

Université de Montréal

**Dégénérescence locale et réparation anormale de la
jonction neuromusculaire dans un modèle de la sclérose
latérale amyotrophique**

par **Éric Martineau**

Département de neurosciences
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Sciences Neurologiques

Décembre 2018

© **Éric Martineau**, 2018

Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est maladie neurodégénérative agressive, caractérisée par la perte des motoneurones supérieurs et inférieurs, ainsi que de leurs connexions synaptiques avec les fibres musculaires, les jonctions neuromusculaires (JNMs). Au courant de la dernière décennie, une panoplie de nouvelles causes génétiques de la SLA furent identifiées, et de nombreux mécanismes de toxicité cellulaire leur furent associés. Notamment, il est maintenant reconnu que les motoneurones ne dégèrent pas seuls dans la SLA et que les cellules gliales contribuent à de nombreux aspects de sa pathogenèse. Néanmoins, aucun consensus quant à l'origine de la dégénérescence sélective de ces neurones n'a été atteint.

Plusieurs études récentes ont identifié des altérations locales au niveau des JNMs, dont notamment une dysfonction des cellules gliales y étant associées, les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSPs), suggérant qu'une déstabilisation précoce de cette synapse pourrait contribuer à la SLA. Néanmoins, la séquence d'événements menant à la perte des JNMs dans la SLA demeure mal définie. Notamment, si la perte de JNMs est causée par la dégénérescence sélective d'un sous-groupe de motoneurones ou par la dégénérescence locale de branches axonales individuelles demeure une question controversée. Cette distinction est d'une grande importance, les mécanismes sous-jacents à ces deux événements différant potentiellement grandement. D'autre part, bien que plusieurs éléments portent à croire que certains motoneurones tentent de compenser pour la perte de JNMs, l'ampleur et l'efficacité de cette compensation demeurent incertaines.

L'objectif de cette thèse était donc dans un premier temps de caractériser les événements dégénératifs et compensatoires prenant place au sein de l'arborisation axonale des motoneurones durant la progression de la maladie chez un modèle classique de la SLA, la souris SOD1^{G37R}. En imageant à répétition des arborisations axonales uniques *in vivo*, nous montrons que des branches axonales individuelles se rétractent progressivement de leurs JNMs alors que d'autres sont maintenues durant plusieurs semaines avant que l'axone entier ne dégère. Ce démantèlement asynchrone des terminaisons axonales est accompagné par la formation de nombreuses nouvelles branches axonales, rétablissant des connexions synaptiques avec des JNMs qui n'étaient pas préalablement innervées par ce motoneurone. De manière intéressante,

nous montrons que ces événements compensatoires sont nettement plus fréquents chez les femelles, mais qu'ils sont associés à une progression légèrement plus rapide de la pathologie, suggérant qu'une compensation excessive puisse être délétère. De plus, malgré la présence de certains types d'événements compensatoires (bourgeonnement axonal), d'autres semblaient absents ou inefficaces (bourgeonnement terminal) suggérant que les mécanismes régulant la réparation des JNMs sont altérés durant la SLA. Ainsi, dans un deuxième temps, nous avons investigué plus en profondeur l'un des mécanismes pouvant contribuer à l'instabilité et à la réparation anormale des JNMs, la dysfonction des CSPs. Plus particulièrement, nous avons évalué si l'altération des propriétés des CSPs affectait leur capacité à promouvoir la réparation des JNMs et contribuait ainsi aux déficits que nous avons observés *in vivo*. Nous avons identifié que les CSPs semblaient incapables d'adapter leur phénotype suite au démantèlement des JNMs. Notamment, nous montrons que les CSPs n'augmentent pas leur expression de la Galectine-3, un facteur associé à la phagocytose de débris axonaux, suite à la perte de la terminaison axonale. De manière importante, cette incapacité des CSPs à promouvoir la réinnervation reflète le gradient de vulnérabilité des différents types de JNMs dans la SLA, suggérant que les CSPs soient l'un des facteurs y contribuant.

Dans l'ensemble, ces études montrent que la perte initiale de JNMs chez les souris SOD1 est causée par le démantèlement local de branches axonales individuelles, et est associée à une compensation aberrante des CSPs contribuant potentiellement aux déficits de réparation des JNMs. Ces données suggèrent fortement que des mécanismes locaux, au niveau des terminaisons axonales et dans leur entourage, mènent à la perte de JNMs dans la SLA. Des thérapies favorisant la stabilité des JNMs pourraient ainsi être bénéfiques afin d'améliorer la fonction motrice des patients atteints de la SLA.

Mots-clés : Sclérose latérale amyotrophique, motoneurones, jonction neuromusculaire, cellules de Schwann pérисynaptiques, SOD1, dénervation, réinnervation, Galectine-3

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an aggressive neurodegenerative disease characterized by the loss of upper and lower motor neurons, and of their connections to muscle cells, the neuromuscular junctions (NMJs). In the last century, a plethora of novel genetic causes of ALS were identified and were associated with numerous mechanisms of cellular toxicity. Notably, it is now well appreciated that motor neurons do not degenerate by themselves and that glial cells contribute to numerous aspects of ALS pathogenesis. Nevertheless, no consensus has been reached on the origin of the selective degeneration of these neurons.

Multiple recent studies identified local alterations at the level of NMJs, including notably a dysfunction of the glial cells at this synapse, the perisynaptic Schwann cells (PSCs). These alterations suggest that an early destabilization of NMJs could contribute to ALS. Nevertheless, the sequence of events leading to NMJ loss in ALS is ill-defined. Notably, whether the loss of NMJs is caused by the selective degeneration of a subpopulation of motor neurons or by the local degeneration of individual axonal branches remains a controversial question. This distinction is of great importance as the mechanisms underlying these two events potentially differ greatly. Furthermore, the extent and efficiency of compensatory events remain uncertain, even though ample elements suggesting that some motor neurons attempt to compensate for the loss of NMJs.

Hence, the goal of this thesis was first to characterize the degenerative and compensatory events taking place within the axonal arborization of individual motor neurons during disease progression in a classical model of ALS, the SOD1^{G37R} mice. Through the repeated *in vivo* imaging of individual axonal arborization, we show that some axonal branches progressively retract from their NMJs while others are maintained for several weeks before global axonal degeneration. This asynchronous dismantlement of axon terminals is accompanied by the formation new axonal branches, reestablishing synaptic connections with NMJs which were not initially innervated by this motor neuron. Interestingly, we show that these compensatory events were much more frequent in females, but were associated with a slightly faster disease progression, suggesting that excessive compensation could be deleterious. Moreover, we show that, despite the presence of some types of compensatory events (axonal sprouting), other types

of compensatory events seemed absent or inefficient (terminal sprouting), suggesting that mechanisms regulating NMJ repair are altered in ALS. Hence, we next wanted to investigate one of the mechanisms which could contribute to NMJ instability and repair abnormalities, namely the dysfunction of PSCs. Specifically, we evaluated if the alteration of PSC properties affected their capacity to promote NMJ repair and contributed to the deficits observed *in vivo*. We identified that PSCs failed to adapt their phenotype upon the dismantling of NMJs. Notably, we show that PSCs did not upregulate their expression of Galectin-3, a factor associated with glial phagocytosis of axonal debris. Importantly, this incapacity of PSCs to promote reinnervation reflected the selective vulnerability of different types of NMJs in ALS, suggesting that PSCs could be one of the factors contributing to this vulnerability gradient.

Altogether, these studies show that the initial loss of NMJs in SOD1 mice is caused by the local dismantlement of individual axonal branches. This phenomenon is accompanied by a maladapted response of PSCs which potentially contributes to NMJ repair deficits in ALS. These evidence strongly suggest that local mechanisms, at the level of axon terminals and their neighboring cells, lead to NMJ loss in ALS. Therapies aimed at stabilizing NMJs could thus benefit ALS patients by improving their motor function.

Keywords : Amyotrophic lateral sclerosis, motor neurons, neuromuscular junctions, perisynaptic Schwann cells, SOD1, denervation, reinnervation, Galectin-3

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des sigles.....	xvi
Liste des abréviations.....	xviii
Remerciements.....	xx
CHAPITRE I : Introduction.....	22
1.1 La sclérose latérale amyotrophique.....	22
1.1.1 Présentation clinique.....	22
1.1.1.1 Symptomatologie.....	22
1.1.1.2 Diagnostic.....	24
1.1.1.3 Épidémiologie.....	25
1.1.1.4 Traitements.....	26
1.1.2 Étiologie.....	26
1.1.2.1 Causes génétiques.....	27
1.1.2.2 Facteurs environnementaux.....	29
1.1.3 Les enjeux liés à la SLA.....	30
1.1.3.1 La découverte de nouveaux traitements.....	30
1.1.3.2 Le développement de biomarqueurs.....	31
1.2 Physiopathologie de la SLA.....	34
1.2.3 Inclusions, agrégats pathologiques et toxicité.....	35
1.2.3.1 Des agrégats hétérogènes.....	35
1.2.3.2 Modèles animaux.....	36
1.2.3.2.1 Modèles murins SOD1.....	37
1.2.3.2.2 Autres modèles murins notables.....	39
1.2.1.3 Mécanismes de toxicité.....	40
1.2.1.3.1 Superoxyde dismutase 1 (SOD1).....	43

1.2.2	Vulnérabilité sélective des motoneurones supérieurs, inférieurs et de la jonction neuromusculaire	45
1.2.3	Non-autonomie cellulaire : la contribution des autres types cellulaires	48
1.2.3.1	Les cellules gliales	50
1.2.3.1.1	Les astrocytes.....	50
1.2.3.1.2	La microglie.....	51
1.2.3.1.3	Les oligodendrocytes matures et immatures.....	52
1.2.3.1.4	Les cellules de Schwann	53
1.2.3.2	Les autres populations neuronales	54
1.2.3.3	Les fibres musculaires.....	55
1.2.3.4	Le système immunitaire périphérique.....	57
1.2.4	Hypothèses quant à l'origine de la dégénérescence neuronale	59
1.2.4.1	L'hypothèse de la mort antérograde	60
1.2.4.2	L'hypothèse de la mort rétrograde.....	62
1.2.4.3	L'importance de l'étude de la JNM dans la SLA	63
1.3	La jonction neuromusculaire : une synapse tripartite	65
1.3.1	Structure et fonction de la JNM.....	65
1.3.1.2	L'élément présynaptique : l'axone moteur	66
1.3.1.3	L'élément postsynaptique : la fibre musculaire	67
1.3.1.4	L'élément glial : les cellules de Schwann pérисynaptiques.....	68
1.3.1.4.1	La détection de l'activité synaptique.....	70
1.3.1.4.2	La modulation de l'activité synaptique	71
1.3.1.5	Les types d'unités motrices.....	72
1.3.2	La plasticité et la réparation de la JNM	73
1.3.2.1	La réinnervation suite à une lésion axonale.....	73
1.3.2.1.1	La régénérescence de l'axone lésé	74
1.3.2.1.2	Le bourgeonnement axonal compensatoire.....	75
1.3.2.2	Le rôle crucial des cellules de Schwann pérисynaptiques	76
1.3.2.2.3	Le guidage axonal	77
1.3.2.2.2	La phagocytose des débris axonaux.....	77
1.3.2.2.3	L'adaptabilité des CSPs	78

1.4 Changements locaux à la JNM dans la SLA.....	81
1.4.1 Les altérations précoces moléculaires et fonctionnelles de la JNM	81
1.4.1.1 L'altération précoce de l'activité synaptique.....	81
1.4.1.2 L'apparition de facteurs déstabilisant la synapse.....	82
1.4.1.3 L'altération précoce de l'activité des CSPs	84
1.4.2 La réinnervation de la JNM durant la SLA.....	85
1.5 Objectifs et buts de la thèse	86
CHAPITRE II : Le réarrangement dynamique de l'arborisation axonale des motoneurones précède leur dégénérescence dans un modèle murin de la SLA	88
2.1. Résumé.....	88
2.2 Texte intégral du premier article.....	89
2.2.1 Abstract.....	90
2.2.2. eLife digest: What happens to motoneurons in ALS?	91
2.2.3 Introduction.....	92
2.2.4 Results.....	94
2.2.4.1 <i>In vivo</i> imaging of single MU arbors	94
2.2.4.2 Asynchronous NMJ dismantlement in SOD1 ^{G37R} mice.....	94
2.2.4.3 Local NMJ loss precedes global MU degeneration	97
2.2.4.4. MUs expand their axonal arbor but do not reinnervate their lost NMJs.....	99
2.2.4.5. NMJ dismantlement seems to propagate	100
2.2.5. Discussion	102
2.2.6. Concluding remarks	105
2.2.7 Supplementary figures	106
2.2.8. Material and Methods	111
2.2.8.1. Animals.....	112
2.2.8.2. Repeated <i>in vivo</i> imaging	113
2.2.8.3. <i>In vivo</i> images and data analysis	114
2.2.8.4. Myosin heavy chains labeling.....	115
2.2.8.5. Whole-mount NMJ immunolabeling and motor neuron counts	116
2.2.8.6. Statistical analysis.....	117
2.2.9. Acknowledgments.....	119

2.2.10. References.....	120
CHAPITRE III Différences liées au sexe dans le réarrangement axonal des motoneurones dans un modèle murin de la SLA	125
3.1 Résumé.....	125
3.2 Texte intégral du deuxième article.....	126
3.2.1 Abstract	127
3.2.2 Introduction.....	128
3.2.3 Results.....	130
3.2.3.1 MU expansions are more frequent in females SOD1 ^{G37R} mice	130
3.2.3.2 Grip strength, but not body weight, declines slightly faster in female SOD1 ^{G37R} mice.....	131
3.2.3.3 Motor neuron loss and NMJ denervation are slightly exacerbated in female SOD1 ^{G37R} mice	132
3.2.4 Discussion	135
3.2.5 Material and Methods	137
3.2.5.1 Animals.....	137
3.2.5.2 Repeated in vivo imaging and image analysis.....	137
3.2.5.3 Whole-mount NMJ immunolabeling and motor neuron counts	137
3.2.5.4 Statistical analysis.....	138
3.2.6 Acknowledgments.....	140
3.2.7 References.....	141
CHAPITRE IV Les propriétés des cellules gliales à la JNM sont incompatibles avec la réinnervation dans un modèle murin de la SLA	143
4.1 Rationnelle	143
4.2 Résumé.....	144
4.3 Texte intégral du troisième article	146
4.3.1 Abstract	147
4.3.2 Significance Statement.....	148
4.3.3 Introduction.....	149
4.3.4 Materials and Methods.....	151
4.3.4.1 Animals.....	151

4.3.4.2	Phenotype evaluation	151
4.3.4.3	Sciatic nerve crush surgery	152
4.3.4.5	Sternomastoid calcium imaging.....	153
4.3.4.6	Whole-mount muscle preparations and immunohistochemistry.....	154
4.3.4.7	Gal-3 labelling on non-permeabilized whole-mount muscle tissue.....	155
4.3.4.8	Analysis of NMJ morphology.....	156
4.3.4.9	Muscle cross-section immunohistochemistry	156
4.3.4.10	Experimental design and statistical analyses	157
4.3.5	Results.....	158
4.3.5.1	PSC Ca ²⁺ activity is reduced in the STM of SOD1 ^{G37R} mice	158
4.3.5.2	Increased relative mAChR-dependent PSC activity in the STM.....	159
4.3.5.3	Nerve-induced PSC activity is heterogeneous at individual NMJs in SOD1 ^{G37R} mice.....	162
4.3.5.4	PSC detection of purinergic signals is reduced in the STM of SOD1 ^{G37R} mice	163
4.3.5.5	PSCs express and secrete the phagocytic marker Gal-3 following denervation in WT mice.....	165
4.3.5.6	Some PSCs fail to upregulate Gal-3 following denervation in presymptomatic SOD1 ^{G37R} mice.....	167
4.3.5.7	Similar level of denervation in STM and SOL muscles of symptomatic SOD1 ^{G37R} mice.....	169
4.3.5.8	Lack of Gal-3 at denervated NMJs in symptomatic SOD1 animals.....	171
4.3.5.9	Gal-3 is expressed on some innervated STM NMJs in symptomatic SOD1 mice	173
4.3.5.10	Gal-3 expression on partially innervated NMJs in the STM	173
4.3.5.11	PSCs extend disorganized processes in both the STM and the SOL	174
4.3.5.12	Nerve terminal sprouting is absent in the STM and disorganized in the SOL	176
4.3.6	Discussion	179
4.3.6.1	NMJ repair defects in ALS	179
4.3.6.2	Motor-unit type-dependent and independent diversity in PSC properties.....	180

4.3.6.3 Non-cell autonomy at the NMJ and impact of PSC dysfunction on the disease.	181
4.3.6.4 Role of Gal-3 in ALS	182
4.3.6.5 Conclusion	183
4.3.7 Acknowledgements	184
4.3.8 References	185
CHAPITRE V : Discussion	190
5.1 Résumé des résultats	190
5.2 L'instabilité des terminaisons axonales dans la SLA: un processus autonome ou non autonome?	191
5.2.1 L'instabilité du cytosquelette et le transport axonal	191
5.2.1.1 Dysfonction du transport axonal antérograde	192
5.2.1.2 Dysfonction du transport axonal rétrograde	192
5.2.1.3 Désassemblage du cytosquelette d'actine	193
5.2.2 L'altération du métabolisme énergétique : un lien entre la perte de JNMs, la taille de l'axone et la vulnérabilité sélective	195
5.2.2.1 L'impact d'un déficit énergétique	195
5.2.2.2 La taille de l'arborisation axonale et le métabolisme énergétique	196
5.2.2.3 La SOD1 mal-repliée et l'altération de la fonction mitochondriale	197
5.2.3 Les CSPs : un élément crucial régulant la stabilité et la réinnervation	199
5.2.3.1 L'altération de la signalisation calcique	200
5.2.3.2 La réponse inadéquate à la dénervation et l'impact sur la réinnervation	201
5.2.3.3 Les CSPs et la vulnérabilité sélective	202
5.2.3.5 Les CSPs contribuent-elles pour autant à la perte de JNM et à la SLA?	204
5.2.4 Et les autres types cellulaires présents à la JNM?	206
5.3 La ressemblance avec l'élimination synaptique postnatale	209
5.3.1 Désassemblage sélectif du cytosquelette	210
5.3.2 Un lien entre l'activité synaptique et l'instabilité des JNMs?	212
5.3.2 L'implication des CSPs et des récepteurs purinergiques	216
5.4 Qu'en est-il des autres gènes associés à la SLA?	219
5.4.1 Altérations précoces de la JNM dans les modèles non-SOD1	219

5.4.2 Rôles potentiels de TDP-43 à la JNM.....	220
5.4.2.1 TDP-43 régule le transport d'ARN messenger et est localisé au niveau des JNMs	220
5.4.2.3 TDP-43 régule la régénérescence des fibres musculaires et s'y agrège durant la SLA.....	222
5.4.3 Un gain de fonction axonale toxique de FUS dans la SLA	223
5.5 Implications cliniques	225
5.5.1 Préserver les JNMs dans la SLA.....	225
5.5.2 Le développement des biomarqueurs neuromusculaires	227
5.5.3 L'importance de l'étude de la JNM humaine	228
5.6 Conclusion	232
6. Bibliographie.....	233
Annexe 1 : Opposite Synaptic Alterations At The Neuromuscular Junction In An Als Mouse Model: When Motor Unit Matters	i
Annexe 2 : Early and Persistent Abnormal Decoding by Glial Cells at the Neuromuscular Junction in an ALS Model	xlviii

Liste des tableaux

<i>Tableau 1.1 : Description des types de biomarqueurs dans le contexte de la SLA.</i>	32
<i>Table 2.1: Key Ressource Table</i>	111
<i>Table 3.1: Effect of time, sex and genotype on disease progression in SOD1^{G37R} mice.....</i>	132
<i>Table 3.2: Effect of sex and genotype on neuron survival and innervation in SOD1^{G37R} mice.</i>	134

Liste des figures

Figure 1.1 Symptômes associés à la SLA.....	23
Figure 1.2 Identification des causes génétiques de la SLA au fil des années.	28
Figure 1.3 Dégénérescence des neurones moteurs, inclusions et agrégats cytoplasmiques dans la SLA.	34
Figure 1.4. Principaux mécanismes de toxicité proposés afin d’expliquer la pathogenèse de la SLA.	40
Figure 1.5. Vulnérabilité sélective des différentes populations de motoneurones.	46
Figure 1.6. Les cellules non neuronales sont affectées et contribuent à la SLA.....	49
Figure 1.7. Hypothèses quant à l’origine de la dégénérescence neuronale.	60
Figure 1.8. Structure de la JNM.....	65
Figure 1.9. Modulation de l’activité synaptique par les CSPs.....	69
Figure 1.10. Mécanismes de réinnervation suite à une lésion axonale.....	74
Figure 1.11. Types de bourgeonnement compensatoire.	76
Figure 1.12. Rôle des CSPs aux JNMs dénervées.	78
Figure 1.13. Altérations moléculaires et fonctionnelles précoces aux JNMs dans la SLA.	84
Figure 2.1. NMJs in a single motor-unit of WT/YFP mice are stable.	95
Figure 2.2. Single motor-unit degeneration is initially asynchronous and can last for several weeks in SOD1 ^{G37R} /YFP mice.....	96
Figure 2.3. Asynchronous branch-specific dismantlement precedes synchronous motor-unit degeneration in SOD1 ^{G37R} /YFP mice.	98
Figure 2.4. MUs retracted and expanded constantly during disease progression in SOD1 ^{G37R} /YFP mice.	100
Figure 2.5. Denervation events tended to propagate from the first lost NMJ in the MU, with a higher susceptibility of distal branches.	101
Figure 2.6. Proposed model of NMJ dynamism in ALS.....	102
Figure 2.7 - Supplement 1 for figure 1: Classification of NMJs within single MUs.....	106
Figure 2.8 - Supplement 1 for figure 2: Mating of loxSOD1 ^{G37R} to thy1-YFP-H mice did not alter disease course or mutant SOD1 levels.....	107

Figure 2.9 - Supplement 1 for figure 2.3: Motor-units are mainly fast-fatigable on the surface of the Tibialis anterior in SOD1^{G37R}/YFP mice. 108

Figure 2.10 - Supplement 1 for figure 2.4: Heat-map of all MU changes across all sessions. 109

Figure 2.11 -. Supplement 2 for figure 2.4: Asynchronously lost postsynaptic sites do not become refractory to other MUs 110

Figure 3.1. Sex-specific differences in MU dynamics in female SOD1^{G37R}/YFP mice. 129

Figure 3.2. Motor function declines slightly faster in female SOD1^{G37R}/YFP mice. 131

Figure 3.3. α -motor neuron loss and NMJ denervation are slightly more pronounced in female SOD1^{G37R}/YFP mice at P360. 133

Figure 4.1. Disease progression in SOD1^{G37R} mice and fiber type composition of the Sternomastoid muscle. 152

Figure 4.2. Relative increase of mAChR-dependent PSC activity in SOD1^{G37R} mice at a presymptomatic stage. 160

Figure 4.3. Muscarinic receptor-independent heterogeneity in PSC activity at individual NMJs in presymptomatic SOD1^{G37R} animals 162

Figure 4.4. PSC Ca²⁺ responses elicited by local application of muscarine or ATP 164

Figure 4.5. PSCs express the phagocytic marker Gal-3 following denervation. 166

Figure 4.6. More PSCs fail to express the phagocytic marker Gal-3 in presymptomatic SOD1^{G37R} mice than in WT mice following denervation. 168

Figure 4.7. Experimental design for the morphological analysis. 170

Figure 4.8. Paradoxical expression of Gal-3 in the STM and the SOL of symptomatic SOD1^{G37R} mice 172

Figure 4.9. Gal-3 in PSCs associated with nerve terminals on partially innervated NMJs in the STM of symptomatic SOD1^{G37R} mice. 174

Figure 4.10: Abnormal and disorganized nerve terminal sprouting and PSC process extension in the STM and the SOL of symptomatic SOD1^{G37R} mice 177

Figure 5.1. Mécanismes autonomes et non autonomes contribuant à l'instabilité des terminaisons axonales dans la SLA. 194

Figure 5.2. Rôles des enzymes clivant les microtubules dans la morphogénèse neuronale. .. 213

Figure 5.3. Mécanismes analogues entre l'élimination synaptique postnatale et le démantèlement des JNMs dans la SLA? 217

Figure 5.4. Différences morphologiques entre les JNMs humaines et les JNMs murines. 230

Liste des sigles

Ach : Acétylcholine

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

ADN : Acide déoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

APP : Protéine précurseure de l'amyloïde (« Amyloid precursor protein »)

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

Clip-Seq : « Cross-linking immunoprecipitation »

CHMP2B : « Charged multivesicular body protein 2B »

CSM : Cellule de Schwann axonale myélinisante

CSP : Cellule de Schwann périssynaptique

C9ORF72 : « Chromosome 9 open reading frame 72 »

Dok-7 : « Docking protein 7 » ou « Downstream Of Tyrosine Kinase 7 »

EMG : Électromyogramme

EAAT2 : « Excitatory amino acid transporter 2 »

FF : Rapide fatiguable (« Fast-fatigable »)

FGF: « Fibroblast growth factor »

FGFBP1: « FGF-binding protein 1 »

FR : Rapide résistante à la fatigue (« Fast-fatigue-resistant »)

FTD : Démence fronto-temporale (« Fronto-temporal dementia »)

FUS : « Fused in liposarcoma »

Gal-3 : Galectine-3

GluR2 : « Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 »

hiPSC : cellules souches pluripotentes humaines induites (« human induced pluripotent stem cells »)

JNM : Jonction neuromusculaire

LRP4 : « Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 4 »

mAChR : Récepteur muscarinique à l'acétylcholine

nAChR : Récepteur nicotique à l'acétylcholine
MHC : Chaîne lourde de myosine (« Myosin heavy-chain »)
miR-206 : Micro ARN interférant 206
mPTP : Pore de perméabilité transitoire mitochondrial « mitochondrial permeability transition pore »
MuSK : « Muscle-specific kinase »
OPTN : Optineurine
PPM : Potentiel de plaque motrice
P2YR : Récepteur purinergique de type métabotrope
SEMA3A : Sémaphorine 3A
S : Lente (« Slow », en parlant des types d'unité motrice ou de JNMs)
SLA : Sclérose latérale amyotrophique
SLAf : Sclérose latérale amyotrophique familiale
SLAs : Sclérose latérale amyotrophique sporadique
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
SOD1 : Cu/Zn Superoxyde dismutase 1
SQSTM1 : p62/Sequestosome-1
TBK1 : « TANK-binding kinase 1 »
TDP-43 ou *TARDBP* : « Tar-DNA binding protein 43 »
TUBA4A : Tubuline α 4A
UBQLN2 : Ubiquilin-2
vAChT : Transporteur vésiculaire de l'ACh
VCP : « valosin-containing protein »
VDAC : « voltage-dependant anion channel »

Liste des abréviations

Etc. : Et cætera

Motoneurone : Neurone moteur

Stress-RE : Stress du réticulum endoplasmique

À maman,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Richard Robitaille, pour m'avoir guidé à travers ce projet de recherche, mes cours, la rédaction d'articles et pour m'avoir constamment donné l'opportunité de repousser mes limites et de relever de nouveaux défis. Votre support et vos conseils m'auront permis d'apprendre continuellement, tandis que votre bonne humeur et votre attitude positive auront su rendre le parcours agréable. Merci encore de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et pour toutes ces belles années!

