ainsi, une uniformisation des phénomènes de plasticité synaptique pourrait avoir des conséquences majeures sur la régulation synaptique de la JNM et les fonctions musculaires (Ko and Robitaille, 2015).

7.1.2.1.1 Libération altérée de purines

Des données suggèrent que la libération de GliotTs, telles que les purines, est à l'origine de phénomènes de plasticité à la JNM. En effet, autant pour les phénomènes de potentialisation que de dépression, la libération d'ATP ou d'adénosine d'origine gliale serait la cause de la modification de la libération de NTs à la JNM immature et mature de SOL de souris (Darabid, 2016; Todd et al., 2010). Le patron de l'activité de la terminaison axonale est déterminant pour l'activation des CSPs, la relâche de GliotTs et l'activation subséquente des récepteurs présynaptiques pour l'adénosine. Plus spécifiquement, une stimulation soutenue provoquerait une potentialisation de la neurotransmission dépendante de l'activation des

récepteurs A_{2A} , alors qu'une activation phasique entraînerait une dépression synaptique dépendante de l'activation des récepteurs A1 (Correia-de-Sa et al., 1996; Todd et al., 2010). Il est important de mentionner ici que le modèle proposé est une balance d'activation entre ces deux sous-types de récepteurs pour l'adénosine ($A1/A_{2A}$). Tel que proposé plus haut, si la CSP ne décode pas les subtilités de l'activité présynaptique, alors on pourrait supposer que la libération purinergique de GlioTs pourrait être non seulement uniformisée mais également minimisée. Puisqu'il a été proposé que l'activation des récepteurs A1 survient lorsque les niveaux d'adénosine sont bas (Todd et al., 2010), cette libération minimisée de GlioTs pourrait ainsi favoriser l'activation des récepteurs A1 (\uparrow des A1 et \downarrow des A_{2A}) à la JNM de souris SLA. D'ailleurs, les résultats de deux études suggèrent que la balance des récepteurs présynaptiques de l'adénosine ($A1/A_{2A}$) est altérée à la JNM de souris $SOD1^{G93A}$ et, plus particulièrement, que l'activation des récepteurs A1 est exacerbée alors que celle des récepteurs A_{2A} est diminuée lors de la progression de la maladie (Nascimento et al., 2015; Nascimento et al., 2014).

Il semble que la signalisation purinergique soit également altérée dans le SNC dans la SLA (pour une revue récente sur le sujet : (Volonte et al., 2016)). Ainsi, il est possible que ce phénomène puisse s'appliquer aux astrocytes du SNC. Une étude publiée en 2014 a rapporté que les astrocytes exprimant la mutation $SOD1^{G93A}$ démontraient des mécanismes altérés de régulation de la gestion interne du Ca^{2+} (Kawamata et al., 2014). Cette même étude a également avancé que des taux anormalement élevés d'ATP étaient libérés par les astrocytes d'une manière dépendante des SNARE et qu'un blocage de cette exocytose gliale a retardé le développement de la maladie (Kawamata et al., 2014). D'ailleurs, l'actualisation du rôle des astrocytes dans la maladie sera plus amplement discutée dans la section 7.5.3 de cette thèse.

Étant donné l'importance des réponses calciques pour la libération de GlioTs et l'impact sur la transmission synaptique, les phénomènes de plasticité à la JNM de souris $SOD1$ doivent être étudiés dans un avenir rapproché. Puisque les événements de plasticité synaptique peuvent influencer la stabilité morphologique, la section suivante discutera comment la mauvaise capacité de détection des CSPs, influençant potentiellement les événements de plasticité synaptique, pourrait également promouvoir une diminution de la stabilité de la JNM dans la SLA.

7.1.2.2 Impact sur la stabilité morphologique

Il semble que les événements de plasticité synaptique puissent avoir un impact sur la stabilisation des synapses. Par exemple, dans le SNC et le SNP en développement, les synapses potentialisées seront renforcées et stabilisées (Buffelli et al., 2003; Maletic-Savatic et al., 1999). Au même titre qu'une potentialisation de l'activité synaptique peut induire la formation de nouveaux boutons synaptiques et mener à l'expansion des éléments neuronaux de la synapse (Toni et al., 1999), il y aurait également, en parallèle, une augmentation de la mobilité des prolongements astrocytaires (Bernardinelli et al., 2014; Perez-Alvarez et al., 2014). Cette augmentation de mobilité gliale serait d'ailleurs directement corrélée avec un meilleur recouvrement de la synapse et augmenterait la stabilité *in vivo* à long terme de cette dernière (Bernardinelli et al., 2014). Il est donc possible qu'une mauvaise détection de l'activité synaptique des CSPs puisse entraîner des altérations au niveau de la plasticité synaptique et ainsi avoir des impacts sur le recouvrement glial et la stabilité de la JNM. Malheureusement, l'analyse des marquages immunohistochimiques de notre étude n'offre pas une résolution suffisante pour confirmer ou infirmer cette dernière hypothèse. Des analyses en microscopie électronique seraient probablement nécessaires. D'autres éléments pourraient également s'ajouter à ceux discutés dans cette section pour placer la JNM dans un état d'instabilité morphologique, comme un mauvais phénotype glial dû à des altérations de leurs récepteurs.

7.2 Implications des altérations des mAChRs des CSPs dans la SLA

7.2.1 Activation muscarinique et purinergique des CSPs

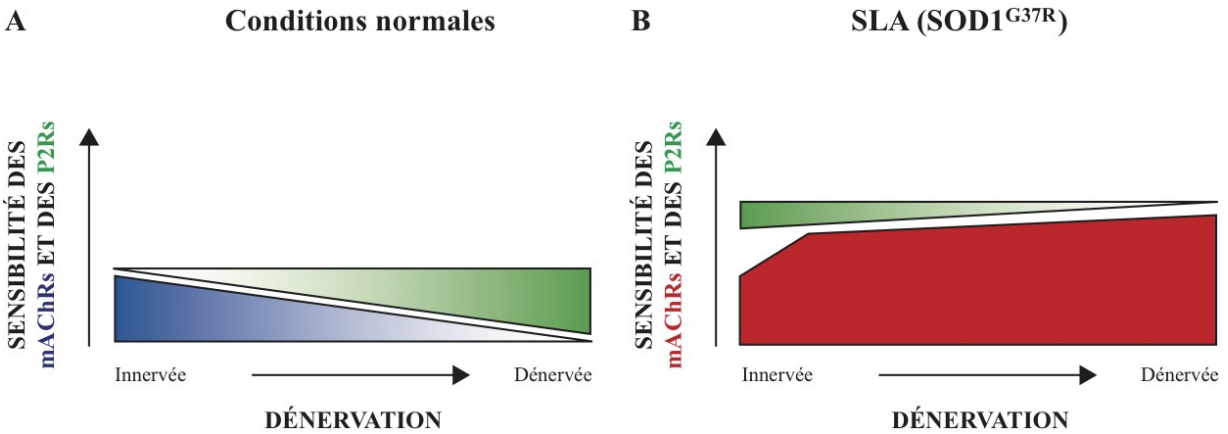
Tel que mentionné dans l'introduction, le niveau d'activation des mAChRs gliaux semble être un élément clé pour la détermination de leur mode fonctionnel (maintenance vs réparation) (Ko and Robitaille, 2015). En effet, la réduction de l'activation des mAChRs des CSPs *in vivo* a permis d'observer une augmentation significative des signes de réparation à la JNM de souris SOD1 (G37R et G93A). Toutefois, un autre résultat important issu du

deuxième article est celui concernant la sensibilité des P2Rs des CSPs. Plus précisément, la sensibilité des P2Rs des CSPs aux JNMs dénervées de souris YFP.SOD1^{G37R} semble être à l'inverse de celle des CSPs associées avec des JNMs dénervées chez la souris YFP.WT ayant subi un écrasement du nerf sciatique (Deuxième article; Figure 6.1 et S6.2). Ces observations suggèrent un mauvais ajustement de la sensibilité des récepteurs des CSPs en fonction de l'état d'innervation.

7.2.1.1 Une balance appropriée pour un phénotype glial approprié

Tout comme la réduction de la sensibilité des mAChRs, l'augmentation de la sensibilité purinergique pourrait favoriser une meilleure réparation de la JNM. Cette dernière proposition est d'ailleurs cohérente avec ce qui a été rapporté dans les contextes synaptiques requérant une certaine plasticité et un remodelage morphologique (Darabid et al., 2014). À titre d'exemple, notons une activation strictement purinergique lors des phénomènes de poly-innervation survenant lors de la compétition synaptique dans le développement et dans les processus de réinnervation à l'âge adulte (Darabid et al., 2013; Perez-Gonzalez, 2016). Dans cette perspective, une activation appropriée des mAChRs favoriserait la stabilité et l'efficacité de la JNM alors que les P2Rs seraient plus permissifs et faciliteraient les changements morphologiques. Une autre façon d'illustrer ce dernier propos serait le fait que les CSPs associées aux JNMs immatures sont très dynamiques alors que celles associées aux JNMs matures ne démontrent que très peu de motilité (Brill et al., 2011). La balance des récepteurs gliaux (mAChRs/P2Rs) pourrait être une nuance de plus à apporter à ce projet d'injection *in vivo* (Figure 7.3). Il est possible de penser que d'avoir ciblé les deux familles de récepteurs gliaux à la JNM de souris SLA aurait pu donner de meilleurs résultats, via l'emploi d'une combinaison d'antagoniste muscarinique et d'agoniste purinergique. Une autre possibilité est que le réajustement de l'activation des mAChRs ait pu rebalancer celui des P2Rs. Des injections prolongées, jusqu'à une période de dénervation plus importante, seront nécessaires pour répondre à cette question.

Figure 7.3 Statut d'innervation en fonction de la sensibilité des mAChRs et des P2Rs dans des conditions normales et pathologiques de SLA



A. Évolution de la sensibilité des mAChRs et des P2Rs au cours du processus de dénervation de la JNM dans des conditions normales. Lorsque la JNM passe de l'état innervé à dénervé, la sensibilité des mAChRs des CSPs diminue de manière importante alors que celle des P2Rs augmente. Il est important de noter ici la complémentarité de ces deux familles de récepteurs. **B.** Évolution de la sensibilité des mAChRs et des P2Rs au cours du processus de dénervation de la JNM dans des conditions pathologiques de SLA (SOD1^{G37R}). La sensibilité des mAChRs des CSPs semble être à un niveau comparable de celui retrouvé en conditions normales au début de la vie de l'animal. Cependant, cette sensibilité muscarinique augmente rapidement par la suite et semble demeurée stable lorsque la JNM passe de l'état innervé à dénervé, alors que celle des P2Rs diminue.

Il se pourrait également que ce mauvais ajustement de la sensibilité des récepteurs gliaux puisse confiner la CSP dans un phénotype glial inapproprié. Ce phénotype glial inapproprié pourrait notamment favoriser le fait qu'une certaine proportion de CSPs pourrait être dans un état de non-réceptivité face à de la dénervation. Cet état se caractérise notamment par une CSP qui ne semble pas être proactive face à un changement d'innervation. À titre d'exemple, il a été observé à de multiples reprises que les CSPs associées à des JNMs dénervées ne démontraient aucun changement morphologique (extension de leurs

prolongements, par exemple) (Deuxième article). Il est intéressant de mentionner que ce type de CSPs (dans un état de non-réceptivité) a été observé autant dans des souris ayant été traitées avec de la fIPir (Deuxième article; Figure 6.6, animal #9) que la solution saline (Deuxième article; Figure S6.6, animal #15). Le fait d'avoir pu observer ces comportements gliaux dans les deux groupes expérimentaux (drogue et solution saline) suggère que cet état de non-réceptivité pourrait parfois être difficile à renverser, car même le traitement de fIPir n'a pas été suffisant. C'est d'ailleurs ce qui pourrait expliquer les différences entre les résultats obtenus chez les souris SOD1^{G37R} et SOD1^{G93A} (uniquement une augmentation significative du nombre de JNMs associées avec de la poly-innervation dans les souris SOD1^{G93A}). Par exemple, cet état de non-réceptivité pourrait être plus persistant et difficilement réversible à des stades plus avancés de la maladie. Puisque les souris SOD1^{G93A} ont une progression de la maladie beaucoup plus rapide et agressive que celles des SOD1^{G37R} et que ces deux souches de souris n'ont pas reçu le traitement au même stade de la maladie, le réajustement de la sensibilité des récepteurs gliaux a pu être plus difficilement atteignable chez les CSPs des souris SOD1^{G93A}. Cependant, le fait que ce phénotype glial de non-réceptivité puisse survenir avant les stades plus avancés de la maladie n'est pas à exclure.

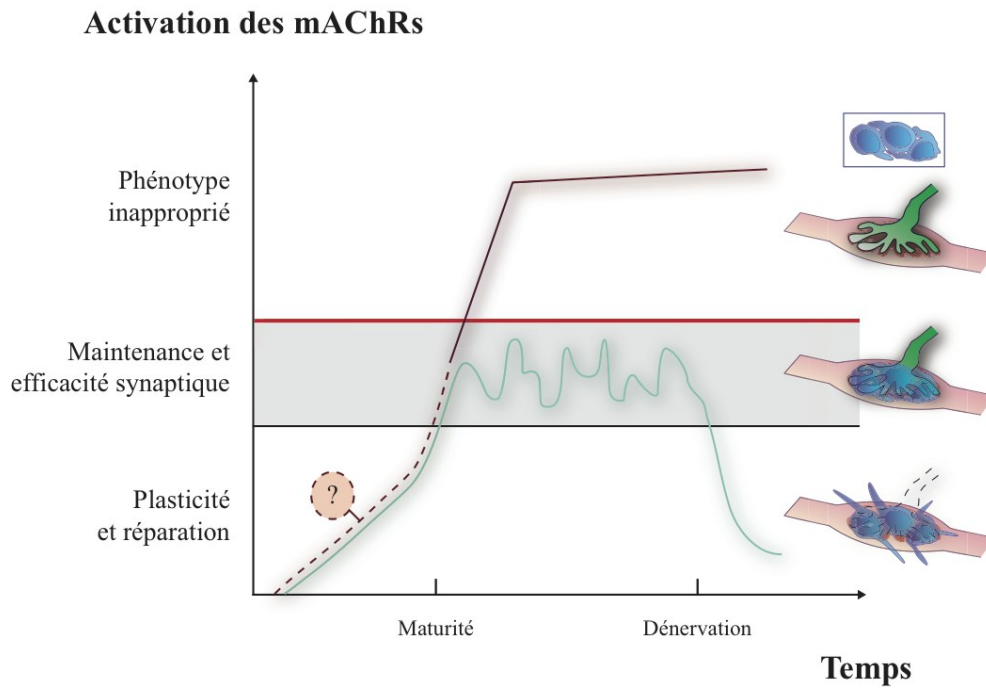
Il est important de rajouter que, même chez des souris sauvages traitées avec la fIPir, il a été possible d'observer des diminutions des pourcentages de JNMs associées avec des processus de réparation comparativement aux souris sauvages traitées avec la solution saline. D'emblée, cette observation ne semble pas intuitive puisqu'un blocage des mAChRs est reconnu pour provoquer l'effet inverse chez la plupart des CSPs (Wright et al., 2009). Pourtant, l'observation de CSPs n'ayant aucune modification morphologique a déjà été rapportée dans ces mêmes expériences de blocage des mAChRs (Wright et al., 2009). Une explication potentielle serait que les souris sauvages possèdent des CSPs avec des taux d'activation appropriés de leurs récepteurs et qu'une réduction de l'activation des mAChRs par la fIPir a peut-être stimulé des phénomènes de compensation chez ces animaux et confiné certaines CSPs dans ce même état de non-réceptivité. C'est ce qui pourrait justement expliquer que la stimulation du nerf moteur n'a pas évoqué des réponses calciques différentes entre les CSPs issues de souris sauvages traitées avec de la saline et la fIPir (Deuxième article; figure

S6.5). En résumé, toute altération de la balance mAChR/P2R pourrait confiner la CSP dans ce même état de non-réceptivité.

7.2.1.2 Notion de seuil d'activation muscarinique

À cette notion de phénotype glial de non-réceptivité, s'ajoute aussi celle d'un seuil d'activation des mAChRs. Ce seuil aurait une limite inférieure et supérieure (Figure 7.4). Le niveau d'activation des mAChRs situé en dessous de la limite inférieure serait celui où s'effectuerait le changement vers un mode fonctionnel de réparation et de plasticité morphologique. Ces niveaux d'activation bas des mAChRs gliaux ont normalement lieu lors d'interruption de la communication synaptique ou de dénervation (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994; Ko and Robitaille, 2015). Les niveaux d'activation situés entre la limite inférieure et supérieure correspondraient à l'éventail d'activation permettant aux CSPs de détecter les subtilités de l'activité présynaptique. Cet intervalle d'activation leur permettrait notamment de pouvoir détecter des élévations et des diminutions de l'activité synaptique sans perturber leur mode fonctionnel de maintenance et d'efficacité synaptique. Toutefois, si la limite supérieure du seuil est atteinte, tel qu'observé chez les CSPs de souris SOD1^{G37R}, la CSP se retrouverait donc complètement isolée de son environnement synaptique. Cet isolement ferait en sorte que la CSP ne serait plus en phase avec l'état d'innervation de la synapse, ne détecterait et ne régulerait plus adéquatement la transmission synaptique et pourrait également être dans un état de non-réceptivité face à la dénervation. Une expérience intéressante pouvant être effectuée, avec une approche virale, serait de faire exprimer des mAChRs constitutivement activés spécifiquement dans les CSPs de souris sauvages et de provoquer une dénervation partielle par un écrasement du nerf sciatique. Suivant la notion des limites du seuil d'activation, les CSPs de ces souris seraient dorénavant comparables à celle de souris SOD1^{G37R}. On pourrait donc prédire que les phénomènes de réparation seraient réduits. Cette notion de seuil d'activation des mAChRs démontre l'aspect dynamique de la CSP à s'adapter à différents contextes synaptiques, d'où la proposition que les CSPs feraient preuve d'une adaptabilité muscarinique contextuelle (Figure 7.4).

Figure 7.4 Adaptabilité muscarinique contextuelle des CSPs



Représentation graphique de l'adaptabilité muscarinique contextuelle des CSPs. Cette adaptabilité se caractérise par une activation des mAChRs qui varie en fonction du contexte d'innervation de la JNM. Une caractéristique importante de cette adaptabilité est la présence d'un seuil d'activation muscarinique (encadré gris) ayant une limite inférieure (ligne noire) et supérieure (ligne rouge). Une fois ces limites atteintes, ceci dictera le mode fonctionnel dans lequel entrera la CSP. L'évolution de l'activation des mAChRs pour une CSP située à une JNM d'un individu en santé est représentée par une ligne verte continue. Plus précisément, lorsque l'état d'innervation est immature (développement ou avant maturité) ou lorsqu'il y a blessure synaptique (dénervation), l'activation des mAChRs est diminuée, favorisant un mode fonctionnel de plasticité et de réparation. Ce mode fonctionnel entraîne des changements multiples dans les CSPs dont notamment des changements morphologiques (JNM en bas, à droite; CSPs ayant des prolongements qui sortent des limites de la plaque motrice). Dans des conditions de stabilité synaptique (maturité), les CSPs ont des taux d'activation de leurs mAChRs qui varient en fonction de l'activité présynaptique mais qui demeurent dans les limites du seuil (encadré gris). Les CSPs seront donc dans un mode fonctionnel assurant le maintien de la JNM (JNM à droite, au milieu; JNM ayant les trois éléments synaptiques alignés). Ce scénario est toutefois bien différent pour des CSPs exprimant la mSOD1 (tracé bourgogne). Dans un premier lieu, l'évolution de

l'activation des mAChRs dans le développement demeure inconnue (tracé bourgogne pointillé). Dans un deuxième lieu, à une JNM mature, l'évolution de l'activation des mAChRs augmente rapidement (Premier article; de P60 à P120) pour atteindre des niveaux excédant ceux de la CSP normale. Au-delà de la limite supérieure du seuil d'activation muscarinique (ligne rouge), les CSPs seraient confinés dans un phénotype et un mode fonctionnel inapproprié où elles seraient complètement isolées du contexte synaptique (à droite, en haut; représenté par le rectangle bleu contenant les CSPs, isolées des deux autres éléments synaptiques), Ce confinement pourrait notamment expliquer que certaines CSPs sont non réceptives face à des épisodes de dénervation.

Le confinement des CSPs dans ce phénotype glial inapproprié pourrait également affecter d'autres propriétés de ces cellules. Par exemple, la libération de substances neurotrophiques favorisant la stabilité de la JNM en réponse à des changements de communication synaptique. Une étude publiée en 2014 a rapporté que lorsque l'activité physique d'un animal était augmentée (course ou nage), des phénomènes de plasticité morphologique étaient observés à la JNM de SOL de rat, tels qu'une augmentation de l'aire et du périmètre de la plaque motrice (Gyorkos et al., 2014). Ce phénomène de plasticité morphologique est notamment en accord avec l'existence d'un lien entre l'activité présynaptique, la modulation gliale et la plasticité morphologique (notion préalablement discutée dans la section 7.1.2.2). De plus, selon leurs résultats obtenus avec la méthode immuno-enzymatique ELISA (de l'anglais, *enzyme-linked immunosorbent assay*), ils ont noté une augmentation du contenu en facteur neurotrophique dérivé de la cellule gliale (GDNF; de l'anglais, *glial cell-derived neurotrophic factor*). Cette augmentation était positivement corrélée avec les changements morphologiques observés (Gyorkos et al., 2014). Cette substance est d'ailleurs reconnue pour promouvoir la survie des MNs de la moelle épinière (Suzuki et al., 2007) et celle des JNMs dans un contexte de SLA (Suzuki et al., 2008). Il est donc possible de présumer que la mauvaise détection de la communication synaptique et de ses ajustements par les CSPs de souris SLA pourrait limiter non seulement les phénomènes de plasticité morphologique de la JNM mais également la relâche de substances neurotrophiques. Ce dernier exemple illustre, encore une fois, comment le niveau d'activation des mAChRs

pourrait être la base structurante de plusieurs problèmes reliés à la stabilité et la survie des JNMs dans la SLA.

7.2.1.3 Mécanismes moléculaires à la base des altérations des mAChRs

Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces dysfonctions muscariniques peuvent être regroupés en deux catégories différentes : une première touchant les récepteurs et l'autre touchant leur voie de transduction.

Les mAChRs pourraient avoir une organisation fonctionnelle spécifique. En effet, leur distribution spatiale pourrait être concentrée à proximité des zones actives. Ainsi, une petite concentration d'ACh libérée pourrait assurer l'activation rapide des récepteurs. Une telle organisation fonctionnelle a d'ailleurs été observée pour les P2Rs des CSPs dans le développement (Darabid et al., 2013). Une autre combinaison pouvant assurer une activation rapide et élevée de ces récepteurs est celle de coupler cette localisation spécifique avec un nombre plus élevé de récepteurs. Des analyses d'immunohistochimie avec de la microscopie électronique combinées avec des analyses de spectrométrie de masse pourraient nous aider à confirmer ou infirmer cette possibilité. Une analyse de spectrométrie de masse pourrait non seulement nous donner des informations sur la quantité de protéine mais également sur l'intégrité de celle-ci, les interactions ligand-protéine et les modifications post-traductionnelles. Ces informations seraient très utiles puisque de tels changements pourraient notamment sous-tendre des changements de conformation qui pourraient provoquer des modifications affectant la fonction et la voie de signalisation des récepteurs.

La qualité et/ou la suractivation de la voie de signalisation de ces récepteurs représentent également d'autres options attrayantes pour expliquer ces altérations. Tel que mentionné dans la discussion du premier article, il a été rapporté que la protéine sauvage SOD1 extracellulaire est capable de se lier aux mAChRs et d'activer leur voie de transduction, allant même jusqu'à induire une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire dans des cellules en culture (Damiano et al., 2013). Ainsi, la mSOD1 extracellulaire, due à sa sécrétion dans le milieu, pourrait se lier aux mAChRs et activer leur voie de transduction. On pourrait même avancer que, suite à la liaison de la mSOD1 avec le récepteur, une séquestration de ce dernier

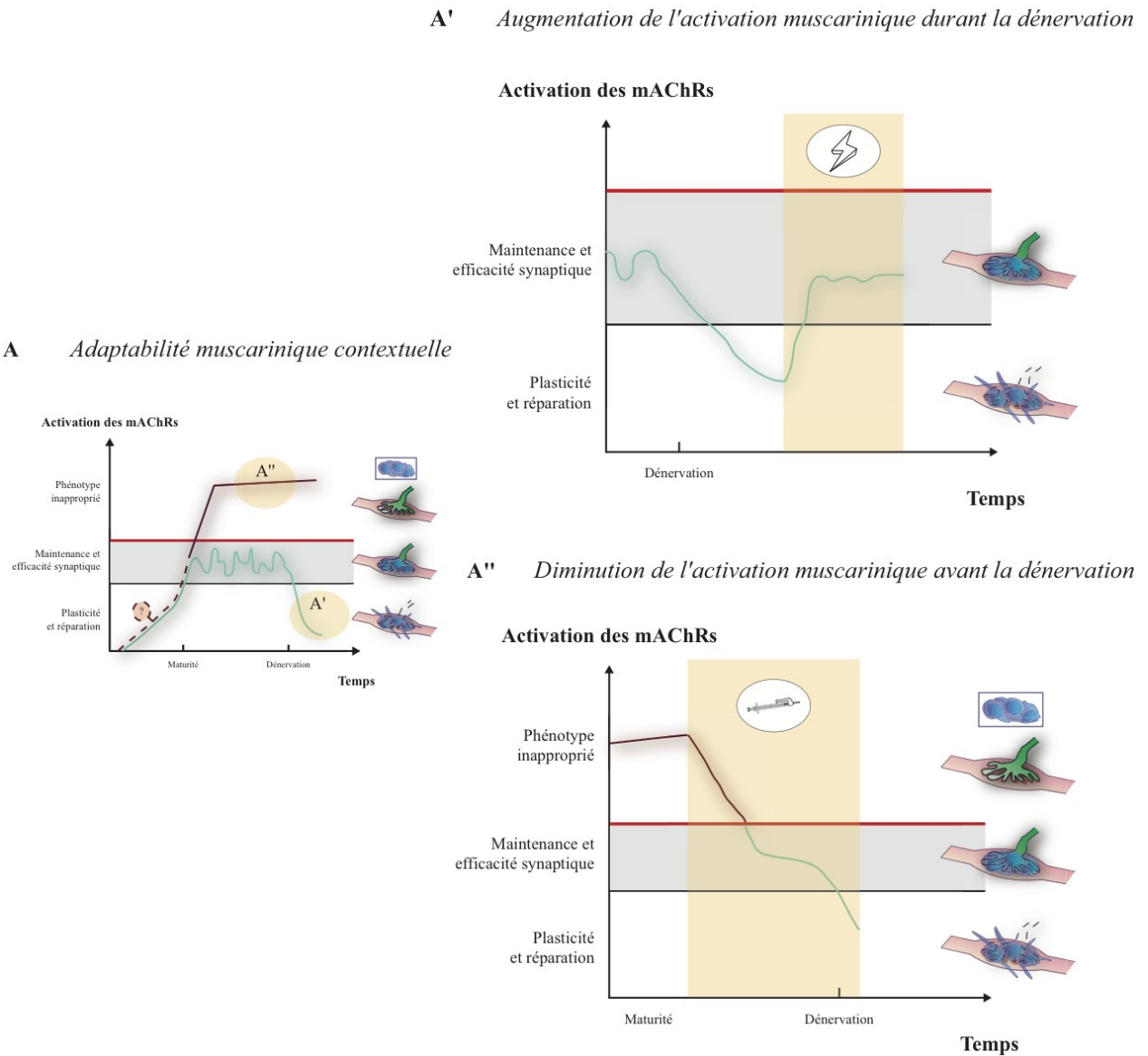
pourrait survenir (blocage de leur internalisation). De plus, puisque la mSOD1 est exprimée dans les CSPs à des taux très élevés avant la dénervation dans la souris SOD1^{G93A} (Gould et al., 2006), ceci pourrait également provoquer des modifications de l'ARN du récepteur et ainsi engendrer des changements de conformation. Ces changements de conformation pourraient, à leur tour, provoquer soit l'activation constitutive du récepteur et/ou l'augmentation de l'affinité du récepteur pour son ligand. Pour finir, toutes les protéines ainsi que les constituants de la voie de signalisation (tels que la phospholipase C, le diacylglycérol ou l'IP₃), dont la gestion du Ca²⁺ dans le RE, pourraient être altérés. En résumé, bien que plusieurs mécanismes puissent être à l'origine de la suractivation des mAChRs, il semble qu'une diminution de leur activation, via l'application de flPir, soit suffisante pour influencer le mode fonctionnel des CSPs et de favoriser la réparation de la JNM.