Ensuite, je tiens à remercier tous les membres présents et passés de la TEAM ALS du laboratoire pour leur grand esprit d'équipe et pour ne jamais avoir hésité à partager leur expertise et leurs opinions sur nos travaux. Tout d'abord, je tiens à remercier Elsa Tremblay, pour son aide, sa collaboration, son esprit critique et pour amener quotidiennement rire et énergie au laboratoire. Je remercie également les deux plus-si-nouvelles recrues, Frédéric Provost et Sandrine Marchand, pour leur enthousiasme, leurs idées novatrices et leur aide dans tous les aspects de la vie de laboratoire. Je remercie également tous les stagiaires ayant contribué aux divers projets sur la SLA, Caroline Favron-Godbout, Gabrielle Normandin, et spécialement Frédéric « FF » Fiore pour son aide sur l'un des aspects de mon projet de doctorat qui ne peut malheureusement pas être inclus dans la présente thèse. Je tiens également à remercier Julie Pépin pour son assistance technique constante, mais aussi pour Neige-Folle, « Le seigneur est dans le moteur », 1%, le rotarod allemand et toutes les autres niaiseries que je n'ai pas le temps d'énumérer ici. Je tiens aussi à remercier sincèrement Joanne Vallée, notre agente de recherche dévouée, pour m'avoir appris bon nombre de techniques que je maîtrise aujourd'hui, pour son support logistique, mais aussi pour m'avoir enseigné l'art de faire des gaffes en bonne et due forme, et surtout, pour m'avoir enduré à chaque fois que je suis arrivé à côté de son bureau en disant : « Jooaaaaanne... Le (pièce d'équipement) vient de briser! ». Finalement, je tiens à remercier la fondatrice de TEAM ALS, Danielle « Duchesse » Arbour, pour toute l'aide qu'elle m'a apportée au courant de ma thèse. Que ce soit par ses commentaires constructifs, son regard critique, son assistance pour plusieurs expériences, son sens de l'organisation légendaire ou son oreille attentive durant les moments plus difficiles, Danielle aura su m'aider du début à la fin, et pour cela je l'en remercie.

Je tiens également à remercier tous les autres membres présents et passés du laboratoire, notamment Sébastien « ***** » Barbat, Anthony Bosson, Ayman Moustaine, Houssam Darabid, Anna Perez, Noam Krief et Ouafa Benzina, pour leur support et leurs commentaires constructifs au courant de mes études doctorales. Je tiens spécialement à remercier Alexandre St-Pierre-See pour les innombrables discussions sur la microscopie, l'analyse des données ou le monde de la science en générale, et pour m'avoir appris qu'il est possible de trouver une façon de répondre à n'importe quelle question en science lorsqu'on prend le temps d'y réfléchir. Je tiens également à remercier mes marraines, Dre Christine Vande Velde et Dre Adriana Di Polo pour leur support constant, leur regard critique et leurs commentaires constructifs et pour avoir directement contribué à la réalisation des travaux présentés dans cette thèse.

Je tiens également à remercier la Société canadienne pour la SLA, les Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) et le fond Catherine Fradette pour leur soutien financier et pour avoir cru en ce projet et en ma capacité à le mener à terme.

Finalement, je tiens à remercier ma famille et mes amis pour leur support et leur aide constante durant ces longues années d'études. Leur présence fut essentielle afin de relativiser et de voir au-delà des embûches et des obstacles propres à tous projets de recherche. Notamment, je ne peux passer sous silence l'aide inestimable que ma conjointe et partenaire de vie, Audrée Lachance, m'a apportée au courant de mes années d'études. Que ce soit par son écoute, son regard externe (clinique), ses encouragements ou sa compréhension, Audrée m'aura accompagné à travers toutes les étapes du cursus. Je crois sincèrement que rien de tout cela n'aurait été possible sans elle. Ma réussite est en partie la sienne, et je ne saurais dire à quel point je suis heureux de la partager avec elle.

CHAPITRE I : Introduction

1.1 La sclérose latérale amyotrophique

1.1.1 Présentation clinique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative affectant les neurones moteurs supérieurs et inférieurs. Le neurologue français Jean-Marie Charcot (1825-1893) conféra ce nom à la pathologie en 1869 (Charcot and Joffroy, 1869) en référence à l'atteinte et la dégénérescence caractéristique de ces deux types de motoneurones, qu'il détailla tant au niveau clinique qu'anatomique. Le terme « sclérose latérale » réfère à la formation de tissu cicatriciel au niveau des colonnes latérales de la moelle épinière (voie corticospinale) due à la dégénérescence des axones des motoneurones supérieurs, situés dans la couche V du cortex moteur. Le terme « amyotrophique » renvoie quant à lui à l'atrophie musculaire issue de la dégénérescence des motoneurones inférieurs, situés dans la corne antérieure de la moelle épinière et les noyaux moteurs du tronc cérébral, et de leurs connexions avec les muscles squelettiques, les jonctions neuromusculaires (JNMs).

Presque 150 ans plus tard, la SLA, également connue sous les noms de *maladie de Lou Gherig* aux États-Unis et de *maladie des neurones moteurs* au Royaume-Uni, demeure une maladie neurodégénérative fatale, caractérisée par une progression fulgurante, pour laquelle peu de traitements sont disponibles. Plus de 3000 patients au Canada (ALS-Society-of-Canada, 2017) et 200 000 à travers le monde (Arthur et al., 2016) seraient actuellement affectés par la SLA. Le risque de développer la pathologie sur la durée d'une vie s'évalue à 1:350 – 400 (Hardiman et al., 2011; Kiernan et al., 2011), en faisant l'une des maladies neuromusculaires les plus communes.

1.1.1.1 Symptomatologie

La présentation clinique de la SLA varie considérablement d'un patient à l'autre. De manière générale, la SLA se manifeste par l'apparition focale, et souvent asymétrique, de symptômes moteurs non spécifiques. L'atteinte des motoneurones supérieurs se traduit typiquement par une spasticité, une hyperréflexie et des crampes tandis que l'atteinte des

motoneurones inférieurs se manifeste initialement par des fasciculations ainsi qu'une atrophie et une faiblesse musculaire (Figure 1.1a). Bien qu'initialement circonscrits à un muscle ou un groupe de muscles, ces faiblesses progressent rapidement vers les muscles adjacents et controlatéraux menant inévitablement à une paralysie complète de presque tous les muscles squelettiques (Ravits and La Spada, 2009). L'expression anglophone « relentlessly progressive », se traduisant par progression inexorable, décrit probablement le plus fidèlement l'évolution la SLA (Kiernan et al., 2011; Swinnen and Robberecht, 2014). En effet, seulement 15 à 20% des patients survivent au-delà des 5 années suivant le diagnostic, et 5 à 10 % des patients survivent plus de 10 ans (Chio et al., 2009; Turner et al., 2009).

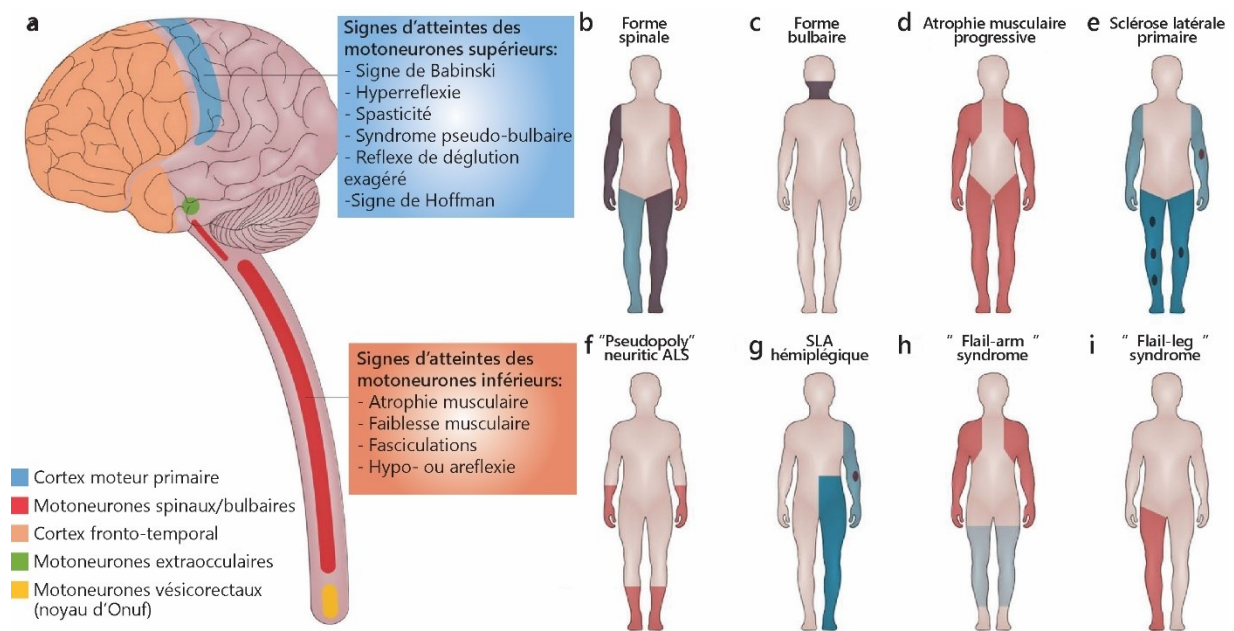


Figure 1.1 Symptômes associés à la SLA. (a) Schéma représentant les régions du système nerveux affectées dans la SLA, et les symptômes leur étant associés. Les motoneurones supérieurs situés dans le cortex moteur (bleu) et les motoneurones inférieurs du tronc cérébral et de la moelle épinière (rouge) sont préférentiellement affectés. Les neurones du cortex fronto-temporal (orange) sont également fréquemment affectés, menant à des symptômes s'apparentant à la démence fronto-temporale. Les motoneurones extraoculaires (vert) et vésicorectaux (jaune) sont résistants à la pathologie, n'étant affectés qu'à des stades très tardifs. (b-i) Présentation clinique des différentes formes de la SLA. Le rouge indique la présence de signes d'atteinte des motoneurones inférieurs, alors que le bleu indique la présence de signes d'atteinte des motoneurones supérieurs. Le brun représente une atteinte conjointe des deux types de motoneurones. La forme spinale et la forme bulbaire sont les plus fréquentes. Adapté de Swinnen and Robberecht (2014). Droits de reproduction obtenus de Springer Nature et Copyright Clearance Center.

Plusieurs formes peuvent être identifiées en fonction du site d'apparition des premiers symptômes. Principalement, on distingue la forme spinale (~65% des patients), la forme bulbaire (~30% des patients), et la forme respiratoire (~5% des patients) (Figure 1.1b-i)

(Hardiman et al., 2011; Kiernan et al., 2011; Swinnen and Robberecht, 2014). La forme spinale est caractérisée par une atteinte initiale des muscles innervés par la moelle épinière menant à la paralysie progressive des membres et du tronc. Typiquement, les muscles les plus distaux sont affectés en premier. La forme bulbaire affecte plutôt les muscles orofaciaux, innervés par les motoneurones du tronc cérébral, causant ainsi des difficultés d'élocution et de déglutition. Quant à elle, la forme respiratoire est caractérisée par une atteinte initiale du diaphragme et des muscles respiratoires accessoires. Finalement, une atteinte pure des motoneurones supérieurs ou inférieurs spinaux caractérise certaines variantes rares de la SLA, respectivement nommées sclérose latérale primaire ou amyotrophie musculaire progressive.

Bien que traditionnellement vue comme une maladie neurologique n'affectant pas la cognition et le comportement, des études récentes ont démontré un lien étroit entre la SLA et la démence fronto-temporale (Ling et al., 2013). Ce lien découle notamment de l'identification de causes génétiques et de lésions histopathologiques communes aux deux maladies (Neumann et al., 2006; DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011; Kim et al., 2013). Bien que la présente thèse se concentre sur la composante motrice de la SLA, il est tout de même important de mentionner qu'environ 50% des patients atteints de SLA développent également des troubles cognitifs, dont 15% remplissent le critère diagnostique pour la démence fronto-temporale (Phukan et al., 2012; Swinnen and Robberecht, 2014; Woolley and Strong, 2015).

1.1.1.2 Diagnostic

L'hétérogénéité dans la présentation de la SLA et l'absence de test diagnostique spécifique rendent le diagnostic différentiel de SLA difficile et long. Les neurologues doivent s'en remettre à un examen neurologique et des électromyogrammes (EMG) afin d'évaluer la présence de signes d'atteinte des motoneurones supérieurs et inférieurs. Le nombre de régions affectées, la concordance entre les signes d'atteinte des motoneurones supérieurs et inférieurs, et l'observation d'une progression déterminent le degré de certitude envers le diagnostic selon les critères diagnostiques d'El Escorial modifié (Brooks et al., 2000) et d'Awaji (de Carvalho et al., 2008). Cependant, le diagnostic de la SLA est dit un « diagnostic d'exclusion » en raison de la nature non spécifique des symptômes et de l'existence de nombreuses pathologies pouvant l'imiter (Hardiman et al., 2011; Vucic et al., 2014). Une série d'analyses de laboratoire et de

tests de neuro-imagerie viennent donc compléter l'examen neurologique afin d'éliminer toute autre pathologie confondante. En raison de ces nombreuses investigations et d'une présentation parfois partielle des symptômes durant les premiers stades de la maladie, le délai entre l'apparition des premiers symptômes et le diagnostic définitif est en moyenne de 9 à 15 mois (Chio, 1999; Al-Chalabi and Hardiman, 2013).

1.1.1.3 Épidémiologie

L'incidence annuelle de la SLA est d'environ 2 pour 100 000 personnes à l'échelle mondiale (Chio et al., 2013). Cependant, cette statistique tend à sous-évaluer le risque de développer la SLA puisqu'elle se manifeste majoritairement dans une fenêtre d'âge restreinte. En effet, les premiers symptômes de la SLA apparaissent en majorité entre les âges de 45 et 65 ans, bien que certains cas puissent se manifester dans la vingtaine ou chez les octogénaires. Il est donc plus représentatif de parler du risque à l'échelle d'une vie de développer la SLA (« lifetime risk ») qui s'évalue à 1 :350-400 (Hardiman et al., 2011; Kiernan et al., 2011).

Les hommes semblent légèrement plus susceptibles de développer la SLA, avec une incidence de 1.2 à 1.5 homme pour une femme (McCombe and Henderson, 2010; Al-Chalabi and Hardiman, 2013). Cette différence semble en partie liée à une influence du sexe sur l'âge d'apparition des premiers symptômes. En effet, le ratio d'incidence homme-femme est de 3.98 :1 pour les cas se manifestant avant 49 ans alors qu'il n'est que de 1.63 pour 1 lorsque les symptômes apparaissent après l'âge de 55 ans. Le ratio atteint 1 :1 chez les octogénaires (McCombe and Henderson, 2010) . Cet effet du sexe sur l'âge d'apparition de la SLA explique ainsi pourquoi le risque à l'échelle d'une vie est similaire entre les hommes (1 :350) et les femmes (1 :400) (Hardiman et al., 2011; Kiernan et al., 2011). Le sexe semble également affecter le site de déclenchement de la SLA, la forme bulbaire étant largement plus fréquente chez les femmes selon la majorité des études (McCombe and Henderson, 2010).

La majorité des études épidémiologiques sur la SLA se sont concentrées sur les populations caucasiennes de descendance européenne. Ainsi, peu d'informations sont disponibles sur l'influence de la localisation géographique ou de l'origine ethnique sur le développement de la SLA. Bien que certaines études suggèrent une plus faible incidence dans les populations d'origine hispanique et asiatique, ces différences pourraient simplement être

liées à des différences démographiques au sein des populations étudiées (Cronin et al., 2007; Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Rechtman et al., 2015; Marin et al., 2017).

1.1.1.4 Traitements

L'annonce du diagnostic de la SLA est souvent dévastatrice pour les patients et leur famille en raison de son caractère fatal et de l'absence de traitements efficaces. Seuls deux traitements sont actuellement approuvés pour la SLA, et leur efficacité est modeste dans la plupart des cas. Le premier traitement pour la SLA, le riluzole (Rilutek®), fut approuvé en 1996 (Lacomblez et al., 1996), mais il ne prolonge la vie des patients que de 3 à 6 mois en moyenne (Miller et al., 2012). Plus récemment, l'edaravone (Radicava® ou Radicut®) a été approuvé en 2015 au Japon, en 2017 aux États-Unis et en 2018 au Canada. L'Edaravone ralentit le rythme de progression de la SLA de 30% en moyenne, mais uniquement chez les patients étant à un stade précoce de la maladie, mais présentant une progression rapide (Writing and Edaravone, 2017). Bien qu'il soit encore tôt, des études récentes suggèrent que ce ralentissement se traduirait par une augmentation significative de la survie chez ces patients (Writing Group On Behalf Of The Edaravone Als 19 Study, 2017; Okada et al., 2018). Des études post-commercialisation à grande échelle permettront certainement de mieux cerner le contexte clinique dans lequel l'Edaravone prodigue des effets bénéfiques.

1.1.2 Étiologie

Comme pour plusieurs autres maladies neurodégénératives, les causes de la SLA sont complexes et élusives. Chez les cas dits « familiaux » (SLAf; ~5 à 10%), l'existence d'un historique familial pointe vers une cause génétique héréditaire à la maladie. Cependant, plus de 90% des patients, dits « sporadiques » (SLAs), n'ont aucun antécédent familial. Des mutations génétiques peuvent néanmoins être à l'origine de ces cas, puisqu'environ 15% des patients atteints de SLAs sont porteurs de mutations associées à la SLAf (Taylor et al., 2016; Chia et al., 2018). Pour ces patients, l'absence d'historique familial pourrait simplement être liée à un déclenchement tardif ou au décès de leurs ancêtres porteurs avant l'apparition des symptômes, à une mutation *de novo*, ou à une plus faible pénétrance de ces mutations (Turner et al., 2013; Renton et al., 2014; Swinnen and Robberecht, 2014). Néanmoins, la cause des 85% des cas de

SLAs restants demeure nébuleuse. Bien que plusieurs hypothèses aient été émises, aucune n'a à ce jour été liée de manière définitive à la SLA. Notamment, certains facteurs environnementaux pourraient interagir avec des prédispositions génétiques pour causer la SLA (Swinnen and Robberecht, 2014; Powers et al., 2017). D'autre part, l'existence de causes polygéniques, où chaque mutation individuelle n'augmenterait que légèrement le risque de développer la SLA, ne peut être écartée (van Blitterswijk et al., 2012; Turner et al., 2013; Renton et al., 2014).

1.1.2.1 Causes génétiques

À ce jour, plus de 50 gènes sont potentiellement associés à la SLA, dont 29 ayant une association ferme et globalement acceptée par la communauté scientifique (Chia et al., 2018). Des mutations dans ces gènes expliquent plus de 70% des cas de SLAf et environ 15% des cas de SLAs (figure 1.2). De nombreuses mutations dans chacun de ces gènes peuvent causer la SLA, complexifiant l'identification du mécanisme pathologique (section 1.2.1.3). À titre d'exemple extrême, plus de 150 mutations ont été identifiées dans le gène *SOD1* encodant une protéine n'ayant que 153 acides aminés (Taylor et al., 2016). Les gènes les plus fréquemment étudiés par la communauté scientifique sont *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9ORF72*.

SOD1 fut le premier gène à être associé à la SLA, en 1993 (Rosen, 1993), et cause environ 20% des cas de SLAf et 2% des cas de SLAs. Les mutations dans le gène *SOD1* induisent un mauvais repliement de l'enzyme Cu/Zn superoxyde-dismutase 1 (SOD1), lui conférant des propriétés toxiques diverses qui seront présentées en détail à la section 1.2.2.2. Encore aujourd'hui, *SOD1* est l'un des gènes les plus étudiés dans le contexte de la SLA, ayant servi à générer un grand nombre de modèles animaux de la maladie.

Ce n'est qu'en 2008-2009 que survint la prochaine découverte majeure sur la génétique de la SLA avec l'identification de mutations dans les gènes *TARDBP* et *FUS* (Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009), responsables d'environ 4-5% des cas de SLAf. Ces deux gènes encodent deux protéines régulatrices liant les ARNs messagers (ARNm), nommées respectivement « Tar-DNA binding protein 43 » (TDP-43) et « FUSed in liposarcoma » (FUS). La découverte de nombreuses mutations dans un domaine favorisant l'agrégation de ces deux protéines (« Prion-like domain ») et de la présence

de TDP-43 au sein d'inclusions cytoplasmiques dans les motoneurones pour 97% des patients atteints de la SLA (Neumann et al., 2006) a donné naissance à un immense domaine de recherche cherchant à identifier les changements dans le métabolisme des ARNm dans la SLA.