7.2.2 Implications pour la réparation de la JNM dans la SLA

La capacité de détection des CSPs, sous-jacente à un niveau approprié d'activation de leurs mAChRs, est vitale pour la première étape des processus de réparation, soit de détecter l'état de dénervation. Toutefois, cette capacité de détection est également essentielle afin de trouver une JNM innervée à proximité. En effet, bien que l'activation des mAChRs doit être basse pour demeurer dans un mode de réparation, la CSP doit être également apte à détecter les terminaisons axonales fonctionnelles dans son environnement (revoir Figure 3.6C de l'introduction et la Figure 7.4). D'une façon cohérente avec les limites du seuil d'activation des mAChRs, si le niveau d'activité synaptique est anormalement augmenté lors des processus de réparation, de façon à dépasser la limite inférieure du seuil d'activation, la CSP retournera dans un mode fonctionnel de maintenance et les processus de réparation seront altérés (Figure 7.5). Cette proposition est en accord avec les résultats publiés par deux groupes de recherche différents. En effet, il a été démontré, dans un contexte de dénervation partielle, que le nombre de CSPs arborant une extension de leurs prolongements ainsi que le nombre d'évènements reliés à un guidage de la terminaison axonale (de l'anglais, *sprouting*) étaient grandement diminués par la stimulation du muscle ou d'une racine ventrale ou par l'augmentation de l'activité physique (Love et al., 2003; Love and Thompson, 1999; Tam et al., 2001; Tam and

Gordon, 2003). Ces résultats suggèrent que la capacité de détection ainsi que le niveau d'activation des mAChRs des CSPs semblent être garants d'une réparation efficace et coordonnée de la JNM. D'ailleurs, l'approche expérimentale utilisée dans le deuxième article de recherche de cette thèse (injection d'antagoniste des mAChRs) est en accord avec la notion de seuil d'activation muscarinique; la diminution de l'activation des mAChRs provoquerait le retour des CSPs dans un état favorisant la plasticité et la réparation de la JNM (Figure 7.5).

Figure 7.5 Modulation de l'activation des mAChRs et impact sur la réparation de la JNM



Une modulation de l'activation des mAChRs des CSPs peut avoir un impact majeur sur le mode fonctionnel dans lequel seront les CSPs et, par conséquent, les processus de réparation de la JNM. Par exemple, en gardant en tête les notions d'adaptabilité muscarinique contextuelle et des limites du seuil d'activation muscarinique (A), il est possible d'intervenir, dans le temps, avec différentes approches afin d'augmenter ou de diminuer l'activation des mAChRs des CSPs. Tel qu'illustré en A', une augmentation de l'activation des mAChRs des CSPs pendant une période de dénervation partielle

(encadré jaune), via une stimulation répétée d'une racine ventrale par exemple (représentée par un éclair blanc), aura comme conséquence de ramener la CSP dans un mode de maintenance et de diminuer le nombre de JNMs associées avec des processus de réparation (réduction du nombre de CSPs avec des extensions de leurs prolongements et des événements de guidage des terminaisons axonales, ou *sprouting*). A'' Dans cette thèse, étant donné que les mAChRs des CSPs des souris SOD1^{G37R} étaient hyper-activés, nous avons procédé à une réduction de l'activation des mAChRs via des injections intermusculaires d'antagoniste (représenté par une seringue) durant la période présymptomatique (encadré jaune). Par cette approche, nous avons pu réduire suffisamment l'activation des mAChRs afin de favoriser un mode fonctionnel de réparation de la JNM.

Un autre aspect important pouvant grandement influencer l'efficacité et la qualité de la réinnervation est la capacité des CSPs à libérer diverses substances. Par exemple, différents signaux pourraient favoriser le maintien des nAChRs en cas de dénervation, dont des facteurs trophiques. Également, la perte des nAChRs peut être prévenue grâce à une activation de ces derniers (Akaaboune et al., 1999). Il est intéressant de mentionner que les CSPs associées avec des JNMs dénervées peuvent relâcher de l'ACh (Dennis and Miledi, 1974). Bien que la pertinence physiologique de ce mécanisme demeure toujours indéterminée, il est tentant de proposer que cette libération d'ACh pourrait favoriser la stabilité des récepteurs postsynaptiques durant la période de dénervation et ainsi éviter un démantèlement hâtif de la plaque motrice (Shyng and Salpeter, 1990). Il est également possible que la libération d'ACh par les CSPs soit déficiente dans la SLA, tout comme la libération d'autres molécules pouvant positivement moduler l'élongation des prolongements gliaux, l'induction du bourgeonnement de la terminaison axonale, la vitesse de navigation de la terminaison axonale le long des prolongements gliaux et l'arrimage de la terminaison axonale à la JNM dénervée.

La libération d'une substance gliale et/ou l'expression de certains récepteurs gliaux pourraient également diminuer le taux de succès de la réinnervation. En effet, suite à une dénervation partielle ou une paralysie musculaire, les CSPs associées à des JNMs de types FF peuvent relâcher de la Sémaphorine 3A (Sema3A) (De Winter et al., 2006), une substance répulsive pour les neurites en croissance (Kolodkin, 1996). L'expression de Sema3A a

d'ailleurs été confirmée dans les CSPs associées à des JNMs de type FF dans un modèle de souris SOD1^{G93A} (De Winter et al., 2006). Cette expression de molécules chémorépulsives peut donc fortement diminuer le nombre de terminaisons axonales provenant de JNM innervée, à contacter ces JNMs dénervées. Ultiment, il est également possible que cette libération puisse prévenir l'extension des prolongements de la CSP libérant la substance, la confinant ainsi dans le même phénotype de non-réceptivité précédemment discuté (section 7.2.1.1). Cette libération de Sema3A diminuerait grandement les phénomènes de réinnervation survenant aux UMs de type FFs, les plus vulnérables dans la SLA (Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008; Pun et al., 2006).

Un autre exemple de substance répulsive est l'éphrine-A3. Elle est spécifiquement exprimée sur les myofibres de type S et son récepteur, l'EphA8, est exclusivement exprimé par les CSPs localisées sur les JNMs de types rapides (Stark et al., 2015). Ceci suggère que les CSPs retrouvées aux JNMs du muscle SOL de souris SLA sur-exprimeraient ce récepteur, limitant encore plus la réinnervation des JNMs de type S par celle de type FR. Par conséquent, ce phénotype glial inapproprié pourrait exacerber l'impact de ces interactions répulsives et significativement perturber les mécanismes de compensation à la JNM dans un contexte de SLA. D'ailleurs, une augmentation d'un autre récepteur pour l'éphrine, l'EphA4, diminuerait la capacité de réinnervation chez des poissons zébrés SOD1^{G93A} alors que, chez l'humain, une expression réduite de ce dernier serait corrélée avec un développement tardif de la maladie (Van Hoecke et al., 2012). Cependant, aucune corrélation entre le niveau d'activation des mAChRs des CSPs et la libération de substances répulsives ou l'expression de récepteurs pour des substances répulsives n'a encore été démontrée à ce jour. Évidemment, l'étude de la libération de molécules pouvant favoriser la stabilisation de la synapse nouvellement formées serait tout aussi pertinente.

En dernier lieu, la capacité de détection des CSPs pourrait également être essentielle lors de la dernière étape du processus de réparation, soit la gestion de l'état de poly-innervation. Il est intéressant de mentionner que les processus de réinnervation de la JNM mature présentent des caractéristiques similaires avec ceux de la formation de synapses à la JNM immature (Darabid et al., 2014). Tout d'abord, dans les deux cas, les JNMs subissent une période de compétition synaptique dont l'issue mènera inévitablement à une JNM mono-

innervée (Kang and Lichtman, 2013). En second lieu, tout comme l'élimination synaptique à la JNM en développement, l'élimination des connections surnuméraires lors de la réinnervation à l'âge adulte dépend, entre autre, de l'activité synaptique (Favero et al., 2012). Par conséquent, il semble que certains éléments se produisant lors du développement soient récapitulés lors de la réinnervation à l'âge adulte.

Cette même comparaison pourrait également s'appliquer aux CSPs. Durant les stades plus avancés de la poly-innervation dans le développement, c'est-à-dire lorsqu'il ne reste que 2 terminaisons axonales différentes innervant une même plaque motrice, les CSPs sont capables de détecter la différence de force synaptique entre les deux terminaisons axonales, de potentialiser la plus forte et d'influencer les processus d'élimination synaptique (Darabid, 2016; Darabid et al., 2013). Ce phénomène survient notamment grâce à l'ajustement de la contribution relative des mAChRs et P2Rs, où la seule famille de récepteurs contribuant à la détection de la transmission synaptique est celle des P2Rs. D'ailleurs, un blocage des P2Rs pendant la période du développement a retardé le processus d'élimination synaptique (Darabid, 2016), suggérant que la détection des différences synaptiques par les P2Rs des CSPs est très importante dans la dernière étape menant à une JNM mono-innervée. Par conséquent, une mauvaise détection combinée à un mauvais ajustement des récepteurs gliaux pourrait grandement affecter les processus impliqués dans la réinnervation à l'âge adulte.

Puisque l'activation des mAChRs des CSPs aux JNMs dénervées de souris SLA est supérieure à ce qui est observé chez des souris sauvages dénervées et que celle des P2Rs est inférieure, il est possible que les CSPs issues de souris SLA ne soient pas capables de gérer l'état de poly-innervation. D'une part, elles pourraient ne pas assurer convenablement la sélection de la terminaison axonale la plus forte et, d'autre part, le processus d'élimination synaptique pourrait être retardé. Ces deux dernières éventualités pourraient, à leur tour, favoriser soit le maintien de l'état de poly-innervation, soit l'élimination de la synapse poly-innervée ou l'instabilité de la JNM nouvellement formée. Dans le deuxième article de recherche de cette thèse, puisqu'il y a eu une augmentation du pourcentage de JNMs associées avec de la poly-innervation, et ce, autant chez des souris SOD1^{G37R} et SOD1^{G93A}, il semble raisonnable d'affirmer que l'usage de fIPir ait favorisé toutes les étapes précédant l'état de poly-innervation. Bien que la progression vers l'état de mono-innervation, la stabilité ainsi que

la fonctionnalité des JNMs nouvellement formées n'aient pas été étudiées, une augmentation de JNM poly-innervées augmente drastiquement les chances de favoriser une réinnervation complète (JNM mono-innervée) des JNMs de souris SLA ainsi qu'une meilleure récupération des fonctions motrices.

7.3 Implications morphologiques et fonctionnelles de l'augmentation de la réparation dans la SLA

La réinnervation est une étape critique du processus de compensation lorsque la JNM fait face à une dénervation. La promotion de ce mécanisme chez des patients atteints de SLA pourrait avoir des impacts physiologiques majeurs, dont notamment de favoriser le maintien de la fonction musculaire et la prévention de l'atrophie musculaire (Aydin et al., 2004; Sobotka and Mu, 2015). Cependant, l'obtention d'un impact physiologique significatif est grandement tributaire de la quantité de JNMs réinnervées (Sobotka and Mu, 2015). La quantité de JNMs réinnervées, elle, dépend, entre autres, d'un élément essentiel: le temps. Plus précisément, deux dimensions du temps peuvent s'appliquer ici: la probabilité de réinnervation est non seulement dépendante de l'âge de l'individu, mais également du temps séparant la dénervation de la réinnervation (Jacob and Robbins, 1990a; Kang and Lichtman, 2013). L'âge de l'individu ne sera volontairement pas traité dans la prochaine section pour les raisons suivantes: 1) bien qu'il existe des cas de SLA juvénile, il semble que la majorité des cas de SLA soit diagnostiquée à un âge adulte (Al-Chalabi and Hardiman, 2013), 2) le modèle animal principal utilisé dans cette thèse ($SOD1^{G37R}$) est également caractérisé par un développement de la maladie qui survient à l'âge adulte et 3) la structure anatomique de la JNM mature de mammifère est généralement très stable durant la grande majorité de la vie de l'animal (O'Malley et al., 1999). Par conséquent, dans le contexte de l'étude, il semble adéquat d'écarter l'âge de l'individu. La prochaine section traitera donc de la probabilité de réinnervation en fonction du temps séparant la dénervation de la réinnervation ainsi que de l'état de la CSP.

7.3.1 Les processus de réparation : une course contre la montre !

Le temps est un enjeu majeur lors des processus de réparation à la JNM. En effet, il semble que le succès de réinnervation soit inversement corrélé avec la durée de la dénervation (Kang et al., 2014; Stefancic et al., 2016). Plus précisément, il a été rapporté que plus la JNM est dénervée de manière prolongée, plus elle est susceptible de perdre des récepteurs postsynaptiques en cas de réinnervation, moins les mécanismes dépendants des CSPs sont nombreux et plus les chances de recouvrer les fonctions motrices perdues sont faibles (Kang and Lichtman, 2013; Kang et al., 2014; Koirala et al., 2000; Sakuma et al., 2016). Ainsi, diminuer l'intervalle de temps séparant la dénervation de la réinnervation pourrait significativement augmenter la probabilité d'une réinnervation efficace et le maintien/rétablissement des fonctions motrices. Cependant, selon les résultats issus de cette thèse, il semble que plusieurs facteurs augmentent cet intervalle de temps (ou diminuent la probabilité de réinnervation) dans la SLA, dont notamment les CSPs.

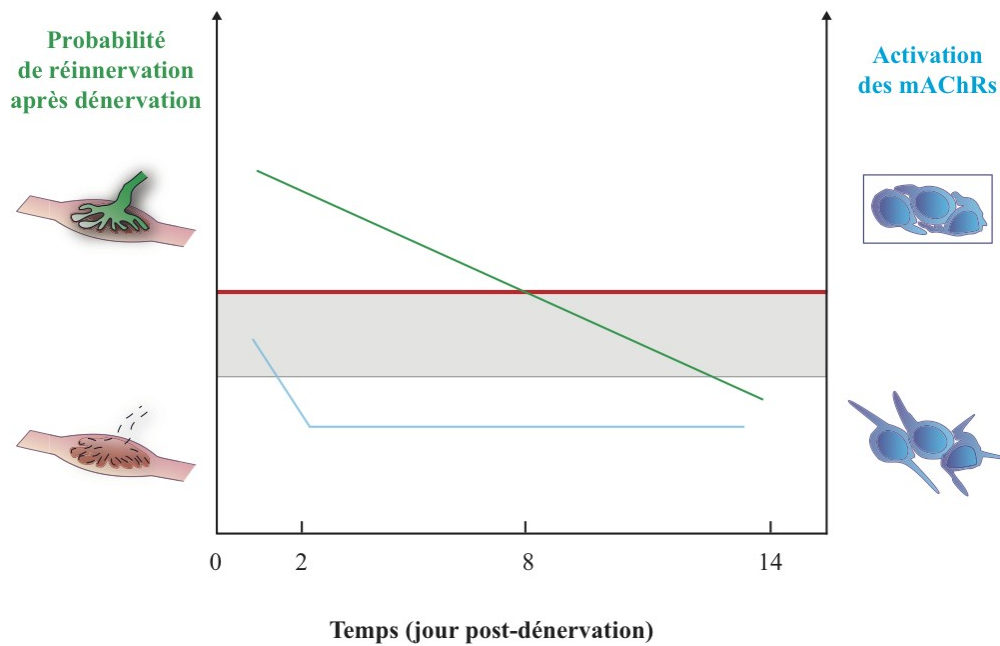
Premièrement, à la JNM de grenouille, des changements de la sensibilité des mAChRs et de l'expression génique sont observés dans les premières heures suivant l'interruption de la communication synaptique (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994). À la JNM de souris, des changements de la sensibilité des mAChRs sont observés dans les premiers jours suivants la dénervation (Deuxième article de recherche; Figure S6.2) (Perez-Gonzalez, 2016). Ceci suggère que, dans des conditions normales, le changement de mode fonctionnel s'opère rapidement. Cependant, à la JNM de souris SOD1^{G37R}, la CSP ne détecte pas l'état de dénervation de la JNM (Deuxième article de recherche; Figure 6.1). Cette mauvaise détection pourrait faire en sorte que le changement de mode fonctionnel pourrait être soit retardé ou, même, ne jamais s'enclenché. Cette altération gliale, due à l'hyperactivation des mAChRs, pourrait grandement influencer le temps et la probabilité de réinnervation dans la SLA.

Deuxièmement, même si le changement de mode fonctionnel survient, les processus de réparation en lien avec les CSPs (extension des prolongements, bourgeonnement de la terminaison axonale et présence de poly-innervation) se doivent d'être en nombre suffisant afin de pallier à la dénervation rencontrée dans la SLA. En effet, il a été proposé que la présence d'un nombre élevé d'axones disponibles pour la réinnervation favorisait le rétablissement de la force musculaire (Sobotka and Mu, 2015). Cependant, le pourcentage de

JNMs associées avec les mécanismes de réparation en lien avec les CSPs dans les souris exprimant le gène *SOD1* muté n'est pas différent de celui des souris sauvages, et ce, malgré la présence de dénervation à un stade symptomatique de la maladie (Deuxième article de recherche; Figure 6.2). Ainsi, la participation réduite des CSPs aux mécanismes de réparation pourrait conserver la JNM dénervée plus longtemps, réduisant ainsi sa probabilité de réinnervation.

Troisièmement, la réinnervation doit être efficace, dirigée et rapide (Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995a, b). Pourtant, dans un stade symptomatique de la maladie, nous avons observé que, lorsque des prolongements gliaux sont associés avec la terminaison axonale, ceux-ci ne semblent pas se diriger vers des JNMs dénervées ou semblent tout simplement être désorganisés et/ou erratiques (Deuxième article de recherche; Figure 6.2Bzoom). Ces résultats suggèrent donc que la réinnervation pourrait être d'une part retardée et, d'autre part, même ne jamais survenir si les nouvelles terminaisons axonales ne parviennent pas à atteindre les JNMs dénervées. Il est également important de mentionner qu'une diminution de l'activation des mAChRs des CSPs a favorisé le retour d'un guidage dirigé des terminaisons axonales par les CSPs en direction de JNMs dénervées et une meilleure réinnervation (Deuxième article de recherche; observation rapportée et Figure 6.8). Par conséquent, étant donné qu'un bas niveau d'activation des mAChRs est nécessaire pour déclencher (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994; Robitaille et al., 1997; Todd et al., 2007; Wright et al., 2009) maintenir (Love et al., 2003; Love and Thompson, 1999; Tam et al., 2001; Tam and Gordon, 2003) et favoriser des processus de réparation dirigés et efficaces, le niveau d'activation des mAChRs des CSPs pourrait donc être directement en lien avec la probabilité de réinnervation (Figure 7.6). D'ailleurs, cette proposition est en accord avec la notion des seuils d'activation muscarinique présentée en section 7.2.1.2.

Figure 7.6 Probabilité de réinnervation en fonction de l'activation des mAChRs des CSPs



Représentation graphique du temps post-dénervation en fonction de la probabilité de réinnervation et de l'activation des mAChRs des CSPs. Plus une JNM est dénervée de façon prolongée (en bas à gauche, JNM ayant uniquement des nAChRs rouges), moins elle est susceptible d'être réinnervée (en haut à gauche, JNM avec des nAChRs rouges et une terminaison axonale verte). La probabilité de réinnervation après dénervation est donc inversement corrélée avec le temps post-dénervation (ligne verte). Également, le niveau d'activation des mAChRs des CSPs doit rapidement s'ajuster suite à une dénervation (ligne bleue). Plus précisément, un niveau d'activation bas des mAChRs semble nécessaire et suffisant pour favoriser et maintenir des processus de réparation efficaces et rapides (à droite en bas, CSPs ayant des extensions de leurs prolongements). Ainsi, une réduction de l'activation des mAChRs devrait être corrélée avec une meilleure probabilité de réinnervation. Cette suggestion est cohérente avec la notion des limites du seuil d'activation (encadré gris), où le dépassement de la limite supérieure (ligne rouge) pourrait confiner les CSPs dans un état de non-réceptivité face à de la dénervation (notion proposée en section 7.2.1.1 et représentée par le rectangle entourant les CSPs du haut à gauche). Cet état pourrait notamment ralentir les processus de réparation et par conséquent, diminuer les probabilités de réinnervation.

Toutefois, il est également important de mentionner que d'autres facteurs que les CSPs pourraient contribuer à augmenter le délai de réinnervation. Par exemple, il n'est pas garanti que la terminaison axonale ayant servi à réinnover une JNM dénervée, grâce aux processus de réparation impliquant les CSPs, soit fonctionnelle (d'un point de vue synaptique). D'ailleurs, les résultats d'une étude ayant procédé à des écrasements répétés du nerf sciatique, afin de prolonger la période de dénervation, ont démontré que, bien que les JNMs étaient réinnervées, aucune amplitude du potentiel d'activité musculaire (de l'anglais, *compound muscle action potential*) n'a été enregistrée (Sakuma et al., 2016). Ainsi, même si les mécanismes de réparation dépendants des CSPs s'opèrent convenablement, d'autres facteurs peuvent également interférer avec la résultante motrice. En résumé, l'ensemble de ces résultats suggère que, parmi les éléments pouvant augmenter le temps des différentes étapes menant à une réinnervation efficace et fonctionnelle, les propriétés de la CSP semblent être un élément important à considérer.

Dans un même ordre d'idées, les résultats issus d'autres études suggèrent que les CSPs pourraient ralentir les processus de réinnervation en ne réagissant pas convenablement à la dénervation, notamment en ayant une expression génique altérée ainsi qu'une réduction de leur viabilité. Plus précisément, un patron d'expression génique altéré a été rapporté uniquement dans les muscles des membres postérieurs (et non pour les muscles extra-oculaires) de souris et de patients atteints de SLA (Liu et al., 2013). Il est important de mentionner qu'un gène en particulier se retrouve sur la liste des gènes altérés et est exprimé par les cellules de Schwann, dont les CSPs : la GFAP. La GFAP est une protéine notamment impliquée dans les changements de cytosquelette des CSPs (Georgiou et al., 1994) et son expression est tributaire d'une réinnervation efficace (Triolo et al., 2006). Puisque l'activation des mAChRs des CSPs peut diminuer l'expression de la GFAP, il est possible que l'hyperactivation des mAChRs des CSPs puisse être à l'origine de ce dérèglement de l'expression génique et également avoir des impacts sur les changements morphologiques des CSPs observés dans les mécanismes de réparation. Cependant, cette possibilité reste à être validée, car aucun lien entre l'activation des mAChRs et celle de certains gènes n'a été fait dans la présente étude.

Un autre groupe a récemment démontré que les CSPs pouvaient entrer en apoptose en réponse à la dénervation (Carrasco et al., 2016a). Il est surprenant de constater que les CSPs adoptent plutôt un comportement mitotique lors de la réinnervation en conditions normales (Love and Thompson, 1998). Bien qu'aucun changement qualitatif apparent du nombre de CSPs n'ait été observé aux JNMs de SOL de souris SOD1^{G37R} et SOD1^{G93A} dans la présente étude, une étude subséquente pourrait notamment procéder à des marquages immunohistochimiques dirigés contre certaines protéines et des marqueurs de l'apoptose (tels que des anticorps dirigés contre des caspases ou la fragmentation de l'ADN par TUNEL), et ce, avec ou sans injections d'antagoniste muscarinique.

L'ensemble de ces résultats supportent la notion que les CSPs seraient dans un phénotype glial inapproprié dans la SLA, voire même de non-réceptivité face à la dénervation. Puisque les mécanismes en amont de la réinnervation ainsi que le patron de réinnervation dépendent majoritairement de la CSP (Kang et al., 2014; Koirala et al., 2000; O'Malley et al., 1999; Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995a, b; Son et al., 1996), cette dernière se doit d'être rapidement en phase avec sa JNM pour pouvoir initier et faciliter les étapes nécessaires à la réinnervation, influencer la résultante motrice et, potentiellement, la survie du MN.

7.3.2 Impact sur la survie du motoneurone

Favoriser la réinnervation de la JNM pourrait avoir des effets bénéfiques sur le MN puisqu'il semble y avoir une certaine dépendance des MNs pour leurs cibles postsynaptiques. Plus précisément, la perte de contact des MNs avec les muscles qu'ils innervent, suite à une amputation ou une section du nerf, provoque une perte significative des MNs (Crews and Wigston, 1990). De plus, il semble que cette perte neuronale soit dépendante, encore une fois, de l'âge et du temps de cette privation. Ceci renforce la notion d'une période critique de réinnervation au cours de laquelle les MNs doivent avoir des JNMs réinnervées afin de survivre. Bien que cette dépendance semble s'appliquer uniquement dans des cas de dénervation majeure (amputation et section du nerf), il se peut néanmoins qu'il puisse y avoir un seuil de dénervation dans la SLA. Le nombre de JNMs dénervées pourrait justement

correspondre à ce seuil. Plus précisément, si un certain nombre de JNMs dénervées est atteint dans une UM donnée, ceci pourrait favoriser la mort du MN. Cette notion de seuil de dénervation est d'ailleurs cohérente avec des résultats de reconstruction d'UMs entières. Ces résultats ont montré que certaines UM comptaient plusieurs JNMs innervées alors que d'autres avaient perdu toutes leurs synapses périphériques (Schaefer et al., 2005). Ainsi, en préservant le plus de JNMs innervées (le nombre de JNM dénervées demeurerait en dessous du seuil de dénervation), ceci favoriserait la survie du MN. Il se pourrait également que la survie des JNMs provoque indirectement la survie du MN en agissant sur d'autres mécanismes moléculaires, tels que la réduction du transport axonal de facteurs de stress en provenance de la JNM (Perlson et al., 2009).

Inversement, il se pourrait également que l'augmentation des mécanismes de réparation à la JNM et l'expansion conséquente de la taille de l'UM provoquent l'effet inverse et soient néfastes pour la survie du MN. En effet, sachant que le MN est déjà dans une situation précaire de stress, ces phénomènes de réparation et de compensation pourraient imposer des exigences excédentaires sur la demande métabolique du MN en augmentant notamment la synthèse et le transport axonal de protéines impliquées dans la mobilité de la terminaison axonale et la production de nouveaux sites synaptiques fonctionnels. Également, un stress supplémentaire pourrait s'ajouter à celui déjà existant du RE ainsi qu'une surcharge énergétique au niveau des mitochondries. D'ailleurs, une augmentation de l'activité d'une UM, en stimulant de façon répétée le nerf moteur, a accentué la dégénérescence des axones moteurs chez une souris $SOD1^{G127X}$ (Alvarez et al., 2013). Une dénervation des JNMs a également été observée dans un muscle de la patte postérieure dans un modèle canin de maladie des MNs à la suite d'une dénervation de muscles synergiques, assumant la même fonction motrice (ici, l'extension de la cheville) (Carrasco et al., 2004). Cependant, l'application de facteur neurotrophique ciliaire (de l'anglais, *ciliary neurotrophic factor*, CNTF), une substance réputée, mais non nécessaire, pour favoriser les phénomènes en lien avec la réparation de la JNM (Siegel et al., 2000; Wright and Son, 2007), a contribué à prévenir la perte des JNMs et des axones dans un modèle de souris SLA (Pun et al., 2006). Ces derniers résultats suggèrent donc que l'emploi d'une stratégie favorisant les mécanismes de compensation à la JNM pourrait être bénéfique dans un contexte de SLA.

Pour conclure, il semble adéquat de présenter un tableau récapitulatif des différents mécanismes proposés dans les deux dernières sections de cette thèse (Tableau 7.1). Ce tableau fait état non seulement des différents mécanismes proposés, mais également des altérations potentielles les sous-tendant (augmentation ou diminution) ainsi que leur(s) impact(s) physiologique(s) probant(s). Ce tableau illustre que la contribution des CSPs à la SLA pourrait être d'origine diverse. D'autres mécanismes seront également proposés dans la section suivante, portant sur un article de revue publiée dans *The Journal of Physiology*.