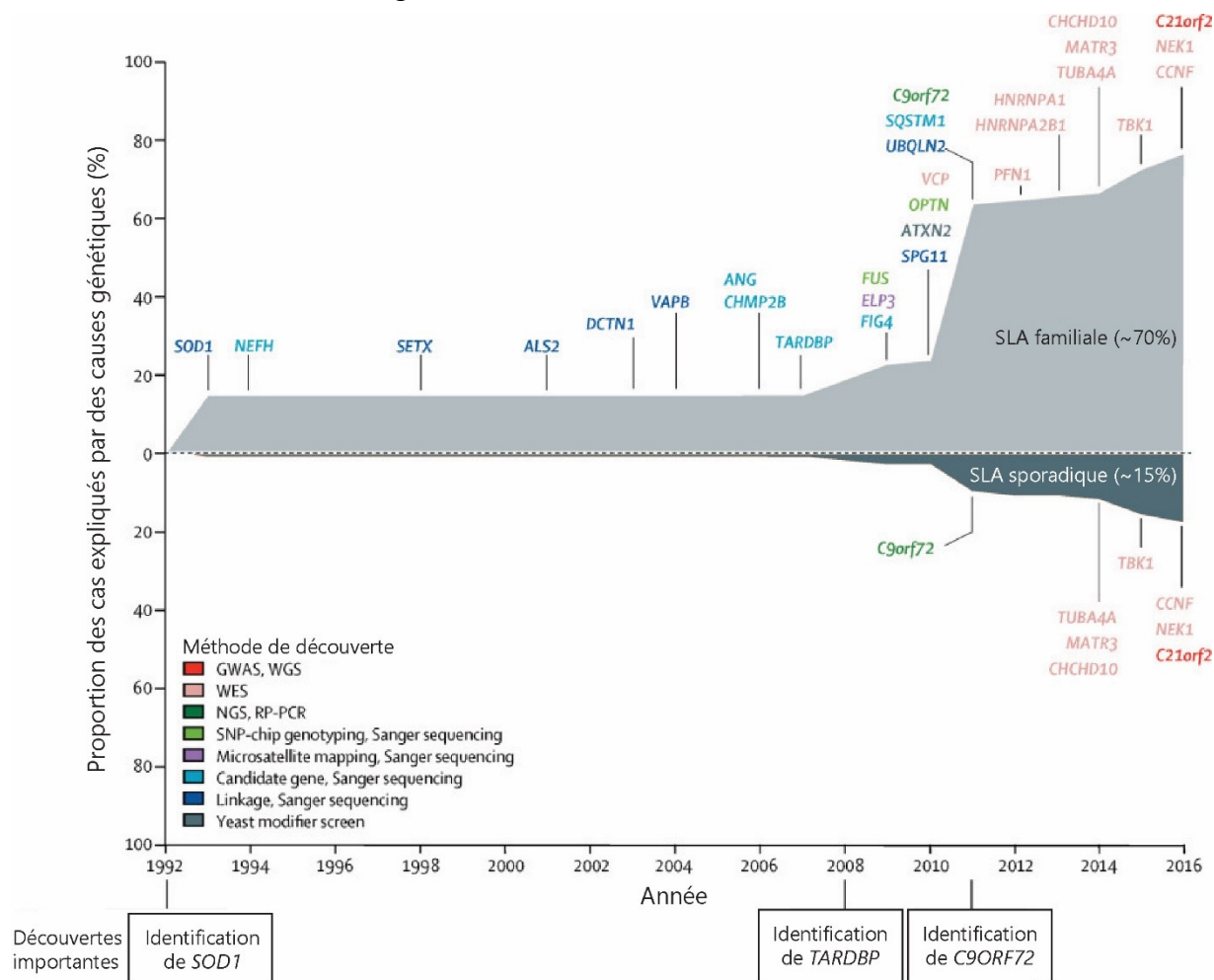


Figure 1.2 Identification des causes génétiques de la SLA au fil des années. Graphique représentant l’historique (jusqu’à 2016) des découvertes des mutations génétiques associées à la SLA en fonction de leur prévalence au sein des cas familiaux (SLAf) et sporadiques (SLAs) de SLA. Les couleurs représentent la technologie et la méthodologie utilisée afin de dépister ces mutations. Noter l’augmentation rapide du nombre de gènes associés à la SLA dans les années récentes (2008-2016) grâce à l’avènement de nouvelles technologies. Adapté de (Chia et al., 2018). Droits de reproduction obtenus de Elsevier et Copyright Clearance Center.

Finaleme nt en 2011, une autre avancée majeure eut lieu grâce à l’identification de l’expansion d’une séquence répétée de six nucléotides (GGGGCC) dans le premier intron d’un gène ayant alors une fonction inconnue, portant le nom de « Chromosome 9 Open Reading Frame 72 » (*C9ORF72*) (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Cette mutation

est à l'origine de 25 à 40% des cas de SLAf et de 10% des cas de SLAs, en faisant la cause de la SLA la plus fréquente connue à ce jour (Taylor et al., 2016; Chia et al., 2018).

1.1.2.2 Facteurs environnementaux

Une association entre plusieurs facteurs environnementaux et la SLA ont été suggérées, mais la rareté des études épidémiologiques et les limites méthodologiques auxquelles elles font face limitent notre capacité à établir des liens directs. Des liens entre la SLA et l'activité physique, les pesticides, le tabagisme ou le fait d'avoir servi dans les forces armées durant un conflit ont tous été suggérés (voir (Al-Chalabi and Hardiman, 2013) pour une revue détaillée). Cependant, plusieurs de ces études ont pour limite d'avoir étudié une population homogène (activité physique et pesticides notamment) ou de présenter des résultats contradictoires (tabagisme). Notamment, plusieurs études suggèrent un lien entre l'activité physique et la SLA, mais ce lien semble restreint aux activités ludiques (le soccer en Italie par exemple (Chio et al., 2005)) et aucun lien « dose-réponse » n'a pu être établi (Huisman et al., 2013). Ces résultats suggèrent donc que l'activité physique coïnciderait avec d'autres facteurs ou prédispositions plutôt que causerait la SLA en soi.

Une association intéressante découle de l'observation d'une incidence anormalement élevée de cas de SLA et de maladie de Parkinson dans la population Chamorros de l'île du Pacifique de Guam (Kurland and Mulder, 1954). Une cyanotoxine, la β -methylamino-L-alanine (BMAA), présente dans les graines et les racines des *Cycadales*, pourrait être à l'origine de ces cas de maladies neurodégénératives en raison de sa présence dans l'alimentation des Chamorros et de sa bioaccumulation au sein de plusieurs espèces animales de l'île (Bradley and Mash, 2009). Bien que d'autres causes, tel un effet fondateur, soient souvent énoncées afin d'expliquer ce phénomène (Steele and McGeer, 2008), plusieurs études récentes démontrent un effet neurotoxique du BMAA (Cox et al., 2016; Powers et al., 2017). Une hypothèse intéressante serait que l'exposition à cette toxine environnementale couplée à une prédisposition génétique dans la population Chamorro pourrait être à l'origine de ces cas de maladies neurodégénératives.

Somme toute, l'exemple de Guam reflète bien l'hypothèse actuelle concernant l'influence des facteurs environnementaux sur la SLA. C'est-à-dire que l'exposition à des facteurs environnementaux interagit avec diverses prédispositions, d'origine mono- ou

polygénique, au fil du temps pour affecter le risque d'un individu de développer la SLA (Al-Chalabi and Hardiman, 2013).

1.1.3 Les enjeux liés à la SLA

À la lumière des connaissances cliniques actuelles sur la SLA, plusieurs enjeux devront être surmontés afin d'améliorer la qualité de vie des patients en étant atteints. Notamment, les enjeux liés à la découverte de nouveaux traitements et au développement de biomarqueurs pour la SLA sont intimement liés et mobilisent autant la communauté scientifique que la communauté clinique.

1.1.3.1 La découverte de nouveaux traitements

Il peut paraître évident de parler du besoin de développer de nouveaux traitements dans une thèse de recherche portant sur une maladie incurable. Cependant, cet enjeu est particulièrement important dans le contexte de la SLA. En effet, malgré les avancées technologiques, la découverte de nombreux nouveaux gènes, le raffinement dans les méthodes d'évaluation de la progression et une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent la maladie, les vingt années ayant suivi la commercialisation du Riluzole furent jalonnées par l'échec de plus de 50 essais cliniques majeurs (Hardiman and van den Berg, 2017). Majoritairement dans les phases tardives de leur développement, ces échecs étaient liés à un manque d'efficacité des traitements (Mitsumoto et al., 2014). Les modèles expérimentaux et animaux furent fréquemment mis en cause, mais il est maintenant clair que d'autres facteurs semblent avoir contribué à ces échecs. Notamment, le manque de concordance entre les traitements expérimentaux et les essais cliniques, et l'hétérogénéité entre les patients atteints de la SLA sont des éléments de réflexion.

Bon nombre d'études expérimentales traitaient les modèles animaux de la SLA avant l'apparition des premiers symptômes, généralement par simplicité ou en raison de la courte durée de la phase symptomatique dans certains modèles. Or, tel que mentionné précédemment, aucun test diagnostique ne permet de dépister la SLA avant l'apparition des symptômes et le délai pour établir un diagnostic est en moyenne de 9 à 15 mois. Ainsi, bien qu'elles soient

essentielles à notre compréhension de la pathogenèse de la SLA, l'applicabilité de ces études au contexte humain n'est pas garantie.

D'autre part, les patients atteints de la SLA représentent une population hétérogène en raison de ses nombreuses différentes étiologies et de sa présentation clinique variable. Un traitement efficace chez un modèle animal pourrait donc n'être bénéfique que chez un sous-groupe précis de patients (Bakkar et al., 2015). L'Edaravone représente un exemple probant de cette réalité. En effet, les premières études cliniques sur l'Edaravone dans la SLA n'ont pas démontré d'effet significatif du traitement (Abe et al., 2014). Ce n'est qu'en raffinant les critères d'inclusions afin d'étudier un sous-groupe de patients à un stade précoce et ayant une progression rapide qu'un effet a pu être démontré (Writing and Edaravone, 2017). L'avènement de nouveaux modèles expérimentaux, telle la souris mutante pour *C9orf72* ou les motoneurons dérivés de cellules souches pluripotentes de patients (hiPSC), amènera certainement une plus grande diversité aux études précliniques qui furent pendant longtemps limitées aux modèles *SOD1*. La difficulté demeure toutefois d'identifier ou d'extrapoler le sous-groupe de patients auquel le traitement sera plus bénéfique.

Ces limitations soulignent l'importance de ne pas limiter la recherche préclinique à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques contribuant aux différentes formes de SLA et de leur relation temporelle avec le phénotype clinique permettra certainement de cerner les fenêtres d'intervention thérapeutique des traitements proposés. D'autre part, le développement de biomarqueurs pour la SLA favorisera l'application des études précliniques à un contexte clinique approprié.

1.1.3.2 Le développement de biomarqueurs

Le terme « biomarqueur » fait référence à toute mesure objective permettant d'évaluer un processus biologique, pathologique ou une réponse biologique à un traitement (Biomarkers Definitions Working, 2001). Il est possible d'identifier 5 catégories non exclusives de biomarqueurs pouvant avoir de multiples utilités dans le contexte du développement de traitements pour une maladie (tableau 1).

Tableau 1.1 : Description des types de biomarqueurs dans le contexte de la SLA.

Type de biomarqueur	Description	Utilité dans le contexte de la SLA
Diagnostic	Mesure permettant de catégoriser des individus par la présence ou l'absence d'une maladie ou d'un état physiologique.	<ul style="list-style-type: none"> - Faciliter et accélérer le diagnostic - Réduire les risques de mauvais diagnostic
Pronostic	Mesure permettant de catégoriser les patients selon leur degré de risque de développer une pathologie ou d'informer sur le décours temporel d'une maladie.	<ul style="list-style-type: none"> - Stratifier les patients en fonction de leur rythme de progression attendu.
Prédictif	Mesure permettant de catégoriser les patients selon leur probabilité de réponse à un traitement.	<ul style="list-style-type: none"> - Identifier le sous-groupe de patients susceptible de répondre à un traitement ciblant un aspect particulier de la pathologie.
Pharmacodynamique	Marqueur montrant l'occurrence d'une réponse physiologique chez un patient ayant reçu un traitement.	<ul style="list-style-type: none"> - Stratifier les patients en fonction de leur degré de réponse à un traitement. - Identifier le sous-groupe de patient ayant répondu au traitement <i>post hoc</i>
Progression	Marqueur reflétant l'état de la progression de la maladie chez un patient	<ul style="list-style-type: none"> - Mesurer objectivement la progression de la SLA chez un patient - Mesure substitut pour mesurer l'efficacité d'un traitement lors d'un essai clinique

Adapté de Benatar et al. (2016) et basé sur les définitions du « Food and drug administration » (FDA) aux États-Unis (Biomarkers Definitions Working, 2001). Droits obtenus de John Wiley and Sons et Copyright Clearance Center.

Dans le contexte de la SLA, l'utilisation plus fréquente de biomarqueurs permettrait certainement d'identifier les sous-groupes de patients susceptibles de répondre à un traitement et d'améliorer le taux de succès des essais cliniques (Turner et al., 2009; Gordon and Meininger, 2011; Mitsumoto et al., 2014; Chio and Traynor, 2015). Dans ce but, le développement de biomarqueurs devrait faire partie intégrante des études sur les modèles animaux afin de faciliter l'application des découvertes aux patients atteints de la SLA (Bakkar et al., 2015; Benatar et al., 2016). À titre indicatif, une étude récente a montré que les niveaux d'un peptide issus de la transcription du gène muté de *C9ORF72* pouvaient être mesurés dans le liquide céphalo-rachidien de patients (Gendron et al., 2017). Cette mesure pourrait servir de biomarqueur

pharmacodynamique lors du développement actuel de thérapies géniques visant à réduire l'expression de l'allèle muté chez les patients porteurs de la mutation de *C9ORF72*.

Ensemble, ces besoins cliniques démontrent l'importance d'une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent le développement et la progression de la SLA. Que ce soit afin d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques ou de développer des biomarqueurs, une meilleure appréciation des altérations pathologiques et de leur évolution à l'échelle moléculaire, cellulaire et du réseau neuronal est essentielle.

1.2 Physiopathologie de la SLA

Au niveau histologique, la SLA est caractérisée par une dégénérescence sélective des JNMs et des motoneurons supérieurs et inférieurs, ainsi que par la présence caractéristique d'inclusions ou agrégats cytoplasmiques (Figure 1.3). Les mécanismes physiopathologiques reliant la présence de ces agrégats à la dégénérescence des motoneurons sont complexes, hétérogènes et encore peu compris à ce jour. Plusieurs fonctions cellulaires fondamentales peuvent être affectées selon la cause génétique de la SLA, tels l'homéostasie protéique, le métabolisme des ARNm, la régulation du cytosquelette et la recapture du glutamate (Taylor et al., 2016). Pourtant, ces mécanismes semblent tous converger vers la dégénérescence sélective des motoneurons et la préservation d'autres populations neuronales voisines. Ainsi, malgré l'hétérogénéité et la complexité, certains principes fondamentaux semblent communs à toutes les formes de SLA. Notamment, la vulnérabilité sélective, la contribution des cellules non motoneuronale (non-autonomie cellulaire) et l'atteinte de la JNM représentent des avenues

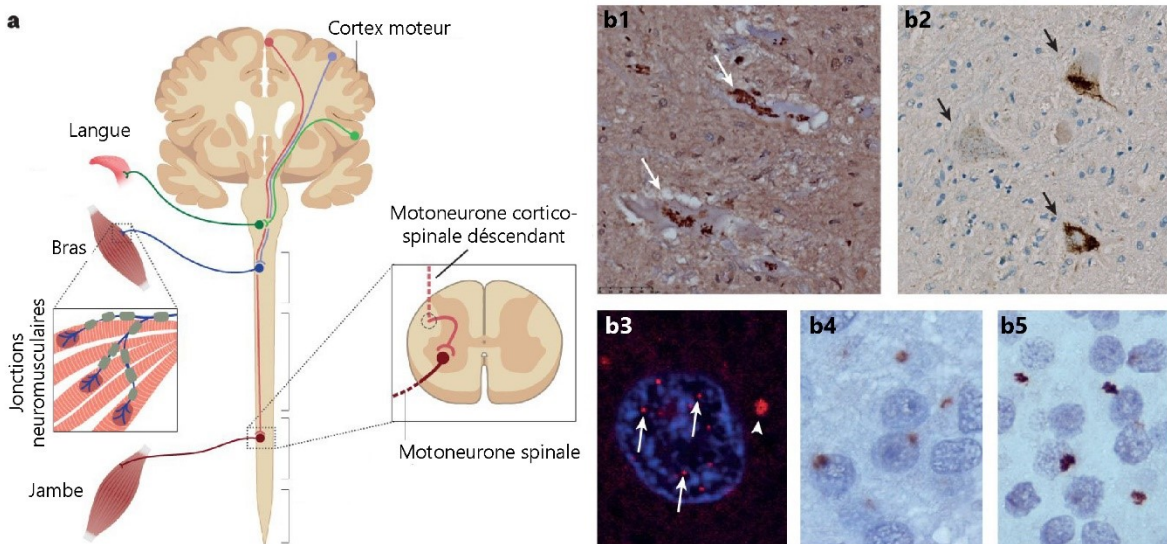


Figure 1.3 Dégénérescence des neurones moteurs, inclusions et agrégats cytoplasmiques dans la SLA. (a) Schéma montrant que les populations de neurones affectés par la SLA, soit principalement les motoneurons supérieurs (corticospinaux) du cortex moteur, les motoneurons inférieurs du tronc cérébral et de la moelle épinière ainsi que leurs JNMs au niveau des muscles squelettiques. (b) Inclusions et agrégats typiques de différentes formes de SLA. (b1) Agrégats cytoplasmiques de SOD1 (flèches) dans les motoneurons spinaux d'un patient atteint de SLA lié à une mutation de SOD1; (b2) Inclusions cytoplasmiques de TDP-43 (flèches) dans les motoneurons spinaux d'un patient atteint de SLA; (b3) foyer d'ARN (« RNA foci ») dans le noyau (flèches) et cytoplasme (tête de flèche) d'un neurone cortical d'un patient atteint de SLA/FTD lié à la mutation de C9ORF72; agrégat de polychaînes du dipeptide GA (b4) ou GR (b5) répété dans le noyau dentelé d'un patient atteint de SLA/FTD lié à la mutation de C9ORF72. Adapté de (Taylor et al., 2016). Droits obtenus de Springer-Nature et Copyright Clearance Center.

intéressantes afin de mieux comprendre la physiopathologie de la SLA. Notamment, par rapport à ce dernier élément, la perte des JNMs est un événement précoce dans la physiopathologie de la SLA dont l'étude pourrait apporter des réponses aux enjeux précédemment mentionnés (voir section 1.2.4.3). En effet, étant localisé au niveau des muscles squelettiques, la JNM est plus facilement observable et accessible que les corps cellulaires des motoneurones.

Évidemment, la dégénérescence corticale s'étend au-delà du cortex moteur chez les patients ou dans les modèles présentant des déficits cognitifs et des symptômes associés à la dégénérescence fronto-temporale. Les facteurs déterminant pourquoi ces neurones sont affectés dans certains cas et non d'autres sont encore méconnus à ce jour. Par souci de concision, la présente section n'abordera la physiopathologie de la SLA qu'en termes d'atteintes des neurones moteurs, bien que plusieurs des concepts et mécanismes puissent probablement être appliqués aux autres neurones pyramidaux du cortex fronto-temporal.

1.2.3 Inclusions, agrégats pathologiques et toxicité

1.2.3.1 Des agrégats hétérogènes

La présence d'agrégats protéiques intra- ou extracellulaire est caractéristique de nombreuses maladies neurodégénératives. Cependant, contrairement à ceux retrouvés dans la maladie d'Alzheimer ou la maladie d'Huntington, les agrégats retrouvés dans la SLA sont caractérisés par leur hétérogénéité (Figure 1.3b). Malgré leur présence ubiquitaire chez tous les patients atteints de SLA, leur composition et localisation varie grandement, entre autres selon l'étiologie de chaque cas. Notamment, la translocation dans le cytoplasme et l'agrégation de TDP-43, une protéine à prédominance nucléaire, est présente dans la grande majorité des cas de SLA (97%), incluant les cas de SLAs et plusieurs cas de SLAf non associés à une mutation du gène *TARBP* (Mackenzie et al., 2007; Ling et al., 2013). Les cas de SLAf associés à des mutations de *SOD1* ou de *FUS* font notablement exception à cette règle, étant plutôt caractérisés par la présence d'agrégats SOD1- ou FUS-positifs majoritairement dans les motoneurones inférieurs (Mackenzie et al., 2007; Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009; Ling et al., 2013). En plus des inclusions TDP-43-positives, la présence de foyer d'ARN agrégé et d'inclusions cytoplasmique contenant des chaînes de dipeptides issus de la transcription et de la translation de l'expansion pathologique de *C9ORF72* caractérise les patients porteurs de cette

mutation (Mackenzie et al., 2014). D'autres composantes fréquentes de ces agrégats sont l'ubiquitine (Leigh et al., 1988), p62/sequestosome 1 (Mizuno et al., 2006; Al-Sarraj et al., 2011) et l'unité p65 du complexe NF- κ B (Swarup et al., 2011a). Finalement, certaines études ont suggéré une présence d'agrégats SOD1-positifs chez des patients atteints de SLAs en absence de mutations de *SOD1* (Bosco et al., 2010; Forsberg et al., 2010; Pokrishevsky et al., 2012) bien que cela ait été réfuté par plusieurs études récentes (Liu et al., 2009; Brotherton et al., 2012; Da Cruz et al., 2017).

Certaines indications suggèrent que le lien entre la présence de ces agrégats et la dégénérescence neuronale n'est pas nécessairement direct. Premièrement, la localisation de certaines espèces d'inclusions dans le SNC ne correspond pas avec le patron de neurodégénérescence. C'est le cas notamment des foyers d'ARN agrégés et des agrégats de chaînes de dipeptides qui sont retrouvés fréquemment, et parfois même préférentiellement, au niveau du cervelet, de l'hippocampe et du néocortex (Mackenzie et al., 2014). De même, les agrégats de SOD1 ne sont que rarement observés dans le cortex moteur (Da Cruz et al., 2017) alors que les agrégats de chaînes de dipeptides sont presque absents des motoneurons inférieurs (Mackenzie et al., 2014; Saberi et al., 2018). Dans un deuxième temps, certaines mutations liées à la SLA peuvent mener à la formation de plusieurs espèces de protéines mal-repliées ne partageant pas nécessairement la même toxicité. C'est le cas notamment de SOD1 et des chaînes de dipeptides où plusieurs espèces peuvent coexister et affecter différemment certaines fonctions cellulaires (Wen et al., 2014; Lopez-Gonzalez et al., 2016; Pickles et al., 2016). Ainsi, bien que la présence d'agrégats intracellulaires soit un signe de dysfonction cellulaire, ceux-ci ne sont peut-être pas la cause directe de la toxicité cellulaire. Le simple fait que la protéine soit mutée ou mal-repliée pourrait en soi être la cause de la dégénérescence neuronale. L'étude des mécanismes de toxicité liés à la présence de ces espèces protéiques mutées permettra sans doute de mieux comprendre si leurs agrégats représentent une structure délétère, un simple sous-produit ou un mécanisme de protection cellulaire.

1.2.3.2 Modèles animaux

Une multitude de modèles animaux transgéniques ont été générés afin d'étudier *in vivo* la formation de ces agrégats et les mécanismes de toxicité y étant associés. De nombreux

organismes différents ont été utilisés selon les besoins expérimentaux et les questions de recherche, allant du nématode *C. Elegans* jusqu'aux mammifères tels la souris (*Mus musculus*) ou le chien. Il n'existe que deux modèles animaux spontanés ayant une maladie s'apparentant à la SLA humaine, la souris *wobbler* et la myélopathie dégénérative chez le chien. Cependant, ces animaux ne présentent pas nécessairement tous les aspects de la SLA humaine et pourraient bien représenter des pathologies connexes (Boillee et al., 2003; Nardone et al., 2016). Ainsi, la majorité des modèles animaux pour la SLA sont basés sur l'insertion dans le génome de l'organisme d'étude d'un gène humain porteur d'une mutation causant la SLA. Ces modèles requièrent souvent la surexpression de la protéine mutée pour développer un phénotype moteur. De manière générale, les souris et les rats (*Rattus norvegicus*) représentent les modèles les plus utilisés, offrant un juste équilibre entre l'aisance des manipulations génétiques pouvant être faites, la vitesse du cycle reproducteur et la ressemblance avec la biologie humaine. Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués à l'aide de souris transgéniques porteuses d'une mutation de *SOD1* (souris *SOD1*). Seuls les principaux modèles *SOD1* ainsi que d'autres modèles murins mentionnés au courant de la thèse seront présentés en détail dans cette introduction. Pour une revue détaillée de la majorité des modèles animaux de la SLA générés avant 2016, j'invite le lecteur à se référer à la revue de littérature par Picher-Martel et al. (2016).