Tableau 7.1 Liste des différents mécanismes proposés relatant l'implication physiologique potentielle des CSPs dans la maladie de la SLA

Mécanismes	Altération (↑ et/ou ↓)	Impact(s) physiologique(s)
mAChRs	↑	- Mauvaise capacité de détection synaptique - Mauvaise réparation de la JNM - Mauvaise modulation synaptique - Mauvaise stabilisation morphologique - Altération de l'expression génique (ex. GFAP) - Diminution de la survie des MNs
P2Rs	↓	- Plasticité morphologique réduite lors de la réparation - Mauvaise gestion de la poly-innervation
Libération de facteurs trophiques	↓	- Mauvaise stabilisation de la JNM - Mauvaise réparation de la JNM - Diminution de la survie des MNs
Libération d'ACh	↓ aux JNMs dénervées	- Mauvaise stabilisation des nAChRs
Libération de Sema3A	↑ aux JNMs de type FF	- Mauvaise réinnervation de la JNM
Expression du récepteur EpHA8	↑ aux JNMs de type FR	- Mauvaise réinnervation de la JNM
Expression génique	↑ et ↓	- Mauvaise réinnervation de la JNM
Apoptose	↑ aux JNMs dénervées	- Mauvaise réinnervation de la JNM - Diminution de la survie des MNs

7.4 Introduction à l'article de revue

Deux des caractéristiques principales de la SLA dans un modèle de souris SOD1 sont la destruction de la JNM et la contribution des cellules gliales dans le SNC. Étant donné les rôles majeurs joués par les CSPs, il était nécessaire de faire le point sur les interactions neuron-glie potentielles à la JNM dans un contexte de SLA. Puisqu'il y a peu de données concernant l'implication de ces cellules gliales dans la SLA, cette revue est prospective; elle propose différentes pistes d'études pouvant être explorées et pouvant même servir à orienter l'avenir de la recherche dans le domaine. Cet article de revue met l'emphase sur la relation intime qu'entretiennent la CSP et la terminaison axonale du MN et met en valeur les propriétés dynamiques des CSPs. Ainsi, cet article de revue nous a permis d'émettre plusieurs hypothèses concernant les altérations potentielles des CSPs et de mettre en perspective les différents résultats de recherche publiés à ce jour. Cette revue propose donc des altérations de natures diverses qui pourraient s'ajouter à celles présentées dans les sections précédentes.

Pour cet article de revue, j'ai rédigé le plan de rédaction, j'ai fait la recherche dans la littérature, j'ai fait l'ébauche des figures et j'ai également rédigé le manuscrit. Le Dr Robitaille ainsi que la Dre Vande Velde, ont révisé toutes les étapes.

Les pages suivantes présentent la revue portant sur les perspectives des interactions neurone-glie à la JNM de SLA:

Arbour D, Vande Velde C, and Robitaille R. (2017) *New perspectives on amyotrophic lateral sclerosis: the role of glial cells at the neuromuscular junction*. The Journal of Physiology. 595 (3): 647-661.

7.4.1 NEW PERSPECTIVES ON THE NEUROMUSCULAR JUNCTION IN ALS: THE ROLE OF GLIAL CELLS

Short title: Neuron-glia interactions at the NMJ in ALS

Arbour Danielle^{1,2}, Vande Velde Christine^{1,2,3}, Robitaille Richard^{1,2*}

¹ : Département de neurosciences, Université de Montréal

² : Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal, PO box 6128, Station centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

³ : Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9

* To whom correspondence should be addressed: richard.robaille@umontreal.ca

(Received 27 June 2016; accepted after revision 12 September 2016; first published online 16 September 2016)

Number of pages: 29

Number of figures: 3

Number of tables: 0

Numbers of words: Abstract 191, Topical Review 6785 (Intro = 521, Electrophysiological changes = 2367, Role of PSCs = 2317, Molecular and age-dependent interactions = 1437, Conclusion = 143)

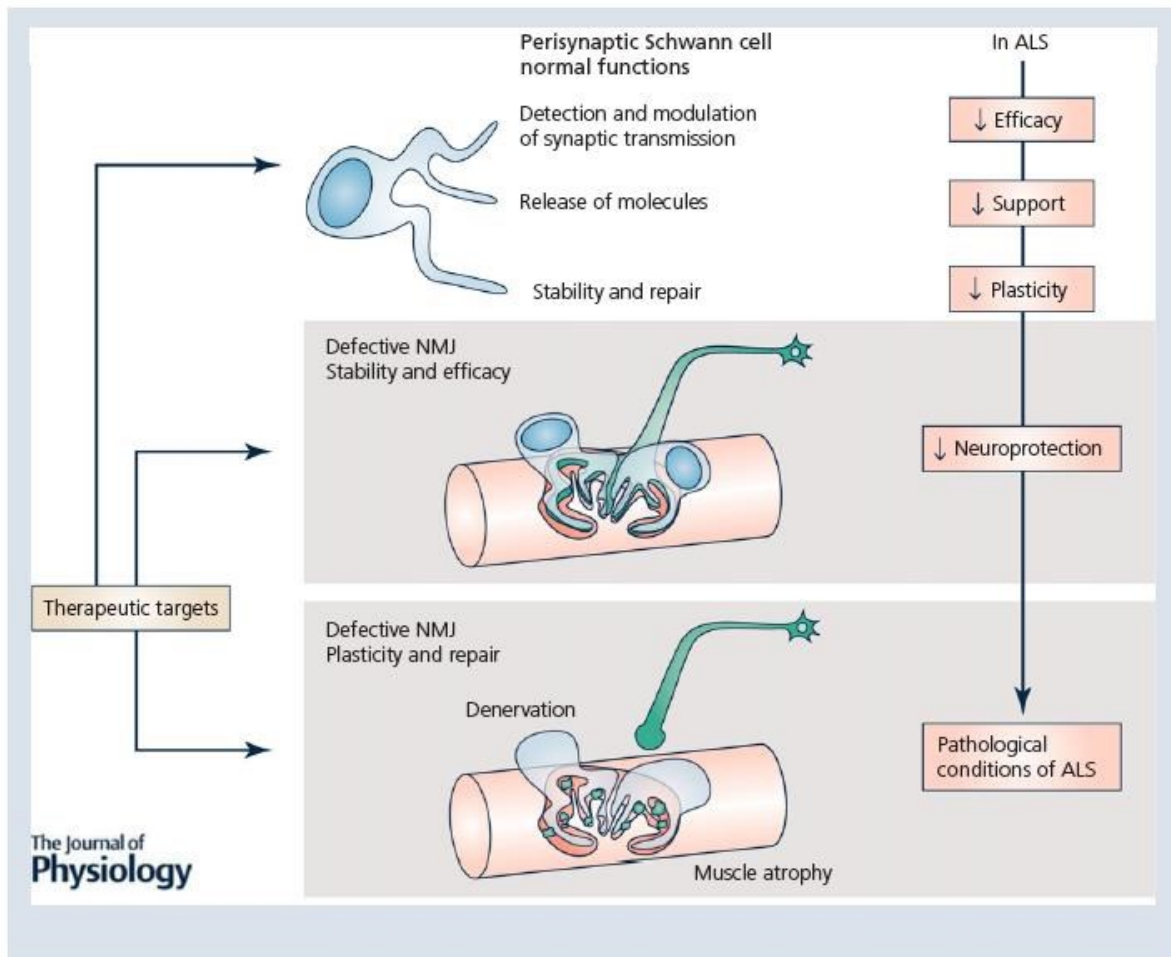
7.4.1.1 ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a disease leading to the death of motor neurons (MNs). It is also recognized as a non-cell autonomous disease where glial cells in the CNS are involved in its pathogenesis and progression. However, although denervation of neuromuscular junctions (NMJs) represents an early and major event in ALS, the importance of glial cells at this synapse receives little attention. An interesting possibility is that altered relationships between glial cells and MNs in the spinal cord in ALS may also take place at the NMJ. Perisynaptic Schwann cells (PSCs), which are glial cells at the NMJ, show great morphological and functional adaptability to ensure NMJ stability, maintenance and repair. More specifically, PSCs change their properties according to the state of innervation. Hence, abnormal changes or lack of changes can have detrimental effects on NMJs in ALS. This review will provide an overview of known and hypothesized interactions between MN nerve terminals and PSCs at NMJs during development, aging and ALS-induced denervation. These neuron–PSC interactions may be crucial to the understanding of how degenerative changes begin and progress at NMJs in ALS, and represent a novel therapeutic target.

Keywords

ALS, non-cell autonomous, perisynaptic Schwann cell, NMJ, synaptic transmission, motor-unit, vulnerability, denervation, remodeling, plasticity, molecular interactions

Figure 7.7 Abstract Figure



Normal PSC functions may be altered and contribute to ALS pathology. Understanding PSC dysfunctions may lead to a new set of therapeutic targets.

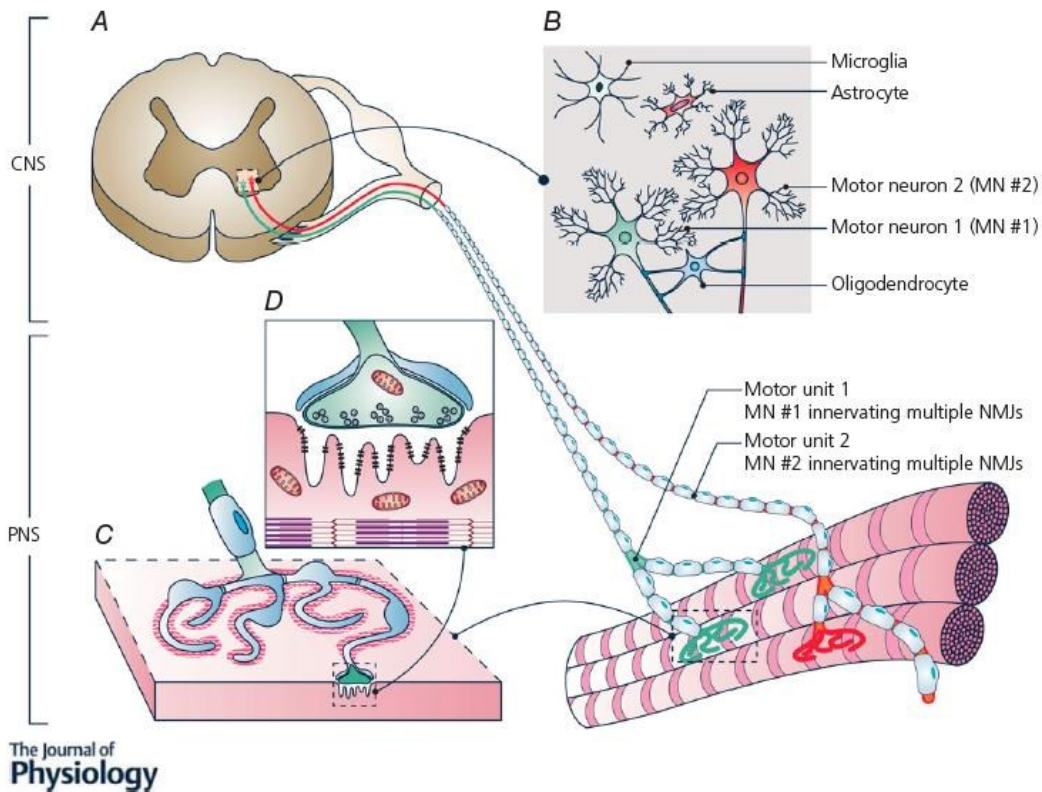
7.4.1.2 INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by a rapid and progressive loss of upper and lower motor neurons (MNs) (Ilieva et al.2009). Patients suffer muscle weakness and paralysis due to the retraction of MN nerve terminals at striated muscles. Despite an impressive amount of knowledge on MNs in the CNS, there is a limited knowledge of the mechanisms that contribute to the loss of this distal synapse, the neuromuscular junction (NMJ). Yet, the destruction of the NMJ is a major determinant of disease progression and severity in ALS since NMJ degeneration still occurs even when MN degeneration is rescued from mutant superoxide dismutase 1 (SOD1)-mediated death (Gould et al. 2006). Indeed, several *in vivo* studies reveal a complete dissociation between MN death and NMJ denervation (Gould et al. 2006; Dewil et al. 2007; Suzuki et al. 2007), identifying the presynaptic nerve terminal of the MN and its environment as one potential site of distinctive mutation-mediated toxicity. Since the NMJ is a complex cellular structure composed of different compartments necessary for its proper function and repair, understanding how each component copes with ALS may reveal unexplored mechanisms contributing to ALS pathophysiology and perhaps pave the way to novel therapeutic approaches.

A landmark discovery, reported in 2003 using a mutant SOD1 rodent model, was that cell types other than MNs are contributors to ALS pathogenesis and progression (Clement et al. 2003). For instance, non-neuronal cells that do not express mutant SOD1 delay degeneration and significantly extend survival of mutant-expressing MNs. However, mutant SOD1 protein expression in both MNs and glial cells is sufficient to induce MN nerve terminal degeneration, while expression in either MNs, astrocytes or muscles alone is not (for review see Ilieva et al. 2009). Although the case for glia contributing to ALS-related MN degeneration is clear in the CNS, it has been less well considered in the periphery. Interestingly, a number of studies highlight potential glial cell involvement in the peripheral nervous system (PNS) (De Winter et al. 2006; Keller et al. 2009; Carrasco et al. 2010, 2016a,b; Arbour et al. 2015), raising the possibility that the signalling between MN nerve terminals and glial cells might be a critical element in the maintenance of NMJ integrity.

Perisynaptic Schwann cells (PSCs; also called terminal Schwann cells) are specialized glial cells at the NMJ (see Fig. 7.8) which play crucial roles in all major aspects of NMJ functions, including synapse formation, maintenance, repair and regulation of synaptic efficacy. However, little is known regarding the role of these cells in driving ALS-related pathological changes. Owing to PSC roles at the NMJ, it is imperative to analyse this synapse with a novel perspective, considering not only the MN but also its associated glia. In this review, we will discuss the intercellular interactions between the presynaptic motor nerve terminal and PSCs and examine outstanding issues in ALS. Specifically, we will focus on the impact of these neuron–glia interactions at the NMJ during synaptic changes and denervation, as well as molecular and age-dependent perturbations that occur in ALS, highlighting the potential heterogeneous contribution of this distinct glial cell population to this disease.

Figure 7.8 Spatial organization of MNs and NMJs



A, ALS is characterized by MN loss, axonal degeneration and NMJ destruction. The MN cell body is located in the ventral horn of the spinal cord while the axon projects outside of the CNS to directly innervate multiple muscle fibres (motor unit). The MN cell body and its local environment (dotted area highlights the region enlarged in **B**) are important sites of mutation-mediated toxicity. Indeed, the contribution of glial cells (**B**, microglia in green, astrocyte in red and oligodendrocyte in blue) in disease development and progression is well established in the CNS. However, the contribution of glial cells at the NMJ, the output of the MNs in the PNS, remains ill-defined. **C**, the NMJ is composed of three synaptic elements: the presynaptic nerve terminal (green), the postsynaptic motor endplate enriched in nicotinic receptors (red stripes on the darker pink muscle fibre) and the perisynaptic Schwann cells (PSCs; blue). Note that these three synaptic elements are precisely aligned with each other. Unlike motor axons that are wrapped with myelinating Schwann cells, the nerve terminal is only covered by non-myelinating PSCs that do not invade the synaptic cleft. A close view of the dotted area in **C** represents the sagittal plane of the NMJ shown in **D**. The different components and the potential interactions between them are described in Fig. 7.9.

7.4.1.3 ALS-RELATED ELECTROPHYSIOLOGICAL CHANGES IN MNS AND NMJs

It has been suggested that MN excitability and activation might influence the progression rates of motor dysfunction, MN death and NMJ denervation (Gordon et al. 2010; Saxena et al. 2013). Therefore, intrinsic spinal MN excitability appears to be a key issue in ALS and relevant to disease. However, MN excitability dysfunction that might influence synaptic output at the NMJ remains ill-defined.

In the first part of this section, we will review the current status of MN excitability and NMJ synaptic impairments in ALS. Unfortunately, in most publications, MN cell body excitability and nerve terminal properties have been investigated as two separate entities, making direct causal links difficult. Since the majority of published results on functional NMJ synaptic properties have been performed in SOD1 mouse models, data on other ALS-causative genes will be included wherever possible. In the second part, NMJ synaptic impairments will be revisited by considering not only the neuronal component but also adding PSCs into this tripartite synapse. Investigating glial contributions to the modulation of synaptic activity at the NMJ and how disease can affect these neuron–glia interactions in the PNS will provide a better-integrated view of NMJ alterations in ALS.

Altered MN excitability and NMJ synaptic impairments in ALS

Early alterations in spinal MN electrical properties have been reported in ALS. Indeed, enhanced intrinsic excitability was observed in spinal MNs from mutant SOD1^{G93A} embryos recorded in culture and in organotypic slices (Pieri et al. 2003; Kuo et al. 2004). At a time when synaptic competition was still present at the NMJ, excitability of lumbar MNs of 7-day-old SOD1^{G93A} animals appears unchanged compared to controls (Quinlan et al. 2011). This was due to an increase in the input conductance of MNs (Bories et al. 2007) that compensated for increased Na⁺ voltage-dependent currents (Quinlan et al. 2011). Importantly, another study performed in the same temporal window reported that Slow-type MNs are hyperexcitable while Fast-type MNs are not (Leroy et al. 2014). It is well considered that the large MNs which innervate fast-contracting muscles fibres are more vulnerable in ALS. In contrast, small

MNs innervating slow-contracting fibres are more resistant to the disease. Therefore, MN subtypes may account for the apparent discrepancies observed in these early developmental processes and the early phase of the disease.

A recent study by Delestree et al. (2014) investigated the intrinsic electrical properties of adult mouse MNs both *in vitro* and *in vivo*. They showed that while NMJ denervation was ongoing in adult SOD1^{G93A} mice, the excitability of MNs in the lumbar or sacrocaudal region is unchanged compared to wild-type (wt) animals. However, they also reported that a large subpopulation of MNs become hypoexcitable, suggesting that MN hyperexcitability may be an early and transient event in SOD1^{G93A} mice and that this hypoexcitability could be a marker of early disease (Delestree et al. 2014). Moreover, this further suggests that at the time NMJs face important morphological modifications (synaptic competition and denervation), electrical properties of spinal MNs undergo functional changes in the mutant SOD1 mouse model of ALS. Interestingly, a temporal analysis of human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived MNs harbouring mutations in different genes associated with ALS also displays initial hyperexcitability (Dewil et al. 2007; Wainger et al. 2014). However, even in this human cell-based model, controversial results have been reported (Sareen et al. 2013), emphasizing the crucial need to understand the intrinsic electrical properties of MNs and the ability of MNs to generate an appropriate synaptic output at the NMJ.

Synaptic transmission at the NMJ is altered early in non-SOD1 models of ALS. Indeed, synaptic transmission at the NMJ of fast-twitch-like muscles is reduced in larval zebrafish expressing human FUS and TDP-43 disease-associated mutations (Armstrong & Drapeau, 2013a,b) and in FUS-expressing *Drosophila* larvae (Shahidullah et al. 2013; Machamer et al. 2014). However, no such comparison has yet been performed in mutant SOD1 animals (during development of fast-twitch muscles). However, at the pre-symptomatic phase of the disease in mutant SOD1 mice (G93A and G37R mutations), synaptic transmission is enhanced at mature and stable NMJs (Rocha et al. 2013; Arbour et al. 2015). This was reported in two different nerve–muscle preparations (diaphragm and soleus) characterized by the same motor unit (MU) composition (slow (S) - and fast-fatigue resistant (FR)). Interestingly, this abnormal nerve-evoked synaptic property was only observed at NMJs with slow properties (the more disease-resistant ones) (Arbour et al. 2015), supporting the idea that their higher resilience to disease may be related to higher synaptic strength (Saxena et al.

2013; Leroy et al. 2014). In symptomatic SOD1^{G93A} mice, where NMJ denervation is already ongoing, data reveal at least two distinct groups of NMJs: one having the same synaptic properties as their wt littermates and the other group exhibiting reduced synaptic strength (Rocha et al. 2013). Again, it is noteworthy to mention that MU subtypes may explain this divergence in NMJ synaptic properties over the course of the disease. Thus, given the numerous fundamental differences in the properties of MNs and NMJs, extrapolating NMJ synaptic impairment based on MN excitability or *vice versa* is risky.

Dissecting disease-relevant causality relationships between MN and NMJ synaptic impairments has remained challenging, mainly due to the technical difficulties inherent to the murine model. Interestingly, to the best of our knowledge, only two studies have reported recordings of both MN and NMJ synaptic activity in other model organisms in the early phase of the disease process. For instance, in the mutant FUS zebrafish larvae model, MNs were found to be more excitable and synaptic transmission at the NMJ of fast-twitch muscles was reduced (Armstrong & Drapeau, 2013b) while in mutant FUS Drosophila larvae, a normal electrical excitability of the MN cell body and axon was reported despite a severe decrease in neurotransmitter release at the NMJ (Shahidullah et al. 2013). According to these results, regardless of the status of MN excitability, synaptic impairment at the NMJ during development seems to be a common feature in these models of ALS.

Although any generalization should be considered with caution, it appears that MN excitability and NMJ synaptic alterations are dependent on disease progression, MU subtypes and mutation, all of which add additional levels of complexity for the treatment of this disease. Hence, a thorough longitudinal analysis of MN excitability and NMJ synaptic changes is required to more accurately define how MN properties ultimately influence NMJ functions and establish the selective synaptic properties relevant to MN vulnerability and resistance in ALS. This could provide insight into how the relationship of MN excitability and NMJ synaptic dysfunctions relates to the vulnerability of the lower motor circuit in ALS. However, it is very important to highlight that, besides MN and NMJ properties, strong evidence indicates that alterations are also present at several other levels of the motor circuit in ALS (reviewed in de Carvalho et al. 2014).

Cross-talk of MN nerve terminals and PSCs for coordinated synaptic efficacy at the NMJ

Because of their role at the NMJ, it is necessary to incorporate PSCs as active partners to obtain a better integrated perspective of NMJ functions in ALS. By considering the bidirectional relationship between MN nerve terminals and associated glia in the regulation of synaptic output, we will focus on how synaptic activity regulates PSC activity and properties and how, in return, PSCs influence NMJ synaptic properties.

First, PSCs are normally tuned with their associated motor nerve terminal. For example, neurotransmitter release by the motor nerve terminal mobilizes PSC G-protein-coupled receptors (GPCRs; mainly muscarinic and purinergic receptors) that control an inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)-mediated mechanism and Ca²⁺ release from internal endoplasmic reticulum (ER) stores (Castonguay & Robitaille, 2001; Rochon et al. 2001; Darabid et al. 2013). This PSC Ca²⁺ response is not only a good reporter of their excitability but also a reliable indicator of their decoding ability. That is to say that it reflects the ability of PSCs to distinguish differences of synaptic strength between two competing nerve terminals at the same NMJ (Darabid et al. 2013), or two different types of NMJs (fast and slow) (Rousse et al. 2010), or even detect different patterns of neuronal activity (Todd et al. 2010). Furthermore, similar to neurons, changes in synaptic activity trigger dynamic and plastic changes in PSC properties, especially muscarinic sensitivity (Belair et al. 2010), suggesting that PSC activity and properties are adaptable to a given synaptic environment.

Second, PSCs can influence synaptic activity and NMJ stability. For instance, selective *in vivo* ablation of PSCs at adult vertebrate NMJs causes a decrease in neurotransmitter release as well as motor nerve terminal retraction (Reddy et al. 2003), highlighting the importance of PSCs in NMJ synaptic function and innervation. In addition, PSCs integrate the activity of the synapse and balance the strength of the connection under normal physiological conditions. More specifically, by releasing different gliotransmitters (e.g. ATP), PSCs will elicit different forms of short-term synaptic plasticity (potentiation or depression) owing to the different kinetics of Ca²⁺ responses (i.e. timing, duration, pattern) that they generate (Todd et al. 2010). Interestingly, PSC Ca²⁺ responses are both sufficient and necessary for the induction of these synaptic plasticity events (Todd et al. 2010). Furthermore, the specific and direct activation of PSC IP₃ receptors leading to Ca²⁺ release or the modulation of PSC G-protein activity can

either potentiate or decrease synaptic efficacy, respectively (Robitaille, 1998; Castonguay & Robitaille, 2001). As a whole, PSCs participate in the fine-tuning of the net output at the NMJ. However, whether PSC functions are altered in the pathological context of ALS remains an open question.

An interesting but unexplored avenue in ALS research is the relative influence of the motor nerve terminal on PSC activity and properties, and *vice versa*. A recent study showed that the ability of PSCs to decode synaptic transmission was greatly altered in a mutant SOD1 mouse model, such that PSC Ca^{2+} responses elicited by motor nerve stimulation were significantly enhanced (Arbour et al. 2015). Moreover, PSC Ca^{2+} responses did not correlate with the specific strength of the motor nerve terminal at the soleus muscle of SOD1^{G37R} mice. This mismatch between synaptic and PSC properties of NMJs in this ALS model suggests that PSCs lose their ability to adapt to a given synaptic environment and instead function according to their own intrinsic glial properties. Indeed, while the altered synaptic strength was stable throughout the pre-symptomatic phase of the disease in SOD1^{G37R} mice, the sensitivity of PSC receptors gradually increased toward disease onset and became dependent on MU vulnerability (Arbour et al. 2015). This raises the question as to whether intrinsic glial cell properties alter synaptic activity and plasticity at the NMJ throughout the different disease stages. Furthermore, an alteration of A1/A2A receptors, which are the target of PSC gliotransmitters, has been reported in mutant SOD1 mice (Nascimento et al. 2014; Nascimento et al. 2015). The same group proposes that the level of extracellular adenosine is increased at the synaptic cleft during the symptomatic phase of ALS (Nascimento et al. 2015), which may suggest a possible altered release of this PSC gliotransmitter in ALS.

Changes in neuron-glia interactions at the NMJ in ALS

Surprisingly, there is limited information on the ALS disease process at the NMJ. Thus, we will explore different mechanisms known to influence MNs and discuss their possible relevance in the context of the NMJs. More specifically, concepts that are thought to contribute to MN vulnerability in ALS will be exported to PSCs, such as Ca^{2+} mishandling, ER and oxidative stress, which can all affect synaptic transmission. These mechanisms could represent potential targets for prospective therapeutic treatments.

Since mutant SOD1 expression induces ER stress affecting MN cell bodies (Saxena et

al. 2009), a dysfunction affecting neuron–glia interactions at the NMJ may be related to ER stress regulation and mitochondrial function. Indeed, SOD1 mutations are known to interfere with these two highly interconnected organelles of MNs in ALS (reviewed in Ilieva et al. 2009). Interestingly, the membranous contact between these two organelles seems to be the host of protein interactions related to intracellular Ca^{2+} handling through IP_3 activation (Manfredi & Kawamata, 2016). Importantly, IP_3 activation regulates PSC Ca^{2+} elevations and potentiates transmitter release (Castonguay & Robitaille, 2001). Given that PSC Ca^{2+} responses are altered in ALS (Arbour et al. 2015), SOD1 mutations may affect PSC IP_3 regulation via ER-mitochondria misregulation resulting in profound effects on PSC Ca^{2+} signalling and synaptic transmission at the NMJ.

Mutant SOD1 expression also increases Ca^{2+} accumulation in the motor nerve terminal (Siklos et al. 1996) and yields abnormal ER Ca^{2+} release in cultured SOD1^{G93A} astrocytes (Kawamata et al. 2014). Given the importance of Ca^{2+} -dependent signalling by PSCs in the decoding and modulation of synaptic activity and the altered PSC Ca^{2+} properties in ALS models (Arbour et al. 2015), a dysfunction in PSC Ca^{2+} -dependent functions could be detrimental for NMJ synaptic function. Thus, one might argue that NMJ synaptic function in ALS could be restored by targeting PSC Ca^{2+} signalling. However, no direct evidence is yet available on PSC Ca^{2+} regulation of synaptic functions in ALS. Another possible mechanism is that mutant SOD1 protein interacts with PSC muscarinic receptors (mAChRs) and alters their signal transduction yielding increased intracellular Ca^{2+} concentrations (Damiano et al. 2013). Based on PSC mAChR over-activation during synaptic communication, an early and persistent abnormal PSC decoding ability was observed in mutant SOD1 mice (Arbour et al. 2015). This would be predicted to contribute to the maintenance of inefficient PSC responses to changes in synaptic properties during the progression of ALS-related NMJ denervation.

PSC over-activation in ALS could also lead to substantial cellular damage via disruption of fundamental cellular pathways. Indeed, glial over-activation leads to increased intracellular Ca^{2+} levels in ALS models (Kawamata et al. 2014; Arbour et al. 2015). Moreover, since Ca^{2+} is an important second messenger implicated in multiple cellular functions, other Ca^{2+} -dependent signalling pathways could also be altered and possibly be deleterious for normal glial cell function. Glial over-activation could also enhance free radical production and consequent mitochondrial overload, redox disturbances and membrane damage. This cascade

of events may ultimately lead to ER and oxidative stress. Interestingly, this greatly correlates with the cellular perturbations observed in MNs expressing SOD1 mutations (for review see Ilieva et al. 2009). Therefore, major pathway dysfunctions affecting MNs can also be critical for its associated glia.

7.4.1.4 THE ROLE OF PSCs IN PATHOLOGICAL CHANGES AT THE NMJ

It remains unclear how MN degeneration and NMJ denervation impact on each other. In particular, there are two main opposing hypotheses proposed to explain the origin of NMJ denervation. The dying-forward hypothesis proposes that the earliest degenerative process starts from the upper MNs and descends to the NMJ (Menon et al. 2014; Thomsen et al. 2014). In contrast, the dying-back hypothesis posits that the degenerative process starts at the level of the NMJs (Fischer et al. 2004; Pun et al. 2006). Regardless of the starting point or if MNs undergo significant stress originating from both the CNS and the PNS, the inevitable loss of neuromuscular synapses is a key event in ALS. Thus, understanding the dysfunctions that are involved in NMJ denervation is critical for improving our understanding of ALS. In this section, we will focus on the characterization of the denervation process at the NMJ, the differential susceptibility of MUs to denervation and re-innervation, and the possible implications of PSCs in these processes.

Denervation and differential susceptibility to denervation in ALS

Although a fundamental event in ALS, the temporal sequence of NMJ denervation remains ill defined. For instance, the morphological sequences by which NMJs are selectively dismantled in ALS do not fit with Wallerian degeneration. Wallerian degeneration is characterized by a series of specific cellular and molecular axonal mechanisms that define the disconnection between the motor nerve terminal and muscle fibres following axonal injury and in normal aging (Gillingwater & Ribchester, 2003). In contrast, NMJ denervation in the context of ALS is characterized by a gradual retraction of the motor nerve terminal without any gross fragmentation or major disintegration of the myelin sheath (Murray et al. 2008). In many aspects, this process is reminiscent of the cellular mechanisms that occur during pruning of excess axonal inputs at NMJs during synaptic competition (Gillingwater & Ribchester,

2003; Schaefer et al. 2005; Darabid et al. 2014). This is corroborated by the inability of the spontaneous mutation Wlds, which confers delayed Wallerian degeneration, to rescue mutant SOD1 mice (G37R and G85R) (Vande Velde et al. 2004), although a contradictory report using SOD1^{G93A} mice claimed a very modest extension in survival and delayed NMJ denervation exclusively in females (Fischer et al. 2005).

There is a positive correlation between NMJ denervation and the degree of MN vulnerability. Indeed, it is reported that NMJs from fast-fatigable (FF) MUs are affected selectively, synchronously and early on and to a lesser extent than fast-resistant NMJs (Atkin et al. 2005; Pun et al. 2006; Hegedus et al. 2007, 2008). Furthermore, NMJs with S properties are partially resistant to the disease and their resistance permits them to compensate for the denervation of NMJs from FF MUs (Frey et al. 2000; Schaefer et al. 2005; Pun et al. 2006). This compensatory mechanism is mainly due to the sprouting of the remaining motor nerve terminals that attempt to re-innervate previously denervated NMJs. This causes an enlargement of the MUs, which eventually fail to counterbalance for the degeneration occurring in the disease (Tam et al. 2001; Schaefer et al. 2005; Pun et al. 2006). One could also argue that increased MU size may further exacerbate the oxidative stress and/or metabolic demand experienced by the compensating MNs, leading to its potential degeneration and elimination, effectively establishing a vicious cycle. However, the underlying mechanisms that account for the differential susceptibility to denervation and re-innervation among MUs remain ill defined.

NMJ susceptibility to denervation and the lack of anatomical plasticity (or sprouting capacity) may depend on the specific properties of NMJ components, i.e. motor nerve terminal, muscle fibre and PSC. A contributing factor may be the existence of profound differences among MNs themselves. Lichtman's group reported that degenerative (denervation) *versus* regenerative (re-innervation) changes are largely confined to distinct populations of MNs within the same motor pool in SOD1^{G93A} mice (Schaefer et al. 2005). In other words, amongst the fast MUs, some motor nerve terminals are in the process of degenerating or compensating, but not both. Thus, although susceptibility in ALS could be attributed to intrinsic MN factors, differential regulation by the local environment at the NMJ also appears to be important (Frey et al. 2000; Pun et al. 2002; Gould et al. 2006). Adding further support for potential peripheral disease mechanisms, it has been proposed that,

following injury in healthy animals, the re-innervation process is more effective at FF NMJs than S NMJs. Specifically, the recovery after nerve injury is faster and the effects of structural degeneration are less pronounced (Nishizawa et al. 2006). Thus, even though FF NMJs are more amenable to re-innervation in non-pathological conditions, they succumb first to ALS-related degeneration, suggesting that additional toxic mechanisms must contribute to FF NMJ loss in ALS.

With regards to the muscle, there is no simple correlation between the level of transgenic SOD1 expression or aggregation and the differential vulnerability of muscle fibre types in SOD1^{G93A} mice (Atkin et al. 2005). Furthermore, the reduction of mutant SOD1 synthesis and accumulation via viral delivery of hRNA or by selective mutant gene excision within muscles did not affect onset, progression or survival of SOD1 mice (Miller et al. 2006). Moreover, it appears that motor nerve terminal degeneration is independent of muscle-restricted expression of the mutant protein, but seems rather dependent on the pairing of mutant-expressing MN axons/nerve terminals and Schwann cells (Carrasco et al. 2010). Thus, similar to the apparent limited contribution of muscles to ALS pathogenesis, they may also not be implicated in specific NMJ resistance and plasticity. In contrast, various PSC-related mechanisms have been described as potential contributors to NMJ susceptibility. For instance, semaphorin 3A (Sema3A) is selectively expressed by PSCs at FF NMJs in SOD1^{G93A} mice (De Winter et al. 2006), suggesting that the chemorepellent release of Sema3A by PSCs may participate in the restricted anatomical plasticity of this particular subset of NMJs. Therefore, it is plausible (if not likely) that PSCs influence motor nerve terminal sprouting capacity during the course of ALS.

The close and dynamic relationship between PSCs and a motor nerve terminal are primarily governed by the innervation state of the NMJ (i.e. innervated *versus* denervated). Indeed, PSCs are exquisitely sensitive to the level of activity at the NMJ. When deprived of synaptic activity, PSCs will drastically change their gene expression profile by upregulating glial fibrillary acidic protein (GFAP), growth-associated protein-43 (GAP-43), low-affinity nerve growth factor (NGF) receptor p75, nestin, cell adhesion molecule CD44 and transcriptional factor zinc-finger proliferation 1 (Zfp1) (reviewed in Sugiura & Lin, 2011). However, the implication of these genes in NMJ re-innervation remains unexplored. In addition, PSCs are an indispensable participant in the re-innervation process by inducing

major plastic changes in their morphology. Results from multiple groups demonstrate that PSCs at denervated NMJs rapidly extend processes towards innervated NMJs (termed bridges). In turn, they initiate the formation of nerve terminal sprouts towards the denervated NMJ (referred to as sprouting) (Reynolds & Woolf, 1992; Son & Thompson, 1995a,b; O'Malley et al. 1999). This indicates that PSCs might be crucial for NMJ plasticity and repair. Interestingly, there is a link between synaptic activity and PSC-mediated repair of the NMJ. In fact, the number of bridges and sprouting is regulated by synaptic activity (Love et al. 2003; Tam & Gordon, 2003). This suggests that an adequate level of synaptic signalling from all NMJ components to PSCs is necessary for PSCs to reach innervated NMJs and guide the sprouting nerve terminal back towards the denervated NMJ (Tam & Gordon, 2003). Thus, PSC anatomical plasticity at a denervated NMJ is a crucial adaptation and repair process, and there is a need to understand the factors that regulate this compensatory mechanism in ALS.

PSC process extension and sprouting have been observed in ALS patients and mouse models of ALS (Frey et al. 2000; Gordon et al. 2004; Gould et al. 2006; Arbour et al. 2015; Tallon et al. 2015). However, the extent of sprouting reported is very limited and most of the observed sprouts were not directed toward areas of denervated NMJs (Tallon et al. 2015). Moreover, there is evidence that this re-innervation mechanism is deficient following denervation in ALS (Gordon et al. 2004; Arbour et al. 2015). The progressive failure of this adaptive sprouting in ALS may be indicative of a change in PSC decoding ability and/or properties since it is the first step that permits them to evaluate the innervation state of the NMJ. For example, when an NMJ is denervated, neurotransmitter release is decreased and there is a consequent failure of endogenous acetylcholine to activate mAChRs located on PSCs (see next section for more details) and GFAP is upregulated (Georgiou et al. 1994, 1999). This suggests that there is a 'motor nerve terminal to PSC' signal requiring presynaptic neurotransmitter release, which regulates PSC gene expression and morphology. Thus, one could argue that the ability of PSCs to detect this presynaptic signal may be impaired and be a possible cause for inadequate NMJ repair as observed in ALS. However, a clear link between PSCs and NMJ repair still requires clarification in the pathological context of ALS.

One possible explanation for the altered ability of PSCs to decode and modulate NMJ synaptic activity could be the disruption in RNA regulation within PSCs. Indeed, a number of GPCR family members and cyclooxygenase-2 (COX-2) are among the transcripts bound by

TDP-43 (Narayanan et al. 2013). These two elements are known to be present in PSCs and influence their ability to decode and modulate NMJ functions (Robitaille, 1998; Lindgren et al. 2013). Since TDP-43-bound RNAs are implicated in synaptic function and are normally found at NMJs (Narayanan et al. 2013; Alami et al. 2014), understanding TDP-43-related changes that occur in this mechanism may help identify links between the genetic causes of the disease and alterations of neuron–glia interactions at the NMJ in ALS.

Interactions between motor nerve terminals and PSCs during re-innervation

Re-innervation of a denervated NMJ proceeds through several steps including phagocytosis of axonal debris, remodelling of the postsynaptic nicotinic receptors (nAChRs) and stabilization of the newly re-innervated NMJ. Several of these steps involve PSCs. For instance, PSCs acquire macrophagocytic-like behaviours that contribute to the removal of axonal debris after nerve injury or presynaptic poisoning with neurotoxin injection (Kang & Lichtman, 2013; Duregotti et al. 2015). Importantly, facilitating the clearance of debris accelerates the rate of re-innervation at the NMJ (Kang & Lichtman, 2013). Interestingly, signalling molecules released from the motor nerve terminal, which activate PSC macrophagocytic-like behaviours, seemed to be derived from mitochondria (Duregotti et al. 2015), a preferential target of misfolded SOD1 toxicity (reviewed in Pickles & Vande Velde, 2012). This suggests that debris clearance by PSCs may also be altered in ALS. Furthermore, during denervation, as indicated above, PSCs extend elaborate processes away from the NMJ, but they also retract others from endplate areas they previously occupied (Kang et al. 2014). Hence, even if re-innervation very often occurs at the same previously occupied synaptic gutters, PSCs actively participate in synapse remodelling by influencing the removal or addition of postsynaptic receptor sites at re-innervated NMJs. Interestingly, the degree of the retraction depends on the length of the period of denervation (Kang et al. 2014). In addition, the fact that regenerating axons preferentially follow PSC processes suggests that remodelling of the nerve terminal after re-innervation may occur, further implying that the newly re-innervated NMJ will be different from the initial one. Knowing that the re-innervation process eventually fails in ALS, it would be interesting to determine which factors influence debris clearance, duration of the re-innervation process and what retains PSC occupation of denervated synaptic sites. Importantly, even though re-innervation occurs in ALS, one could

question if these newly re-formed NMJs are fully functional. Owing to PSCs' essential roles for NMJ establishment and maintenance (Reddy et al. 2003), another interesting and as yet unexplored avenue in ALS would be to identify the signalling pathways that promote stabilization of newly re-formed synapses.

Adequate activation of PSCs is a key feature that influences the outcome of re-innervation. For instance, interruption of synaptic activity either by nerve crush/cut or synaptic blockade (tetrodotoxin or botulinum toxin) triggers an injury-like response in PSCs (i.e. GFAP upregulation, PSC processes extension, bridges and sprouting) (Georgiou et al. 1994; Son & Thompson, 1995a,b) that can be prevented by artificially maintaining the activation of PSC mAChRs (Georgiou et al. 1999). This suggests that the ability of PSCs to switch from a maintenance mode to a repair mode is regulated by their capacity to detect synaptic transmission, specifically via the activation of their mAChRs. This phenotype is also induced by *in vivo* blockage of mAChRs at the NMJ (Wright et al. 2009). It is noteworthy that the contribution and the sensitivity of PSC mAChRs is greatly diminished in situations where major morphological and functional rearrangements of the NMJ are required. Consequently, a change in PSC muscarinic properties may contribute to the cascade of events ultimately causing impairment in NMJ re-innervation and repair. In other words, one could argue that an alteration of PSC mAChRs may affect their ability to decode a change in the state of innervation (innervated → denervated) preventing the switch to a repair mode (gene expression and morphological changes). Most interestingly, two muscarinic alterations in SOD1^{G37R} mice have been reported: (1) an early and persistent abnormal decoding ability of PSCs related to an enhanced muscarinic contribution during synaptic communication, and (2) a gradual increased sensitivity of PSC mAChRs towards disease onset that becomes dependent on MU vulnerability (Arbour et al. 2015). Thus, as proposed earlier, PSC mAChRs may be the key for the proper detection of innervation state and repair of the NMJ in ALS (Ko & Robitaille, 2015). Hence, based on the hyper-muscarinic activity of PSCs recently reported in ALS models (Arbour et al. 2015), one could argue that dampening mAChR activity would restore the phenotype of PSCs, making them more amenable to NMJ repair and plasticity. However, the pathological relevance of the muscarinic hypothesis awaits further study.

7.4.1.5 MOLECULAR AND AGE-DEPENDENT INTERACTIONS AT THE NMJ IN ALS

In this section, we will briefly discuss which motor nerve terminal and PSC molecular or age-dependent interactions may be involved in the delicate balance to maintain NMJ structure and function. An extensive and detailed analysis was recently published by Moloney et al. (2014).

Molecular interactions

Synapse elimination, maturation, stability and repair of the NMJ are critical for its function. Neuregulin (NRG) is a family of alternatively spliced factors that are secreted or membrane-bound and signal through the ErbB family of receptor tyrosine kinases. The NRG-ErbB pathway mediates NMJ formation by increasing synthesis and clustering of postsynaptic nAChRs and associated proteins (reviewed in Darabid et al. 2014). Importantly, this pathway has recently been found to be implicated in synapse elimination and plasticity at the NMJ (Lee et al. 2016). Since, NRG and ErbB3 receptors have been localized at adult NMJs and ErbB3 specifically in PSCs (Trinidad et al. 2000; Gorlewicz et al. 2009), an interesting and protective role has been recently suggested for the NRG-ErbB pathway in ALS purported to act through the CD44 pathway (Moloney et al. 2014).

However, a number of observations lead us to propose an alternate hypothesis: that NRG-ErbB signalling is counterproductive in the PNS. Indeed, exogenous application of NRG on innervated neonatal muscles induces motor nerve terminal retraction and migration of PSC somata away from endplates sites (Trachtenberg & Thompson, 1997). Interestingly, these alterations in PSC position and morphology may be involved in nerve terminal retraction (Trachtenberg & Thompson, 1997; Carrasco et al. 2016a,b). This suggests that the integrity of the NMJ is dependent on the stability of its PSCs (Reddy et al. 2003) and synaptic loss is thus probably mediated by changes in NRG-ErbB signalling in PSCs. Hence, we postulate that over-activation of this signalling may be implicated in the synaptic loss of NMJs in ALS. Moreover, expression of constitutively activated ErbB2 receptors in PSCs or an overexpression of NRG1 in motor axons induces PSC process extension, soma migration and proliferation, as well as sprouting of the motor nerve terminal and PSC phagocytic activity

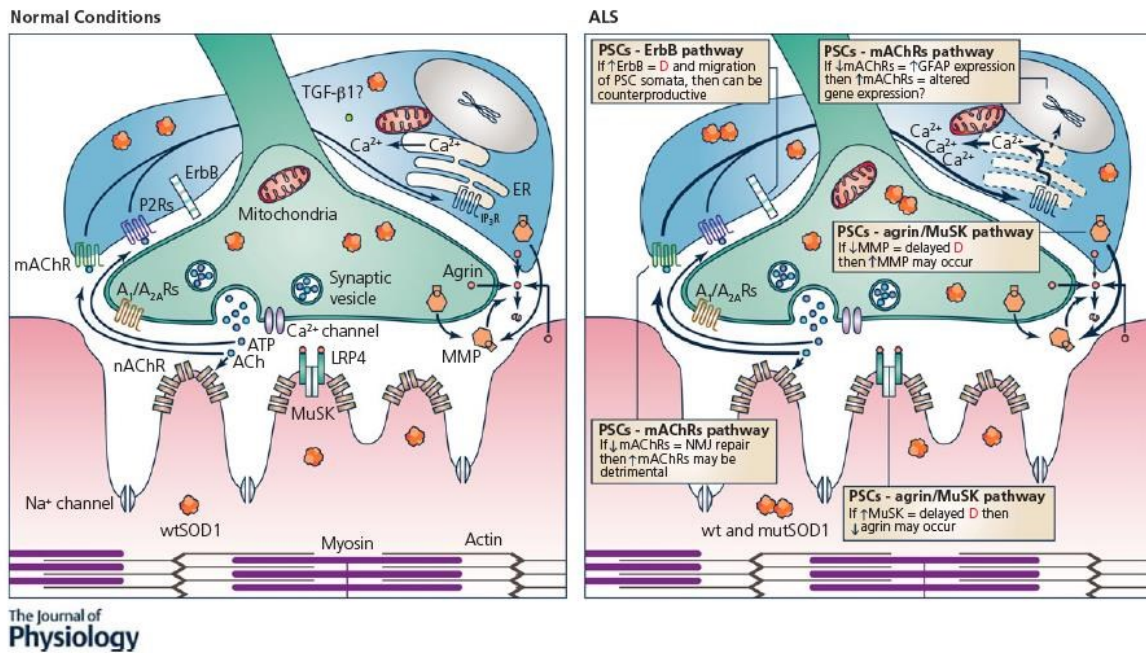
(Hayworth et al. 2006; Lee et al. 2016), indicating that NRG-ErbB signalling is involved in PSC responses upon injury via autocrine/paracrine and/or axo-glial signalling. However, NRG1 expression is reported as significantly reduced in the spinal cords of two mutant SOD1 mouse models and ALS patients. On the other hand, viral-mediated delivery of NRG1 into the spinal cord restores the number of C-boutons and extends the survival of SOD1^{G93A} mice (Lasiene et al. 2016). Hence, it would be important to determine the functionality of this pathway in ALS in the CNS as well as the PNS.

Another molecule that could have differential effect in the CNS and the PNS is transforming growth factor (TGF) β 1. Astrocytic TGF- β 1 probably controls neuroprotective immune responses by regulating microglial activation and T-cell number (Endo et al. 2015). While astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease progression in ALS mice, which is ameliorated by a TGF- β 1 signalling inhibitor (Endo et al. 2015), Schwann cell-derived TGF- β 1 (isolated from sciatic nerve) promotes synaptogenesis by significantly increasing the percentage of co-culture nerve-muscle contacts *in vitro* (Feng & Ko, 2008). Moreover, Schwann cell-derived TGF- β 1 upregulated agrin expression in spinal neuron somata *in vitro* (Feng & Ko, 2008). Hence, TGF- β 1 may play a critical role during the re-innervation process in ALS by promoting the re-establishment of nerve-muscle contacts. In addition, PSC-derived TGF- β 1 could upregulate the release of agrin by the MN nerve terminal, increasing the stabilization of the newly re-formed NMJ.

Another interesting but still unexplored avenue in ALS is the implication of PSCs in the agrin/MuSK pathway for NMJ stability. Agrin and its receptor (muscle-specific kinase, MuSK) are implicated in NMJ assembly and maturation during development (for review see Darabid et al. 2014). First, PSCs release agrin, as do neurons (Yang et al. 2001) and muscles (Burgess et al. 1999). Since an increase in MuSK activity delays muscle denervation, improves muscle function and delays disease onset in SOD1^{G93A} mice (Perez-Garcia & Burden, 2012), it is tempting to propose that the synthesis of agrin by PSCs may be deficient in ALS. Second, since agrin levels are controlled in part through degradation by matrix metalloproteinases (MMPs) (Darabid et al. 2014), PSCs may regulate agrin levels by changing their secretion of MMPs. Interestingly, MMP-3 is expressed by PSCs at the NMJ and its expression is tightly regulated according to innervation state (VanSaun et al. 2007). Moreover, persistence of agrin due to genetic deletion of MMP-3 leads to the preservation of endplates

following nerve injury and degeneration (Chao et al. 2012) and modulation of neuronal MMP-9 levels significantly delays muscle denervation (Kaplan et al. 2014). Collectively, these studies suggest that both motor nerve terminals and PSCs can modulate agrin levels via MMP secretion and, therefore, affect NMJ stability (Figure 7.9).

Figure 7.9 Potential molecular interactions between PSCs, muscle fibers and motor nerve terminals at NMJs



In normal conditions (left panel), the presynaptic nerve terminal (green), the postsynaptic muscle fibre (pink) and the PSCs (blue) regulate synaptic functions in a coordinated fashion. Synaptic transmission is induced when an action potential reaches the presynaptic nerve terminal, activating voltage-dependent calcium channels. This activation will trigger a rapid calcium entry into the nerve terminal, and induce synaptic vesicle exocytosis and subsequent neurotransmitter release into the synaptic cleft. ACh will be co-released with ATP. ACh will bind to nAChRs on the muscle fibre and to mAChRs on PSCs. The binding of ACh to the nAChRs will depolarize the muscle fibre, which can result in the opening of voltage-dependent sodium channels and subsequent muscle contraction (myosin and actin movement). The binding of ACh to mAChRs will trigger an increase in intracellular Ca²⁺ via the activation of the IP₃ receptors (IP₃Rs) of the ER. ATP released during synaptic activity will be detected by PSCs via P2Y G-protein-coupled receptors. They, too, will trigger an increase of intra-PSC Ca²⁺ concentration by releasing Ca²⁺ from IP₃-driven internal stores. In return, PSC detection of neurotransmission will regulate synaptic activity by acting on presynaptic adenosine receptors (A₁/A_{2A}Rs). Interactions between MN nerve terminals and PSCs can also occur via different pathways that influence NMJ stability and repair. For example, PSCs express receptors such as ErbBs that, if

activated, can influence NMJ structure. PSCs can also release TGF- β 1 and agrin, and synthesize MMPs. TGF- β 1 will promote NMJ formation and stability, while agrin, which can be cleaved by MMP, will act on the LRP4 (low density lipoprotein receptor-related protein 4)-MuSK complex to influence NMJ stability. Also, note the presence of mitochondria and wt SOD1 in all three synaptic elements. In ALS pathological conditions (right panel), these different PSC signalling pathways can be altered to promote NMJ denervation (D). Over-activation of PSC muscarinic pathway leads to greater intracellular Ca²⁺ responses, alters gene expression and, hence, influences NMJ repair. Furthermore, the activation of the ErbB pathway can be implicated in alterations in PSC position and morphology as well as synaptic loss. Finally, the PSC agrin/MuSK pathway can be altered such that MMP release by PSCs can be upregulated and released agrin can be reduced, leading to NMJ instability. Boxes: hypothesis and proposed mechanisms. Dotted lines: pathways that are yet to be confirmed. Line thickness: relative increase or decrease of the pathway in comparison to the normal condition.

LRP4, low density lipoprotein receptor-related protein 4; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; SOD1, superoxide dismutase 1.

Age-dependent interactions

ALS is a complex, multi-factorial disease with a long pre-clinical phase. Understanding how disease may affect motor nerve terminals and PSCs during development and aging is essential to identify pathogenic mechanisms culminating in ALS phenotypes.

It has been proposed that patterns of NMJ resistance and susceptibility are strikingly correlated in aging and ALS. Indeed, a comparison of NMJs in aged mice (22-28 months old) with those in SOD1^{G93A} mice reveals that most muscles are similarly affected or spared in aging and ALS and share molecular (i.e. TDP-43 mislocalization in MNs that supply susceptible muscles) as well as structural features (i.e. postsynaptic fragmentation, denervation, sprouting and poly-innervation) (Valdez et al. 2012). Since some NMJs appear to share the same susceptibility in the face of adversity, it is tempting to extrapolate data obtained from aging studies to ALS. However, aging and ALS are two fundamentally different physiological conditions. Even if some NMJs from aged or ALS animals reach the same

morphological endpoint, this does not necessarily imply that the underlying mechanisms to reach this point are similar. Comparative molecular and functional analyses must be evaluated critically and carefully as overlapping mechanisms may link these two processes, such that abnormalities that occur in normal aging could be exacerbated in ALS. For example, it has been proposed that impaired PSC sprouting in aged muscles following nerve injury may be responsible for poor re-innervation during aging (Kawabuchi et al. 2001). Hence, the reciprocal interactions of motor nerve terminal and PSCs during aging might serve as another model to dissect out new contributing factors to NMJ repair failure in the context of ALS.

During aging and ALS, re-innervation occurs when an NMJ is denervated. Interestingly, re-innervation of the NMJ shares similar features with synapse formation, since the repair mechanisms recapitulate several steps observed during development (for reviews, see Darabid et al. 2014; Ko & Robitaille, 2015). This suggests that mechanisms that influence NMJ assembly during development may also influence its disassembly and repair during adulthood. Along the same lines, Caroni's group has reported two distinct patterns of initial assembly of NMJs (fast and delayed synapsing). Interestingly, these two patterns of assembly correlate with two distinct patterns of disassembly, where NMJs from delayed synapsing muscles are more vulnerable to disassembly of AChR clusters after paralysis or denervation (Pun et al. 2002). Surprisingly, there is no direct correlation between this specificity of assembly/disassembly and the different MU types, favouring again the notion that local factors at the NMJ could play valuable roles in NMJ stability. Importantly, a synaptic element that controls NMJ establishment, maintenance and repair is the PSC. Consistent with this idea, PSCs also have distinct process extension capacity at denervated muscles such that robust PSC process extension is detected at all NMJs in muscles with delayed synapsing, while it is weak in fast synapsing muscles (Pun et al. 2002). Taken together, this suggests that distinct intrinsic factors implicated in NMJ synaptogenesis could provide the basis for understanding NMJ susceptibility/plasticity and/or PSC process extension capacity in the adult.

To date, little is known about what contributes to NMJ resistance in ALS. Considering that oculomotor and anal sphincter NMJs are mostly preserved in human and rodent models of aging and ALS (Valdez et al. 2012), and while intrinsic differences in these MN pools have been reported by multiple groups (Nimchinsky et al. 2000; Comley et al. 2015), another intriguing possibility is that PSCs at these specific NMJs have different properties. In fact,

differential expression of distinct synaptically relevant proteins has been reported at oculomotor NMJs compared with limb muscle NMJs of ALS donors (i.e. S100 β , GFAP, p75) (Liu et al. 2013). All of these candidates are expressed by PSCs. Thus, whether PSCs have different decoding and repairing ability, and/or a distinctive molecular signature in resistant NMJs, such as those of the oculomotor pool or Onuf's nucleus, remains to be determined.

7.4.1.6 CONCLUSIONS

Owing to their numerous and essential roles at the NMJ, PSCs might hold the keys to understanding ALS etiology and pathomechanisms. PSCs play dynamic roles in multiple areas of NMJ function, such as modulating synaptic activity, promoting effective re-innervation processes and modifying molecular and age-dependent changes that could all lead to an exacerbation of the ALS phenotype. Overall, we propose that dysfunctions in neuron-glia interactions in the periphery may contribute to the pathological conditions of NMJs in ALS. Moreover, understanding PSC (dys)functions in ALS could provide the foundation for a new set of targets, perhaps opening new strategies to improve patients' quality of life. Harnessing glial cells at NMJs may offer ways to maintain a higher level of muscle function for patients. Owing to the numerous functions of PSCs, these strategies may also prove useful for a broader group of motor neuron diseases.