1.2.3.2.1 Modèles murins *SOD1*

Encore aujourd'hui, les souris et les rats *SOD1* sont parmi les modèles animaux les plus couramment étudiés dans le contexte de la SLA, présentant un phénotype moteur robuste et analogue à celui observé chez les patients. En effet, plusieurs des caractéristiques de la pathologie humaine liée à *SOD1* sont reproduites chez ces modèles, dont la dégénérescence des motoneurons supérieurs et inférieurs, la dégradation des JNMs et la présence de nombreux agrégats pathologiques de *SOD1* au sein des motoneurons inférieurs. Plusieurs mutations différentes ont été utilisées, les principales étant la G93A (glycine -> alanine, position 93), la G37R, et la G85R. Pour plusieurs de ces mutations, plusieurs lignées ont été générées, chacune ayant leurs particularités, notamment en fonction de leur fond génétique.

Souris *SOD1*^{G93A}: les souris *SOD1* porteuses de la mutation G93A, générées en 1994 (Gurney et al., 1994), représentent le premier modèle murin de la SLA et sont encore

fréquemment utilisées aujourd'hui. En raison du fort taux d'expression du transgène (20 fois les niveaux endogènes), ces souris développent une forme très agressive de la maladie, les premiers symptômes apparaissant à l'âge de 80 – 90 jours, et progressent rapidement jusqu'à la mort à l'âge de 130 jours. La perte de JNMs et des motoneurons supérieurs sont des événements très précoces, commençant entre 30 – 60 jours (Pun et al., 2006; Ozdinler et al., 2011; Vinsant et al., 2013). Cependant, l'un des inconvénients liés à ce modèle demeure le niveau de surexpression de la protéine mutée, limitant potentiellement la portée de certaines des découvertes faites sur cette lignée.

Souris SOD1^{G37R}: plusieurs lignées de souris SOD1^{G37R} ont été générées par le groupe du Dr. Don W. Cleveland au fil des années (Wong et al., 1995; Boillee et al., 2006b). De manière intéressante, le gène SOD1 humain a été flanqué de sites *LoxP* dans l'une de ces lignées (*loxSOD1^{G37R}*). Cette construction génique permet l'excision sélective du transgène d'un type cellulaire en présence de l'enzyme Cre-recombinase, et a été utilisé afin d'évaluer la contribution de plusieurs types cellulaires à la maladie (section 1.2.3). Dans l'ensemble, ces lignées sont caractérisées par un déclenchement tardif de la maladie et une progression lente. Cette caractéristique en fait un modèle idéal pour l'étude de l'évolution temporelle et de la progression de la maladie. Notamment, la lignée 29 et la lignée « lox », utilisées dans les présents travaux, présentent des symptômes à partir de l'âge de 425-475 jours et 225-300 jours respectivement, et survivent au-delà de 550 et 400 jours respectivement (Mesci et al., 2015; Tremblay et al., 2017).

D'autres lignées d'intérêts sont les SOD1^{G85R} et SOD1^{G127X}. La mutation G85R, ou son équivalent dans le gène murin (G86R), abolissent l'activité dismutase de l'enzyme (Bruijn et al., 1997) permettant ainsi de dissocier l'effet de la mutation de l'effet de la surexpression ubiquitaire de l'enzyme active. Ces souris sont notamment caractérisées par un déclenchement tardif, mais une progression rapide de la maladie. Ces données suggèrent donc un rôle bénéfique d'une augmentation de l'élimination de O₂⁻ et de la réduction du stress oxydatif sur la progression de la SLA. D'autre part, la souris SOD1^{G127X} est caractérisée par l'insertion d'un codon « STOP » prématuré à la position 127, résultant en une protéine tronquée (Jonsson et al., 2004). Cette mutation est notamment utile afin d'étudier les interactions entre la protéine mutée (tronquée) et la SOD1 endogène non mutée (longueur normale) (Grad et al., 2011).

1.2.3.2.2 *Autres modèles murins notables*

Les années suivant la découverte de l'implication des gènes *TARDBP*, *FUS* et *C9ORF72* furent marquées par plusieurs tentatives visant à développer des modèles murins exprimant ces mutations. Cependant, ces tentatives n'ont pas été fructueuses dans la majorité des cas. Plusieurs des modèles *TARDBP* et *FUS* développent notamment des symptômes moteurs développementaux et souvent létaux (Zhou et al., 2010a; Sephton et al., 2014; Sharma et al., 2016), des troubles gastro-intestinaux létaux (Wegorzewska et al., 2009; Herdewyn et al., 2014) ou avaient un phénotype moteur très faible ou incomplet (Swarup et al., 2011b; Xu et al., 2011). Dans de nombreux cas, la surexpression du gène non muté était également suffisante pour induire le même phénotype (Picher-Martel et al., 2016). Ces variations dans le phénotype pourraient entre autres être associées au niveau d'expression du transgène, au promoteur utilisé ou au site d'insertion du transgène. Un modèle intéressant associé à TDP-43 est la souris TDP-43^{Q331K}, développant un phénotype moteur progressif modéré, mais non létaux, une perte de motoneurones inférieurs et de JNMs, et des troubles cognitifs (Arnold et al., 2013). Néanmoins, ce modèle ne reproduit pas parfaitement la pathologie humaine, n'ayant pas d'atteinte majeure des motoneurones supérieurs ni de relocalisation de TDP-43 dans le cytoplasme (Arnold et al., 2013).

Récemment, plusieurs équipes ont tenté de générer des modèles murins basés sur l'expansion pathologique dans le gène *C9ORF72*. Cependant, seulement l'un de ces modèles montre des symptômes moteurs et une dégénérescence neuronale appréciable (O'Rourke et al., 2015; Peters et al., 2015; Jiang et al., 2016; Liu et al., 2016). Bien que ce modèle semble prometteur, des investigations futures seront nécessaires afin de déterminer s'il reproduit les caractéristiques de la SLA causée par l'expansion dans *C9ORF72*. Notamment, certaines inquiétudes ont été soulevées quant au fait que seulement ~60% des animaux (principalement les femelles) développent la pathologie et que le phénotype soit limité au fond génétique utilisé (Liu et al., 2016).

Dans l'ensemble, malgré les nombreux modèles murins de la SLA ayant été générés au fil des années, les souris SOD1 demeurent les modèles ayant le phénotype représentant le plus fidèlement la pathologie humaine. Ainsi, les modèles SOD1 demeurent les plus appropriés afin d'étudier l'influence ou la contribution d'une altération pathologique sur l'apparition et la

progression de la maladie. Ceux-ci ne sont pas sans limitations cependant; les mécanismes moléculaires et cellulaires peuvent potentiellement différer de ceux associés à d'autres gènes. La validation dans d'autres modèles ou dans des échantillons de patients demeure donc cruciale.

1.2.1.3 Mécanismes de toxicité

L'apparition de ces nombreux modèles animaux a permis l'étude détaillée des mécanismes de toxicité associés aux mutations causant la SLA. Sans surprise, la grande diversité des gènes pouvant causer la SLA mène à une encore plus grande diversité de dysfonctions cellulaires pouvant émaner de leur mutation. Dans plusieurs des cas, les mutations causant la

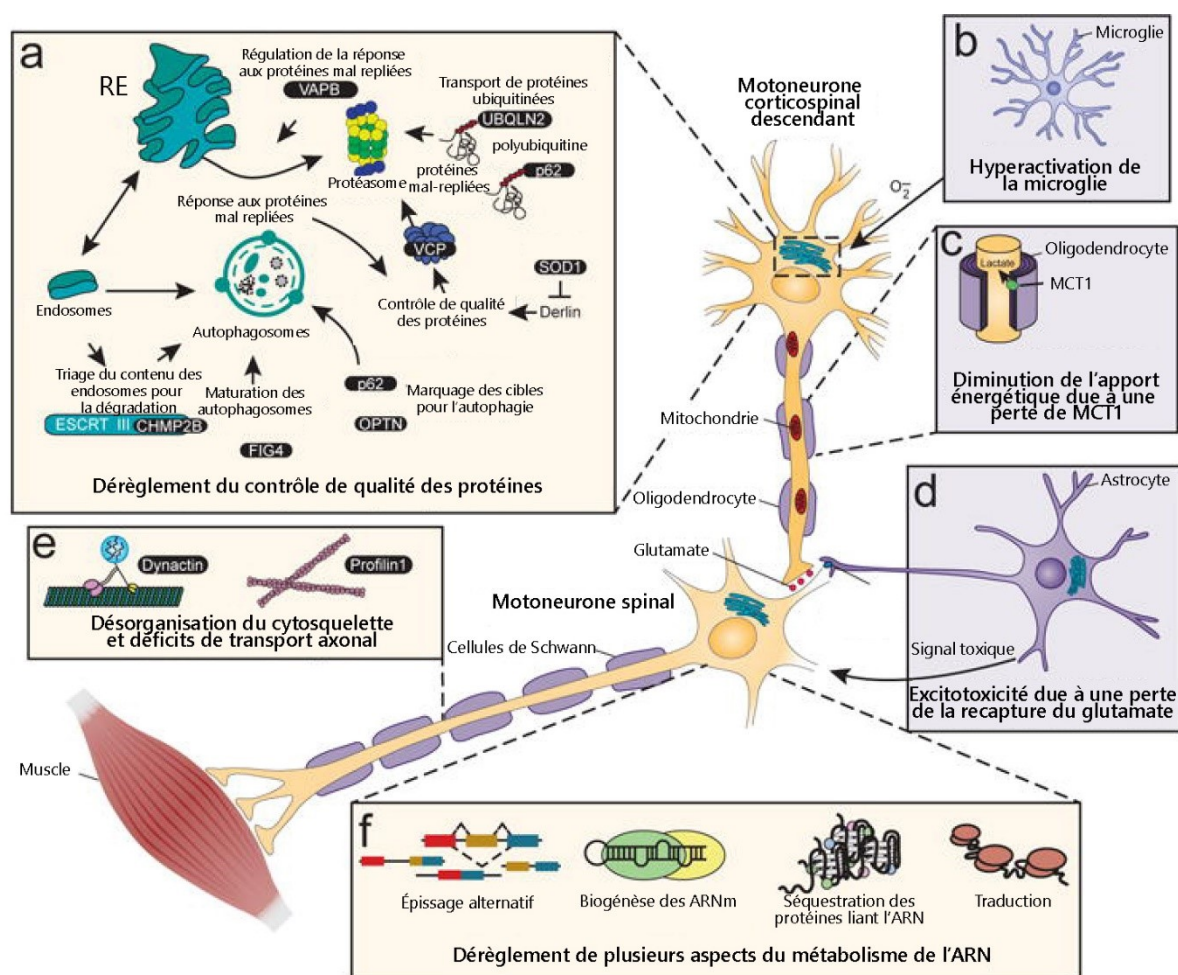


Figure 1.4. Principaux mécanismes de toxicité proposés afin d'expliquer la pathogenèse de la SLA. Schéma représentant plusieurs des mécanismes récurrents ayant été impliqués dans la SLA. (a) L'altération et la surcharge des mécanismes de contrôle de l'homéostasie protéique. (b) L'activation microgliale, et (c) le support énergétique des oligodendrocytes seront présentés en détail à la section 1.2.3.1. (d) L'excitotoxicité liée au glutamate, exacerbé par la perte du transporteur astrocytaire EAAT2. (e) La dysfonction du cytosquelette et du transport axonal. (f) Le dérèglement du métabolisme de l'ARN. Tiré de Taylor et al. (2016). Droits obtenus de Springer-Nature et Copyright Clearance Center.

SLA peuvent à la fois mener à la perte de la fonction de la protéine mutée et à un gain d'une nouvelle fonction aberrante et même toxique. Par exemple, TDP-43 est principalement localisé dans le noyau et y joue un rôle dans plusieurs fonctions liées au métabolisme de l'ARN, incluant l'épissage alternatif, la régulation de l'expression de gènes et la maturation des microARNs. Ainsi, la localisation aberrante de TDP-43 et son agrégation dans le cytoplasme dans la SLA peut causer la perte de ses fonctions nucléaires ou un gain de fonction toxique au sein du cytoplasme (Lagier-Tourenne et al., 2010; Ling et al., 2013). De même, l'expansion pathologique de *C9ORF72* mène conjointement à la diminution de l'expression de la protéine C9ORF72 issue de l'allèle muté (haploinsuffisance, perte de fonction), à la séquestration de protéines liant l'ARN au sein des foyers d'ARN agrégé et à la formation de chaînes de dipeptides (gain de fonction toxique) (Ling et al., 2013). À la lumière de ces informations, il apparaît évident que chaque mutation associée à la SLA peut mener à des altérations fonctionnelles par des mécanismes qui lui sont propres. Malgré cette diversité, plusieurs de ces altérations semblent converger vers certains mécanismes récurrents dont le métabolisme de l'ARN, l'homéostasie protéique, la dysfonction du cytosquelette et l'excitotoxicité (Figure 1.4) (Taylor et al., 2016). D'autres mécanismes propres à SOD1 seront discutés plus en détail dans la section 1.2.1.3.1 en raison de l'utilisation de modèles animaux porteurs de mutations de *SOD1* dans la présente thèse.

La dysfonction du cytosquelette : L'un des premiers mécanismes de toxicité à avoir été découvert dans la SLA est la désorganisation du cytosquelette neuronal et le déficit du transport axonal. Cette hypothèse est notamment fondée sur l'accumulation de neurofilaments dans le corps cellulaire des motoneurones (Hirano et al., 1984). Depuis, plusieurs études ont montré des déficits de transport axonal antérograde et rétrograde dans des modèles SOD1 de la SLA (Williamson and Cleveland, 1999; Perlson et al., 2009; Bilsland et al., 2010). Ces déficits de transport pourraient être à l'origine de l'immobilisation et de la perte des vésicules synaptiques observées au niveau des terminaisons axonales des motoneurones inférieurs chez certaines souris SOD1 (Pun et al., 2006). Récemment, une nouvelle dimension s'est ajoutée à cette hypothèse avec la découverte que TDP-43 est transporté au niveau des axones moteurs et que les mutations de TDP-43 causent des déficits dans le transport axonal antérograde de granules d'ARNm (Fallini et al., 2012; Alami et al., 2014). La traduction locale des ARNm contenus

dans ces granules permet une régulation locale de la synthèse de protéines au niveau des synapses en réponse à des stimuli externes (Krichevsky and Kosik, 2001; Sutton and Schuman, 2006). Une diminution du transport de ces granules pourrait donc engendrer plusieurs déficits synaptiques dans la SLA, dont notamment des déficits de croissance axonale (Fallini et al., 2012).

L'excitotoxicité : Un autre mécanisme est l'excitotoxicité liée au glutamate, qui causerait une entrée excessive de Ca^{2+} dans le neurone et ultimement sa mort. Cette hypothèse découle de l'observation que les motoneurones ont une sensibilité accrue à l'excitotoxicité en raison de leur faible capacité à tamponner le Ca^{2+} et de leur forte expression de récepteurs au glutamate de type AMPA, perméables au Ca^{2+} (récepteurs dépourvus de la sous-unité GluA2) (Williams et al., 1997; Van Damme et al., 2002; von Lewinski and Keller, 2005). De plus, de nombreuses études montrent une perte sélective d'un transporteur astrocytaire au glutamate, EAAT2 (« Excitatory amino acid transporter 2 »), dans la SLA (Rothstein et al., 1992; Rothstein et al., 1995; Trotti et al., 1999; Guo et al., 2003), responsable de sa recapture au niveau des synapses. Un autre facteur pouvant contribuer à ce phénomène est l'hyperexcitabilité corticale observées chez les patients (Vucic et al., 2008; Vucic et al., 2011; Menon et al., 2015). Une hyperactivation des motoneurones supérieurs pourrait engendrer une libération excessive de glutamate et de l'excitotoxicité au niveau des motoneurones inférieurs. Bien que ce dernier mécanisme n'ait jamais été directement testé, le fait que le mécanisme d'action présumé du Riluzole est de diminuer la libération de glutamate et de normaliser l'excitabilité des motoneurones argumente en sa faveur (Cheah et al., 2010; Vucic et al., 2013).

Homéostasie protéique : Comme dans plusieurs autres maladies neurodégénératives, une dysfonction des mécanismes cellulaires régulant le repliement et l'élimination des protéines a été suggérée afin d'expliquer l'accumulation d'agrégats cytoplasmiques dans la SLA. Cette hypothèse découle notamment de l'observation d'une augmentation précoce du stress au niveau du réticulum endoplasmique (stress-RE) dans les souris SOD1 (Lindholm et al., 2006; Saxena et al., 2009). Ce stress-RE émanerait de l'accumulation de protéines SOD1 mal-repliées et de l'inhibition ou surcharge des mécanismes d'élimination des protéines mal repliées, menant ultimement à une surcharge des mécanismes de dégradation protéiques (Boillee et al., 2006a). Plus récemment, l'association entre la SLA et des gènes impliqués dans les voies de dégradation

du protéasome et de l'autophagie suggère que ce mécanisme général n'est pas nécessairement spécifique aux mutations de *SOD1* (Ling et al., 2013; Taylor et al., 2016). Ces gènes incluent Ubiquilin-2 (*UBQLN2*) (Deng et al., 2011), p62/Sequestosome-1 (*SQSTM1*) (Fecto et al., 2011; Teyssou et al., 2013), Optineurine (*OPTN*) (Maruyama et al., 2010), « valosin-containing protein » (*VCP*) (Johnson et al., 2010), « TANK-binding kinase 1 » (*TBK1*) (Freischmidt et al., 2015) et « Charged multivesicular body protein 2B » (*CHMP2B*) (Parkinson et al., 2006; Cox et al., 2010). De plus, l'implication récente de *C9ORF72* dans le trafic des endosomes et l'autophagie (Chitiprolu et al., 2018; Shi et al., 2018) suggère que la perte de fonction de cette protéine (haploinsuffisance) pourrait également déséquilibrer l'homéostasie protéique dans la SLA.

Métabolisme de l'ARN : L'identification de mutations causant la SLA dans plusieurs protéines liant l'ARN dont TDP-43, FUS et plus récemment « heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 » (hnRNPA1) (Kim et al., 2013), ainsi que leur localisation aberrante dans le cytoplasme suggèrent qu'une altération globale du métabolisme de l'ARN pourrait contribuer à la SLA. En effet, ces protéines interagissent avec un grand nombre d'ARNm, de pré-ARNm de gènes et d'autres protéines liant l'ARN afin de réguler l'épissage alternatif, l'expression génique, la biogenèse de microARN et la formation de granules de stress (Lagier-Tourenne et al., 2010). À titre d'exemple, TDP-43 et FUS lient plus de 5500 des approximativement 29 000 ARNs exprimés dans le cerveau humain chacun (Lagier-Tourenne et al., 2010; Polymenidou et al., 2011; Tollervey et al., 2011; Hawrylycz et al., 2012; Lagier-Tourenne et al., 2012). De plus, la formation de foyers d'ARN agrégé lié à l'expansion pathologique de *C9ORF72* peut également séquestrer plusieurs protéines liant l'ARN, menant donc également à un dérèglement du métabolisme de l'ARN (La Spada and Taylor, 2010; Ling et al., 2013; Taylor et al., 2016). De manière intéressante, TDP-43 régule l'expression de gènes associés à l'homéostasie protéique et impliqués dans la SLA telles *CHMP2B*, *VCP* et *OPTN*, suggérant un lien intéressant entre ces deux mécanismes (Polymenidou et al., 2011; Ling et al., 2013).

1.2.1.3.1 *Superoxyde dismutase 1 (SOD1)*

À première vue, les mutations liées à *SOD1* peuvent sembler être des cas particuliers en raison de l'absence de lien fonctionnel entre *SOD1* et les autres gènes principaux associés à la

SLA. En effet, le gène *SOD1* encode la protéine Cu/Zn Superoxyde dismutase 1, l'une des trois enzymes responsables de l'élimination du radical libre anion superoxyde (O_2^-). Cette enzyme est exprimée de façon ubiquitaire dans toutes les cellules du corps et ne semble pas avoir de lien apparent avec les mécanismes ci-dessus. Néanmoins, des données en faveur de la majorité de ces mécanismes ont été obtenues chez les modèles SOD1 (Ilieva et al., 2009) (exception faite du dérèglement du métabolisme de l'ARN). Cette convergence est due au fait que les mécanismes de toxicité liés aux mutations de *SOD1* ne sont pas liés à la perte de sa fonction, mais majoritairement à un gain de fonction toxique (Bruijn et al., 1998). En effet, l'absence d'expression de *SOD1* ne cause pas de symptômes moteurs chez la souris (Reaume et al., 1996) et plusieurs des mutations causant la SLA préservent, et parfois même augmentent, l'activité endogène de SOD1 (Boillee et al., 2006a). Cependant, ces mutations causent systématiquement un mauvais repliement de la protéine, lui conférant ainsi de nouvelles propriétés toxiques (Bruijn et al., 1998; Rakhit et al., 2007; Bosco et al., 2010; Forsberg et al., 2010; Gros-Louis et al., 2010). De manière intéressante, une étude récente a montré que plusieurs espèces de SOD1 mal-repliées, ayant différentes propriétés toxiques, pouvaient coexister au sein d'un même motoneurone (Pickles et al., 2016). Somme toute, malgré leur apparente singularité, les mutations de *SOD1* semblent partager certains mécanismes physiopathologiques avec les autres causes de la SLA.

Néanmoins, certains mécanismes pathologiques ont été plus spécifiquement associés à SOD1, dont la dysfonction mitochondriale. En effet, des études de microscopie électronique ont montré que les mitochondries sont anormalement gonflées et vacuolisées chez les patients atteints de la SLA ou chez les modèles murins exprimant ces mutations (Wong et al., 1995; Kong and Xu, 1998; Higgins et al., 2003; Sasaki and Iwata, 2007). Bien que ce phénomène soit présent chez les patients ne portant pas de mutation de SOD1, le mécanisme menant à ce dysmorphisme mitochondrial demeure largement inconnu et diffère vraisemblablement de celui lié à SOD1. En effet, la liaison de certaines espèces de SOD1 mal-repliées à la membrane externe des mitochondries serait à l'origine de ces altérations morphologiques (Sasaki et al., 2004; Vande Velde et al., 2008; Vande Velde et al., 2011). Cette interaction perturbe la fonction mitochondriale et pourrait contribuer à la toxicité de la SOD1 mal-repliée (Pickles et al., 2013; Pickles et al., 2016). Une étude récente a mis en doute ce mécanisme en montrant que

l'augmentation de la capacité des mitochondries à tamponner le Ca^{2+} restaure la morphologie mitochondriale sans affecter la progression de la maladie (Parone et al., 2013). Cependant, le tamponnage du Ca^{2+} ne représente qu'une des nombreuses fonctions des mitochondries, suggérant que des mécanismes indépendants du Ca^{2+} et de la morphologie puissent contribuer à la SLA, notamment la production d'anion superoxyde et la génération de signaux proapoptotiques (Pasinelli et al., 2004; Pedrini et al., 2010; Pickles et al., 2013; Pickles et al., 2016).

1.2.2 Vulnérabilité sélective des motoneurones supérieurs, inférieurs et de la jonction neuromusculaire

Il peut paraître déconcertant qu'autant de mécanismes distincts et variés puissent contribuer à la dégénérescence neuronale dans la SLA, surtout dans une optique de développement de traitements. Cette dégénérescence semble cependant restreinte à certaines populations de neurones. Cette sélectivité peut apparaître surprenante alors que la plupart des causes et mécanismes proposés affectent des fonctions cellulaires fondamentales et que les acteurs responsables sont souvent présents dans l'ensemble du système nerveux. En effet, la majorité des mutations causant la SLA se trouvent dans des gènes exprimés de manière ubiquitaire au sein du système nerveux (par ex. C9ORF72) ou même de l'organisme entier (par ex. SOD1 et TDP43). Cette particularité n'est pas exclusive à la SLA et est observée dans de nombreuses autres maladies neurodégénératives telles la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie d'Huntington. Bien que le mystère plane sur l'origine cette vulnérabilité, il semble clair que ces maladies prennent naissance en exploitant une prédisposition ou une vulnérabilité sélective à la population de neurones lui étant propre. Une meilleure compréhension des raisons qui sous-tendent cette vulnérabilité sélective dans la SLA permettra potentiellement d'identifier des aspects de la pathogenèse communs à toutes les formes et causes de la maladie.