7.4.1.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Éric Martineau and Elsa Tremblay for reading and commenting the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health research to RR (MOP-14137, MOP-111070), a Bernice Ramsay Discovery Grant (ALS Canada), a grant from the Robert Packard Center for ALS Research at Johns Hopkins and an infrastructure grant from the Fonds Recherche Quebec-Santé (FRQ-S) to the Groupe de recherche sur le Système Nerveux Central. CVV is a CIHR New Investigator and her laboratory is supported by ALS Society of Canada, Brain Canada, Muscular Dystrophy Association, and CIHR. DA held a studentship from National Science Engineering Research Council of Canada. The authors declare no competing financial interests.

7.4.1.8 REFERENCES

Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, Han SS, Kiskinis E, Winborn B, Freibaum BD, Kanagaraj A, Clare AJ, Badders NM, Bilican B, Chaum E, Chandran S, Shaw CE, Eggan KC, Maniatis T & Taylor JP (2014). Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* 81, 536–543.

Arbour D, Tremblay E, Martineau E, Julien JP & Robitaille R (2015). Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model. *J Neurosci* 35, 688–706.

Armstrong GA & Drapeau P (2013a). Calcium channel agonists protect against neuromuscular dysfunction in a genetic model of TDP-43 mutation in ALS. *J Neurosci* 33, 1741–1752.

Armstrong GA & Drapeau P (2013b). Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS. *Hum Mol Genet* 22, 4282–4292.

Atkin JD, Scott RL, West JM, Lopes E, Quah AK & Cheema SS (2005). Properties of slow- and fast-twitch muscle fibres in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord* 15, 377–388.

Belair EL, Vallee J & Robitaille R (2010). In vivo long-term synaptic plasticity of glial cells. *J Physiol* 588, 1039–1056.

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

Burgess RW, Nguyen QT, Son YJ, Lichtman JW & Sanes JR (1999). Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle-derived agrin: their roles at the neuromuscular junction.

Neuron 23, 33–44.

Carrasco DI, Bahr BA, Seburn KL & Pinter MJ (2016a). Abnormal response of distal Schwann cells to denervation in a mouse model of motor neuron disease. *Exp Neurol* 278, 116–126.

Carrasco DI, Bichler EK, Seburn KL & Pinter MJ (2010). Nerve terminal degeneration is independent of muscle fiber genotype in SOD1 mice. *PLoS One* 5, e9802.

Carrasco DI, Seburn KL & Pinter MJ (2016b). Altered terminal Schwann cell morphology precedes denervation in SOD1 mice. *Exp Neurol* 275, 172–181.

Castonguay A & Robitaille R (2001). Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca^{2+} internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21, 1911–1922.

Chao T, Frump D, Lin M, Caiozzo VJ, Mozaffar T, Steward O & Gupta R (2012). Matrix metalloproteinase 3 deletion preserves denervated motor endplates after traumatic nerve injury. *Ann Neurol* 73, 210–223.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS & Cleveland DW (2003). Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302, 113–117.

Comley L, Allodi I, Nichterwitz S, Nizzardo M, Simone C, Corti S & Hedlund E (2015). Motor neurons with differential vulnerability to degeneration show distinct protein signatures in health and ALS. *Neuroscience* 291, 216–229.

Damiano S, Petrozziello T, Ucci V, Amente S, Santillo M & Mondola P (2013). Cu-Zn superoxide dismutase activates muscarinic acetylcholine M1 receptor pathway in

neuroblastoma cells. *Mol Cell Neurosci* 52, 31–37.

Darabid H, Arbour D & Robitaille R (2013). Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 33, 1297–1313.

Darabid H, Perez-Gonzalez AP & Robitaille R (2014). Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nat Rev Neurosci* 15, 703–718.

de Carvalho M, Eisen A, Krieger C & Swash M (2014). Motoneuron firing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Front Hum Neurosci* 8, 719.

Delestree N, Manuel M, Iglesias C, Elbasiouny SM, Heckman CJ & Zytnicki D (2014). Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 592, 1687–1703.

Dewil M, dela Cruz VF, Van Den Bosch L & Robberecht W (2007). Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase activation and mutant SOD1(G93A)-induced motor neuron death. *Neurobiol Dis* 26, 332–341.

DeWinter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bar PR, Niclou SP, van Muiswinkel FL & Verhaagen J (2006). The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci* 32, 102–117.

Duregotti E, Negro S, Scorzeto M, Zornetta I, Dickinson BC, Chang CJ, Montecucco C & Rigoni M (2015). Mitochondrial alarmins released by degenerating motor axon terminals activate perisynaptic Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E497–E505.

Endo F, Komine O, Fujimori-Tonou N, Katsuno M, Jin S, Watanabe S, Sobue G, Dezawa M, Wyss-Coray T & Yamanaka K (2015). Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease

progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells. *Cell Rep* 11, 592–604.

Feng Z & Ko CP (2008). Schwann cells promote synaptogenesis at the neuromuscular junction via transforming growth factor- β 1. *J Neurosci* 28, 9599–9609.

Fischer LR, Culver DG, Davis AA, Tennant P, Wang M, Coleman M, Asress S, Adalbert R, Alexander GM & Glass JD (2005). The WldS gene modestly prolongs survival in the SOD1^{G93A} fALS mouse. *Neurobiol Dis* 19, 293–300.

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. *Exp Neurol* 185, 232–240.

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 & Charlton MP (1994). Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12, 443–455.

Gillingwater TH & Ribchester RR (2003). The relationship of neuromuscular synapse elimination to synaptic degeneration and pathology: insights from WldS and other mutant mice. *J Neurocytol* 32, 863–881.

Gordon T, Hegedus J & Tam SL (2004). Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease. *Neurol Res* 26, 174–185.

Gordon T, Tyreman N, Li S, Putman CT & Hegedus J (2010). Functional over-load saves motor units in the SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 37, 412–422.

Gorlewicz A, Wlodarczyk J, Wilczek E, Gawlak M, Cabaj A, Majczynski H, Nestorowicz K, Herbik MA, Grieb P, Slawinska U, Kaczmarek L & Wilczynski GM (2009). CD44 is expressed in non-myelinating Schwann cells of the adult rat, and may play a role in neurodegeneration-induced glial plasticity at the neuromuscular junction. *Neurobiol Dis* 34, 245–258.

Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE & Oppenheim RW (2006). Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26, 8774–8786.

Hayworth CR, Moody SE, Chodosh LA, Krieg P, Rimer M & Thompson WJ (2006). Induction of neuregulin signaling in mouse Schwann cells in vivo mimics responses to denervation. *J Neurosci* 26, 6873–6884.

Hegedus J, Putman CT & Gordon T (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 28, 154–164.

Hegedus J, Putman CT, Tyreman N & Gordon T (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 586, 3337–3351.

Ilieva H, Polymenidou M & Cleveland DW (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187, 761–772.

Kang H & Lichtman JW (2013). Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young adult and aged animals. *J Neurosci* 33, 19480–19491.

Kang H, Tian L, Mikesch M, Lichtman JW & Thompson WJ (2014). Terminal Schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury. *J Neurosci* 34, 6323–6333.

Kaplan A, Spiller KJ, Towne C, Kanning KC, Choe GT, Geber A, Akay T, Aebischer P & Henderson CE (2014). Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration. *Neuron* 81, 333–348.

Kawabuchi M, Zhou CJ, Wang S, Nakamura K, Liu WT & Hirata K (2001). The spatiotemporal relationship among Schwann cells, axons and postsynaptic acetylcholine receptor regions during muscle reinnervation in aged rats. *Anat Rec* 264, 183–202.

Kawamata H, Ng SK, Diaz N, Burstein S, Morel L, Osgood A, Sider B, Higashimori H, Haydon PG, Manfredi G & Yang Y (2014). Abnormal intracellular calcium signaling and SNARE-dependent exocytosis contributes to SOD1G93A astrocyte-mediated toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 34, 2331–2348.

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.

Ko CP & Robitaille R (2015). Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular synapse: adaptable, multitasking glial cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 a020503.

Kuo JJ, Schonewille M, Siddique T, Schults AN, Fu R, Bar PR, Anelli R, Heckman CJ & Kroese AB (2004). Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J Neurophysiol* 91, 571–575.

Lasiene J, Komine O, Fujimori-Tonou N, Powers B, Endo F, Watanabe S, Shijie J, Ravits J, Horner P, Misawa H & Yamanaka K (2016). Neuregulin 1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons.

Acta Neuropathol Commun 4, 15.

Lee YI, Li Y, Mikesch M, Smith I, Nave KA, Schwab MH & Thompson WJ (2016). Neuregulin1 displayed on motor axons regulates terminal Schwann cell-mediated synapse elimination at developing neuromuscular junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, E479–E487.

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.

Lindgren CA, Newman ZL, Morford JJ, Ryan SB, Battani KA & Su Z (2013). Cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 glycerol ester and nitric oxide are involved in muscarine-induced presynaptic enhancement at the vertebrate neuromuscular junction. *J Physiol* 591, 4749–4764.

Liu JX, Brannstrom T, Andersen PM & Pedrosa-Domellof F (2013). Distinct changes in synaptic protein composition at neuromuscular junctions of extraocular muscles versus limb muscles of ALS donors. *PLoS One* 8, e57473.

Love FM, Son YJ & Thompson WJ (2003). Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J Neurobiol* 54, 566–576.

Machamer JB, Collins SE & Lloyd TE (2014). The ALS gene FUS regulates synaptic transmission at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Hum Mol Genet* 23, 3810–3822.

Manfredi G & Kawamata H (2016). Mitochondria and endoplasmic reticulum crosstalk in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 90, 35–42.

Menon P, Kiernan MC & Vucic S (2014). Cortical hyperexcitability precedes lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clin Neurophysiol* 126, 803–809.

Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umaphathi P, Arnson H, Rizo L, Mendell JR, Gage FH, Cleveland DW & Kaspar BK (2006). Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 19546–19551.

Moloney EB, deWinter F & Verhaagen J (2014). ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Front Neurosci* 8, 252.

Murray LM, Thomson D, Conklin A, Wishart TM & Gillingwater TH (2008). Loss of translation elongation factor (eEF1A2) expression in vivo differentiates between Wallerian degeneration and dying-back neuronal pathology. *J Anat* 213, 633–645.

Narayanan RK, Mangelsdorf M, Panwar A, Butler TJ, Noakes PG & Wallace RH (2013). Identification of RNA bound to the TDP-43 ribonucleoprotein complex in the adult mouse brain. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14, 252–260.

Nascimento F, Sebastiao AM & Ribeiro JA (2015). Presymptomatic and symptomatic ALS SOD1 (G93A) mice differ in adenosine A1 and A2A receptor-mediated tonic modulation of neuromuscular transmission. *Purinergic Signal* 11, 471–480.

Nascimento FP, Macedo-Junior SJ, Pamplona FA, Luiz-Cerutti M, Cordova MM, Constantino L, Tasca CI, Dutra RC, Calixto JB, Reid A, Sawynok J & Santos AR (2014). Adenosine A1 receptor-dependent antinociception induced by inosine in mice: pharmacological, genetic and biochemical aspects. *Mol Neurobiol* 51, 1368–1378.

Nimchinsky EA, Young WG, Yeung G, Shah RA, Gordon JW, Bloom FE, Morrison JH & Hof PR (2000). Differential vulnerability of oculomotor, facial, and hypoglossal nuclei in G86R superoxide dismutase transgenic mice. *J Comp Neurol* 416, 112–125.

Nishizawa T, Yamashita S, McGrath KF, Tamaki H, Kasuga N & Takekura H (2006).

Plasticity of neuromuscular junction architectures in rat slow and fast muscle fibers following temporary denervation and reinnervation processes. *J Muscle Res Cell Motil* 27, 607–615.

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.

Perez-Garcia MJ & Burden SJ (2012). Increasing MuSK activity delays denervation and improves motor function in ALS mice. *Cell Rep* 2, 497–502.

Pickles S & Vande Velde C (2012). Misfolded SOD1 and ALS: zeroing in on mitochondria. *Amyotroph Lateral Scler* 13, 333–340.

Pieri M, Albo F, Gaetti C, Spalloni A, Bengtson CP, Longone P, Cavalcanti S & Zona C (2003). Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 351, 153–156.

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.

Pun S, Sigrist M, Santos AF, Ruegg MA, Sanes JR, Jessell TM, Arber S & Caroni P (2002). An intrinsic distinction in neuromuscular junction assembly and maintenance in different skeletal muscles. *Neuron* 34, 357–370.

Quinlan KA, Schuster JE, Fu R, Siddique T & Heckman CJ (2011). Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 589, 2245–2260.

Reddy LV, Koirala S, Sugiura Y, Herrera AA & Ko CP (2003). Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo.

Neuron 40, 563–580.

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, Sebastiao AM & Ribeiro JA (2013). Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS One* 8, e73846.

Rochon D, Rouse I & Robitaille R (2001). Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21, 3819–3829.

Rouse I, St-Amour A, Darabid H & Robitaille R (2010). Synapse-glia interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties. *Neuroscience* 167, 621–632.

Sareen D, O'Rourke JG, Meera P, Muhammad AK, Grant S, Simpkinson M, Bell S, Carmona S, Ornelas L, Sahabian A, Gendron T, Petrucelli L, Baughn M, Ravits J, Harms MB, Rigo F, Bennett CF, Otis TS, Svendsen CN & Baloh RH (2013). Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. *Sci Transl Med* 5, 208ra149.

Saxena S, Cabuy E & Caroni P (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 12, 627–636.

Saxena S, Roselli F, Singh K, Leptien K, Julien JP, 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.

Schaefer AM, Sanes JR & Lichtman JW (2005). A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* 490, 209–219.

Shahidullah M, Le Marchand SJ, Fei H, Zhang J, Pandey UB, Dalva MB, Pasinelli P & Levitan IB (2013). Defects in synapse structure and function precede motor neuron degeneration in *Drosophila* models of FUS-related ALS. *J Neurosci* 33, 19590–19598.

Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F & Appel SH (1996). Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39, 203–216.

Son YJ & Thompson WJ (1995a). Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14, 133–141.

Son YJ & Thompson WJ (1995b). Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 14, 125–132.

Sugiura Y & Lin W (2011). Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function. *Biosci Rep* 31, 295–302.

Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Klein SM, Aebischer P & Svendsen CN (2007). GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS. *PLoS One* 2, e689.

Tallon C, Russell KA, Sakhalkar S, Andrapallayal N & Farah MH (2015). Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice. *Neuroscience* 312, 179–189.

Tam SL, Archibald V, Jassar B, Tyreman N & Gordon T (2001). Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. *J Neurosci* 21, 654–667.

Tam SL & Gordon T (2003). Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *J Neurobiol* 57, 221–234.

Thomsen GM, Gowing G, Latter J, Chen M, Vit JP, Staggenborg K, Avalos P, Alkaslasi M, Ferraiuolo L, Likhite S, Kaspar BK & Svendsen CN (2014). Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci* 34, 15587–15600.

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.

Trachtenberg JT & Thompson WJ (1997). Nerve terminal withdrawal from rat neuromuscular junctions induced by neuregulin and Schwann cells. *J Neurosci* 17, 6243–6255.

Trinidad JC, Fischbach GD & Cohen JB (2000). The agrin/MuSK signaling pathway is spatially segregated from the neuregulin/ErbB receptor signaling pathway at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 20, 8762–8770.

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.

Vande Velde C, Garcia ML, Yin X, Trapp BD & Cleveland DW (2004). The neuroprotective factor Wlds does not attenuate mutant SOD1-mediated motor neuron disease. *Neuromolecular Med* 5, 193–203.

VanSaun M, Humburg BC, Arnett MG, Pence M & Werle MJ (2007). Activation of matrix metalloproteinase-3 is altered at the frog neuromuscular junction following changes in synaptic activity. *Dev Neurobiol* 67, 1488–1497.

Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SS, Sandoe J, Perez NP, Williams LA, Lee S, Boulting G, Berry JD, Brown RH Jr, Cudkowicz ME, Bean BP, Eggan K & Woolf CJ (2014). Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep* 7, 1–11.

Wright MC, Potluri S, Wang X, Dentcheva E, Gautam D, Tessler A, Wess J, Rich MM & Son YJ (2009). Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses. *J Neurosci* 29, 14942–14955.

Yang JF, Cao G, Koirala S, Reddy LV & Ko CP (2001). Schwann cells express active agrin and enhance aggregation of acetylcholine receptors on muscle fibers. *J Neurosci* 21, 9572–9584.

7.5 Actualisation du modèle de la JNM et de la contribution gliale dans la SLA

À la lumière des résultats présentés dans cette thèse, il semble adéquat de réviser le modèle de la dénervation/réinnervation de la JNM dans la SLA. Avant notre étude, les altérations des CSPs à la JNM étaient totalement inconnues. Nous avons montré que les CSPs détectent anormalement la communication synaptique à la JNM de souris SLA, ce qui empêche les CSPs d'entrer dans un mode fonctionnel de réparation lorsque la JNM fait face à de la dénervation. De plus, nos résultats démontrent que la réduction de l'activation des mAChRS des CSPs peut être bénéfique en limitant le nombre de JNMs dénervées et en favorisant un meilleur taux de réinnervation.

7.5.1 Actualisation du modèle de la JNM dans la SLA

La JNM, bien que considérée comme étant une synapse tripartite par plusieurs groupes de recherche, demeure toujours comme étant un élément rapporteur ou une simple validation de la maladie dans le domaine de la SLA. Plus précisément, l'évaluation de la JNM est systématiquement faite selon l'apposition de l'élément pré- et postsynaptique, où l'élément pérисynaptique glial est très souvent ignoré. C'est notamment ce qui explique qu'aucune évaluation extensive de la JNM n'avait été effectuée à ce jour en considérant les trois éléments synaptiques. Nous espérons que, suite à la publication de nos travaux de recherche, la JNM sera désormais perçue comme étant une synapse tripartite où ses trois éléments synaptiques sont interreliés et ont un rôle à jouer dans les dérèglements de la morphologie et de la fonction de la JNM dans la SLA.

Nous espérons également que l'attention sera particulièrement dirigée sur les CSPs lors de prochaines études portant sur l'excision génétique du gène *SOD1* muté. Jusqu'à aujourd'hui, l'excision génétique du gène *SOD1* muté (G85R et G37R) dans les cellules de Schwann n'a toujours pas donné de résultats clairs quant à la contribution des CSPs (Lobsiger et al., 2009; Wang et al., 2012). La disparité de ces résultats peut notamment s'expliquer par

l'emploi du promoteur pour la protéine de myéline zéro (de l'anglais, *myelin protein zero*, P0) qui ne permet aucune différenciation entre les populations des cellules de Schwann (myélinisantes ou pérисynaptiques). La nécessité de tester des marqueurs spécifiques pour les CSPs se fait dorénavant urgente.

Il est intéressant de mentionner que deux équipes de recherche ont découvert, il y a plus d'une dizaine d'années maintenant, deux marqueurs spécifiques pour les CSPs. Plus précisément, la première étude a procédé à l'isolement de CSPs issues du muscle SOL de rats et a permis d'identifier des gènes spécifiquement exprimés dans ces cellules et non dans les cellules de Schwann myélinisantes ni les fibres musculaires (Oda et al., 2003). Un gène encodant une protéine résidente du RE sensible à l'homocystéine (de l'anglais, *homocystein-responsive ER-resident protein*, Herp) a été identifié. L'utilisation du promoteur de ce gène spécifique serait donc un outil intéressant pour préciser le rôle des CSPs dans la maladie ainsi que celui de diverses protéines et voies de signalisation. Cependant, à savoir si l'expression de ce gène est stable selon l'âge et l'état d'innervation chez la souris reste à être validé.

La deuxième étude a identifié une ubiquitine ligase E3 (LNX1) pouvant catalyser l'attachement final de l'ubiquitine à des protéines destinées à être dégradées (Young et al., 2005). Des marquages immunohistochimiques ont confirmé la présence de LNX1 spécifiquement dans les CSPs. Toutefois, l'expression de cette protéine varie selon le stade de développement et l'état d'innervation de la JNM (Young et al., 2005). De plus, LNX1 a comme partenaire de liaison un récepteur pour la NRG, ErbB2 (introduit en section 3.3.1.1). La voie de signalisation de la NRG est reconnue pour influencer le comportement glial durant la réinnervation de la JNM et pour moduler l'expression de certains sous-types de mAChRs (Ford et al., 2003). En effet, l'expression de la NRG est normalement augmentée dans les CSPs suite à une dégénérescence des terminaisons axonales (Carroll et al., 1997). De plus, l'application de NRG-1 ou l'induction de l'expression du récepteur ErbB2 constitutivement actif dans les SCs induisent des changements morphologiques gliaux similaires à ceux observés lors de dénervation partielle (extension des prolongements, guidage du bourgeonnement de la terminaison axonale) (Hayworth et al., 2006; Trachtenberg and Thompson, 1996). D'ailleurs, une interprétation du rôle tangible de cette voie de signalisation dans la SLA a été discutée dans la section 7.4.1.5 de cette thèse. Il serait donc intéressant de

poursuivre les recherches sur ces potentiels marqueurs spécifiques des CSPs et de valider leur régulation dans la SLA.

7.5.2 CSP, un élément glial pouvant influencer le développement et la progression de la maladie

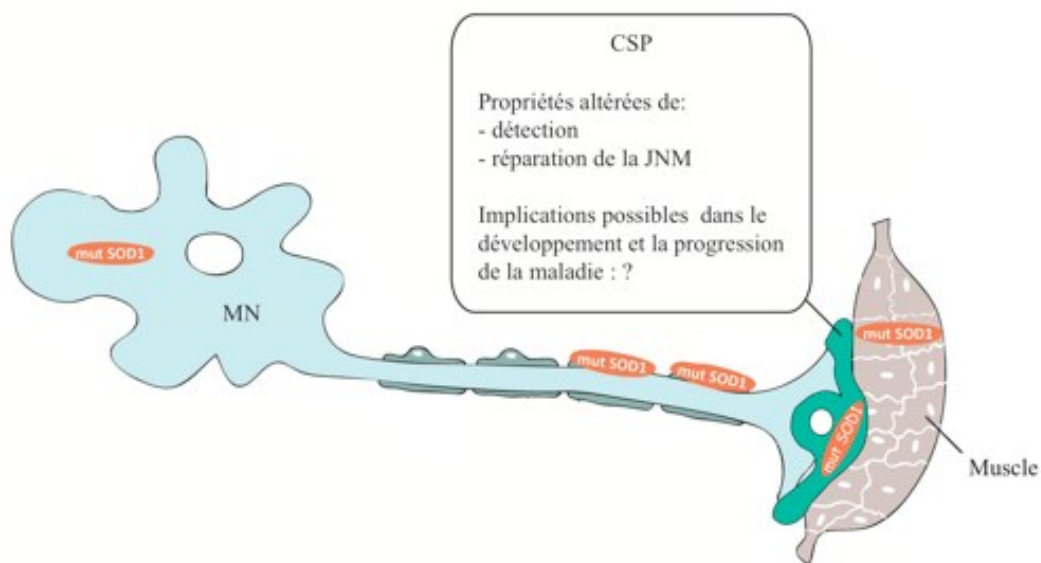
En vertu de ce qui a été présenté dans les autres sections de cette discussion, il apparaît que les CSPs pourraient influencer le développement et la progression de la maladie. En effet, certaines altérations gliales sont non seulement observées avant l'apparition des symptômes, mais sont également un élément prédictif de la dénervation future. Parmi ces altérations, notons la sensibilité des mAChRs qui est augmentée à mesure que la maladie progresse et devient spécifique pour les JNMs de type FR (Premier article de recherche, Figure 5.10), celles qui seront dénervées en premier dans le SOL (Pun et al., 2006). Un autre exemple serait la diminution du nombre des CSPs ainsi que le mauvais emplacement des corps cellulaires des CSPs observés uniquement aux JNMs qui seront dénervées dans un avenir éminent (Carrasco et al., 2016c). Puisque l'ablation des CSPs à la JNM adulte de grenouille a provoqué la dénervation de la JNM, cette diminution du nombre de CSPs pourrait sévèrement compromettre la stabilité de la JNM (Reddy et al., 2003). Ces deux exemples, combinés avec d'autres altérations potentielles des CSPs, dont notamment, mais non exclusivement, une incapacité à moduler convenablement la transmission synaptique, et la libération de substances faisant la promotion de la stabilité morphologique, sont des arguments en faveur de l'implication possible des CSPs dans la survie des MNs et le développement de la maladie (Tableau 7.1 et Figure 7.10).

La progression de la maladie pourrait également être influencée par les CSPs. En effet, l'évaluation de la sensibilité des récepteurs gliaux aux JNMs dénervées a confirmé que les CSPs n'étaient pas capables d'ajuster adéquatement la balance relative de ces récepteurs (mAChRs/P2Rs). De plus, le maintien de cette hyper-activation des mAChRs peut significativement réduire les mécanismes de réparation à la JNM de souris SOD1. Cette inaptitude des CSPs à arborer le phénotype glial approprié face à de la dénervation peut également s'illustrer par une expression génique altérée (Liu et al., 2013), des CSPs en

apoptose (Carrasco et al., 2016a), une libération de substance répulsive (De Winter et al., 2006) ou l'expression d'un récepteur ayant des impacts limitants sur les processus de réinnervation (Stark et al., 2015). Sans oublier une réduction de leur viabilité lorsque la JNM est dénervée (Tableau 7.1 et Figure 7.9) (Carrasco et al., 2016a). Par conséquent, ceci pourrait exacerber le taux de dénervation des JNMs, limiter les processus de compensation et de réparation de la JNM, augmenter l'intervalle de temps séparant la dénervation de la réinnervation, favoriser une accélération de la perte des MNs, de la fonction motrice et, ainsi, favoriser la progression de la SLA. D'ailleurs, une étude ayant utilisé une approche virale a démontré qu'une diminution de l'expression du gène *SOD1* muté dans les astrocytes a induit une préservation des JNMs et a significativement prolongé la survie des souris *SOD1*^{G93A} (Dirren et al., 2015). Toutefois, il est important de mentionner ici que les auteurs ont employé le promoteur du gène *GFAP* dont la transcription est normalement augmentée dans les CSPs lors de la dénervation (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994) dans un modèle murin de SLA (Keller et al., 2009). Même si aucune validation de l'expression de leur molécule fluorescente rapportrice n'a été faite à la JNM, il est possible de penser que l'effet observé dans cette dernière étude soit également dû à la réduction de l'expression du gène *SOD1* muté dans les CSPs.

En résumé, bien que les mécanismes par lesquels contribuent les CSPs ne soient pas encore tout à fait clairs, la contribution de ces cellules dans le SNP pourrait s'étendre au-delà d'un impact sur les mécanismes de réparation de la JNM et aller jusqu'à influencer le développement et la progression de la maladie, au même titre que la plupart des cellules gliales du SNC (Figure 7.10).

Figure 7.10 Actualisation de la contribution potentielle des CSPs à la JNM dans la maladie de la SLA



Actualisation du modèle de la contribution potentielle des CSPs dans la maladie de la SLA présentée en figure 2.1 de l'introduction. Avant les travaux issus de cette thèse, les altérations fonctionnelles des CSPs étaient inconnues. Nos résultats démontrent des altérations majeures des CSPs dans leur capacité de détection de la communication synaptique et de réparation de la JNM. Ces deux altérations pourraient influencer le développement et la progression de la maladie.

La figure 7.10 a été modifiée de (Ilieva et al., 2009).

7.5.3 Actualisation de la contribution gliale dans le SNC dans la SLA

Selon son état, la CSP ressemble énormément aux astrocytes ou aux cellules microgliales du SNC. En effet, au même titre que les CSPs, les astrocytes peuvent détecter l'activité synaptique et la moduler (Araque et al., 1999; Halassa et al., 2007; Henneberger et

al., 2010; Panatier and Robitaille, 2012; Panatier et al., 2011; Perea and Araque, 2005). Plus précisément, dans des conditions normales, un astrocyte de l'hippocampe est capable de non seulement discriminer l'activité de différentes synapses, appartenant à différentes voies axonales, mais également de générer différentes élévations calciques selon la fréquence de stimulation (Perea and Araque, 2005). Toutefois, aucune étude similaire n'a encore été conduite dans un contexte de SLA. Sachant que la gestion du Ca^{2+} et la libération de GlioTs sont altérées chez les astrocytes exprimant la SOD1^{G93A} (Kawamata et al., 2014), il serait donc raisonnable de prédire que leur capacité de détection soit anormale. Suivant la même logique que celle appliquée aux CSPs, une mauvaise détection pourrait être le point de départ d'une mauvaise modulation de la transmission synaptique, une uniformisation des événements de plasticité synaptique, une mauvaise stabilité synaptique, une mauvaise régulation génique ainsi qu'une augmentation de la relâche de cytokines.