Différents niveaux, ou « paliers » de vulnérabilité sélective peuvent être identifiés dans la SLA (Figure 1.5). Premièrement, à l'échelle du système nerveux, les motoneurones semblent nettement plus vulnérables que d'autres populations de neurones ayant des propriétés similaires. En effet, les neurones sensoriels des ganglions dorsaux ne sont peu ou pas affectés. Pourtant,

ces neurones possèdent d'immenses axones parcourant de grandes distances tout comme les motoneurones inférieurs. De même, pourquoi les neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur (motoneurones supérieurs), et du cortex fronto-temporal dans les cas ayant une composante de FTD, dégénèrent-ils alors que d'autres neurones pyramidaux dans d'autres régions corticales ne sont pas affectés ?

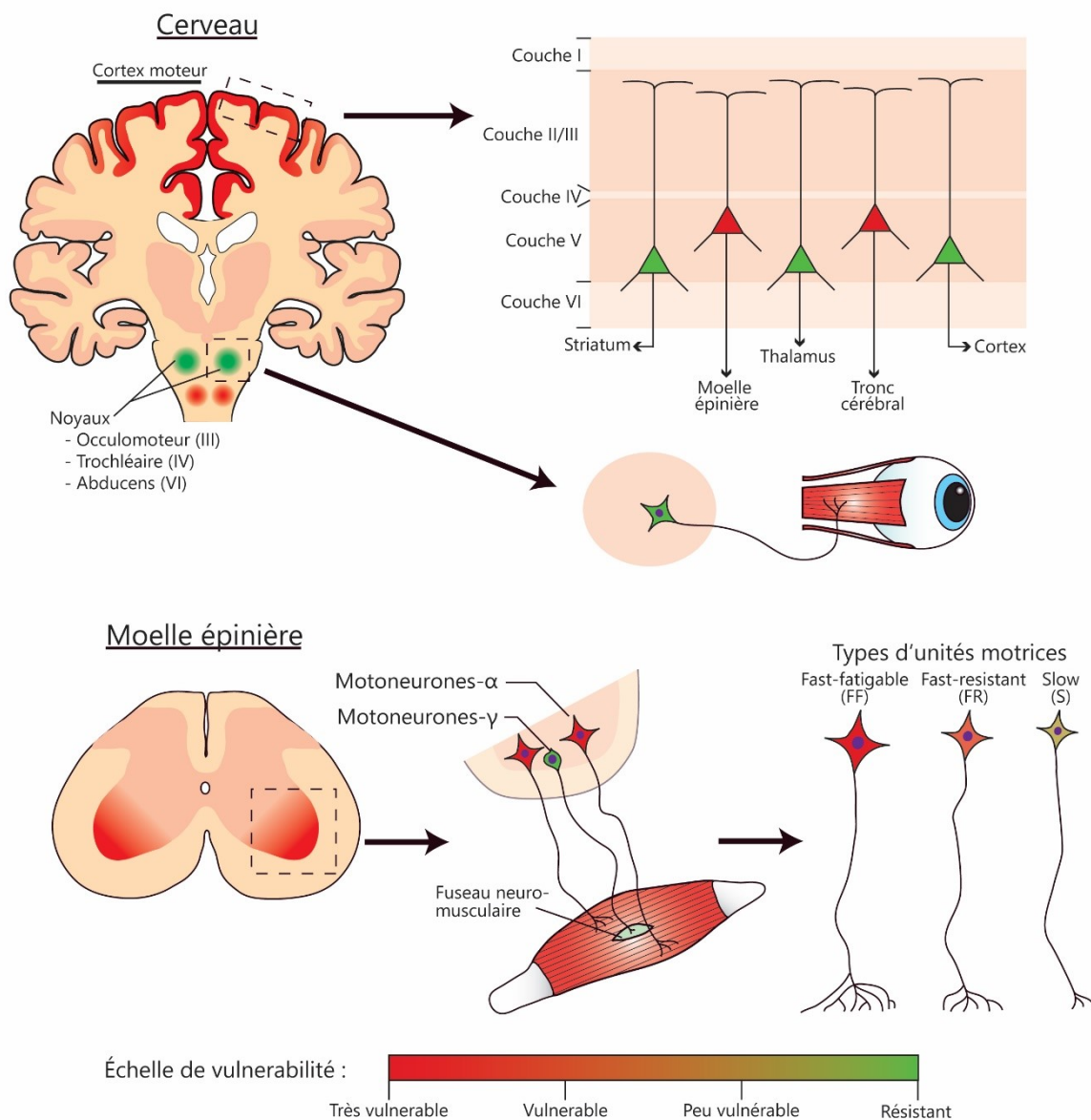


Figure 1.5. Vulnérabilité sélective des différentes populations de motoneurones. Schéma représentant les différents « paliers » de vulnérabilité observés dans la SLA. Bien que la majorité des motoneurones du cortex moteur, du tronc cérébral et de la moelle épinière soient affectés, tous ne partagent pas la même vulnérabilité (échelle rouge). À noter que certaines populations de motoneurones sont même résistantes à la pathologie (vert), dont les motoneurones oculomoteurs, les motoneurones γ et les motoneurones pyramidaux ne projetant pas vers les motoneurones inférieurs.

Deuxièmement, tous les sous-groupes de motoneurones ne sont pas nécessairement vulnérables à la maladie. Au niveau des motoneurones supérieurs, les motoneurones de la couche V du cortex moteur qui ne projettent pas directement vers les motoneurones inférieurs ne semblent pas affectés. En effet, bien qu'ils soient voisins des motoneurones supérieurs (motoneurones corticaux-spinaux) et qu'ils aient des propriétés analogues, les motoneurones cortico-thalamiques, cortico-striataux et cortico-corticaux semblent épargnés selon des études chez la souris SOD1^{G93A} (Ozdinler et al., 2011; Jara et al., 2012). Au niveau des motoneurones inférieurs, plusieurs sous-groupes de motoneurones sont résistants à la pathologie. Les motoneurones innervant les muscles extraoculaires et le sphincter anal externe, situés respectivement au sein des noyaux oculomoteurs, abducens et throcléaires, et du noyau d'Onuf, ne sont affectés qu'à des stades très avancés de la pathologie (Mannen et al., 1982; Nimchinsky et al., 2000; Nijssen et al., 2017). Les JNMs formés par ces motoneurones sont également préservés durant la majeure partie de la progression de la pathologie (Valdez et al., 2012; Nijssen et al., 2017). De même, les motoneurones de type gamma (motoneurones γ), innervant les fuseaux neuromusculaires, sont préservés et leurs JNMs sont généralement dépourvues d'altérations morphologiques (Lalancette-Hebert et al., 2016). Ces motoneurones contrôlent le tonus des fuseaux neuromusculaires, un organe proprioceptif au sein des muscles squelettiques, alors que les motoneurones de type alpha (motoneurones α), vulnérable à la SLA, contrôlent la contraction musculaire comme telle.

Finalement, le principe de vulnérabilité sélective s'applique également au sein d'un groupe de motoneurones α innervant un même muscle (nommé « motor pool » en anglais). En effet, des études pionnières de la JNM dans la SLA ont su mettre en lumière un « gradient de vulnérabilité », dépendant notamment des propriétés des motoneurones et des fibres musculaires qu'ils innervent (présentés en détails à la section 1.3.1.4). Cette notion découle notamment de l'observation que les motoneurones α de type rapide fatigable (« Fast-fatigable », FF) se rétractent de leurs JNMs avant tout autre type de motoneurones (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006; Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008). Par la suite, les JNMs innervées par des motoneurones de type rapide résistant à la fatigue (« Fast-resistant », FR) et de type lent (« Slow », S) sont affectées séquentiellement. Plus récemment, d'autres études ont montré que les motoneurones de type FF perdent leur capacité à décharger en bouffée et ont un niveau de

stress-RE accru comparativement aux autres types de motoneurones avant même l'apparition des premiers symptômes chez la souris *SOD1*^{G93A} (Saxena et al., 2009; Martinez-Silva et al., 2018). Malheureusement, aucune étude n'a, à ce jour, évalué si un palier de vulnérabilité sélective similaire existe au sein des motoneurones supérieurs, probablement en raison de difficultés techniques liées à l'étude de ces neurones.

1.2.3 Non-autonomie cellulaire : la contribution des autres types cellulaires

Bien que les motoneurones soient sélectivement vulnérables aux mécanismes pathologiques associés à la SLA, les cellules entourant les motoneurones ne sont pas « saines » pour autant. En effet, un autre facteur crucial à considérer dans la pathogenèse de la SLA est la contribution des autres types cellulaires à la dysfonction et à la mort des motoneurones.

Au fil des années, de nombreuses études ont permis d'établir que des cellules autres que les motoneurones, bien qu'elles ne dégèrent pas directement, contribuent à la pathogenèse de la SLA. Cette notion émane de trois études pionnières au début des années 2000 (Pramatarova et al., 2001; Lino et al., 2002; Clement et al., 2003). Tout d'abord, Pramatarova et al. (2001) et Lino et al. (2002) ont montré que l'expression d'une mutation de *SOD1* exclusivement dans les neurones n'était pas suffisante pour induire la dégénérescence des motoneurones et des symptômes moteurs. Par la suite, Clement et al. (2003) ont généré plusieurs lignées de souris chimères ayant une expression aléatoire, en mosaïque, de la protéine mutée. L'étude de ces différentes chimères a pu mettre en lumière que l'absence d'expression de la *SOD1* mutée dans les cellules non neuronales améliorait la survie des motoneurones alors que des motoneurones n'exprimant pas la mutation dégénéraient lorsqu'entourés d'autres cellules l'exprimant. De ces études émergea le concept de non-autonomie cellulaire (« non-cell autonomy ») stipulant que la mort des motoneurones dépend également d'altérations pathologiques ayant lieu dans d'autres types cellulaires (Boillee et al., 2006a). En effet, l'excision du gène *SOD1* spécifiquement des motoneurones inférieurs, via une stratégie *Cre-Lox*, ne retarde que marginalement la manifestation de la maladie (Boillee et al., 2006b). S'en est suivi une série d'études ayant pour but de disséquer la contribution de chaque type cellulaire à la maladie dans les souris *SOD1*. Ainsi, il est maintenant reconnu que plusieurs types de cellules gliales, d'autres types de

neurones, les cellules immunitaires périphériques et potentiellement les fibres musculaires elles-mêmes peuvent jouer un rôle délétère dans la SLA (Figure 1.6).

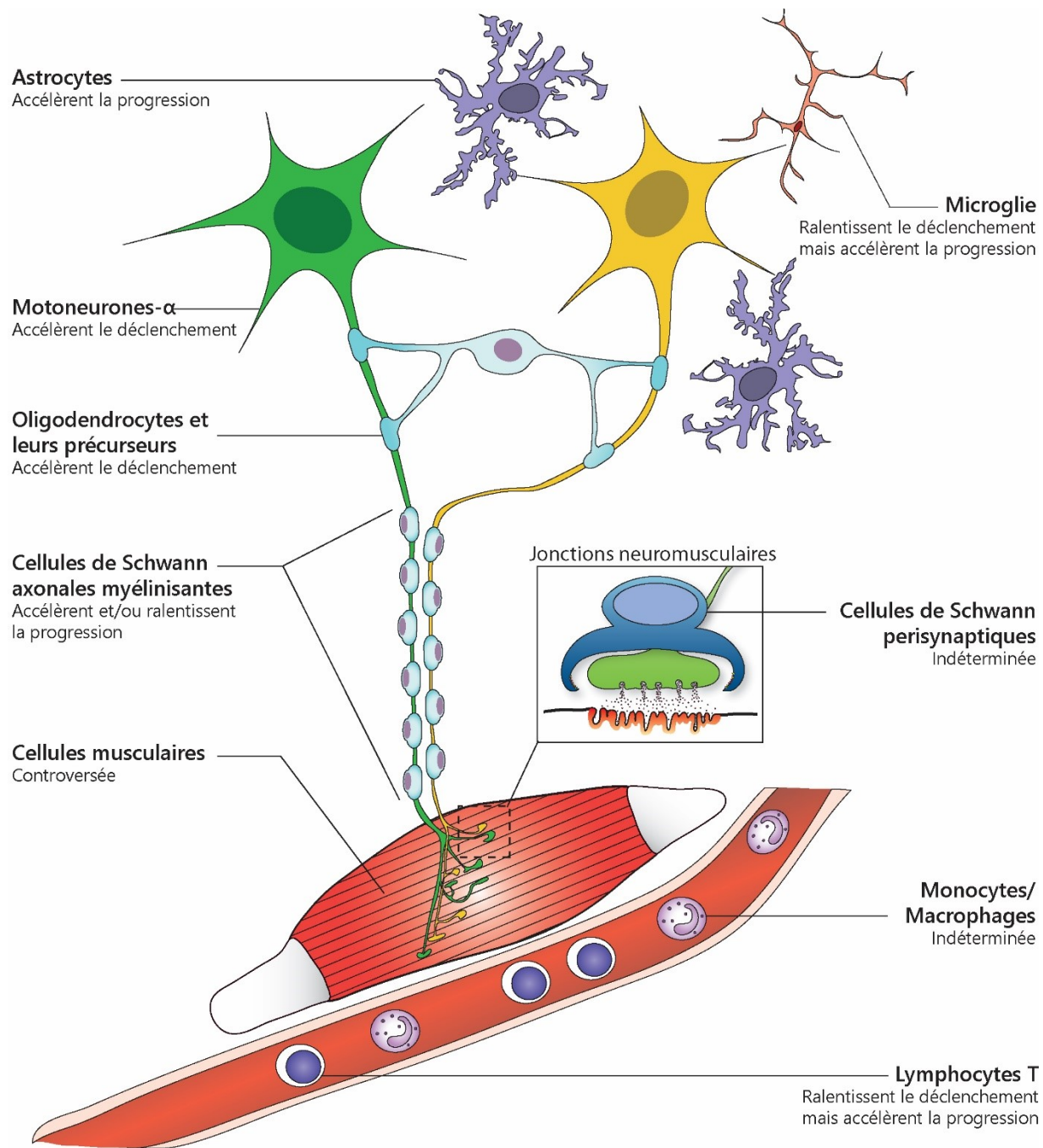


Figure 1.6. Les cellules non neuronales sont affectées et contribuent à la SLA. Schéma représentant la contribution des différents types de cellules non neuronales dans la SLA. À des fins de simplicité, les autres types de neurones contribuant à la dégénérescence des motoneurones α , tels les motoneurones γ , les motoneurones corticospinaux et les afférences sensorielles I_A , n'ont pas été représentés sur ce schéma.

À noter que, bien que la majorité des données en faveur de ce concept découlent d'études sur les souris SOD1, plusieurs études ont depuis montré que ce concept semble applicable à toute forme de SLA. Notamment, d'autres études récentes ont montré que le même principe pouvait être appliqué aux souris TDP-43^{Q331K} ainsi qu'à un modèle de SLA lié à FUS (Ditsworth et al., 2017; Scekcic-Zahirovic et al., 2017). D'autre part, une série d'étude par Haidet-Phillips et al. (2011), Re et al. (2014) et Meyer et al. (2014) a montré que des astrocytes, un type de cellules gliales, issues de patients atteints de la SLAs étaient toxiques envers des motoneurones sains en culture, similairement à ce qui est observé dans les modèles SOD1.

1.2.3.1 Les cellules gliales

Le terme "cellules gliales" réfère au nom initialement utilisé par Rudolf Virchow afin de décrire ces cellules non neuronales : « neuroglia » signifiant « colle à nerf » ou « mastique à nerf » (Somjen, 1988). De nos jours, il est maintenant reconnu que les cellules gliales contribuent à de nombreux aspects du fonctionnement du SNC, apportant un soutien métabolique et trophique aux neurones, en plus de participer activement à l'élaboration de leur connectivité, à la myélinisation des axones et à la transmission synaptique. Plusieurs types de cellules gliales peuvent être identifiés, et la contribution de chacun d'entre eux à la SLA a été évaluée en détail (Boillee et al., 2006a; Ilieva et al., 2009).

1.2.3.1.1 Les astrocytes

Les astrocytes tirent leur nom de leur aspect étoilé. Ils représentent le type cellulaire le plus abondant dans le SNC adulte et jouent notamment un rôle crucial dans l'homéostasie ionique, le support métabolique, le maintien de la barrière hématoencéphalique, la recapture de neurotransmetteur tels le glutamate et la régulation de la transmission synaptique (Barres, 2008; Araque et al., 2014). Dans un contexte pathologique, les astrocytes adoptent également un phénotype dit « réactif », soit pro- ou anti-inflammatoire (Zamanian et al., 2012; Liddel et al., 2017), et peuvent contribuer à de nombreuses neuropathologies.

Dans le contexte de la SLA, les astrocytes contribuent à la progression de la maladie en exerçant un effet toxique sur les motoneurones. En effet, l'excision du gène *SOD1* muté des astrocytes via une stratégie *Cre-Lox*, ralentit substantiellement la progression de la maladie chez des souris SOD1, sans affecter l'âge d'apparition des premiers symptômes (Yamanaka et al.,

2008b). Cet effet serait médié par plusieurs voies de signalisation distinctes, incluant le « receptor interacting protein 1 » (RIP1) (Re et al., 2014) activant une voie de signalisation s'apparentant à la nécrose, le « tumor-necrosis factor alpha » (TNF α) (Kia et al., 2018) et la perte de fonction du transporteur au glutamate EAAT2 (Rothstein et al., 1992; Rothstein et al., 1995; Trotti et al., 1999; Guo et al., 2003; Foran et al., 2011) (Figure 1.4d). En raison de leur effet sur la progression et non la manifestation de la maladie, et de leur implication dans la SLAs (Haidet-Phillips et al., 2011; Meyer et al., 2014; Re et al., 2014), l'étude des astrocytes est très intéressante d'un point de vue thérapeutique. Leur rôle délétère dans la SLA ne se limite pas cependant à leur toxicité envers les motoneurones. En effet, une étude récente montre que les astrocytes dans la SLA provoquent une augmentation de l'expression du transporteur endothélial P-glycoprotéine (« multidrug resistance transporteur ABCB1 »), responsable de l'export de plusieurs composés pharmacologiques du SNC (Qosa et al., 2016). Ainsi, les astrocytes pourraient contribuer à la pharmacorésistance chez les patients atteints de la SLA, limitant potentiellement l'efficacité de plusieurs composés thérapeutiques, dont le Riluzole (Jablonski et al., 2015).

1.2.3.1.2 La microglie

En raison de leur origine embryonnaire, les cellules microgliales sont souvent considérées comme les cellules immunitaires résidentes du SNC. Bien que cela ne soit pas inexact en raison de leur rôle dans l'inflammation, l'élimination de pathogènes et la phagocytose, la microglie joue un rôle beaucoup plus complexe. Notamment, la microglie contribue à l'élaboration de la connectivité neuronale lors du développement en participant à l'élimination des synapses surnuméraires (Schafer et al., 2012; Stephan et al., 2012). De plus, la microglie pourrait, similairement aux astrocytes, être impliquée dans la régulation de l'activité synaptique (Li et al., 2012; Pfeiffer et al., 2016). De manière intéressante, la microglie interagit directement avec les astrocytes afin d'induire leur phénotype pro-inflammatoire, suggérant qu'elle puisse être à l'origine de la réactivité astrocytaire dans plusieurs maladies neurodégénératives (Liddelow et al., 2017).

À l'instar des astrocytes, l'absence de *SOD1* muté dans la microglie ralentit considérablement la progression de la pathologie, sans en retarder le déclenchement (Beers et

al., 2006; Boillee et al., 2006b). Plusieurs mécanismes ont été suggérés afin d'expliquer cette contribution délétère de la microglie, incluant la libération de cytokines pro-inflammatoires (Barbeito et al., 2010), la sécrétion d' O_2^- (Beers et al., 2006; Wu et al., 2006; Taylor et al., 2016) (Figure 1.4b), l'activation de la voie NF- κ B (Frakes et al., 2014) et la libération de glutamate via le transporteur « système x_C » (Mesci et al., 2015). Par contre, contrairement aux astrocytes, la microglie semble avoir un rôle biphasique dans la maladie, ayant plutôt un phénotype anti-inflammatoire neuroprotecteur avant la manifestation de la maladie (Gravel et al., 2016). Ce rôle neuroprotecteur est notamment associé à la production d'IL-10 et l'inhibition de son récepteur précipite le déclenchement de la maladie chez les souris SOD1. De manière intéressante, la délétion de la sous-unité x_{CT} du transporteur « système x_C » provoque à la fois un ralentissement de la progression et une précipitation du déclenchement de la maladie (Mesci et al., 2015), suggérant qu'un lien puisse exister entre ces deux voies de signalisation.

1.2.3.1.3 Les oligodendrocytes matures et immatures

Les oligodendrocytes sont un type de cellules gliales présent majoritairement dans la substance blanche, mais aussi au niveau de la matière grise. Les oligodendrocytes sont responsables de la myélinisation des axones de projection à travers le SNC, en plus d'apporter un support métabolique crucial aux axones, notamment via le transport du lactate par le transporteur « monocarboxylate transporteur 1 » (MCT1) (Lee et al., 2012).

N'étant pas associée à l'apparition d'immenses plaques de démyélinisation comme dans la sclérose en plaques, la SLA n'est pas reconnue comme une maladie pouvant impliquer les oligodendrocytes. Pourtant, l'excision du gène *SOD1* muté des cellules NG2⁺, un précurseur des oligodendrocytes dans le cerveau adulte, retarde considérablement l'apparition des premiers symptômes chez des souris SOD1, sans affecter les phases tardives de la maladie (Kang et al., 2013). En effet, des études ont montré que les cellules NG2⁺ ont un rythme de prolifération et de différenciation accélérée dans la moelle épinière de souris SOD1, surtout au niveau de la matière grise (Kang et al., 2010). Cette production accrue d'oligodendrocytes dans la matière grise précède le déclenchement de la pathologie et est associée à une dégénérescence des oligodendrocytes matures (Kang et al., 2013). L'augmentation du renouvellement des oligodendrocytes matures (dégénérescence et régénérescence) dans les souris SOD1 mène à une

perte du transporteur MCT1 et à des problèmes de myélinisation dans la matière grise (Lee et al., 2012; Kang et al., 2013). Ainsi, comme les motoneurones, les oligodendrocytes contribuent aux phases précoces de la maladie, alors que les autres cellules gliales du SNC, telles que les astrocytes et la microglie contribuent à la progression et aux phases tardives (Yamanaka et al., 2008a).

1.2.3.1.4 Les cellules de Schwann

De manière générale, le terme « cellule de Schwann » est utilisé en référence aux analogues des oligodendrocytes dans le système nerveux périphérique, responsables de la myélinisation et du support métabolique des axones. Cependant les cellules Schwann ne sont pas une population homogène et cette définition réfère plutôt à un sous-groupe de cellules de Schwann, les cellules de Schwann axonales myélinisantes (CSM). Les autres sous-groupes majeurs sont les cellules de Schwann axonales non myélinisantes (cellules de Remak), entourant les axones non myélinisés, et les cellules de Schwann pérисynaptiques (CSP, aussi appelées cellules de Schwann terminales) localisés au niveau des JNMs, qui seront décrites en détail à la section 1.3.1.3. Cette section réfèrera uniquement aux cellules de CSM, puisque la contribution spécifique des autres sous-groupes dans la SLA demeure largement inconnue.