Tout comme les CSPs, les cellules microgliales ont des capacités de phagocytose. Puisque des résultats non publiés de notre laboratoire suggèrent que la capacité de phagocytose des CSPs est altérée dans la SLA, et ce, autant aux synapses innervées que dénervées (Martineau and Robitaille, 2017), il serait donc possible de croire que la capacité de phagocytose des cellules microgliales soit aussi altérée. D'ailleurs, différentes mutations dans des gènes en lien avec la phagocytose ont été identifiées dans la SLA et la FTD (telles que TREM₂, profiline 1 et progranuline) (Radford et al., 2015). L'autophagie, une étape en aval de la phagocytose, pourrait également être altérée dans les cellules microgliales. Mises ensemble, ces propositions suggèrent que l'on pourrait exporter des concepts du SNP au SNC, et vice-versa, afin d'orienter les futures avenues de recherche dans la SLA.

7.6 Implications des résultats de cette thèse pour la recherche fondamentale et clinique

Dans cette dernière section, les perspectives de recherche fondamentale et clinique seront abordées en se concentrant particulièrement sur les CSPs dans différents contextes,

allant de la JNM dans la SLA, dans le vieillissement normal, et, pour finir, dans d'autres maladies neuromusculaires.

7.6.1 Implications pour la recherche fondamentale sur les CSPs à la JNM de souris SLA

Puisque des résultats de notre laboratoire suggèrent que des altérations muscariniques des CSPs sont également observées dans des muscles ayant des UMs de type rapides (FF) (Martineau and Robitaille, 2017), les futures recherches pourraient être abordées d'une façon plus systémique. Par exemple, la modulation de l'activation des mAChRs des CSPs pourrait se faire via l'utilisation d'une approche virale provoquant une diminution soit de l'affinité des récepteurs pour leur ligand ou de la disponibilité des protéines G sous-jacentes à l'activation du récepteur. À titre d'exemple, notons la possibilité de surexprimer la troisième boucle intracellulaire du mAChR. Ceci aurait comme effet de créer un peptide dominant négatif; ce peptide, combiné avec l'expression des mAChRs, aurait la capacité d'agir à titre d'antagoniste compétitif en interagissant avec les protéines G et, ainsi, de réduire leurs interactions avec les récepteurs endogènes (Boroto-Escuela et al., 2010). Cette approche systémique nous permettrait de pouvoir évaluer à plus long terme les effets d'une augmentation de la capacité de réparation des CSPs.

Cette diminution d'activation systémique des mAChRs pourrait comporter de nombreux avantages. Par exemple, notons celui de pouvoir étudier différents moments où cette diminution d'activation pourrait être critique (avant vs après l'apparition des symptômes). De plus, l'effet de différentes durées de traitement ainsi que le dosage de cette diminution d'activation pourraient être plus facilement étudiés. Une méthode systémique pourrait également nous donner l'opportunité de tester les performances motrices globales (rotarod) ainsi que musculaires et neuromusculaires (transducteur de force musculaire). Sans oublier de mentionner que l'évaluation du nombre d'axones et de MNs pourrait se faire en parallèle avec celle du développement et de la progression de la maladie puisqu'une diminution de la mort neuronale aurait un impact majeur sur la survie de l'animal.

Pour finir, la démonstration de l'existence de ces mêmes altérations gliales à la JNM dans d'autres modèles de SLA (par exemple TDP-43, FUS et C9orf72) devrait également se faire afin de mettre en évidence l'importance et la grande implication de ces mécanismes. Une fois cette démonstration faite, il serait envisageable de procéder à des traitements combinés afin de cibler les altérations du SNC et SNP.

7.6.2 Implications pour la recherche clinique pour les patients atteints de SLA

Pour les personnes atteintes de SLA, une augmentation des signes de réparation de la JNM par les CSPs pourrait être synonyme d'une conservation prolongée de leurs JNMs et, par conséquent, une meilleure préservation de leur capacité motrice. Inévitablement, la préservation de l'autonomie motrice pourrait avoir des répercussions importantes sur la qualité de vie des patients. Cette qualité de vie pourrait également se traduire par des impacts importants sur la santé psychologique du patient. En effet, la plupart des patients atteints de SLA souffrent de dépression et cette dernière a des effets néfastes sur la survie de l'individu (Thakore and Piro, 2016). Ainsi, conserver de meilleures fonctions motrices pourrait favoriser un meilleur taux de survie des patients atteints de SLA. Un autre argument en faveur de la survie de l'individu serait le fait que les capacités respiratoires des patients pourraient être également préservées plus longtemps. Puisque le diaphragme a le même type d'UMs que le SOL (Gregorevic et al., 2008; Zardini and Parry, 1994), on pourrait également anticiper qu'une augmentation de l'activation des mAChRs est aussi présente dans ce muscle et qu'une diminution de cette activation pourrait prévenir la dénervation de ce dernier.

7.6.3 Implications pour la recherche portant sur le vieillissement normal

La dénervation à la JNM est considérée comme étant un facteur important contribuant à la perte de la masse et de la fonction musculaire dans le vieillissement (Park, 2015; Valdez et al., 2012). La compréhension des mécanismes modulant la réinnervation de la JNM est également un élément clé pour le développement de thérapies pour lutter contre la faiblesse

musculaire liée à l'âge. Parmi les déficits observés à des JNMs de rats âgés lors de la réinnervation, plusieurs sont en lien avec les CSPs : 1) la dimension des sites occupés par les CSPs est diminuée, 2) le chevauchement spatial (ou le degré d'apposition) entre les CSPs et les nAChRs est réduit, 3) une diminution du nombre de CSPs arborant une extension de leurs prolongements et de bourgeonnement de la terminaison axonale a été observée et 4) la présence persistante de prolongements gliaux associés avec une terminaison axonale (*sprouting*) et de JNMs poly-innervées ont été également rapportées (Kawabuchi et al., 2001). En parallèle avec ces observations, il est important de mentionner ici que des altérations muscariniques gliales ont également été observées à la JNM de souris âgées (Krief, 2016). Il serait donc intéressant de procéder à une modulation de l'activation muscarinique des CSPs dans un contexte de vieillissement non-pathologique. Il serait peut-être également pertinent de faire l'évaluation de ces mécanismes dans un modèle de vieillissement prolongé comme le rat Lou/c (Alliot et al., 2002).

7.6.4 Implications pour la recherche portant sur d'autres maladies neuromusculaires

La compréhension des mécanismes favorisant la préservation et la capacité de réinnervation de la JNM est essentielle mais représente un défi pour la recherche portant sur les maladies neuromusculaires. Les données de cette thèse pourraient peut-être être pertinentes pour la compréhension d'autres maladies comme la Dystrophie musculaire de Duchenne. Cette maladie est caractérisée par des déficits de la dystrophine qui permet aux muscles de résister à l'effort; sans elle, les fibres musculaires dégénèrent. De plus, plusieurs autres protéines sont associées à la dystrophine et forment un complexe liant les filaments fins d'actine avec la matrice extracellulaire, dont la laminine (Li and Arner, 2015). La perte de ce complexe, causée par des déficits de la dystrophine, peut donc avoir de sévères conséquences sur la stabilité de la JNM. En effet, dans un modèle murin de la maladie, il a été rapporté que les JNMs subissaient également une dénervation et que les CSPs n'étaient pas parfaitement apposées avec les autres éléments synaptiques (Personius and Sawyer, 2005). Également, les CSPs élaboraient des prolongements, mais l'organisation de ceux-ci était anormale. Plus

précisément, les prolongements étaient incapables de naviguer en direction des JNMs innervées (formation de pont glial) et étaient plutôt orientés dans la direction opposée (Personius and Sawyer, 2005), suggérant que les mécanismes en lien avec la navigation et la détection des CSPs soient également altérés dans cette maladie.

La destruction de la JNM est également une caractéristique précoce d'une autre maladie neuromusculaire, celle de l'amyotrophie spinale (de l'anglais, *spinal muscular atrophy*). Cette maladie est due à une mutation du gène SMN responsable de la survie du MN (de l'anglais, *survival motor neuron*). Dans un modèle de souris de cette maladie, il a été démontré qu'il y avait également une diminution des mécanismes de compensation et de réinnervation des JNMs. Plus particulièrement, il y avait une diminution du nombre de prolongements gliaux associés avec des terminaisons axonales (*sprouting*) ainsi que du nombre de CSPs (Murray et al., 2013). De plus, l'ablation génétique de CNTF dans ce modèle de souris a diminué les signes de réinnervation et accentué les déficits moteurs (Simon et al., 2010). Ces résultats suggèrent que de favoriser les mécanismes de compensation et de réparation via l'étude des propriétés gliales pourrait être bénéfique pour la préservation des JNMs dans ces deux autres types de maladies neuromusculaires.

Conclusion

Les travaux de cette thèse présentent, pour la première fois, des altérations majeures dans les propriétés des cellules gliales à la JNM de souris SOD1. Nos données supportent l'hypothèse selon laquelle une augmentation de l'activation des mAChRS des CSPs empêcherait de convenablement détecter l'état d'innervation de la JNM et de procéder à sa réparation. Cette mauvaise capacité de détection pourrait être en amont d'une cascade d'évènements pouvant grandement contribuer au développement et à la progression de la maladie.

Ces travaux auront permis d'approfondir les connaissances sur les CSPs et de valider le modèle voulant que les mAChRs des CSPs soient la plaque tournante des fonctions de détection et de réparation de la JNM. De plus, ces travaux offrent non seulement une meilleure compréhension de la JNM dans la SLA mais proposent également une nouvelle perspective globale d'évaluation de la JNM, en tenant compte des trois éléments synaptiques. D'une manière plus importante, ces travaux mettent sous les projecteurs un type cellulaire jusqu'ici ignoré et justifient la poursuite des recherches sur cette cellule fondamentale pour le destin de la JNM. La découverte de ces altérations gliales pourrait notamment permettre d'élaborer de nouveaux traitements thérapeutiques afin de promouvoir les mécanismes de réparation et de compensation dans la SLA. Le développement de traitements thérapeutiques visant les propriétés des CSPs pourrait être bénéfique pour la qualité de vie ainsi que la survie des patients atteints de SLA ou d'autres maladies neuromusculaires.

Bibliographie

- Ahn, J.S., Lee, T.H., and Lee, M.C. (1998). Ultrastructure of neuromuscular junction in vacor-induced diabetic rats. *Korean J Intern Med* 13, 47-50.
- Akaaboune, M., Culican, S.M., Turney, S.G., and Lichtman, J.W. (1999). Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *Science* 286, 503-507.
- Al-Chalabi, A., and Hardiman, O. (2013). The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* 9, 617-628.
- Alami, N.H., Smith, R.B., Carrasco, M.A., Williams, L.A., Winborn, C.S., Han, S.S., Kiskinis, E., Winborn, B., Freibaum, B.D., Kanagaraj, A., *et al.* (2014). Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* 81, 536-543.
- Alexianu, M.E., Ho, B.K., Mohamed, A.H., La Bella, V., Smith, R.G., and Appel, S.H. (1994). The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 36, 846-858.
- Alliot, J., Boghossian, S., Jourdan, D., Veyrat-Durebex, C., Pickering, G., Meynial-Denis, D., and Gaumet, N. (2002). The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, B312-320.
- Almad, A.A., Doreswamy, A., Gross, S.K., Richard, J.P., Huo, Y., Haughey, N., and Maragakis, N.J. (2016). Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 64, 1154-1169.
- Alnaes, E., and Rahamimoff, R. (1975). On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. *J Physiol* 248, 285-306.
- Alvarez, S., Calin, A., Graffmo, K.S., Moldovan, M., and Krarup, C. (2013). Peripheral motor axons of SOD1(G127X) mutant mice are susceptible to activity-dependent degeneration. *Neuroscience* 241, 239-249.
- Andreadou, E., Kapaki, E., Kokotis, P., Paraskevas, G.P., Katsaros, N., Libitaki, G., Petropoulou, O., Zis, V., Sfagos, C., and Vassilopoulos, D. (2008). Plasma glutamate and glycine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *In Vivo* 22, 137-141.
- Annunziata, P., and Volpi, N. (1985). High levels of C3c in the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 72, 61-64.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728-739.

- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22, 208-215.
- Arbour, D., Tremblay, E., Martineau, E., Julien, J.P., and Robitaille, R. (2015). Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model. *J Neurosci* 35, 688-706.
- Armstrong, G.A., and Drapeau, P. (2013a). Calcium channel agonists protect against neuromuscular dysfunction in a genetic model of TDP-43 mutation in ALS. *J Neurosci* 33, 1741-1752.
- Armstrong, G.A., and Drapeau, P. (2013b). Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS. *Hum Mol Genet* 22, 4282-4292.
- Atkin, J.D., Scott, R.L., West, J.M., Lopes, E., Quah, A.K., and Cheema, S.S. (2005). Properties of slow- and fast-twitch muscle fibres in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord* 15, 377-388.
- Audet, J.N., Gowing, G., and Julien, J.P. (2010). Wild-type human SOD1 overexpression does not accelerate motor neuron disease in mice expressing murine Sod1 G86R. *Neurobiol Dis* 40, 245-250.
- Aulas, A., and 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.
- Aydin, M.A., Mackinnon, S.E., Gu, X.M., Kobayashi, J., and Kuzon, W.M., Jr. (2004). Force deficits in skeletal muscle after delayed reinnervation. *Plast Reconstr Surg* 113, 1712-1718.
- Ayers, J.I., Fromholt, S., Koch, M., DeBosier, A., McMahon, B., Xu, G., and Borchelt, D.R. (2014). Experimental transmissibility of mutant SOD1 motor neuron disease. *Acta Neuropathol* 128, 791-803.
- Ayers, J.I., Fromholt, S.E., O'Neal, V.M., Diamond, J.H., and Borchelt, D.R. (2015). Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta Neuropathol* 131, 103-114.
- Bandyopadhyay, U., Cotney, J., Nagy, M., Oh, S., Leng, J., Mahajan, M., Mane, S., Fenton, W.A., Noonan, J.P., and Horwich, A.L. (2013). RNA-Seq profiling of spinal cord motor neurons from a presymptomatic SOD1 ALS mouse. *PLoS One* 8, e53575.
- Banker, B.Q., Kelly, S.S., and Robbins, N. (1983). Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J Physiol* 339, 355-377.

Beers, D.R., Henkel, J.S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A.A., Siklos, L., McKercher, S.R., and Appel, S.H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 16021-16026.

Beers, D.R., Henkel, J.S., Zhao, W., Wang, J., and Appel, S.H. (2008). CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 15558-15563.

Beers, D.R., Ho, B.K., Siklos, L., Alexianu, M.E., Mosier, D.R., Mohamed, A.H., Otsuka, Y., Kozovska, M.E., McAlhany, R.E., Smith, R.G., *et al.* (2001). Parvalbumin overexpression alters immune-mediated increases in intracellular calcium, and delays disease onset in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* *79*, 499-509.

Belair, E.L., Vallee, J., and Robitaille, R. (2010). In vivo long-term synaptic plasticity of glial cells. *J Physiol* *588*, 1039-1056.

Bendotti, C., and Carri, M.T. (2004). Lessons from models of SOD1-linked familial ALS. *Trends Mol Med* *10*, 393-400.

Bergmann, M., Volpel, M., and Kuchelmeister, K. (1995). Onuf's nucleus is frequently involved in motor neuron disease/amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* *129*, 141-146.

Bernardinelli, Y., Randall, J., Janett, E., Nikonenko, I., Konig, S., Jones, E.V., Flores, C.E., Murai, K.K., Bochet, C.G., Holtmaat, A., *et al.* (2014). Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. *Curr Biol* *24*, 1679-1688.

Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* *312*, 1389-1392.

Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.S., Guarnieri, M., Xu, Z.S., Wong, P.C., Brown, R.H., Jr., Price, D.L., Sisodia, S.S., and Cleveland, D.W. (1994). Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8292-8296.

Borroto-Escuela, D.O., Correia, P.A., Perez Alea, M., Narvaez, M., Garriga, P., Fuxe, K., and Ciruela, F. (2010). Impaired M(3) muscarinic acetylcholine receptor signal transduction through blockade of binding of multiple proteins to its third intracellular loop. *Cell Physiol Biochem* *25*, 397-408.

Bosco, D.A., Morfini, G., Karabacak, N.M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B.A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., *et al.* (2010). Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci* *13*, 1396-1403.

- Bourque, M.J., and Robitaille, R. (1998). Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 512 (Pt 1), 197-209.
- Brill, M.S., Lichtman, J.W., Thompson, W., Zuo, Y., and Misgeld, T. (2011). Spatial constraints dictate glial territories at murine neuromuscular junctions. *J Cell Biol* 195, 293-305.
- Brotherton, T.E., Li, Y., and Glass, J.D. (2013). Cellular toxicity of mutant SOD1 protein is linked to an easily soluble, non-aggregated form in vitro. *Neurobiol Dis* 49, 49-56.
- Brujin, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., *et al.* (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18, 327-338.
- Brujin, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., and Cleveland, D.W. (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281, 1851-1854.
- Brujin, L.I., Miller, T.M., and Cleveland, D.W. (2004). Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27, 723-749.
- Buffelli, M., Burgess, R.W., Feng, G., Lobe, C.G., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2003). Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature* 424, 430-434.
- Burke, R.E., Levine, D.N., Tsairis, P., and Zajac, F.E., 3rd (1973). Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234, 723-748.
- Carrasco, D.I., Bahr, B.A., Seburn, K.L., and Pinter, M.J. (2016a). Abnormal response of distal Schwann cells to denervation in a mouse model of motor neuron disease. *Exp Neurol* 278, 116-126.
- Carrasco, D.I., Bahr, B.A., Seburn, K.L., and Pinter, M.J. (2016b). Abnormal response of distal Schwann cells to denervation in a mouse model of motor neuron disease. *Exp Neurol*.
- Carrasco, D.I., Rich, M.M., Wang, Q., Cope, T.C., and Pinter, M.J. (2004). Activity-driven synaptic and axonal degeneration in canine motor neuron disease. *J Neurophysiol* 92, 1175-1181.
- Carrasco, D.I., Seburn, K.L., and Pinter, M.J. (2016c). Altered terminal Schwann cell morphology precedes denervation in SOD1 mice. *Exp Neurol* 275 Pt 1, 172-181.
- Carri, M.T., Ferri, A., Battistoni, A., Famhy, L., Gabbianelli, R., Poccia, F., and Rotilio, G. (1997). Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral

sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 414, 365-368.

Carriedo, S.G., Yin, H.Z., and Weiss, J.H. (1996). Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci* 16, 4069-4079.

Carroll, S.L., Miller, M.L., Frohnert, P.W., Kim, S.S., and Corbett, J.A. (1997). Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 17, 1642-1659.

Carunchio, I., Mollinari, C., Pieri, M., Merlo, D., and Zona, C. (2008). GAB(A) receptors present higher affinity and modified subunit composition in spinal motor neurons from a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 28, 1275-1285.

Casas, C., Herrando-Grabulosa, M., Manzano, R., Mancuso, R., Osta, R., and Navarro, X. (2013). Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav* 3, 145-158.

Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A.M., Appeltauer, U., Takei, K., Kindler, S., Veh, R.W., De Camilli, P., Gundelfinger, E.D., and Garner, C.C. (1996). Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur J Cell Biol* 69, 214-223.

Castonguay, A., and Robitaille, R. (2001). Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21, 1911-1922.

Chang, Q., and Martin, L.J. (2011). Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 31, 2815-2827.

Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., Tian, G., Ilieva, H., Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Wong, P.C., and Lin, C.L. (2008). Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS One* 3, e2849.

Chen, J., Billings, S.E., and Nishimune, H. (2011). Calcium channels link the muscle-derived synapse organizer laminin beta2 to Bassoon and CAST/Erc2 to organize presynaptic active zones. *J Neurosci* 31, 512-525.

Chever, O., Djukic, B., McCarthy, K.D., and Amzica, F. (2010). Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J Neurosci* 30, 15769-15777.

Chew, J., Gendron, T.F., Prudencio, M., Sasaguri, H., Zhang, Y.J., Castanedes-Casey, M., Lee, C.W., Jansen-West, K., Kurti, A., Murray, M.E., *et al.* (2015). Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science* 348, 1151-1154.

Chipman, P.H., Schachner, M., and Rafuse, V.F. (2014). Presynaptic NCAM is required for motor neurons to functionally expand their peripheral field of innervation in partially denervated muscles. *J Neurosci* 34, 10497-10510.

Chiu, I.M., Chen, A., Zheng, Y., Kosaras, B., Tsiftoglou, S.A., Vartanian, T.K., Brown, R.H., Jr., and Carroll, M.C. (2008). T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17913-17918.

Chiu, I.M., Morimoto, E.T., Goodarzi, H., Liao, J.T., O'Keeffe, S., Phatnani, H.P., Muratet, M., Carroll, M.C., Levy, S., Tavazoie, S., *et al.* (2013). A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep* 4, 385-401.

Chow, I., and Poo, M.M. (1985). Release of acetylcholine from embryonic neurons upon contact with muscle cell. *J Neurosci* 5, 1076-1082.

Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boillee, S., Rule, M., McMahon, A.P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R.J., *et al.* (2003). Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302, 113-117.

Cleveland, D.W., and Rothstein, J.D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2, 806-819.

Collins, Y., Chouchani, E.T., James, A.M., Menger, K.E., Cocheme, H.M., and Murphy, M.P. (2012). Mitochondrial redox signalling at a glance. *J Cell Sci* 125, 801-806.

Colomar, A., and Robitaille, R. (2004). Glial modulation of synaptic transmission at the neuromuscular junction. *Glia* 47, 284-289.

Comley, L., Allodi, I., Nichterwitz, S., Nizzardo, M., Simone, C., Corti, S., and Hedlund, E. (2015). Motor neurons with differential vulnerability to degeneration show distinct protein signatures in health and ALS. *Neuroscience* 291, 216-229.

Cooper, G.M. (1999). *La cellule. Une approche moléculaire.* DeBoeck Université *Paris, Bruxelles*, Traduction de la 1re édition américaine.

Correia-de-Sa, P., Timoteo, M.A., and Ribeiro, J.A. (1996). Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J Neurophysiol* 76, 3910-3919.

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

Coussee, E., De Smet, P., Bogaert, E., Elens, I., Van Damme, P., Willems, P., Koopman, W., Van Den Bosch, L., and Callewaert, G. (2011). G37R SOD1 mutant alters mitochondrial complex I activity, Ca²⁺ uptake and ATP production. *Cell Calcium* 49, 217-225.

Crews, L.L., and Wigston, D.J. (1990). The dependence of motoneurons on their target muscle during postnatal development of the mouse. *J Neurosci* 10, 1643-1653.

Dadon-Nachum, M., Melamed, E., and Offen, D. (2011). The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci* 43, 470-477.

Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M., and Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem* 96, 1349-1361.

Damiano, S., Petrozziello, T., Ucci, V., Amente, S., Santillo, M., and Mondola, P. (2013). Cu-Zn superoxide dismutase activates muscarinic acetylcholine M1 receptor pathway in neuroblastoma cells. *Mol Cell Neurosci* 52, 31-37.

Darabid, H., and Robitaille, R. (2016). Glial cells regulate synaptic plasticity to influence synapse competition at the mammalian neuromuscular junction maturation. En préparation.

Darabid, H., Arbour, D., and Robitaille, R. (2013). Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 33, 1297-1313.

Darabid, H., Perez-Gonzalez, A.P., and Robitaille, R. (2014). Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nat Rev Neurosci* 15, 703-718.

Das, M.M., and Svendsen, C.N. (2015). Astrocytes show reduced support of motor neurons with aging that is accelerated in a rodent model of ALS. *Neurobiol Aging* 36, 1130-1139.

David, G., and Barrett, E.F. (2003). Mitochondrial Ca²⁺ uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol* 548, 425-438.

de Carvalho, M., Eisen, A., Krieger, C., and Swash, M. (2014). Motoneuron firing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Front Hum Neurosci* 8, 719.

De Koninck, Y. (2007). Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Curr Opin Pharmacol* 7, 93-99.

De Winter, F., Vo, T., Stam, F.J., Wisman, L.A., Bar, P.R., Niclou, S.P., van Muiswinkel, F.L., and Verhaagen, J. (2006). The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci* 32, 102-117.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., *et al.* (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245-256.

Del Castillo, J., and Katz, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124, 560-573.

Dengler, R., Konstanzer, A., Kuther, G., Hesse, S., Wolf, W., and Struppler, A. (1990). Amyotrophic lateral sclerosis: macro-EMG and twitch forces of single motor units. *Muscle Nerve* 13, 545-550.

Dennis, M.J., and Miledi, R. (1974). Electrically induced release of acetylcholine from denervated Schwann cells. *J Physiol* 237, 431-452.

Descarries, L.M., Cai, S., Robitaille, R., Josephson, E.M., and Morest, D.K. (1998). Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J Neurocytol* 27, 829-840.

Dewil, M., dela Cruz, V.F., Van Den Bosch, L., and Robberecht, W. (2007). Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase activation and mutant SOD1(G93A)-induced motor neuron death. *Neurobiol Dis* 26, 332-341.

Di Castro, M.A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P., and Volterra, A. (2011). Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat Neurosci* 14, 1276-1284.

Di Giorgio, F.P., Carrasco, M.A., Siao, M.C., Maniatis, T., and Eggan, K. (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10, 608-614.

Diaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragnolini, A., Martinez-Palma, L., Cassina, P., Beckman, J., and Barbeito, L. (2011). Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 18126-18131.

Dirren, E., Aebischer, J., Rochat, C., Towne, C., Schneider, B.L., and Aebischer, P. (2015). SOD1 silencing in motoneurons or glia rescues neuromuscular function in ALS mice. *Ann Clin Transl Neurol* 2, 167-184.

Doble, A. (1996). The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 47, S233-241.

Duregotti, E., Negro, S., Scorzeto, M., Zornetta, I., Dickinson, B.C., Chang, C.J., Montecucco, C., and Rigoni, M. (2015). Mitochondrial alarmins released by degenerating motor axon terminals activate perisynaptic Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E497-505.

- Edens, B.M., Miller, N., and Ma, Y.C. (2016). Impaired Autophagy and Defective Mitochondrial Function: Converging Paths on the Road to Motor Neuron Degeneration. *Front Cell Neurosci* 10, 44.
- Eisen, A., Kiernan, M., Mitsumoto, H., and Swash, M. (2014). Amyotrophic lateral sclerosis: a long preclinical period? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85, 1232-1238.
- Ellerton, E.L., Thompson, W.J., and Rimer, M. (2008). Induction of zinc-finger proliferation 1 expression in non-myelinating Schwann cells after denervation. *Neuroscience* 153, 975-985.
- Elliott, J.L., and Snider, W.D. (1995). Parvalbumin is a marker of ALS-resistant motor neurons. *Neuroreport* 6, 449-452.
- Ezzi, S.A., Urushitani, M., and Julien, J.P. (2007). Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J Neurochem* 102, 170-178.
- Farg, M.A., Soo, K.Y., Walker, A.K., Pham, H., Orian, J., Horne, M.K., Warraich, S.T., Williams, K.L., Blair, I.P., and Atkin, J.D. (2012). Mutant FUS induces endoplasmic reticulum stress in amyotrophic lateral sclerosis and interacts with protein disulfide-isomerase. *Neurobiol Aging* 33, 2855-2868.
- Fatt, P., and Katz, B. (1951). An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol* 115, 320-370.
- Fatt, P., and Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117, 109-128.
- Favero, M., Busetto, G., and Cangiano, A. (2012). Spike timing plays a key role in synapse elimination at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1667-1675.
- Feiler, M.S., Strobel, B., Freischmidt, A., Helferich, A.M., Kappel, J., Brewer, B.M., Li, D., Thal, D.R., Walther, P., Ludolph, A.C., *et al.* (2015). TDP-43 is intercellularly transmitted across axon terminals. *J Cell Biol* 211, 897-911.
- Felice, K.J. (1997). A longitudinal study comparing thenar motor unit number estimates to other quantitative tests in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 20, 179-185.
- Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41-51.
- Feng, Z., and Ko, C.P. (2008). The role of glial cells in the formation and maintenance of the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* 1132, 19-28.

- Ferrante, R.J., Browne, S.E., Shinobu, L.A., Bowling, A.C., Baik, M.J., MacGarvey, U., Kowall, N.W., Brown, R.H., Jr., and Beal, M.F. (1997a). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* *69*, 2064-2074.
- Ferrante, R.J., Shinobu, L.A., Schulz, J.B., Matthews, R.T., Thomas, C.E., Kowall, N.W., Gurney, M.E., and Beal, M.F. (1997b). Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Ann Neurol* *42*, 326-334.
- Ferri, A., Cozzolino, M., Crosio, C., Nencini, M., Casciati, A., Gralla, E.B., Rotilio, G., Valentine, J.S., and Carri, M.T. (2006). Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 13860-13865.
- Ferrucci, M., Spalloni, A., Bartalucci, A., Cantafora, E., Fulceri, F., Nutini, M., Longone, P., Paparelli, A., and Fornai, F. (2010). A systematic study of brainstem motor nuclei in a mouse model of ALS, the effects of lithium. *Neurobiol Dis* *37*, 370-383.
- Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., and Glass, J.D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* *185*, 232-240.
- Foerster, B.R., Callaghan, B.C., Petrou, M., Edden, R.A., Chenevert, T.L., and Feldman, E.L. (2012). Decreased motor cortex gamma-aminobutyric acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* *78*, 1596-1600.
- Ford, B.D., Liu, Y., Mann, M.A., Krauss, R., Phillips, K., Gan, L., and Fischbach, G.D. (2003). Neuregulin-1 suppresses muscarinic receptor expression and acetylcholine-activated muscarinic K⁺ channels in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *308*, 23-28.
- Foust, K.D., Salazar, D.L., Likhite, S., Ferraiuolo, L., Ditsworth, D., Ilieva, H., Meyer, K., Schmelzer, L., Braun, L., Cleveland, D.W., *et al.* (2013). Therapeutic AAV9-mediated suppression of mutant SOD1 slows disease progression and extends survival in models of inherited ALS. *Mol Ther* *21*, 2148-2159.
- Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., and Caroni, P. (2000). Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* *20*, 2534-2542.
- Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* *264*, 7761-7764.
- Gaffield, M.A., Rizzoli, S.O., and Betz, W.J. (2006). Mobility of synaptic vesicles in different pools in resting and stimulated frog motor nerve terminals. *Neuron* *51*, 317-325.

Garbuzova-Davis, S., Haller, E., Saporta, S., Kolomey, I., Nicosia, S.V., and Sanberg, P.R. (2007). Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain Res* 1157, 126-137.

Georgiou, J., Robitaille, R., and Charlton, M.P. (1999). Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci* 19, 3836-3846.

Georgiou, J., Robitaille, R., Trimble, W.S., and Charlton, M.P. (1994). Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12, 443-455.

Golby, R., Poirier, B., Fabros, M., Cragg, J.J., Yousefi, M., and Cashman, N. (2016). Five-Year Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in British Columbia (2010-2015). *Can J Neurol Sci* 43, 791-795.

Gomes, C., Keller, S., Altevogt, P., and Costa, J. (2007). Evidence for secretion of Cu,Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 428, 43-46.

Gong, Y.H., Parsadanian, A.S., Andreeva, A., Snider, W.D., and Elliott, J.L. (2000). Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 20, 660-665.

Gordon, T., Hegedus, J., and Tam, S.L. (2004). Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease. *Neurol Res* 26, 174-185.

Gorlewicz, A., Wlodarczyk, J., Wilczek, E., Gawlak, M., Cabaj, A., Majczynski, H., Nestorowicz, K., Herbig, M.A., Grieb, P., Slawinska, U., *et al.* (2009). CD44 is expressed in non-myelinating Schwann cells of the adult rat, and may play a role in neurodegeneration-induced glial plasticity at the neuromuscular junction. *Neurobiol Dis* 34, 245-258.

Gould, T.W., Buss, R.R., Vinsant, S., Prevette, D., Sun, W., Knudson, C.M., Milligan, C.E., and Oppenheim, R.W. (2006). Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26, 8774-8786.

Gowing, G., Philips, T., Van Wijmeersch, B., Audet, J.N., Dewil, M., Van Den Bosch, L., Billiau, A.D., Robberecht, W., and Julien, J.P. (2008). Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *J Neurosci* 28, 10234-10244.

Grad, L.I., Guest, W.C., Yanai, A., Pokrishevsky, E., O'Neill, M.A., Gibbs, E., Semenchenko, V., Yousefi, M., Wishart, D.S., Plotkin, S.S., *et al.* (2011). Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16398-16403.

Grad, L.I., Pokrishevsky, E., Silverman, J.M., and Cashman, N.R. (2014a). Exosome-dependent and independent mechanisms are involved in prion-like transmission of propagated Cu/Zn superoxide dismutase misfolding. *Prion* 8, 331-335.

Grad, L.I., Yerbury, J.J., Turner, B.J., Guest, W.C., Pokrishevsky, E., O'Neill, M.A., Yanai, A., Silverman, J.M., Zeineddine, R., Corcoran, L., *et al.* (2014b). Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 3620-3625.

Graffmo, K.S., Forsberg, K., Bergh, J., Birve, A., Zetterstrom, P., Andersen, P.M., Marklund, S.L., and Brannstrom, T. (2012). Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 22, 51-60.

Gravel, M., Beland, L.C., Soucy, G., Abdelhamid, E., Rahimian, R., Gravel, C., and Kriz, J. (2016). IL-10 Controls Early Microglial Phenotypes and Disease Onset in ALS Caused by Misfolded Superoxide Dismutase 1. *J Neurosci* 36, 1031-1048.

Gregorevic, P., Meznarich, N.A., Blankinship, M.J., Crawford, R.W., and Chamberlain, J.S. (2008). Fluorophore-labeled myosin-specific antibodies simplify muscle-fiber phenotyping. *Muscle Nerve* 37, 104-106.

Griffin, J.W., and Thompson, W.J. (2008). Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 56, 1518-1531.

Guo, H., Lai, L., Butchbach, M.E., Stockinger, M.P., Shan, X., Bishop, G.A., and Lin, C.L. (2003). Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet* 12, 2519-2532.

Gurney, M.E. (1984). Suppression of sprouting at the neuromuscular junction by immune sera. *Nature* 307, 546-548.

Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., *et al.* (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.

Gyorkos, A.M., McCullough, M.J., and Spitsbergen, J.M. (2014). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression and NMJ plasticity in skeletal muscle following endurance exercise. *Neuroscience* 257, 111-118.

Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., *et al.* (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* 29, 824-828.

Halassa, M.M., Fellin, T., and Haydon, P.G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13, 54-63.

- Hardiman, O., van den Berg, L.H., and Kiernan, M.C. (2011). Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 7, 639-649.
- Hart, P.J., Liu, H., Pellegrini, M., Nersissian, A.M., Gralla, E.B., Valentine, J.S., and Eisenberg, D. (1998). Subunit asymmetry in the three-dimensional structure of a human CuZnSOD mutant found in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Protein Sci* 7, 545-555.
- Hassan, S.M., Jennekens, F.G., Veldman, H., and Oestreicher, B.A. (1994). GAP-43 and p75NGFR immunoreactivity in presynaptic cells following neuromuscular blockade by botulinum toxin in rat. *J Neurocytol* 23, 354-363.
- Hayashi, S., Sakurai, A., Amari, M., and Okamoto, K. (2001). Pathological study of the diffuse myelin pallor in the anterolateral columns of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 188, 3-7.
- Hayworth, C.R., Moody, S.E., Chodosh, L.A., Krieg, P., Rimer, M., and Thompson, W.J. (2006). Induction of neuregulin signaling in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation. *J Neurosci* 26, 6873-6884.
- Hegedus, J., Putman, C.T., and 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.
- Hegedus, J., Putman, C.T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 586, 3337-3351.
- Hellstrom, J., Oliveira, A.L., Meister, B., and Cullheim, S. (2003). Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2. *J Comp Neurol* 460, 476-486.
- Henkel, J.S., Beers, D.R., Wen, S., Bowser, R., and Appel, S.H. (2009). Decreased mRNA expression of tight junction proteins in lumbar spinal cords of patients with ALS. *Neurology* 72, 1614-1616.
- Henkel, J.S., Engelhardt, J.I., Siklos, L., Simpson, E.P., Kim, S.H., Pan, T., Goodman, J.C., Siddique, T., Beers, D.R., and Appel, S.H. (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 55, 221-235.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232-236.
- Henneman, E. (1957). Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science* 126, 1345-1347.

Hennig, R., and Lomo, T. (1985). Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* *314*, 164-166.

Hensley, K., Fedynyshyn, J., Ferrell, S., Floyd, R.A., Gordon, B., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q.N., *et al.* (2003). Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* *14*, 74-80.

Hensley, K., Floyd, R.A., Gordon, B., Mou, S., Pye, Q.N., Stewart, C., West, M., and Williamson, K. (2002). Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* *82*, 365-374.

Herrera, A.A., and Grinnell, A.D. (1980). Transmitter release from frog motor nerve terminals depends on motor unit size. *Nature* *287*, 649-651.

Heuser, J.E., and Reese, T.S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* *57*, 315-344.

Higgins, C.M., Jung, C., and Xu, Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* *4*, 16.

Hirano, A., Donnenfeld, H., Sasaki, S., and Nakano, I. (1984a). Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* *43*, 461-470.

Hirano, A., Nakano, I., Kurland, L.T., Mulder, D.W., Holley, P.W., and Saccomanno, G. (1984b). Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* *43*, 471-480.

Hitchler, M.J., and Domann, F.E. (2014). Regulation of CuZnSOD and its redox signaling potential: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* *20*, 1590-1598.

Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., *et al.* (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1604-1609.

Ilieva, H., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* *187*, 761-772.

Irvin, C.W., Kim, R.B., and Mitchell, C.S. (2015). Seeking homeostasis: temporal trends in respiration, oxidation, and calcium in SOD1 G93A Amyotrophic Lateral Sclerosis mice. *Front Cell Neurosci* *9*, 248.

Jaarsma, D., Haasdijk, E.D., Grashorn, J.A., Hawkins, R., van Duijn, W., Verspaget, H.W., London, J., and Holstege, J.C. (2000). Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis* 7, 623-643.

Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E.D., De Zeeuw, C.I., and Hoogenraad, C.C. (2008). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J Neurosci* 28, 2075-2088.

Jacob, J.M., and Robbins, N. (1990a). Age differences in morphology of reinnervation of partially denervated mouse muscle. *J Neurosci* 10, 1530-1540.

Jacob, J.M., and Robbins, N. (1990b). Differential effects of age on neuromuscular transmission in partially denervated mouse muscle. *J Neurosci* 10, 1522-1529.

Jahromi, B.S., Robitaille, R., and Charlton, M.P. (1992). Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8, 1069-1077.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol*.

Jiang, M., Schuster, J.E., Fu, R., Siddique, T., and Heckman, C.J. (2009). Progressive changes in synaptic inputs to motoneurons in adult sacral spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 29, 15031-15038.

Juranek, J., Mukherjee, K., Rickmann, M., Martens, H., Calka, J., Sudhof, T.C., and Jahn, R. (2006). Differential expression of active zone proteins in neuromuscular junctions suggests functional diversification. *Eur J Neurosci* 24, 3043-3052.

Kaminski, H.J., Richmonds, C.R., Kusner, L.L., and Mitsumoto, H. (2002). Differential susceptibility of the ocular motor system to disease. *Ann N Y Acad Sci* 956, 42-54.

Kang, H., and Lichtman, J.W. (2013). Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young adult and aged animals. *J Neurosci* 33, 19480-19491.

Kang, H., Tian, L., Mikesh, M., Lichtman, J.W., and Thompson, W.J. (2014). Terminal Schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury. *J Neurosci* 34, 6323-6333.

Kang, H., Tian, L., Son, Y.J., Zuo, Y., Procaccino, D., Love, F., Hayworth, C., Trachtenberg, J., Mikesh, M., Sutton, L., *et al.* (2007). Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity. *J Neurosci* 27, 5948-5957.

Kang, H., Tian, L., and Thompson, W. (2003). Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *J Neurocytol* 32, 975-985.

- Kang, S.H., Fukaya, M., Yang, J.K., Rothstein, J.D., and Bergles, D.E. (2010). NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 68, 668-681.
- Kang, S.H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D.W., Ostrow, L.W., Rothstein, J.D., and Bergles, D.E. (2013). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 16, 571-579.
- Kanning, K.C., Kaplan, A., and Henderson, C.E. (2010). Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 33, 409-440.
- Katz, E., Ferro, P.A., Weisz, G., and Uchitel, O.D. (1996). Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 497 (Pt 3), 687-697.
- Kaur, S.J., McKeown, S.R., and Rashid, S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene* 577, 109-118.
- Kawabuchi, M., Zhou, C.J., Wang, S., Nakamura, K., Liu, W.T., and Hirata, K. (2001). The spatiotemporal relationship among Schwann cells, axons and postsynaptic acetylcholine receptor regions during muscle reinnervation in aged rats. *Anat Rec* 264, 183-202.
- Kawahara, Y., Ito, K., Sun, H., Aizawa, H., Kanazawa, I., and Kwak, S. (2004). Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427, 801.
- Kawamata, H., Ng, S.K., Diaz, N., Burstein, S., Morel, L., Osgood, A., Sider, B., Higashimori, H., Haydon, P.G., Manfredi, G., *et al.* (2014). Abnormal intracellular calcium signaling and SNARE-dependent exocytosis contributes to SOD1G93A astrocyte-mediated toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 34, 2331-2348.
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T., and McGeer, P.L. (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140, 691-707.
- Keller, A.F., Gravel, M., and 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.
- Keller, B.A., Volkening, K., Droppelmann, C.A., Ang, L.C., Rademakers, R., and Strong, M.J. (2012). Co-aggregation of RNA binding proteins in ALS spinal motor neurons: evidence of a common pathogenic mechanism. *Acta Neuropathol* 124, 733-747.
- Kieran, D., Woods, I., Villunger, A., Strasser, A., and Prehn, J.H. (2007). Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20606-20611.

Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., and Zoing, M.C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377, 942-955.

Kihira, T., Yoshida, S., Yoshimasu, F., Wakayama, I., and Yase, Y. (1997). Involvement of Onuf's nucleus in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 147, 81-88.

Kikuchi, H., Almer, G., Yamashita, S., Guegan, C., Nagai, M., Xu, Z., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., 2nd, and Przedborski, S. (2006). Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6025-6030.

Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L.A., Boulting, G.L., Moccia, R., Wainger, B.J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., *et al.* (2014). Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell* 14, 781-795.

Ko, C.P., and Robitaille, R. (2015). Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.

Koirala, S., Qiang, H., and Ko, C.P. (2000). Reciprocal interactions between perisynaptic Schwann cells and regenerating nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *J Neurobiol* 44, 343-360.

Kolodkin, A.L. (1996). Growth cones and the cues that repel them. *Trends Neurosci* 19, 507-513.

Konno, H., Yamamoto, T., Iwasaki, Y., and Iizuka, H. (1986). Shy-Drager syndrome and amyotrophic lateral sclerosis. Cytoarchitectonic and morphometric studies of sacral autonomic neurons. *J Neurol Sci* 73, 193-204.

Kostic, V., Jackson-Lewis, V., de Bilbao, F., Dubois-Dauphin, M., and Przedborski, S. (1997). Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 277, 559-562.

Krief, N., St-Amour, A., Vallée, J., and Robitaille, R. (2016). Alteration of neuron-glia interactions at the neuromuscular junction of old mice. *En soumission (Neurobiology of aging)*.

Kwiatkowski, T.J., Jr., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., *et al.* (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205-1208.

Laferrriere, F., and Polymenidou, M. (2015). Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Swiss Med Wkly* 145, w14054.

Laird, F.M., Farah, M.H., Ackerley, S., Hoke, A., Maragakis, N., Rothstein, J.D., Griffin, J., Price, D.L., Martin, L.J., and Wong, P.C. (2008). Motor neuron disease occurring in a mutant

dynactin mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking. *J Neurosci* 28, 1997-2005.

Lareau-Trudel, E., Fortin, E., Gauthier, M., Lavoie, S., Morissette, E., and Mathieu, J. (2013). Epidemiological surveillance of amyotrophic lateral sclerosis in Saguenay region. *Can J Neurol Sci* 40, 705-709.

Lasiene, J., and Yamanaka, K. (2011). Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int* 2011, 718987.

Lee, M.K., Marszalek, J.R., and Cleveland, D.W. (1994). A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron* 13, 975-988.

Lee, Y., Morrison, B.M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M.H., Hoffman, P.N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.W., *et al.* (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487, 443-448.

Lee, Y.I., Li, Y., Mikesch, M., Smith, I., Nave, K.A., Schwab, M.H., and Thompson, W.J. (2016). Neuregulin1 displayed on motor axons regulates terminal Schwann cell-mediated synapse elimination at developing neuromuscular junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E479-487.

Levanon, D., Lieman-Hurwitz, J., Dafni, N., Wigderson, M., Sherman, L., Bernstein, Y., Laver-Rudich, Z., Danciger, E., Stein, O., and Groner, Y. (1985). Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBO J* 4, 77-84.

Li, M., and Arner, A. (2015). Immobilization of Dystrophin and Laminin alpha2-Chain Deficient Zebrafish Larvae In Vivo Prevents the Development of Muscular Dystrophy. *PLoS One* 10, e0139483.

Li, M., Ona, V.O., Guegan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L.J., Olszewski, A.J., Stieg, P.E., Lee, J.P., Przedborski, S., *et al.* (2000). Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288, 335-339.

Li, Q., Vande Velde, C., Israelson, A., Xie, J., Bailey, A.O., Dong, M.Q., Chun, S.J., Roy, T., Winer, L., Yates, J.R., *et al.* (2010). ALS-linked mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) alters mitochondrial protein composition and decreases protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21146-21151.

Li, Y., Du, X.F., Liu, C.S., Wen, Z.L., and Du, J.L. (2012). Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev Cell* 23, 1189-1202.

- Liao, B., Zhao, W., Beers, D.R., Henkel, J.S., and Appel, S.H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol* 237, 147-152.
- Lin, W., Sanchez, H.B., Deerinck, T., Morris, J.K., Ellisman, M., and Lee, K.F. (2000). Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1299-1304.
- Lindgren, C.A., Newman, Z.L., Morford, J.J., Ryan, S.B., Battani, K.A., and Su, Z. (2013). Cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 glycerol ester and nitric oxide are involved in muscarine-induced presynaptic enhancement at the vertebrate neuromuscular junction. *J Physiol* 591, 4749-4764.
- Lino, M.M., Schneider, C., and Caroni, P. (2002). Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 22, 4825-4832.
- Liu, J.X., Brannstrom, T., Andersen, P.M., and Pedrosa-Domellof, F. (2011). Different impact of ALS on laminin isoforms in human extraocular muscles versus limb muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 4842-4852.
- Liu, J.X., Brannstrom, T., Andersen, P.M., and Pedrosa-Domellof, 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, Y., Pattamatta, A., Zu, T., Reid, T., Bardhi, O., Borchelt, D.R., Yachnis, A.T., and Ranum, L.P. (2016). C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron* 90, 521-534.
- Lobsiger, C.S., Boillee, S., McAlonis-Downes, M., Khan, A.M., Feltri, M.L., Yamanaka, K., and Cleveland, D.W. (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.
- Lobsiger, C.S., and Cleveland, D.W. (2007). Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci* 10, 1355-1360.
- Lorenzo, L.E., Barbe, A., Portalier, P., Fritschy, J.M., and Bras, H. (2006). Differential expression of GABAA and glycine receptors in ALS-resistant vs. ALS-vulnerable motoneurons: possible implications for selective vulnerability of motoneurons. *Eur J Neurosci* 23, 3161-3170.
- Love, F.M., Son, Y.J., and Thompson, W.J. (2003). Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J Neurobiol* 54, 566-576.

Love, F.M., and Thompson, W.J. (1998). Schwann cells proliferate at rat neuromuscular junctions during development and regeneration. *J Neurosci* *18*, 9376-9385.

Love, F.M., and Thompson, W.J. (1999). Glial cells promote muscle reinnervation by responding to activity-dependent postsynaptic signals. *J Neurosci* *19*, 10390-10396.

Lu, L., Zheng, L., Viera, L., Suswam, E., Li, Y., Li, X., Estevez, A.G., and King, P.H. (2007). Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis destabilizes vascular endothelial growth factor mRNA and downregulates its expression. *J Neurosci* *27*, 7929-7938.

Lubischer, J.L., and Bebinger, D.M. (1999). Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction. *J Neurosci* *19*, RC46.

Lubischer, J.L., and Thompson, W.J. (1999). Neonatal partial denervation results in nodal but not terminal sprouting and a decrease in efficacy of remaining neuromuscular junctions in rat soleus muscle. *J Neurosci* *19*, 8931-8944.

Machler, P., Wyss, M.T., Elsayed, M., Stobart, J., Gutierrez, R., von Faber-Castell, A., Kaelin, V., Zuend, M., San Martin, A., Romero-Gomez, I., *et al.* (2016). In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metab* *23*, 94-102.

MacVicar, B.A., and Newman, E.A. (2015). Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*.

Magill, C.K., Tong, A., Kawamura, D., Hayashi, A., Hunter, D.A., Parsadanian, A., Mackinnon, S.E., and Myckatyn, T.M. (2007). Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: a confocal microscopic study in transgenic mice. *Exp Neurol* *207*, 64-74.

Magrane, J., Cortez, C., Gan, W.B., and Manfredi, G. (2014). Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum Mol Genet* *23*, 1413-1424.

Maharjan, N., Kunzli, C., Buthey, K., and Saxena, S. (2016). C9ORF72 Regulates Stress Granule Formation and Its Deficiency Impairs Stress Granule Assembly, Hypersensitizing Cells to Stress. *Mol Neurobiol*, 1-16.

Maletic-Savatic, M., Malinow, R., and Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* *283*, 1923-1927.

Mancuso, R., Osta, R., and Navarro, X. (2014). Presymptomatic electrophysiological tests predict clinical onset and survival in SOD1(G93A) ALS mice. *Muscle Nerve* *50*, 943-949.

Mannen, T. (2000). Neuropathological findings of Onuf's nucleus and its significance. *Neuropathology* *20 Suppl*, S30-33.

- Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2009). Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* *11*, 2685-2700.
- Marinkovic, P., Reuter, M.S., Brill, M.S., Godinho, L., Kerschensteiner, M., and Misgeld, T. (2012). Axonal transport deficits and degeneration can evolve independently in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 4296-4301.
- Marques, M.J., and Santo Neto, H. (1998). Imaging neuromuscular junctions by confocal fluorescence microscopy: individual endplates seen in whole muscles with vital intracellular staining of the nerve terminals. *J Anat* *192 (Pt 3)*, 425-430.
- Martineau, É., and Robitaille, R. (2017). Maladapted Glial Cell Properties at the Neuromuscular Junction are Incompatible with Reinnervation in the SOD1G37R ALS model. En préparation.
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* *277*, 29626-29633.
- Meltz Steinberg, K., Nicholas, T.J., Koboldt, D.C., Yu, B., Mardis, E., and Pamphlett, R. (2015). Whole genome analyses reveal no pathogenetic single nucleotide or structural differences between monozygotic twins discordant for amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* *16*, 385-392.
- Mendell, L.M. (2005). The size principle: a rule describing the recruitment of motoneurons. *J Neurophysiol* *93*, 3024-3026.
- Meyer, K., Ferraiuolo, L., Miranda, C.J., Likhite, S., McElroy, S., Rensch, S., Ditsworth, D., Lagier-Tourenne, C., Smith, R.A., Ravits, J., *et al.* (2013). Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 829-832.
- Migheli, A., Atzori, C., Piva, R., Tortarolo, M., Girelli, M., Schiffer, D., and Bendotti, C. (1999). Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nat Med* *5*, 966-967.
- Miles, G.B., Hartley, R., Todd, A.J., and Brownstone, R.M. (2007). Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 2448-2453.
- Miller, R.G., Mitchell, J.D., Lyon, M., and Moore, D.H. (2007). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*, CD001447.
- Miyazaki, K., Yamashita, T., Morimoto, N., Sato, K., Mimoto, T., Kurata, T., Ikeda, Y., and Abe, K. (2013). Early and selective reduction of NOP56 (Asidan) and RNA processing proteins in the motor neuron of ALS model mice. *Neurol Res* *35*, 744-754.

- Morquette, P., Verdier, D., Kadala, A., Fethiere, J., Philippe, A.G., Robitaille, R., and Kolta, A. (2015). An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nat Neurosci* *18*, 844-854.
- Munch, C., O'Brien, J., and Bertolotti, A. (2011). Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 3548-3553.
- Murray, L.M., Beauvais, A., Bhanot, K., and Kothary, R. (2013). Defects in neuromuscular junction remodelling in the *Smn(2B/-)* mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* *49*, 57-67.
- Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H., and Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* *10*, 615-622.
- Nagao, M., Misawa, H., Kato, S., and Hirai, S. (1998). Loss of cholinergic synapses on the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* *57*, 329-333.
- Nagwaney, S., Harlow, M.L., Jung, J.H., Szule, J.A., Ress, D., Xu, J., Marshall, R.M., and McMahan, U.J. (2009). Macromolecular connections of active zone material to docked synaptic vesicles and presynaptic membrane at neuromuscular junctions of mouse. *J Comp Neurol* *513*, 457-468.
- Narayanan, R.K., Mangelsdorf, M., Panwar, A., Butler, T.J., Noakes, P.G., and Wallace, R.H. (2013). Identification of RNA bound to the TDP-43 ribonucleoprotein complex in the adult mouse brain. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* *14*, 252-260.
- Nascimento, F., Sebastiao, A.M., and Ribeiro, J.A. (2015). Presymptomatic and symptomatic ALS SOD1(G93A) mice differ in adenosine A1 and A2A receptor-mediated tonic modulation of neuromuscular transmission. *Purinergic Signal* *11*, 471-480.
- Nascimento, F.P., Macedo-Junior, S.J., Pamplona, F.A., Luiz-Cerutti, M., Cordova, M.M., Constantino, L., Tasca, C.I., Dutra, R.C., Calixto, J.B., Reid, A., *et al.* (2014). Adenosine A1 receptor-dependent antinociception induced by inosine in mice: pharmacological, genetic and biochemical aspects. *Mol Neurobiol* *51*, 1368-1378.
- Nave, K.A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* *468*, 244-252.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., *et al.* (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* *314*, 130-133.
- Ng, A.S., Rademakers, R., and Miller, B.L. (2015). Frontotemporal dementia: a bridge between dementia and neuromuscular disease. *Ann N Y Acad Sci* *1338*, 71-93.

- Nibbering, P.H., Leijh, P.C., and van Furth, R. (1987). Quantitative immunocytochemical characterization of mononuclear phagocytes. II. Monocytes and tissue macrophages. *Immunology* 62, 171-176.
- Niebroj-Dobosz, I., Rafalowska, J., Fidzianska, A., Gadamski, R., and Grieb, P. (2007). Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in SOD1G93A transgenic rats. *Folia Neuropathol* 45, 236-241.
- Nimchinsky, E.A., Young, W.G., Yeung, G., Shah, R.A., Gordon, J.W., Bloom, F.E., Morrison, J.H., and Hof, P.R. (2000). Differential vulnerability of oculomotor, facial, and hypoglossal nuclei in G86R superoxide dismutase transgenic mice. *J Comp Neurol* 416, 112-125.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
- Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., and Ichijo, H. (2008). ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* 22, 1451-1464.
- O'Malley, J.P., Waran, M.T., and Balice-Gordon, R.J. (1999). In vivo observations of terminal Schwann cells at normal, denervated, and reinnervated mouse neuromuscular junctions. *J Neurobiol* 38, 270-286.
- O'Rourke, J.G., Bogdanik, L., Muhammad, A.K., Gendron, T.F., Kim, K.J., Austin, A., Cady, J., Liu, E.Y., Zarrow, J., Grant, S., *et al.* (2015). C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD. *Neuron* 88, 892-901.
- Oda, R., Yaoi, T., Okajima, S., Kobashi, H., Kubo, T., and Fushiki, S. (2003). A novel marker for terminal Schwann cells, homocysteine-responsive ER-resident protein, as isolated by a single cell PCR-differential display. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 872-877.
- Okamoto, K., Hirai, S., Ishiguro, K., Kawarabayashi, T., and Takatama, M. (1991). Light and electron microscopic and immunohistochemical observations of the Onuf's nucleus of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 81, 610-614.
- Oliveira, J.F., Sardinha, V.M., Guerra-Gomes, S., Araque, A., and Sousa, N. (2015). Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends Neurosci* 38, 535-549.
- Orellana, J.A., Retamal, M.A., Moraga-Amaro, R., and Stehberg, J. (2016). Role of Astroglial Hemichannels and Pannexons in Memory and Neurodegenerative Diseases. *Front Integr Neurosci* 10, 26.

Orsini, M., Oliveira, A.B., Nascimento, O.J., Reis, C.H., Leite, M.A., de Souza, J.A., Pupe, C., de Souza, O.G., Bastos, V.H., de Freitas, M.R., *et al.* (2015). Amyotrophic Lateral Sclerosis: New Perspectives and Update. *Neurol Int* 7, 5885.