Le rôle des CSM dans la SLA demeure encore nébuleux à ce jour en raison de plusieurs études d'apparence contradictoires. En effet, l'excision du gène *SOD1* muté des CSM, via une stratégie *Cre-lox* sous le contrôle du promoteur P0, ralentit (Wang et al., 2012) ou accélère (Lobsiger et al., 2009) la progression de la maladie chez les souris *SOD1*. Encore plus surprenant, le croisement de souris *SOD1*^{G93A} à des souris exprimant la *SOD1*^{G93A} spécifiquement dans les CSM ralentit modestement la phase tardive de la progression malgré une augmentation de 50% des niveaux de *SOD1* mutée dans les nerfs périphériques (Turner et al., 2010). Une explication probable pour ces incohérences serait liée à l'activité de la *SOD1* elle-même. En effet, les études de Lobsiger et al. (2009) et Turner et al. (2010) ont montré que l'expression d'une *SOD1* mutée préservant son activité dismutase, la *SOD1*^{G37R} et la *SOD1*^{G93A} respectivement, dans les CSM auraient un effet protecteur sur la progression de la SLA. À l'inverse, l'étude de Wang et al. (2012) utilisait une mutation de *SOD1* abolissant son activité dismutase (*SOD1*^{G85R}) pour montrer un effet délétère. Ainsi, ces études suggèrent que

l'augmentation de l'activité dismutase dans les CSM aurait un effet neuroprotecteur dans la SLA, bien que cette hypothèse n'ait jamais été démontrée directement.

1.2.3.2 Les autres populations neuronales

Depuis son énonciation dans le domaine de la SLA, le concept de non-autonomie cellulaire a été associé à l'implication des cellules gliales dans la pathogenèse de la maladie. Cependant, des études récentes suggèrent que les neurones contribuent aussi à la dégénérescence de leurs congénères. Cette notion s'applique principalement aux motoneurones inférieurs, car peu d'études se sont attardées aux autres populations de neurones dans le cortex moteur. Notamment, les afférences sensorielles, les motoneurones γ et les motoneurones supérieurs eux-mêmes, peuvent contribuer à la dégénérescence des motoneurones inférieurs.

L'une des différences majeures entre les populations de motoneurones vulnérables et résistantes à la SLA, tels les motoneurones γ et les neurones oculomoteurs, est la présence d'afférences monosynaptiques excitatrices des fibres proprioceptives de type I_A . Ces fibres, issues de neurones sensoriels des ganglions dorsaux, innervent les fuseaux neuromusculaires en périphérie et sont responsables du réflexe d'étirement. En effet, un étirement musculaire passif active ces fibres proprioceptives, qui viennent à leur tour induire une décharge des motoneurones α via des connexions monosynaptiques excitatrices, engendrant ainsi une contraction musculaire. Curieusement, les motoneurones γ et les neurones oculomoteurs sont dépourvus de ces connexions monosynaptiques excitatrices (Rao and Prevosto, 2013; Lalancette-Hebert et al., 2016). Ainsi, la présence de ces connexions pourrait contribuer à la dégénérescence des motoneurones α . Effectivement, l'élimination sélective des afférences sensorielles, notamment les I_A , ou des motoneurones γ semble améliorer la survie des motoneurones α dans des souris SOD1 en plus de retarder légèrement la progression de la maladie (Ilieva et al., 2008; Lalancette-Hebert et al., 2016). Le mécanisme sous-tendant cet effet pourrait être l'excitotoxicité, car le nombre de synapses excitatrices sur les motoneurones α provenant d'afférences I_A serait augmenté chez des souris SOD1 (Vaughan et al., 2015), et la dépression synaptique suite à leur activation serait réduite (Hedegaard et al., 2015). De même, l'élimination des motoneurones γ réduit la sensibilité des fuseaux neuromusculaires et donc le taux de décharge des afférences I_A (Lalancette-Hebert et al., 2016).

Similairement, une étude par Thomsen et al. (2014) a montré que la réduction de l'expression de la SOD1 mutée dans le cortex moteur améliore la survie des motoneurons inférieurs. Cet impact direct des motoneurons supérieurs sur la survie des motoneurons inférieurs pourrait être attribuable à une multitude de facteurs. Une hypothèse intéressante serait que l'hyperexcitabilité corticale entraînerait une hyperactivation des motoneurons supérieurs et une libération excessive de glutamate au niveau des motoneurons inférieurs en raison de leurs connexions monosynaptiques.

1.2.3.3 Les fibres musculaires

En raison de la perte précoce des JNMs dans la SLA, la contribution des fibres musculaires à ce phénomène et à la mort des motoneurons a été l'objet de plusieurs investigations. Cependant plusieurs de ces études montrent des résultats contradictoires, et même controversés, limitant notre capacité à apporter une réponse définitive à cette question.

D'une part, la réduction des niveaux de SOD1 mutée sélectivement dans les muscles n'affecte pas le déclenchement de la maladie ou la mort des motoneurons (Miller et al., 2006; Towne et al., 2008). La transplantation de muscles exprimant la SOD1 mutée dans une souris saine n'induit pas la dénervation des JNMs, alors que la transplantation de muscles sains dans une souris SOD1 ne la prévient pas (Carrasco et al., 2010). De même, l'expression de SOD1 sélectivement dans les fibres musculaires n'est pas suffisante pour induire la dégénérescence des JNMs ou de symptômes moteurs (Dobrowolny et al., 2008), bien qu'elle induise une atrophie et une perte de force musculaire, affectant préférentiellement les fibres associées aux motoneurons FF et FR (exprimant la chaîne lourde de myosine de type IIb et IIa respectivement). De même, la surexpression du facteur de transcription PGC1- α chez des souris SOD1, résultant notamment en une augmentation du contenu mitochondrial musculaire, préserve la fonction musculaire et ralentit l'atrophie musculaire sans pour autant affecter la perte de JNMs, la dégénérescence des motoneurons ou la survie de ces animaux (Da Cruz et al., 2012; Park et al., 2013). Ensemble, ces études semblent suggérer que, bien que la SOD1 mutée ait un effet sur la physiologie musculaire, cette toxicité ne contribue pas à la perte des JNMs, à la dégénérescence des motoneurons ou à l'apparition des symptômes moteurs.

Cependant, une autre étude ayant surexprimé la SOD1 mutée spécifiquement dans les muscles rapporte une dégénérescence des motoneurones et de leurs JNMs (Wong and Martin, 2010). De plus, l'expression du facteur de chémorépulsion Nogo-A est augmentée dans les muscles de souris SOD1 et de patients (Dupuis et al., 2002; Jokic et al., 2005; Jokic et al., 2006; Bruneteau et al., 2015). Aussi, le croisement de souris déficientes en Nogo-A avec des souris SOD1 retarde la progression de la maladie (Jokic et al., 2006). Néanmoins, des études récentes chez l'humain montrent plutôt que le blocage de Nogo-A n'affecte pas la progression de la SLA (Meininger et al., 2017) et serait plutôt un marqueur de neuropathies périphériques (Wojcik et al., 2006). D'autre part, plusieurs études documentent un changement dans le métabolisme énergétique et une augmentation du stress oxydatif au sein des cellules musculaires durant l'évolution de la maladie (Loeffler et al., 2016). Bien que le rôle de ces changements métaboliques dans la maladie ne soit pas clair, une étude suggère qu'une perturbation du métabolisme énergétique musculaire serait suffisante pour induire une légère perte de motoneurones et de JNMs (Dupuis et al., 2009). Si cette perturbation est représentative des changements mitochondriaux ayant lieu durant la SLA demeure cependant incertain. D'autre part, la surexpression postnatale de facteurs de transcription régulant la différenciation musculaire (MyoD ou la myogénine) peut affecter la survie neuronale et la progression des symptômes moteurs chez des souris SOD1^{G93A} (Park et al., 2013). Néanmoins, ces effets pourraient simplement être liés à une conversion présymptomatique des fibres musculaires vers un type plus vulnérable ou résistant à la maladie (rapide ou lente respectivement). Finalement, plusieurs études montrent que la sécrétion musculaire de facteurs trophiques, endogènes ou induits par manipulations géniques, pourrait affecter la progression de la SLA (Krakora et al., 2012). Notamment, la sécrétion musculaire d'une chaperonne liée au facteur trophique FGF, le FGFBP1 (« FGF-binding protein 1 »), joue un rôle neuroprotecteur et la perte de son expression pourrait contribuer à la dégénérescence des JNMs dans la SLA (Taetzsch et al., 2017).

Dans l'ensemble, il apparaît logique que les fibres musculaires puissent contribuer à la SLA en raison de leur interaction avec les motoneurones et de l'atteinte précoce des JNMs dans la maladie (section 1.2.4.2). Il est clair que des mutations associées à la SLA peuvent induire des changements dans la fonction musculaire, notamment au niveau du métabolisme énergétique et des mitochondries. De même, il est clair qu'il est possible de manipuler les fibres musculaires

afin d'influencer la perte de JNMs et la survie neuronale. Néanmoins, de plus amples investigations seront nécessaires afin de départager les changements musculaires induits par l'expression d'une protéine mutée et contribuant à la dysfonction neuronale, des changements adaptatifs ou maladaptifs en réponse à cette dysfonction.

1.2.3.4 Le système immunitaire périphérique

Outre les cellules gliales, les neurones et les fibres musculaires, les cellules immunitaires périphériques peuvent également interagir avec les motoneurones et contribuer à la SLA. Plusieurs études suggèrent que le système immunitaire périphérique contribue au processus de neuroinflammation engendré par les astrocytes et la microglie. Plus particulièrement, les macrophages/monocytes et les lymphocytes T et B ont retenu l'attention de la communauté scientifique.

Les monocytes/macrophages sont un des types de cellules issues de la lignée myéloïde participant à l'immunité innée, notamment en phagocytant des pathogènes ou débris cellulaires, en présentant des antigènes aux cellules de l'immunité adaptative et en régulant le processus d'inflammation. Un premier indice de la contribution des monocytes/macrophages à la SLA vient des études ayant étudié le rôle de la SOD1 mutée dans la microglie dans la SLA. En effet, les techniques génétiques utilisées pour que la microglie n'exprime pas la mutation ciblaient également les monocytes/macrophages (Boillee et al., 2006b) ou l'entièreté de la lignée myéloïde (monocytes, neutrophiles, basophiles, etc.) ainsi que les lymphocytes B (Beers et al., 2006). L'effet observé pourrait donc être en partie attribuable aux monocytes/macrophages. De plus, les niveaux de monocytes circulants sont diminués chez des patients atteints de la SLAs, suggérant un recrutement vers les tissus (le parenchyme) (Mantovani et al., 2009; Hooten et al., 2015). Une question importante découlant de ces observations a donc été de déterminer si des monocytes infiltrent le SNC et s'intègrent à la population microgliale durant la SLA. En effet, peu de marqueurs permettent de différencier la microglie résidente du SNC de monocyte/macrophages (Bennett et al., 2016). Une étude élégante utilisant la parabiose (liaison chirurgicale entre la circulation sanguine de deux souris) entre des souris SOD1^{G93A} et des souris exprimant la GFP (« green fluorescent protein ») dans toutes leurs cellules immunitaires montra qu'ils n'infiltrent pas la moelle épinière (Ajami et al., 2007). Cependant, les macrophages

infiltrèrent progressivement les nerfs périphériques et les muscles durant la progression de la maladie chez des souris SOD1 (Chiu et al., 2009; Graber et al., 2010; Wang et al., 2017). Il est connu que l'infiltration de monocytes/macrophages dans les nerfs périphériques est essentielle afin de faciliter le processus de régénérescence suite à une lésion axonale (Rotshenker, 2011). De plus, la prévention de l'infiltration des macrophages au niveau des muscles ralentit légèrement la perte de JNMs et améliore la force musculaire chez des souris SOD1^{G93A} (Wang et al., 2017). Ainsi, bien que leur contribution spécifique demeure hypothétique, il est possible que les monocytes/macrophages jouent un rôle dans la progression de la SLA, notamment au niveau des nerfs périphériques, des muscles ou des JNMs.

Les lymphocytes sont une grande famille de cellules immunitaires issues de la lignée lymphoïde. Il est possible de distinguer les lymphocytes T et B, responsables de l'immunité adaptative, et les cellules NK (« Natural Killer »), participant à l'immunité innée contre les cellules du soi altéré. Un rôle des lymphocytes dans la SLA fut initialement suggéré par plusieurs études montrant une infiltration de lymphocytes T, mais pas de lymphocytes B ou de cellules NK, au niveau de la moelle épinière de patients SLA (Kawamata et al., 1992; Appel et al., 1993; Engelhardt et al., 1993; Barbeito et al., 2010) ou de souris SOD1 (Alexianu et al., 2001). Cependant, c'est une étude clé par Beers et al. (2008) qui, en transplantant de la moelle osseuse de souris saines ou SOD1 dans des souris SOD1 n'ayant pas de lymphocytes T ou B fonctionnels (SOD1^{G93A} / RAG2^{-/-}), montra que les lymphocytes exercent un effet neuroprotecteur, indépendamment de leur expression de SOD1 (Beers et al., 2008). De plus, le croisement de souris SOD1 à des souris déficientes pour le corécepteur CD4 (« cluster of differentiation 4 ») ou pour le TCR β (« T-cell receptor β ») montra que le sous-groupe de lymphocytes T CD4⁺ est responsable de cet effet (Beers et al., 2008; Chiu et al., 2008). Les lymphocytes T CD4⁺ sont une famille hétérogène des cellules de l'immunité adaptative responsable de la coordination de la réponse immunitaire. Plusieurs sous-types peuvent être identifiés dont, de manière générale, les Th1 et Th17, ayant un rôle pro-inflammatoire et généralement neurotoxique, et les Th2 et les T-régulateurs (Tregs), ayant un rôle plutôt neuroprotecteur dans la SLA (Hooten et al., 2015). Des études subséquentes ont permis d'identifier que, similairement à la microglie, la contribution des lymphocytes T dans la SLA est caractérisée par une prédominance de Tregs anti-inflammatoires et par la production d'IL4

par les Th2, favorisant un phénotype microglial anti-inflammatoire durant les stades précoces de la maladie (Beers et al., 2011; Chiu et al., 2008; Hooten et al., 2015). Durant les stades tardifs cependant, la réponse immunitaire est caractérisée par une infiltration de Th1 et Th17 neurotoxiques (Beers et al., 2011; Hooten et al., 2015). De manière intéressante, des études récentes ont montré que les Tregs semblent dysfonctionnels chez les patients atteints de la SLA, particulièrement chez les patients ayant une progression rapide, et que les niveaux sanguins de Tregs sont inversement proportionnels au rythme de progression de la maladie (Henkel et al., 2013; Beers et al., 2017). Cependant, à l'instar des monocytes/macrophages, le site d'action des lymphocytes demeure méconnu. Bien qu'ils infiltrent le SNC, une action au niveau du SNP ou des JNMs ne peut être exclue.

Dans l'ensemble, bien que la SLA ne soit pas une maladie auto-immune, il semble clair que le système immunitaire périphérique contribue à la maladie. Ce rôle semble initialement neuroprotecteur, mais devient graduellement délétère avec la progression de la maladie. Plusieurs études sont cependant encore nécessaires afin de mieux caractériser où et à quel moment chaque type cellulaire agit, notamment afin de déterminer le rôle potentiel des macrophages/monocytes et des lymphocytes T au niveau du SNP (Chiu et al., 2009).

1.2.4 Hypothèses quant à l'origine de la dégénérescence neuronale

Ainsi, la multitude d'altérations cellulaires liées aux mutations causant la SLA affecte la fonction de plusieurs types cellulaires distincts dont l'interaction culmine en l'atteinte sélective des motoneurons supérieurs, inférieurs et de leurs JNMs. Étant donné la nature progressive de la maladie et la diversité des mécanismes impliqués, plusieurs études ont tenté d'identifier le « point d'inflexion » ou l'altération qui amorcerait et engendrerait cette cascade complexe d'événements. Dans cette optique, ces études ont cherché à identifier le site anatomique d'où s'amorçait la dégénérescence neuronale. Deux hypothèses majeures et d'apparence exclusives ont été énoncées : l'hypothèse de la mort antérograde et l'hypothèse de la mort rétrograde (Figure 1.7).

1.2.4.1 L'hypothèse de la mort antérograde

Cette hypothèse fut initialement énoncée par le Dr. Andrew Eisen en 1992 (Eisen et al., 1992) et stipule que la dégénérescence des motoneurones supérieurs engendrerait la perte des

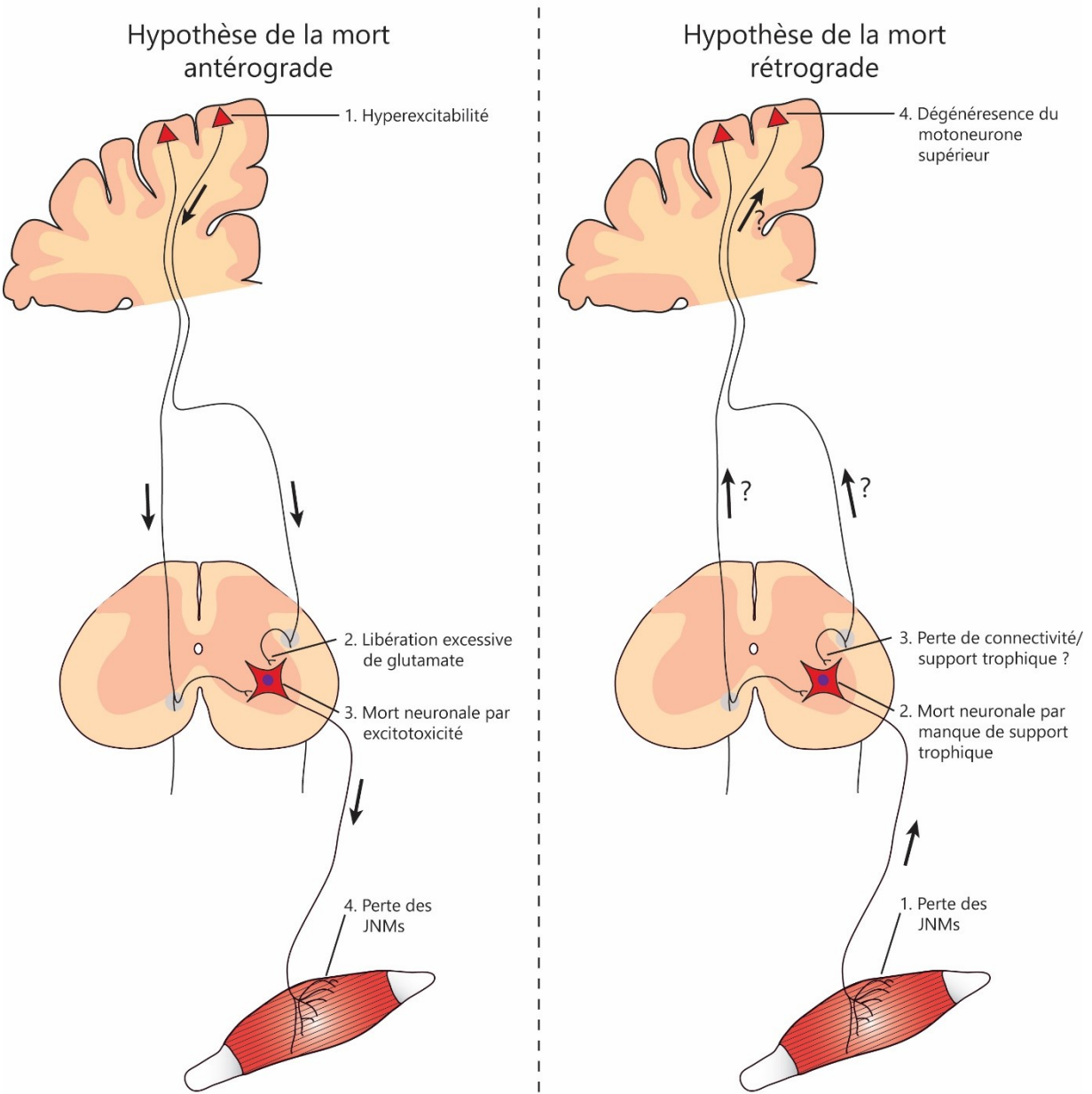


Figure 1.7. Hypothèses quant à l'origine de la dégénérescence neuronale. Schéma représentant les deux hypothèses principales quant à la séquence d'événements ayant lieu dans la SLA. L'hypothèse de la mort antérograde propose que les changements pathologiques s'initieraient au sein du cortex moteur. L'hyperexcitabilité corticale causerait la mort des motoneurones par excitotoxicité et la perte des JNMs. De manière opposée, l'hypothèse de la mort rétrograde suggère que la perte des JNMs serait l'événement initiateur. La perte du support trophique musculaire causerait la mort des motoneurones inférieurs. Le mécanisme par lequel ces événements mèneraient à la dégénérescence des motoneurones supérieurs demeure cependant nébuleux.

motoneurones inférieurs. Anecdotiquement, bien qu'il ne l'ait pas énoncé de manière aussi détaillée, cette notion peut être retracée jusqu'à Charcot lui-même, ayant déclaré lors de sa quatorzième leçon en parlant de la moelle épinière : « [...] *dans la sclérose latérale amyotrophique, la lésion symétrique des cordons latéraux (colonnes latérales), d'où résultent la paralysie et la contracture (spasticité), se montre la première, tandis que l'altération de la substance grise antérieure, à laquelle se rattache l'atrophie des muscles, serait un phénomène consécutif.* » (Charcot and Bourneville, 1872; Turner and Swash, 2015). Comme en témoigne le fait que Charcot y avait déjà adhéré à l'époque, cette hypothèse découle de nombreuses observations cliniques. Notamment, le patron de propagation des symptômes semble parfois suivre l'organisation somatotopique du cortex moteur plutôt que celle de la moelle épinière (Ravits and La Spada, 2009; Eisen and Kuwabara, 2012; Eisen et al., 2017). De plus, les populations de motoneurones inférieurs résistants à la SLA, tels les neurones oculomoteurs et les motoneurones γ , sont dépourvues de connexions directes provenant des motoneurones corticospinaux, suggérant que la présence d'une innervation corticale directe est nécessaire à la dégénérescence des motoneurones inférieurs.

Plus récemment, des études de stimulation magnétique transcrânienne viennent appuyer cette hypothèse. En effet, tel que mentionné précédemment, le cortex moteur des patients SLA est hyperexcitable (Vucic et al., 2008; Vucic et al., 2011) et pourrait contribuer à la dégénérescence des motoneurones inférieurs. De manière intéressante, cette hyperexcitabilité semble précéder le déclenchement de la maladie, étant observé jusqu'à 3 ans avant l'apparition des premiers symptômes chez des patients familiaux porteurs d'une mutation connue (Menon et al., 2015). Chez certains modèles animaux, la dégénérescence des motoneurones supérieurs précède celle des motoneurones inférieurs (Ozdinler et al., 2011; Jara et al., 2012), bien que cet aspect de la pathologie ne soit pas présent dans tous les modèles animaux de la SLA (Arnold et al., 2013; Thomsen et al., 2014). Finalement, la diminution de l'expression de la SOD1 mutée dans le cortex moteur semble influencer la dégénérescence des motoneurones inférieurs (Thomsen et al., 2014). Ensemble, ces résultats suggèrent que l'atteinte des motoneurones supérieurs peut précéder et contribuer à celle des motoneurones inférieurs, même dans des modèles où leur propre dégénérescence n'arrive que dans les stades plus tardifs (Thomsen et al., 2014).

1.2.4.2 L'hypothèse de la mort rétrograde

Opposée à l'hypothèse de la mort antérograde, se trouve l'hypothèse de la mort rétrograde, stipulant que la dégénérescence s'amorcerait plutôt au niveau des terminaisons axonales des motoneurones, et que la perte de support trophique provenant de leur cible mènerait à la dégénérescence du corps cellulaire. La première formulation de cette hypothèse peut probablement être attribuée au Dr. Stanley H. Appel en 1981 (Appel, 1981) qui émit l'hypothèse que la mort neuronale dans les maladies neurodégénératives pourrait être attribuée à la perte de support trophique provenant de leur cible postsynaptique. Cependant, c'est au Dr. Jonathan Glass, en 2004, que l'on doit la formulation actuelle de l'hypothèse et les premières données expérimentales la supportant. Dans une étude pionnière, son équipe montra que la perte des JNMs semblait précéder les premiers signes de mort neuronal au niveau de la moelle épinière chez des souris SOD1^{G93A} ainsi que chez un patient atteint de la SLA étant décédé à un stade précoce de la maladie (Fischer et al., 2004). Ce modèle serait notamment cohérent avec les déficits dans le transport axonal observés dans la maladie (section 1.2.1.3), induisant des dysfonctions en périphérie. Depuis, plusieurs données expérimentales sont venues valider ces observations (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006; Vinsant et al., 2013; Tallon et al., 2016) et appuyer cette hypothèse. La prévention de la mort du corps cellulaire, notamment par l'élimination du gène proapoptotique *Bax*, n'empêche pas ou n'améliore que modestement la dégénérescence des JNMs (Gould et al., 2006; Suzuki et al., 2007; Parone et al., 2013). De plus, Dengler et al. (1990) ont montré, en utilisant des enregistrements EMG chez des patients, que certains motoneurones uniques semblaient produire des potentiels et des forces réduites par rapport à la normale. Ils argumentèrent que ce phénomène reflèterait une perte de certaines terminaisons axonales précédant la dégénérescence globale de ces motoneurones.

Malgré ces études, cette hypothèse demeure hautement controversée à ce jour. En effet, la perte de JNMs ne précède pas la mort des motoneurones inférieurs dans tous les modèles animaux, notamment les rats SOD1^{G93A} (Thomsen et al., 2014). De plus, la dégénérescence globale d'un motoneurone pourrait simplement initialement se manifester par la dégénérescence de son axone. En effet, la perte de JNMs à un temps donné semble rapide et restreinte à un groupe de motoneurones, alors que d'autres motoneurones sont épargnés (Pun et al., 2006; Schaefer et al., 2005

). Si la dégénérescence s'amorçait au niveau des terminaisons, on pourrait s'attendre à ce que les motoneurones soient graduellement affectés. Finalement, le nombre de terminaisons axonales de plusieurs motoneurones semble ne pas régresser, mais plutôt augmenter durant la maladie (McComas et al., 1971; Dengler et al., 1990; Dantes and McComas, 1991; Schmied et al., 1999; Schaefer et al., 2005).

1.2.4.3 L'importance de l'étude de la JNM dans la SLA

Dans l'ensemble, ces deux extrêmes semblent dresser un portrait incomplet de la physiopathologie de la SLA; chaque hypothèse étant incapable de fournir une réponse complète par rapport à l'autre. Cependant, ces deux hypothèses démontrent que des changements précoces se manifestent au niveau du cortex moteur et de la JNM durant la SLA, et semblent contribuer à la pathologie. Ainsi l'étude de ces deux structures et de la contribution des cellules non motoneuronales s'y trouvant, pourrait permettre de mieux comprendre la pathogenèse et les stades précoces de la maladie. Cette connaissance pourrait s'avérer cruciale dans le développement de biomarqueurs ou de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la SLA ciblant ces événements précoces.

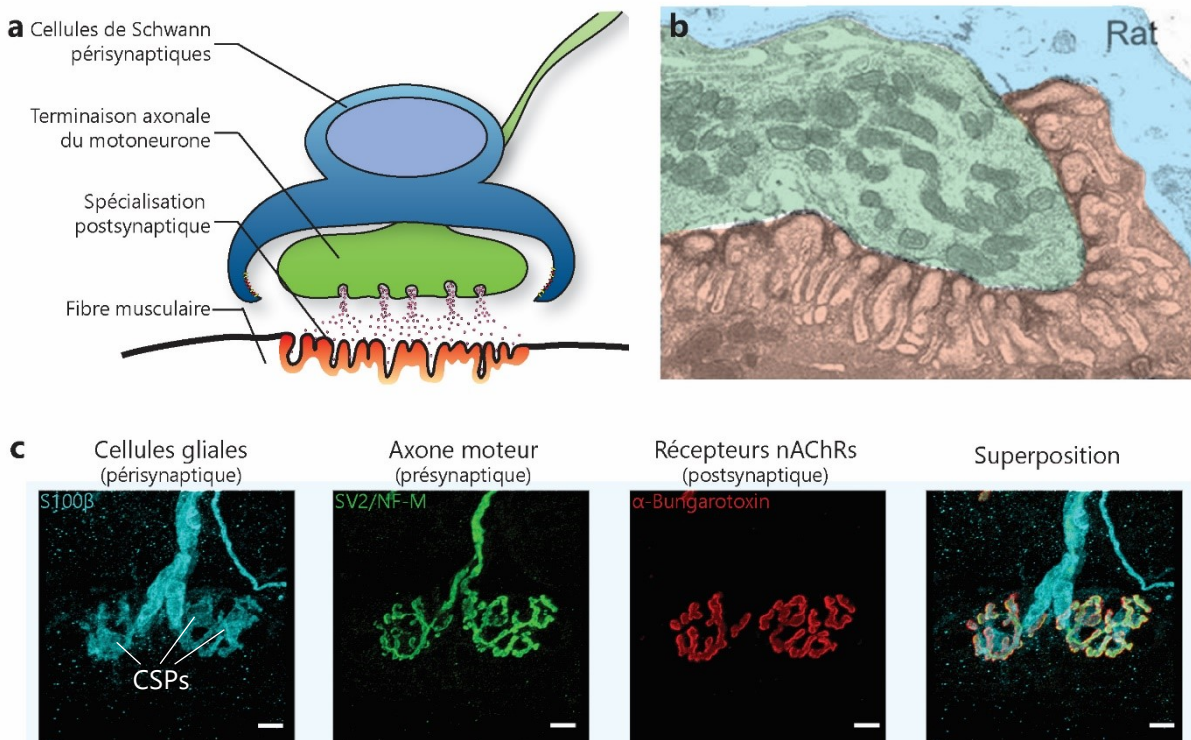
En ce sens, l'étude de la JNM est particulièrement importante dans la SLA. En effet, cette perte précoce de la connexion entre les motoneurones inférieurs et les muscles a un impact direct sur la qualité de vie des patients. De plus, étant situé en périphérie, la JNM est facilement accessible chez les patients, facilitant le développement de thérapies ou de biomarqueurs y étant associé. Il est facile d'envisager que plusieurs des mécanismes de toxicité proposés dans la SLA puissent mener à une déstabilisation des JNMs. Notamment, des déficits dans le transport axonal, le transport de granules d'ARN ou la régulation de la translation locale d'ARN pourrait considérablement affecter les propriétés des JNMs. De même, les terminaisons axonales des motoneurones sont chargées de mitochondries, ce qui pourrait les rendre vulnérable à une altération de la fonction mitochondriale. Finalement, plusieurs des types cellulaires impliqués dans la SLA sont à proximité ou peuvent interagir avec les JNMs, bien que leur rôle précis demeure méconnu dans plusieurs cas (CSPs, fibre musculaires et macrophages par exemple).

Pourtant, peu d'études à ce jour ont tenté de comprendre les mécanismes pathologiques menant à sa perte. Bien que plusieurs changements fonctionnels et moléculaires aient été identifiés (section 1.4) (Moloney et al., 2014; Arbour et al., 2017), le lien avec les mécanismes de toxicité proposés dans la SLA n'a jamais été clairement établi. En fait même la séquence précise des événements y prenant place lors de la progression de la maladie demeure évasive.

1.3 La jonction neuromusculaire : une synapse tripartite

1.3.1 Structure et fonction de la JNM

La JNM est une synapse chimique entre les motoneurones inférieurs et les fibres musculaires. Elle est formée par la superposition de la terminaison de l'axone moteur (présynaptique) et d'une région spécialisée de la fibre musculaire (postsynaptique) (figure 1.8). Ces deux éléments sont recouverts d'un troisième élément, les cellules de Schwann pérисynaptiques, régulant la structure et la fonction de la JNM. Chez les vertébrés, chaque fibre musculaire possède une seule JNM, généralement innervée par un seul axone moteur. Chaque motoneurone peut innerver de 5 à 100 fibres musculaires chez la souris (Hegedus et al., 2008; Valdez et al., 2012), et de 200 à 2000 fibres chez l'humain (Buchthal et al., 1959; Karpati, 2010). Cet ensemble, un motoneurone, ses JNMs et les fibres musculaires qu'elles innervent, porte le nom « d'unité motrice ».



Entre la terminaison axonale et la fibre musculaire se trouve un espace d'environ 50-100 nm appelé fente synaptique (Slater, 2017). Cet espace est rempli par un enchevêtrement de glycoprotéines, la lame basale, un élément de la matrice extracellulaire. La lame basale contient de nombreux éléments essentiels à l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la JNM, dont l'enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine, l'acétylcholinestérase (AChE) (McMahan et al., 1978), les laminines et le dystroglycan (Sanes and Lichtman, 2001).

1.3.1.2 L'élément présynaptique : l'axone moteur

Lorsqu'il s'appose au niveau des fibres musculaires, l'axone moteur forme une structure spécialisée appelée terminaison axonale ou terminaison présynaptique. L'organisation et la composition moléculaire de cette structure diffèrent grandement de celle de l'axone moteur. La terminaison axonale est responsable de la synthèse, du stockage et de la libération des neurotransmetteurs (Wood and Slater, 2001; Slater, 2017). Structurellement, elle est caractérisée par une abondance de mitochondries et un réseau endosomal développé servant à la formation, l'accumulation et le recyclage des vésicules synaptiques. Ces vésicules emmagasinent les neurotransmetteurs libérés à la JNM, l'acétylcholine et l'ATP (Silinsky et al., 1999). Certaines de ces vésicules sont concentrées au-dessus et même liées à des régions spécialisées de la membrane plasmique appelée « zones actives ». Ces régions contiennent une forte densité de canaux calciques voltage-dépendants de type P/Q chez les mammifères et de complexes protéiques SNARE, responsables de l'exocytose des vésicules synaptiques (Wood and Slater, 2001; Slater, 2017).

Lorsqu'un potentiel d'action traverse l'axone moteur et arrive au niveau de la terminaison axonale, la dépolarisation de la membrane induit une entrée massive de Ca^{2+} via les canaux calciques voltage-dépendants. Les ions Ca^{2+} viennent se lier à la synaptotagmine au sein du complexe SNARE permettant ainsi la fusion de la vésicule arrimée avec la membrane plasmique et l'exocytose de son contenu. Cette libération de neurotransmetteur est largement supérieure (2 à 6 fois selon l'espèce; (Wood and Slater, 2001)) à la quantité nécessaire afin d'induire une contraction musculaire, un phénomène appelé « facteur de sécurité ». Cette propriété de la JNM assure une transmission fidèle de l'activité neuronale à la fibre musculaire

même dans des conditions où la libération de neurotransmetteur serait diminuée, par exemple lors d'une décharge soutenue du motoneurone.

Plusieurs éléments peuvent néanmoins venir réguler la libération de neurotransmetteurs à la JNM et l'ampleur du facteur de sécurité. Notamment de nombreux canaux calciques de type L sont situés, non pas au niveau des zones actives, mais en périphérie de la terminaison. Ces canaux peuvent venir moduler le niveau de dépolarisation de la terminaison via l'entrée d'ions Ca^{2+} , modulant ainsi le nombre de vésicules pouvant être relâchées. L'ouverture de ces canaux est notamment modulée par divers récepteurs métabotropes présents sur la terminaison axonale, dont les récepteurs A_{2A} à l'adénosine (Correia-de-Sa et al., 1996; Todd and Robitaille, 2006; Todd et al., 2010). D'autre part, les canaux calciques de type P/Q, au niveau des zones actives, peuvent également être modulés par l'activation de récepteurs A_1 à l'adénosine (Ribeiro and Sebastiao, 1987; Correia-de-Sa et al., 1996; Silinsky, 2004; Todd and Robitaille, 2006; Todd et al., 2010). Finalement, certaines études suggèrent que des autorécepteurs muscariniques de type M2 puissent moduler la libération de neurotransmetteur, mais ce mécanisme demeure incertain et controversé (Slutsky et al., 2001; Minic et al., 2002; Nikolsky et al., 2004). L'importance physiologique de tels mécanismes de régulation demeure incertaine puisque ceux-ci n'affectent pas l'activité musculaire en raison du facteur de sécurité. Néanmoins, il est possible d'émettre l'hypothèse que ces mécanismes permettent de réguler l'efficacité énergétique de la terminaison ou de gérer la vitesse de déplétion de la réserve de vésicules synaptiques lors d'une période d'activité soutenue afin de maintenir le facteur de sécurité.

1.3.1.3 L'élément postsynaptique : la fibre musculaire

L'organisation fonctionnelle de la région spécialisée de la fibre musculaire se trouvant sous la terminaison axonale diffère grandement de celle du reste de la fibre musculaire. Elle est notamment caractérisée par la présence de nombreux repliements de la membrane plasmique apposés aux zones actives, formant des profondes crêtes synaptiques. Le sommet de ces crêtes est peuplé par une forte densité de récepteurs cholinergiques nicotiques (nAChR) alors que le fond des crêtes contient plutôt une grande quantité de canaux sodiques voltage-dépendants (Nav 1.4; (Yang et al., 1991)). Lors de la liaison de l'acétylcholine aux nAChR, une forte dépolarisation est créée, permettant l'atteinte du seuil d'ouverture des canaux sodiques voltage-

dépendants, déclenchant ainsi un potentiel d'action musculaire. La profondeur de ces crêtes varie grandement d'une espèce à l'autre, étant quasi absentes chez les amphibiens et abondantes et complexes chez l'humain (Slater, 2017). Le rôle exact de ces crêtes demeure inconnu à ce jour, mais une possibilité serait qu'elles amplifieraient les courants synaptiques générés au sommet des crêtes, similairement aux épines dendritiques dans le SNC (Slater, 2017).

Plusieurs mécanismes permettent la formation de cette spécialisation postsynaptique et le regroupement de ces canaux et récepteurs à la synapse. Notamment, l'agrine z^+ , sécrétée par la terminaison axonale, entraîne le regroupement des récepteurs nAChR en liant son récepteur « Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 » (LRP4) et en induisant la phosphorylation du corécepteur « Muscle Specific Kinase » (MuSK) (Sanes and Lichtman, 2001; Darabid et al., 2014). En absence de signalisation de MuSK, les nAChRs sont disséminés à travers la membrane musculaire (sarcolemme) (DeChiara et al., 1996). Une autre voie de signalisation cruciale est celle de la neureguline-1 et de la famille de récepteurs tyrosine-kinase ErbB. En effet, bien que d'autres mécanismes semblent contribuer à ce phénomène, la sécrétion de neureguline-1 par la terminaison axonale, ou les cellules de Schwann (Trinidad et al., 2000), favorise la synthèse locale de nAChR (Sanes and Lichtman, 2001; Darabid et al., 2014). Cette synthèse locale est permise par les nombreux noyaux cellulaires sous les crêtes synaptiques, ayant un transcriptome distinct de celui du reste de la fibre musculaire (Ferns and Carbonetto, 2001; Schaeffer et al., 2001; Nazarian et al., 2005; Ketterer et al., 2010).

1.3.1.4 L'élément glial : les cellules de Schwann périssynaptiques

Les CSPs, aussi connues sous le nom de cellules de Schwann terminales, sont un type de cellules de Schwann recouvrant les terminaisons axonales des motoneurons. Le nombre de CSPs recouvrant une JNM varie considérablement selon la taille de la JNM et l'espèce, mais se situe généralement entre 3 et 7 chez la souris (Love and Thompson, 1998; Brill et al., 2011). Chaque CSP couvre un territoire distinct et exclusif sur une même JNM (Brill et al., 2011). Bien qu'en condition normale, les CSPs s'apposent parfaitement sur la terminaison axonale, elles ont des prolongements extrêmement dynamiques, pouvant quitter le territoire synaptique ou envahir la fente synaptique dans certaines circonstances (Zuo and Bishop, 2008; Smith et al., 2013).

Contrairement aux CSMs, les CSPs ne forment pas de gaine de myéline et ont plutôt un rôle analogue à celui des astrocytes du SNC. En effet, les CSPs jouent un rôle crucial à la JNM, étant essentielles au maintien de sa structure et de sa fonction (Ko and Robitaille, 2015). En effet, l'ablation sélective des CSPs provoque de nombreux changements morphologiques et fonctionnels à long terme, menant éventuellement à une dénervation des JNMs (Reddy et al., 2003). Cependant, leur rôle à la JNM ne se limite pas à une fonction de support. À l'instar des astrocytes, plusieurs études au courant des années 90 ont montré que les CSPs sont en mesure de détecter l'activité synaptique et de la moduler de manière aiguë (Jahromi et al., 1992; Reist and Smith, 1992; Robitaille, 1995, 1998) (Figure 1.9). De manière générale, la libération de neurotransmetteur active plusieurs voies de signalisation dépendantes du Ca^{2+} menant à la libération de substances modulatrices portant le nom de « gliotransmetteurs ». Ces études ont permis de déterminer que les CSPs et les astrocytes sont des partenaires actifs essentiels lors de la transmission synaptique, un concept portant le nom de « synapse tripartite » (Araque et al., 1999; Araque et al., 2014).

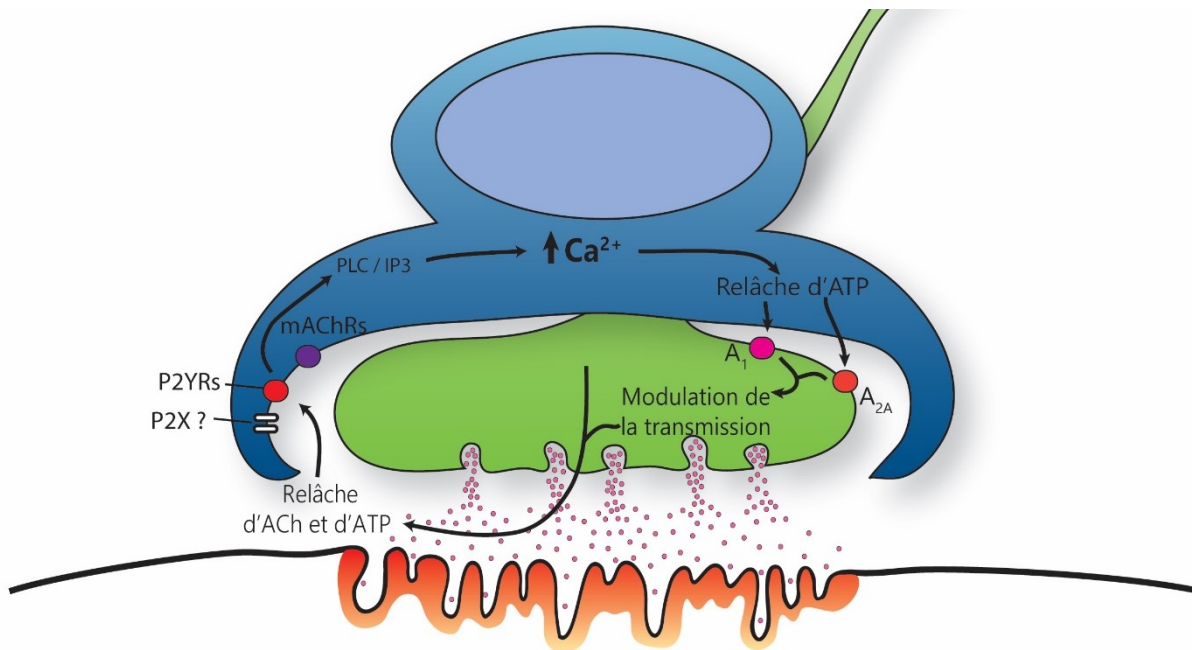


Figure 1.9. Modulation de l'activité synaptique par les CSPs. Les CSPs détectent l'activité synaptique notamment grâce à leurs récepteurs mAChRs et P2YRs. L'activation de ces récepteurs induit une relâche de calcium des réserves internes (réponse calcique). S'en suivent une libération d'ATP gliale et l'activation des récepteurs à l'adénosine de type A_1 ou A_{2A} présynaptique.

1.3.1.4.1 La détection de l'activité synaptique

À la JNM de souris, les CSPs sont en mesure de détecter l'activité de la terminaison axonale grâce à plusieurs types de récepteurs métabotropes. Généralement couplée aux protéines G_q , l'activation de ces récepteurs induit une libération de Ca^{2+} des réserves internes par la cascade classique dépendante de l'IP3 (inositol triphosphate) (Ko and Robitaille, 2015). Les principaux récepteurs sont les mAChR et les récepteurs purinergiques de la famille des P2Y (P2YR), liant l'acétylcholine ou l'ATP et ses dérivés, respectivement (Figure 1.9). L'identité exacte de ces récepteurs a cependant été peu caractérisée. D'une part, les mAChRs couplés aux protéines G_q , les M1, M3 et M5, sont présents à la JNM au niveau des fibres musculaires ou des CSPs (Wright et al., 2009). Des données non-publiées du laboratoire, obtenues dans le cadre d'un projet visant à moduler chroniquement l'activité des mAChRs des CSPs *in vivo*, suggèrent que les sous-types de mAChR principaux sur les CSPs à la JNM adulte serait les M3 et les M1. En effet, un antagoniste très spécifique pour les M3 et les M1, le darifenacin (Moriya et al., 1999; Chapple, 2004), abolit presque complètement les réponses calciques induites par la muscarine (agoniste non spécifique des mAChRs) dans le muscle soléaire (*soleus*) (Tremblay et al., (in prep)). Cependant, il demeure inconnu si d'autres récepteurs cholinergiques contribuent à l'activité des CSPs dans d'autres muscles ou d'autres circonstances. D'autre part, l'identité des récepteurs sous-tendant la signalisation purinergique au sein des CSPs adultes demeure évasive. Lors du développement, cette signalisation est entièrement dépendante des récepteurs P2YR1 (Darabid et al., 2013a; Heredia et al., 2018). Cependant, à la JNM adulte d'autres sous-types de récepteurs, dont les récepteurs A_1 à l'adénosine, semblent être présents, mais leur identité n'a encore à ce jour pu être confirmé avec certitude (Rochon et al., 2001; Arbour et al., 2015). Certaines études suggèrent que les CSPs possèdent des récepteurs ionotropes, dont des récepteurs purinergiques de la famille des P2X (Robitaille, 1995; Rochon et al., 2001; Todd and Robitaille, 2006). De même, une étude récente suggère que des nAChRs de type $\alpha 7$ seraient présents à la JNM de mammifères, bien qu'ils ne semblent pas participer à l'activité des CSPs en conditions physiologiques (Petrov et al., 2014).

De manière intéressante, l'activité calcique des CSPs ne dépend pas seulement de l'activité présynaptique et de la relâche de neurotransmetteur. Une étude clé par Rousse et al. (2010) a montré que la sensibilité des CSPs aux signaux cholinergiques et purinergiques diffère

grandement d'un muscle à l'autre, indépendamment du niveau d'activité présynaptique. En effet, l'augmentation de la quantité de neurotransmetteurs libérés n'affecte pas l'activité des CSPs de manière aiguë, montrant que l'activité des CSPs dépend également de leurs propriétés intrinsèques (Rousse et al., 2010; Arbour et al., 2015). Cependant, ces propriétés ne sont pas immuables, et plusieurs facteurs peuvent moduler leur sensibilité aux neurotransmetteurs. En effet, une augmentation ou une diminution chronique de l'activité présynaptique induit des changements complexes dans leur sensibilité aux signaux cholinergiques et purinergiques (Belair et al., 2010). De même les CSPs possèdent des récepteurs peptidergiques et des récepteurs aux neutrophines, dont le rôle est de moduler leur sensibilité à la signalisation purinergique ou cholinergique à long terme (Bourque and Robitaille, 1998; Todd et al., 2007). Ainsi, l'activité des CSPs dépend à la fois des propriétés présynaptiques et de leurs propriétés intrinsèques modulables à long terme.