Panatier, A., and Robitaille, R. (2012). [Astrocyte, a key partner of neurons during basal synaptic transmission]. *Med Sci (Paris)* 28, 582-584.

Panatier, A., Vallee, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.C., and Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146, 785-798.

Papadeas, S.T., Kraig, S.E., O'Banion, C., Lepore, A.C., and Maragakis, N.J. (2011). Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17803-17808.

Park, K.H. (2015). Mechanisms of Muscle Denervation in Aging: Insights from a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Aging Dis* 6, 380-389.

Parone, P.A., Da Cruz, S., Han, J.S., McAlonis-Downes, M., Vetto, A.P., Lee, S.K., Tseng, E., and Cleveland, D.W. (2013). Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 33, 4657-4671.

Pasinelli, P., Borchelt, D.R., Houseweart, M.K., Cleveland, D.W., and Brown, R.H., Jr. (1998). Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15763-15768.

Pasinelli, P., Houseweart, M.K., Brown, R.H., Jr., and Cleveland, D.W. (2000). Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13901-13906.

Perea, G., and Araque, A. (2005). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25, 2192-2203.

Perez-Alvarez, A., Navarrete, M., Covelo, A., Martin, E.D., and Araque, A. (2014). Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions. *J Neurosci* 34, 12738-12744.

Perez-Gonzalez, A.P., Rousse, I., Lamoureux, B., and Robitaille, R. (2016). Glial cells excitability acquire immature phenotype following injury and during reinnervation at the mammalian neuromuscular junction. *En soumission (Glia)*.

Perlson, E., Jeong, G.B., Ross, J.L., Dixit, R., Wallace, K.E., Kalb, R.G., and Holzbaur, E.L. (2009). A switch in retrograde signaling from survival to stress in rapid-onset neurodegeneration. *J Neurosci* 29, 9903-9917.

Perrie, W.T., Lee, G.T., Curtis, E.M., Sparke, J., Buller, J.R., and Rossi, M.L. (1993). Changes in the myelinated axons of femoral nerve in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm Suppl* 39, 223-233.

Personius, K.E., and Sawyer, R.P. (2005). Terminal Schwann cell structure is altered in diaphragm of mdx mice. *Muscle Nerve* 32, 656-663.

Peters, O.M., Cabrera, G.T., Tran, H., Gendron, T.F., McKeon, J.E., Metterville, J., Weiss, A., Wightman, N., Salameh, J., Kim, J., *et al.* (2015). Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Neuron* 88, 902-909.

Petri, S., Kollwe, K., Grothe, C., Hori, A., Dengler, R., Bufler, J., and Krampfl, K. (2006). GABA(A)-receptor mRNA expression in the prefrontal and temporal cortex of ALS patients. *J Neurol Sci* 250, 124-132.

Petri, S., Krampfl, K., Hashemi, F., Grothe, C., Hori, A., Dengler, R., and Bufler, J. (2003). Distribution of GABAA receptor mRNA in the motor cortex of ALS patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 1041-1051.

Petri, S., Schmalbach, S., Grosskreutz, J., Krampfl, K., Grothe, C., Dengler, R., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., and Bufler, J. (2005). The cellular mRNA expression of GABA and glutamate receptors in spinal motor neurons of SOD1 mice. *J Neurol Sci* 238, 25-30.

Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Friedman, B.A., Carrasco, M.A., Muratet, M., O'Keeffe, S., Nwakeze, C., Pauli-Behn, F., Newberry, K.M., Meadows, S.K., *et al.* (2013). Intricate interplay between astrocytes and motor neurons in ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E756-765.

Philips, T., Bento-Abreu, A., Nonneman, A., Haack, W., Staats, K., Geelen, V., Hersmus, N., Kusters, B., Van Den Bosch, L., Van Damme, P., *et al.* (2013). Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 136, 471-482.

Philips, T., and Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 10, 253-263.

Philips, T., and Rothstein, J.D. (2014). Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 262 Pt B, 111-120.

Pickles, S., and Vande Velde, C. (2012). Misfolded SOD1 and ALS: zeroing in on mitochondria. *Amyotroph Lateral Scler* 13, 333-340.

Pinard, A., Levesque, S., Vallee, J., and Robitaille, R. (2003). Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *Eur J Neurosci* 18, 3241-3250.

- Pioro, E.P., Antel, J.P., Cashman, N.R., and Arnold, D.L. (1994). Detection of cortical neuron loss in motor neuron disease by proton magnetic resonance spectroscopic imaging in vivo. *Neurology* *44*, 1933-1938.
- Pohl, H.B., Porcheri, C., Mueggler, T., Bachmann, L.C., Martino, G., Riethmacher, D., Franklin, R.J., Rudin, M., and Suter, U. (2011). Genetically induced adult oligodendrocyte cell death is associated with poor myelin clearance, reduced remyelination, and axonal damage. *J Neurosci* *31*, 1069-1080.
- Pokrishevsky, E., Grad, L.I., and Cashman, N.R. (2016). TDP-43 or FUS-induced misfolded human wild-type SOD1 can propagate intercellularly in a prion-like fashion. *Sci Rep* *6*, 22155.
- Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2011). The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS. *Cell* *147*, 498-508.
- Pramatarova, A., Laganier, J., Roussel, J., Brisebois, K., and Rouleau, G.A. (2001). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* *21*, 3369-3374.
- Proctor, E.A., Fee, L., Tao, Y., Redler, R.L., Fay, J.M., Zhang, Y., Lv, Z., Mercer, I.P., Deshmukh, M., Lyubchenko, Y.L., *et al.* (2016). Nonnative SOD1 trimer is toxic to motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 614-619.
- Prudencio, M., Durazo, A., Whitelegge, J.P., and Borchelt, D.R. (2010). An examination of wild-type SOD1 in modulating the toxicity and aggregation of ALS-associated mutant SOD1. *Hum Mol Genet* *19*, 4774-4789.
- Prudencio, M., Hart, P.J., Borchelt, D.R., and Andersen, P.M. (2009). Variation in aggregation propensities among ALS-associated variants of SOD1: correlation to human disease. *Hum Mol Genet* *18*, 3217-3226.
- Pullen, A.H., and Athanasiou, D. (2009). Increase in presynaptic territory of C-terminals on lumbar motoneurons of G93A SOD1 mice during disease progression. *Eur J Neurosci* *29*, 551-561.
- Pullen, A.H., Martin, J.E., and Swash, M. (1992). Ultrastructure of pre-synaptic input to motor neurons in Onuf's nucleus: controls and motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* *18*, 213-231.
- Puls, I., Jonnakuty, C., LaMonte, B.H., Holzbaur, E.L., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M.K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S.J., *et al.* (2003). Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* *33*, 455-456.
- Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L., and Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* *9*, 408-419.

- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C. LaMantia, A.S., McNamara, J.O., Williams, S. M. (2005). *Neurosciences*, 3^è Édition. Éditions De Boek Université *Bruxelles*.
- Rabin, S.J., Kim, J.M., Baughn, M., Libby, R.T., Kim, Y.J., Fan, Y., La Spada, A., Stone, B., and Ravits, J. (2010). Sporadic ALS has compartment-specific aberrant exon splicing and altered cell-matrix adhesion biology. *Hum Mol Genet* *19*, 313-328.
- Radford, R.A., Morsch, M., Rayner, S.L., Cole, N.J., Pountney, D.L., and Chung, R.S. (2015). The established and emerging roles of astrocytes and microglia in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Front Cell Neurosci* *9*, 414.
- Ralph, G.S., Radcliffe, P.A., Day, D.M., Carthy, J.M., Leroux, M.A., Lee, D.C., Wong, L.F., Bilsland, L.G., Greensmith, L., Kingsman, S.M., *et al.* (2005). Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* *11*, 429-433.
- Ravits, J. (2014). Focality, stochasticity and neuroanatomic propagation in ALS pathogenesis. *Exp Neurol* *262 Pt B*, 121-126.
- Re, D.B., Le Verche, V., Yu, C., Amoroso, M.W., Politi, K.A., Phani, S., Ikiz, B., Hoffmann, L., Koolen, M., Nagata, T., *et al.* (2014). Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron* *81*, 1001-1008.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr., *et al.* (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* *13*, 43-47.
- Reddy, L.V., Koirala, S., Sugiura, Y., Herrera, A.A., and 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, R.S., and Silinsky, E.M. (1994). ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J Physiol* *477*, 117-127.
- Reichert, F., Saada, A., and Rotshenker, S. (1994). Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *J Neurosci* *14*, 3231-3245.
- Reid, B., Slater, C.R., and Bewick, G.S. (1999). Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *J Neurosci* *19*, 2511-2521.
- Reist, N.E., and Smith, S.J. (1992). Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 7625-7629.

Renton, A.E., Chio, A., and Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* *17*, 17-23.

Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., *et al.* (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* *72*, 257-268.

Reynolds, M.L., and Woolf, C.J. (1992). Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol* *21*, 50-66.

Richards, D.A., Guatimosim, C., and Betz, W.J. (2000). Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron* *27*, 551-559.

Richards, D.A., Guatimosim, C., Rizzoli, S.O., and Betz, W.J. (2003). Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron* *39*, 529-541.

Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R., and Birchmeier, C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* *389*, 725-730.

Rizo, J., Chen, X., and Arac, D. (2006). Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. *Trends Cell Biol* *16*, 339-350.

Rizzoli, S.O., and Betz, W.J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* *6*, 57-69.

Robitaille, R. (1995). Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* *15*, 7121-7131.

Robitaille, R. (1998). Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* *21*, 847-855.

Robitaille, R., Jahromi, B.S., and Charlton, M.P. (1997). Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol* *504 (Pt 2)*, 337-347.

Rocha, M.C., Pousinha, P.A., Correia, A.M., Sebastiao, A.M., and Ribeiro, J.A. (2013). Early Changes of Neuromuscular Transmission in the SOD1(G93A) Mice Model of ALS Start Long before Motor Symptoms Onset. *PLoS One* *8*, e73846.

Rochon, D., Rouse, I., and Robitaille, R. (2001). Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* *21*, 3819-3829.

Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., *et al.* (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* *362*, 59-62.

- Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C.F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., Bredesen, D.E., and Volterra, A. (2008). Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ* 15, 1691-1700.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., *et al.* (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675-686.
- Rothstein, J.D., Kuncl, R., Chaudhry, V., Clawson, L., Cornblath, D.R., Coyle, J.T., and Drachman, D.B. (1991). Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Ann Neurol* 30, 224-225.
- Rothstein, J.D., Patel, S., Regan, M.R., Haenggeli, C., Huang, Y.H., Bergles, D.E., Jin, L., Dykes Hoberg, M., Vidensky, S., Chung, D.S., *et al.* (2005). Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433, 73-77.
- Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, A., Stauch, B.L., and Coyle, J.T. (1990). Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28, 18-25.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38, 73-84.
- Rousse, I., St-Amour, A., Darabid, H., and Robitaille, R. (2010). Synapse-glia interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties. *Neuroscience* 167, 621-632.
- Ruiz, R., Cano, R., Casanas, J.J., Gaffield, M.A., Betz, W.J., and Tabares, L. (2011). Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J Neurosci* 31, 2000-2008.
- Rule, R.R., Schuff, N., Miller, R.G., and Weiner, M.W. (2010). Gray matter perfusion correlates with disease severity in ALS. *Neurology* 74, 821-827.
- Rutkowski, D.T., and Kaufman, R.J. (2007). That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci* 32, 469-476.
- Sakuma, M., Gorski, G., Sheu, S.H., Lee, S., Barrett, L.B., Singh, B., Omura, T., Latremoliere, A., and Woolf, C.J. (2016). Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. *Eur J Neurosci* 43, 451-462.
- Samuel, M.A., Valdez, G., Tapia, J.C., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2012). Agrin and synaptic laminin are required to maintain adult neuromuscular junctions. *PLoS One* 7, e46663.

- Sasabe, J., Chiba, T., Yamada, M., Okamoto, K., Nishimoto, I., Matsuoka, M., and Aiso, S. (2007). D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 26, 4149-4159.
- Saxena, S., Cabuy, E., and Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 12, 627-636.
- Saxena, S., and Caroni, P. (2011). Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron* 71, 35-48.
- Saxena, S., Roselli, F., Singh, K., Leptien, K., Julien, J.P., Gros-Louis, F., and Caroni, P. (2013). Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival. *Neuron* 80, 80-96.
- Schaefer, A.M., Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2005). A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* 490, 209-219.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691-705.
- Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P., and Migheli, A. (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 139 Suppl, 27-33.
- Sekiguchi, T., Kanouchi, T., Shibuya, K., Noto, Y., Yagi, Y., Inaba, A., Abe, K., Misawa, S., Orimo, S., Kobayashi, T., *et al.* (2014). Spreading of amyotrophic lateral sclerosis lesions--multifocal hits and local propagation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85, 85-91.
- Serio, A., Bilican, B., Barmada, S.J., Ando, D.M., Zhao, C., Siller, R., Burr, K., Haggi, G., Story, D., Nishimura, A.L., *et al.* (2013). Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4697-4702.
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.C., and Robitaille, R. (2006). GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci* 26, 5370-5382.
- Shahidullah, M., Le Marchand, S.J., Fei, H., Zhang, J., Pandey, U.B., Dalva, M.B., Pasinelli, P., and Levitan, I.B. (2013). Defects in synapse structure and function precede motor neuron degeneration in *Drosophila* models of FUS-related ALS. *J Neurosci* 33, 19590-19598.
- Shyng, S.L., and Salpeter, M.M. (1990). Effect of reinnervation on the degradation rate of junctional acetylcholine receptors synthesized in denervated skeletal muscles. *J Neurosci* 10, 3905-3915.

- Siegel, S.G., Patton, B., and English, A.W. (2000). Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting. *Exp Neurol* 166, 205-212.
- Siklos, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R.G., Joo, F., and Appel, S.H. (1996). Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39, 203-216.
- Siksou, L., Triller, A., and Marty, S. (2009). An emerging view of presynaptic structure from electron microscopic studies. *J Neurochem* 108, 1336-1342.
- Simon, C.M., Jablonka, S., Ruiz, R., Tabares, L., and Sendtner, M. (2010). Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19, 973-986.
- Smith, I.W., Mikesh, M., Lee, Y., and Thompson, W.J. (2013). Terminal Schwann cells participate in the competition underlying neuromuscular synapse elimination. *J Neurosci* 33, 17724-17736.
- Sobotka, S., and 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., and Thompson, W.J. (1995a). Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14, 133-141.
- Son, Y.J., and Thompson, W.J. (1995b). Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 14, 125-132.
- Son, Y.J., Trachtenberg, J.T., and Thompson, W.J. (1996). Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci* 19, 280-285.
- Song, J.W., Misgeld, T., Kang, H., Knecht, S., Lu, J., Cao, Y., Cotman, S.L., Bishop, D.L., and Lichtman, J.W. (2008). Lysosomal activity associated with developmental axon pruning. *J Neurosci* 28, 8993-9001.
- Song, S., Miranda, C.J., Braun, L., Meyer, K., Frakes, A.E., Ferraiuolo, L., Likhite, S., Bevan, A.K., Foust, K.D., McConnell, M.J., *et al.* (2016). Major histocompatibility complex class I molecules protect motor neurons from astrocyte-induced toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 22, 397-403.
- Squire, L.R., Bloom, F.E., McConnell, S.K., Roberts, J.L., Spitzer, N.C., Zigmond, M.J. (2003). *Fundamental Neuroscience, Second Edition*. Academic Press *San Diego, California*, 1426.

- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., *et al.* (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* *319*, 1668-1672.
- Stark, D.A., Coffey, N.J., Pancoast, H.R., Arnold, L.L., Walker, J.P., Vallee, J., Robitaille, R., Garcia, M.L., and Cornelison, D.D. (2015). Ephrin-A3 promotes and maintains slow muscle fiber identity during postnatal development and reinnervation. *J Cell Biol* *211*, 1077-1091.
- Stefancic, M., Vidmar, G., and Blagus, R. (2016). Long-term recovery of muscle strength after denervation in the fibular division of the sciatic nerve. *Muscle Nerve* *54* (4), 702-708.
- Strong, M.J. (2010). The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neurol Sci* *288*, 1-12.
- Sugiura, Y., and 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., *et al.* (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*.
- Suzuki, M., McHugh, J., Tork, C., Shelley, B., Hayes, A., Bellantuono, I., Aebischer, P., and Svendsen, C.N. (2008). Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Mol Ther* *16*, 2002-2010.
- Suzuki, M., McHugh, J., Tork, C., Shelley, B., Klein, S.M., Aebischer, P., and Svendsen, C.N. (2007). GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS. *PLoS One* *2*, e689.
- Swash, M., Leader, M., Brown, A., and Swettenham, K.W. (1986). Focal loss of anterior horn cells in the cervical cord in motor neuron disease. *Brain* *109* (Pt 5), 939-952.
- Swinnen, B., and Robberecht, W. (2014). The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* *10*, 661-670.
- Tallon, C., Russell, K.A., Sakhalkar, S., Andrapallayal, N., and Farah, M.H. (2015). Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice. *Neuroscience* *312*, 179-189.
- Tam, S.L., Archibald, V., Jassar, B., Tyreman, N., and Gordon, T. (2001). Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. *J Neurosci* *21*, 654-667.

- Tam, S.L., and Gordon, T. (2003). Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *J Neurobiol* 57, 221-234.
- Thakore, N.J., and Pioro, E.P. (2016). Depression in ALS in a large self-reporting cohort. *Neurology* 86, 1031-1038.
- Thomas, S., and Robitaille, R. (2001). Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21, 1087-1095.
- Thomsen, G.M., Gowing, G., Latter, J., Chen, M., Vit, J.P., Staggenborg, K., Avalos, P., Alkaslasi, M., Ferraiuolo, L., Likhite, S., *et al.* (2014). Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci* 34, 15587-15600.
- Todd, K.J., Auld, D.S., and Robitaille, R. (2007). Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci* 25, 1287-1296.
- Todd, K.J., Darabid, H., and Robitaille, R. (2010). Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 30, 11870-11882.
- tom Dieck, S., Sanmarti-Vila, L., Langnaese, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K.H., Kampf, U., Franzer, J.T., *et al.* (1998). Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* 142, 499-509.
- Tomonaga, M. (1980). Selective appearance of Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. A study of the distribution in midbrain and sacral cord. *J Neurol* 223, 259-267.
- Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R., and Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402, 421-425.
- Trachtenberg, J.T., and Thompson, W.J. (1996). Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature* 379, 174-177.
- Tremblay, E., Martineau, É., and Robitaille, R. (2017). Opposite synaptic alterations at the neuromuscular junction in an ALS mouse model: motor unit matters. *Soumis*.
- Triolo, D., Dina, G., Lorenzetti, I., Malaguti, M., Morana, P., Del Carro, U., Comi, G., Messing, A., Quattrini, A., and Previtali, S.C. (2006). Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *J Cell Sci* 119, 3981-3993.

- Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N.C., Brown, R.H., Jr., and Hediger, M.A. (1999). SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 2, 427-433.
- Turner, B.J., Ackerley, S., Davies, K.E., and 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.
- Turner, B.J., Atkin, J.D., Farg, M.A., Zang, D.W., Rembach, A., Lopes, E.C., Patch, J.D., Hill, A.F., and Cheema, S.S. (2005). Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 25, 108-117.
- Turner, M.R., Cagnin, A., Turkheimer, F.E., Miller, C.C., Shaw, C.E., Brooks, D.J., Leigh, P.N., and Banati, R.B. (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15, 601-609.
- Urushitani, M., Kurisu, J., Tsukita, K., and Takahashi, R. (2002). Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 83, 1030-1042.
- Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R., and Julien, J.P. (2006). Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 9, 108-118.
- Valdez, G., Tapia, J.C., Lichtman, J.W., Fox, M.A., and Sanes, J.R. (2012). Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One* 7, e34640.
- Valori, C.F., Brambilla, L., Martorana, F., and Rossi, D. (2014). The multifaceted role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Life Sci* 71, 287-297.
- Van Damme, P., Bogaert, E., Dewil, M., Hersmus, N., Kiraly, D., Scheveneels, W., Bockx, I., Braeken, D., Verpoorten, N., Verhoeven, K., *et al.* (2007). Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14825-14830.
- Van Damme, P., Callewaert, G., Eggermont, J., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2003a). Chloride influx aggravates Ca²⁺-dependent AMPA receptor-mediated motoneuron death. *J Neurosci* 23, 4942-4950.
- Van Damme, P., Leyssen, M., Callewaert, G., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2003b). The AMPA receptor antagonist NBQX prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 343, 81-84.

- Van Dyke, J.M., Smit-Oistad, I.M., Macrander, C., Krakora, D., Meyer, M.G., and Suzuki, M. (2016). Macrophage-mediated inflammation and glial response in the skeletal muscle of a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Exp Neurol* 277, 275-282.
- Van Hoecke, A., Schoonaert, L., Lemmens, R., Timmers, M., Staats, K.A., Laird, A.S., Peeters, E., Philips, T., Goris, A., Dubois, B., *et al.* (2012). EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. *Nat Med* 18, 1418-1422.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., *et al.* (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323, 1208-1211.
- Vande Velde, C., Miller, T.M., Cashman, N.R., and Cleveland, D.W. (2008). Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4022-4027.
- Vargas, M.R., Johnson, D.A., and Johnson, J.A. (2011). Decreased glutathione accelerates neurological deficit and mitochondrial pathology in familial ALS-linked hSOD1(G93A) mice model. *Neurobiol Dis* 43, 543-551.
- Vaughan, S.K., Kemp, Z., Hatzipetros, T., Vieira, F., and Valdez, G. (2015). Degeneration of proprioceptive sensory nerve endings in mice harboring amyotrophic lateral sclerosis-causing mutations. *J Comp Neurol* 523, Spc1.
- Venugopal, S., Hsiao, C.F., Sonoda, T., Wiedau-Pazos, M., and Chandler, S.H. (2015). Homeostatic dysregulation in membrane properties of masticatory motoneurons compared with oculomotor neurons in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 35, 707-720.
- Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013a). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav* 3, 335-350.
- Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013b). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav* 3, 431-457.
- Volonte, C., Apolloni, S., Parisi, C., and Amadio, S. (2016). Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology* 104, 180-193.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29, 3974-3980.

- Walsh, M.K., and Lichtman, J.W. (2003). In vivo time-lapse imaging of synaptic takeover associated with naturally occurring synapse elimination. *Neuron* 37, 67-73.
- Wang, G.J., Jackson, J.G., and Thayer, S.A. (2003). Altered distribution of mitochondria impairs calcium homeostasis in rat hippocampal neurons in culture. *J Neurochem* 87, 85-94.
- Wang, L., Deng, H.X., Grisotti, G., Zhai, H., Siddique, T., and Roos, R.P. (2009a). Wild-type SOD1 overexpression accelerates disease onset of a G85R SOD1 mouse. *Hum Mol Genet* 18, 1642-1651.
- Wang, L., Popko, B., and Roos, R.P. (2011). The unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 20, 1008-1015.
- Wang, L., Pytel, P., Feltri, M.L., Wrabetz, L., and Roos, R.P. (2012). Selective knockdown of mutant SOD1 in Schwann cells ameliorates disease in G85R mutant SOD1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 48, 52-57.
- Wang, L., Sharma, K., Grisotti, G., and Roos, R.P. (2009b). The effect of mutant SOD1 dismutase activity on non-cell autonomous degeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 35, 234-240.
- Wang, X., Zhou, S., Ding, X., Ma, M., Zhang, J., Zhou, Y., Wu, E., and Teng, J. (2015). Activation of ER Stress and Autophagy Induced by TDP-43 A315T as Pathogenic Mechanism and the Corresponding Histological Changes in Skin as Potential Biomarker for ALS with the Mutation. *Int J Biol Sci* 11, 1140-1149.
- Weisberg, S.J., Lyakhovetsky, R., Werdiger, A.C., Gitler, A.D., Soen, Y., and Kaganovich, D. (2012). Compartmentalization of superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) aggregates determines their toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15811-15816.
- Wetts, R., and Vaughn, J.E. (1996). Differential vulnerability of two subsets of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 141, 248-255.
- Williamson, T.L., and Cleveland, D.W. (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.
- Witts, E.C., Zagoraoui, L., and Miles, G.B. (2014). Anatomy and function of cholinergic C bouton inputs to motor neurons. *J Anat* 224, 52-60.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (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.
- Wood, S.J., and Slater, C.R. (2001). Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol* 64, 393-429.

Woolf, C.J., Reynolds, M.L., Chong, M.S., Emson, P., Irwin, N., and Benowitz, L.I. (1992). Denervation of the motor endplate results in the rapid expression by terminal Schwann cells of the growth-associated protein GAP-43. *J Neurosci* *12*, 3999-4010.

Wright, M.C., Potluri, S., Wang, X., Dentcheva, E., Gautam, D., Tessler, A., Wess, J., Rich, M.M., and 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.

Wright, M.C., and Son, Y.J. (2007). Ciliary neurotrophic factor is not required for terminal sprouting and compensatory reinnervation of neuromuscular synapses: re-evaluation of CNTF null mice. *Exp Neurol* *205*, 437-448.

Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E.A., Garcia, M.L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O.R., Cleveland, D.W., and Goldstein, L.S. (2008a). Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 7594-7599.

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., and Cleveland, D.W. (2008b). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* *11*, 251-253.

Yerbury, J.J., Ooi, L., Dillin, A., Saunders, D.N., Hatters, D.M., Beart, P.M., Cashman, N.R., Wilson, M.R., and Ecroyd, H. (2016). Walking the tightrope: Proteostasis and neurodegenerative disease. *J Neurochem*.

Young, P., Nie, J., Wang, X., McGlade, C.J., Rich, M.M., and Feng, G. (2005). LNX1 is a perisynaptic Schwann cell specific E3 ubiquitin ligase that interacts with ErbB2. *Mol Cell Neurosci* *30*, 238-248.

Zainul, Z. (2014). Terminal Schwann Cells Lead Synapse Remodelling following Injury(1,2). *eNeuro* *1*.

Zardini, D.M., and Parry, D.J. (1994). Identification, distribution, and myosin subunit composition of type IIX fibers in mouse muscles. *Muscle Nerve* *17*, 1308-1316.

Zhao, W., Beers, D.R., Bell, S., Wang, J., Wen, S., Baloh, R.H., and Appel, S.H. (2015). TDP-43 activates microglia through NF-kappaB and NLRP3 inflammasome. *Exp Neurol* *273*, 24-35.

Zhao, W., Beers, D.R., Henkel, J.S., Zhang, W., Urushitani, M., Julien, J.P., and Appel, S.H. (2010). Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* *58*, 231-243.

Zhong, Z., Deane, R., Ali, Z., Parisi, M., Shapovalov, Y., O'Banion, M.K., Stojanovic, K., Sagare, A., Boillee, S., Cleveland, D.W., *et al.* (2008). ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci* *11*, 420-422.

Zhong, Z., Ilieva, H., Hallagan, L., Bell, R., Singh, I., Paquette, N., Thiyagarajan, M., Deane, R., Fernandez, J.A., Lane, S., *et al.* (2009). Activated protein C therapy slows ALS-like disease in mice by transcriptionally inhibiting SOD1 in motor neurons and microglia cells. *J Clin Invest* *119*, 3437-3449.

Zimmerman, M.C., Oberley, L.W., and Flanagan, S.W. (2007). Mutant SOD1-induced neuronal toxicity is mediated by increased mitochondrial superoxide levels. *J Neurochem* *102*, 609-618.

Zou, Z.Y., Liu, M.S., Li, X.G., and Cui, L.Y. (2015). Mutations in SOD1 and FUS caused juvenile-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis with aggressive progression. *Ann Transl Med* *3*, 221.

Zuo, Y., and Bishop, D. (2008). Glial imaging during synapse remodeling at the neuromuscular junction. *Neuron Glia Biol* *4*, 319-326.

Zuo, Y., Lubischer, J.L., Kang, H., Tian, L., Mikesch, M., Marks, A., Scofield, V.L., Maika, S., Newman, C., Krieg, P., *et al.* (2004). Fluorescent proteins expressed in mouse transgenic lines mark subsets of glia, neurons, macrophages, and dendritic cells for vital examination. *J Neurosci* *24*, 10999-11009.

Annexe 1

Référence de l'article

Darabid, H., Arbour, D., and Robitaille, R. (2013). Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 33, 1297-1313.

Adresse du site internet - Pubmed

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23345206>

Adresse du site internet - The Journal of Neuroscience

<http://www.jneurosci.org/content/jneuro/33/4/1297.full.pdf>