1.3.1.4.2 La modulation de l'activité synaptique

L'interaction entre les CSPs et les terminaisons axonales est bidirectionnelle et ne se limite pas à la détection de l'activité synaptique. En retour, les CSPs ont la capacité de moduler la transmission synaptique à long terme, un phénomène appelé plasticité synaptique (Robitaille, 1998; Ko and Robitaille, 2015) (Figure 1.9). De manière intéressante, les CSPs peuvent induire une potentialisation ou une dépression à long terme de l'activité synaptique selon le contexte (Todd et al., 2010; Ko and Robitaille, 2015; Darabid et al., 2018). Cette dualité est permise par la capacité des CSPs à discerner la force et le patron d'activité présynaptique (Todd et al., 2010; Darabid et al., 2013a), leur permettant d'adapter leur réponse au contexte synaptique. Ce concept fut notamment mis en lumière dans une étude par Todd et al. (2010), où un patron d'activité tonique ou en bouffée de l'élément présynaptique induisaient des cinétiques calciques distinctes dans les CSPs et une modulation distincte de l'activité synaptique : une potentialisation ou une dépression, respectivement. Dans les deux cas, l'activation des récepteurs A_{2A} ou A₁ présynaptiques via la libération de gliotransmetteurs était impliquée. De façon surprenante, ces phénomènes opposés de plasticité synaptique semblent dépendre du même mécanisme effecteur, soit la libération d'ATP ou d'adénosine gliale (Todd et al., 2010; Darabid et al., 2018). En effet, la cascade de signalisation reliant l'activité calcique des CSPs à la relâche de gliotransmetteurs, et permettant cette modulation distincte, demeure méconnue.

Une hypothèse serait que la quantité d'ATP libérée varierait en fonction de l'activité gliale, induisant préférentiellement une activation des récepteurs A₁ ou A_{2A} selon sa concentration extracellulaire (Todd and Robitaille, 2006; Todd et al., 2010). Alternativement, la libération de gliotransmetteurs pourrait avoir lieu à des sites distincts, activant ainsi des groupes de récepteurs présynaptiques différents (Darabid et al., 2018). Dans l'ensemble, ces études montrent que les CSPs à la JNM de mammifères sont capables de moduler de manière bidirectionnelle l'activité présynaptique, en fonction du contexte, via la libération de gliotransmetteurs.

1.3.1.5 Les types d'unités motrices

Tel qu'invoqué précédemment (section 1.2.2), il existe trois types d'unités motrices, déterminés en fonction des propriétés distinctes des motoneurones α et des fibres musculaires. En effet, les propriétés électrophysiologiques des motoneurones concordent avec les propriétés contractiles des fibres musculaires qu'ils innervent, leur permettant d'exercer des fonctions distinctes (Burke et al., 1971; Burke et al., 1973; Hennig and Lomo, 1985; Manuel and Zytnicki, 2011). À une extrémité du spectre se trouvent les unités motrices de type rapide fatigable (FF), constituées des plus gros motoneurones α innervant les fibres musculaires exprimant l'isoforme IIb ou IIx de la chaîne lourde de la myosine (MHC IIb ou IIx). Il s'agit des unités motrices ayant le plus grand ratio d'innervation (nombre de JNMs par motoneurone), se situant entre 20 et 50 chez la souris (Hegedus et al., 2008; Valdez et al., 2012). Tel que leur nom l'indique, les unités motrices FF génèrent rapidement une grande force contractile, induite par un haut taux de décharge du motoneurone, mais se fatiguent rapidement. À l'autre extrémité du spectre se trouvent les unités motrices lentes (S), ayant un faible ratio d'innervation et innervant des fibres musculaires exprimant la MHC de type I. Ces unités motrices génèrent donc une force musculaire faible, mais capable d'être maintenue de façon tonique presque indéfiniment. Les unités motrices rapides résistantes à la fatigue (FR) représentent le phénotype intermédiaire, générant une grande force musculaire pouvant être modérément soutenue. Ces unités motrices innervent les fibres musculaires exprimant la MHC de type IIa.

De manière intéressante, les propriétés des JNMs associées à chaque type d'unité motrice reflètent également leur fonction. En effet, les JNMs associées aux unités motrices FF et FR sont généralement plus grosses que celles associées aux unités motrices S (Prakash et al., 1996).

De même, les JNMs associées aux unités motrices FF ont une plus grande force synaptique (quantité de vésicules synaptiques libérées par potentiel d'action présynaptique) que celles associées aux unités motrices FR et S (Tremblay et al., 2017). Ces propriétés distinctes émergent probablement d'une composition moléculaire légèrement différente entre chaque type de JNM, bien que, à ma connaissance, aucune étude ne se soit attardée à évaluer spécifiquement ces différences.

1.3.2 La plasticité et la réparation de la JNM

Chez les mammifères adultes, les JNMs sont très stables au fil du temps, ne montrant que peu de changements morphologiques (Balice-Gordon and Lichtman, 1990; Schaefer et al., 2005; Li et al., 2011; Turney et al., 2012). Cependant, cette structure devient extrêmement dynamique suite à une lésion ou une perturbation de sa fonction. Cette plasticité a pour but de restaurer la connectivité entre le SNC et les muscles squelettiques, étant ainsi cruciale pour préserver la fonction musculaire. Les CSPs sont essentielles à ce processus, forgeant le chemin permettant le rétablissement des contacts synaptiques. De manière importante, ces mécanismes ne sont pas spécifiques aux lésions des nerfs périphériques et viennent également compenser la dégénérescence observée lors de maladies neuromusculaires, telle la SLA (Schaefer et al., 2005) (McComas et al., 1971). Ainsi l'étude de ces mécanismes compensatoires permet de mieux comprendre comment ceux-ci peuvent pallier à la perte axonale, efficacement ou non, dans un contexte pathologique.

1.3.2.1 La réinnervation suite à une lésion axonale

Contrairement au SNC, le SNP a l'incroyable capacité de se régénérer suite à une lésion axonale. Une lésion axonale induit la dégénérescence complète et synchrone du segment distal à la lésion alors que la partie proximale est préservée (Figure 1.10) (Waller, 1850). Ce processus fut initialement décrit par Augustus Waller en 1850, lui conférant ainsi son nom : « la dégénérescence Wallerienne ». Plusieurs mécanismes compensatoires complémentaires se mettent alors en marche afin de maintenir la fonction musculaire. Les deux principaux sont la régénérescence de l'axone lésé et le bourgeonnement axonal compensatoire (Brown et al., 1981; Rich and Lichtman, 1989) (Figure 1.10).

1.3.2.1.1 La régénérescence de l'axone lésé

Suite à la dégénérescence du segment distal, le segment proximal à la lésion forme un nouveau cône de croissance et croit à travers le tube endoneural, matrice extracellulaire produite par les CSM et persistant suite à une dégénérescence axonale. Éventuellement, cet axone retrace son chemin jusqu'à son muscle cible initial et rétablit des contacts synaptiques au niveau des sites préexistants, un phénomène appelé « réinnervation » (Letinsky et al., 1976). En effet, suite à la dégénérescence de l'élément présynaptique, la lame basale au niveau des JNMs est maintenue, « marquant » ainsi la localisation de l'ancienne synapse, et assurant le maintien de la spécialisation postsynaptique (Marshall et al., 1977; Burden et al., 1979). Cependant la précision de ce processus va au-delà de la réinnervation des sites synaptiques originaux. Une étude élégante par Nguyen et al. (2002) a montré qu'un motoneurone réinnervait le même groupe de JNMs qu'il innervait initialement (~90% de fidélité), reformant donc la même unité

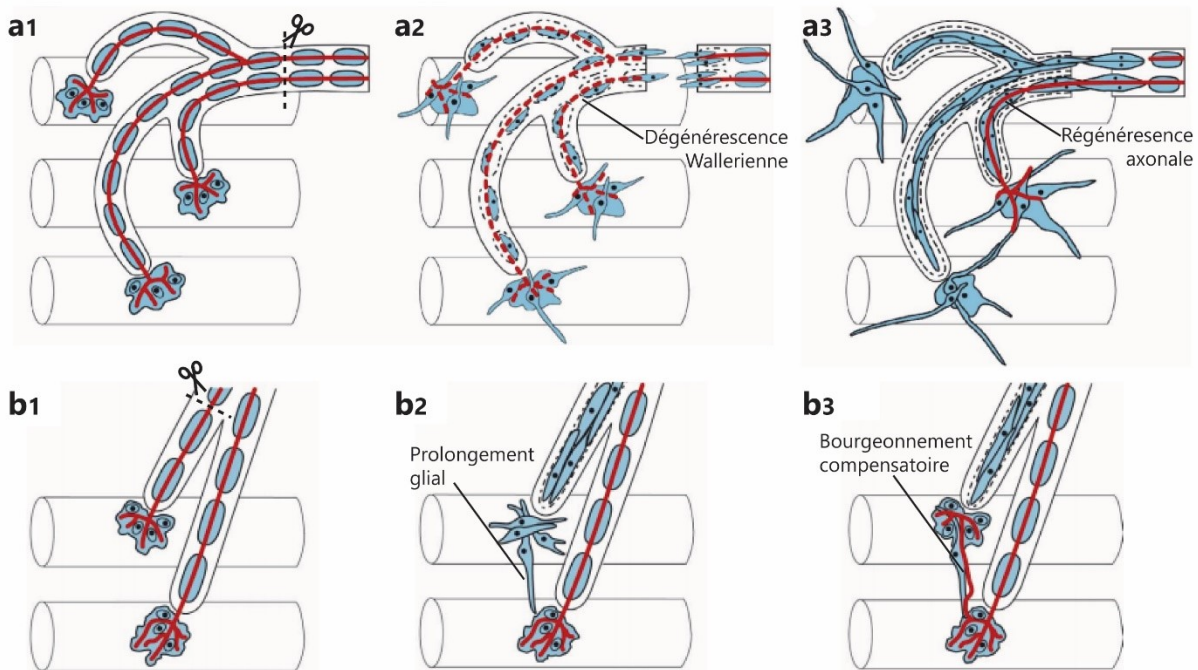


Figure 1.10. Mécanismes de réinnervation suite à une lésion axonale. Schéma représentant les étapes menant à la réinnervation des JNMs suite à une lésion axonale. (a1) Suite à une lésion complète du nerf, (a2) les segments axonaux distaux au site de lésion dégénère par un processus appelé « dégénérescence Wallerienne ». (a3) Éventuellement, le segment proximal forme un cône de croissance et repousse en direction des JNMs qu'il innervait. (b1) Suite à une lésion axonale partielle, (b2) des prolongements gliaux issus des JNMs dénervées contactent les axones restants, (b3) induisant la formation de bourgeonnements axonaux compensatoires. Adapté de (Kang et al., 2003). Droits de reproduction obtenus de Springer Nature /RightsLink.

motrice. Cette démonstration fut permise par l'utilisation de souris exprimant une protéine fluorescente dans seulement quelques motoneurones (*thy1-YFP* lignée H), permettant la visualisation de l'arborisation axonale avant et après la lésion.

Bien que précis, ce processus est très lent, les axones avançant en moyenne de 1 à 2 mm par jour (Kang and Lichtman, 2013). À titre illustratif, la réinnervation des muscles distaux de la patte postérieure d'une souris peut prendre entre 10 et 16 jours suite à une lésion du nerf sciatique se trouvant à seulement quelques centimètres. De plus, ce mécanisme ne s'applique pas complètement dans un contexte où le neurone entier dégénère, tel que lors de la SLA ou d'autres maladies des motoneurones. Ainsi, un autre mécanisme complémentaire permet une récupération fonctionnelle plus rapide, mais requiert que certains axones aient été épargnés par la lésion.

1.3.2.1.2 Le bourgeonnement axonal compensatoire

Suite à une lésion partielle d'un nerf périphérique, les axones survivants forment de nouvelles branches minces afin de réinnover les JNMs voisines dépourvues d'axones. Ce bourgeonnement (traduction du terme anglais « sprouting ») peut émaner de divers endroits le long de l'axone (Figure 1.11). De manière générale, ce bourgeonnement est dit axonal ou nodal s'il se forme au niveau d'un nœud de Ranvier et migre à travers l'ancien tube endoneural d'un axone lésé (Brown et al., 1981; Nguyen et al., 2002). Alternativement, le bourgeonnement peut s'effectuer à partir d'une terminaison axonale intacte et est appelé bourgeonnement terminal (Brown et al., 1981). Cette capacité des axones moteurs à réinnover les JNMs voisines et à augmenter la taille de leur unité motrice permet une récupération fonctionnelle rapide qui ne dépend pas de la survie de l'axone lésé. Éventuellement, si l'axone original ne réinnerve pas la JNM, les bourgeonnements vont maturer et devenir myélinisés, formant ainsi des sources d'innervations « permanentes » (Brown et al., 1981).

La capacité des unités motrices à augmenter leur taille n'est pas infinie, semblant théoriquement limitée à quatre ou cinq fois leur taille initiale chez la souris (Thompson and Jansen, 1977; Brown et al., 1981) et deux fois leur taille initiale chez l'humain (Dengler et al., 1990). De manière intéressante, la capacité des axones moteurs à effectuer un bourgeonnement dépend notamment du type d'unité motrice (Dengler et al., 1990). Une étude par Frey et al.

(2000) a montré qu'au sein d'un même muscle, les unités motrices de type S et FR étaient nettement plus propices à effectuer un bourgeonnement terminal que les unités motrices FF suite à un blocage de la transmission synaptique. De même, les unités motrices S et FR semblent démontrer moins de bourgeonnement axonal (Brown et al., 1980; Brown et al., 1981). Ainsi, bien que tous les types d'unités motrices soient capables d'effectuer du bourgeonnement axonal ou terminal, les propriétés des unités motrices semblent favoriser un type ou l'autre.

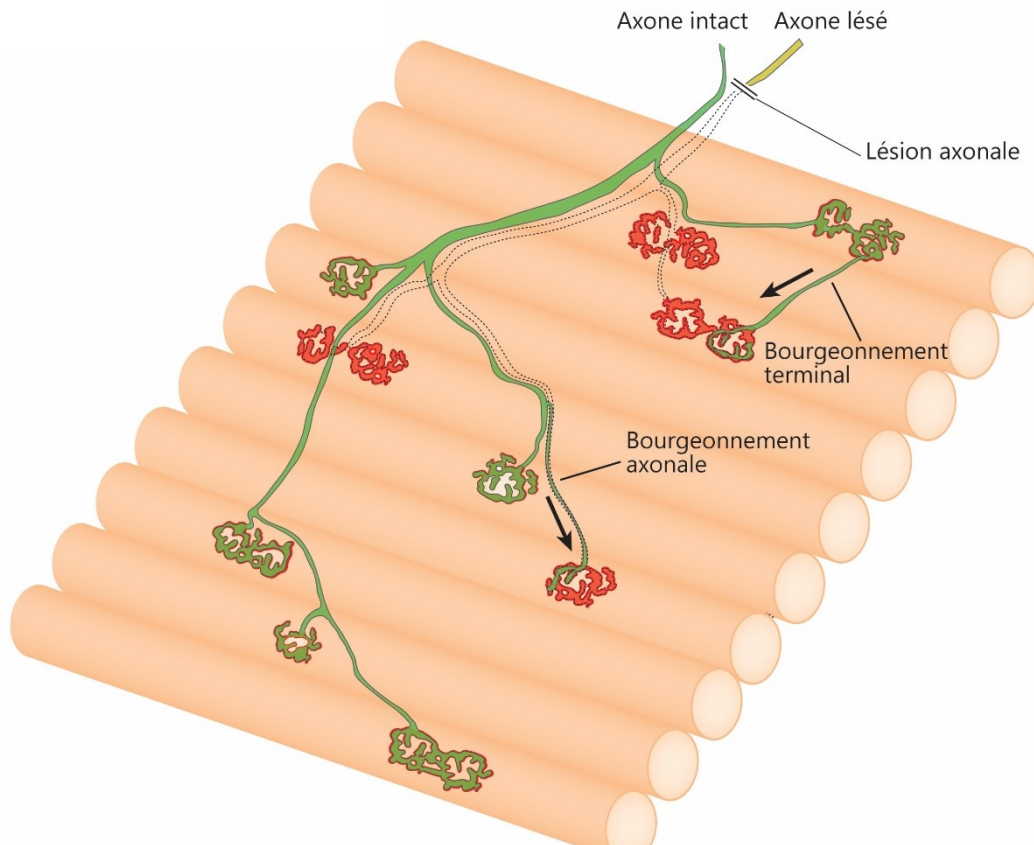


Figure 1.11. Types de bourgeonnement compensatoire. Schéma représentant les lieux d'où peut émaner le bourgeonnement compensatoire. Suite à une lésion axonale partielle, les axones survivants peuvent former des bourgeons à partir d'un nœud de Ranvier (bourgeonnement axonal) ou d'une terminaison axonale (bourgeonnement terminal). Beige : fibres musculaires; Rouge : récepteurs nAChRs postsynaptiques; Vert : axone survivant; Jaune : axone lésé.

1.3.2.2 Le rôle crucial des cellules de Schwann pérисynaptiques

De manière intéressante, les CSPs sont essentielles à ces processus de réparation. En effet, suite à un dommage axonal ou à une interruption de la transmission synaptique, les CSPs vont adopter un phénotype leur permettant de favoriser la formation de bourgeons axonaux ou terminaux et d'éliminer les débris axonaux laissés par l'ancien axone (Figure 1.12).

1.3.2.2.3 Le guidage axonal

Suite à une dénervation ou une interruption de la transmission synaptique, les CSPs associées avec les JNMs affectées forment de long et minces prolongements ciblant des JNMs intactes (Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995b, a; Son et al., 1996; Love and Thompson, 1999; O'Malley et al., 1999). Ces prolongements forment ainsi des « ponts » entre les JNMs innervées et dénervées, et représentent le substrat sur lequel s'effectue le bourgeonnement terminal (Son and Thompson, 1995b, a; Son et al., 1996; O'Malley et al., 1999; Kang et al., 2003) (Figure 1.12a). En effet, le contact de ces prolongements gliaux avec les JNMs innervées induit le bourgeonnement de la terminaison axonale (Son and Thompson, 1995b; Son et al., 1996; O'Malley et al., 1999), et l'inhibition de ce processus diminue drastiquement le nombre de bourgeons terminaux (Love et al., 2003; Tam and Gordon, 2003).

D'autre part, les CSPs sur les JNMs dénervées déterminent la surface postsynaptique qui sera réinnervée par un bourgeon ou l'axone original. L'imagerie *in vivo* conjointe des CSPs et des axones moteurs a montré que les récepteurs nAChR couverts par les CSPs seront réinnervés alors que ceux dépourvus de couverture gliale seront abandonnés par l'élément présynaptique (Kang et al., 2014). En effet, conjointement à la formation de prolongements gliaux, les CSPs sur les JNMs dénervées se rétractent progressivement de l'élément postsynaptique dénervé. Ainsi, une dénervation prolongée mène à une perte de sites synaptiques lors de la réinnervation des JNMs (Rich and Lichtman, 1989). Dans l'ensemble, ces études montrent que les CSPs sont essentielles au guidage des axones lors de la réinnervation à la JNM adulte.

1.3.2.2.2 La phagocytose des débris axonaux

Suite à une lésion axonale, des débris cellulaires et de myéline s'accumulent dans le tube endoneural (Rotshenker, 2011). Les CSMs adoptent alors un phénotype phagocytaire afin d'éliminer ces débris et permettre la croissance axonale (Reichert et al., 1994; Painter et al., 2014; Brosius Lutz et al., 2017). De plus, elles sécrètent de nombreuses chimiokines, des facteurs de la cascade du complément et la lectine Galectine-3 (Gal-3; aussi appelé MAC-2), permettant le recrutement de macrophages et l'opsonisation des débris extracellulaires (Reichert et al., 1994; Rotshenker, 2009, 2011). Ce processus est essentiel à la réinnervation puisque

l'accumulation de débris bloque la croissance axonale et ralentit la réinnervation des JNMs (Kang and Lichtman, 2013).

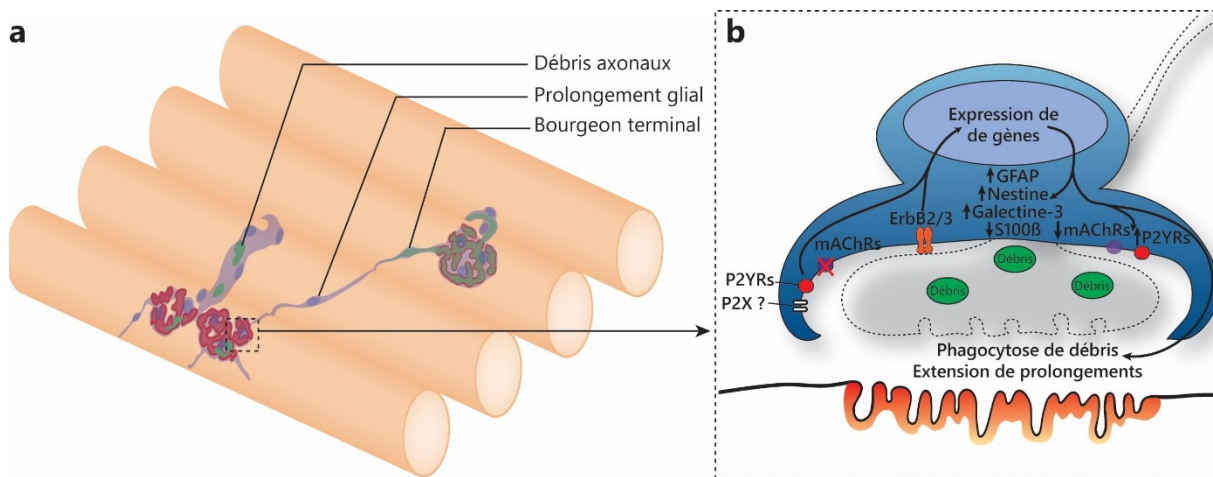


Figure 1.12. Rôle des CSPs aux JNMs dénervées. **a**, Schéma représentant les fonctions remplies par les CSPs aux JNM dénervées. Beige : fibres musculaires; Rouge : récepteurs nAChRs postsynaptiques; Vert : débris axonaux; Bleu : CSPs. **b**, Schéma représentant les changements moléculaires ayant lieu au sein des CSPs aux JNMs dénervées. Il est possible de noter une augmentation de la signalisation purinergique, une diminution de la signalisation muscarinique, une augmentation de l'expression de la Galectine-3 et du GFAP, et une diminution de l'expression du S100 β . Rouge orangé : récepteurs nAChRs postsynaptiques; Vert : débris axonaux; Bleu : CSPs.

Des études récentes montrent que les CSPs adoptent également un phénotype phagocytaire suite à une lésion axonale (Duregotti et al., 2015). En effet, des études de microscopie électronique ont montré que les CSPs contiennent de nombreuses vésicules, des débris de myéline et un réseau endosomal développé dans les jours suivant une lésion axonale (Figure 1.12b) (Birks et al., 1960; Miledi and Slater, 1968). Ce phénotype serait notamment induit par la relâche d'ATP, de peroxyde (H_2O_2) et d'ADN mitochondriale de la terminaison axonale lésée lorsqu'induite par une toxine (Duregotti et al., 2015; Negro et al., 2016). Ces données suggèrent que, similairement aux CSMs, les CSPs participent à l'élimination de débris cellulaires au niveau des terminaisons axonales.

1.3.2.2.3 L'adaptabilité des CSPs

Ainsi, suite à une dénervation, les CSPs semblent adopter un phénotype « pro-régénératif » associé à la formation de prolongements gliaux et à la phagocytose de débris axonaux. Sous-tendant ces changements fonctionnels, les CSPs adaptent leur transcriptome en réponse à l'atteinte de l'élément présynaptique. Notamment, les CSPs augmentent leur

expression de GFAP (chez la grenouille) (Georgiou et al., 1994; Georgiou et al., 1999), de nestine (Kang et al., 2007) et de la Semaphorine 3A (De Winter et al., 2006). De même, l'expression du marqueur glial S100 β diminue graduellement suite à la perte de l'axone moteur (Magill et al., 2007). Des données récentes du laboratoire, obtenues dans le cadre d'un projet visant à comparer les propriétés calciques des CSPs lors du développement post-natal ou suite à une dénervation, montrent que la sensibilité des CSPs aux signaux cholinergiques semble diminuer également (Perez-Gonzalez et al.). Bien qu'aucune étude n'ait réussi à effectuer une comparaison systématique du phénotype des CSPs aux JNMs innervées et dénervées (par séquençage d'ARN par exemple), il est clair que les CSPs ont la capacité de détecter une atteinte de l'élément présynaptique et de s'adapter afin de favoriser la réinnervation.

Outre la potentielle libération d'ATP, de peroxyde et d'ADN de terminaison lésée (Duregotti et al., 2015), un inducteur potentiel de ce phénotype « pro-régénérateur » ayant été suggéré serait la Neureguline-1. En effet, l'activation de la voie de signalisation de la Neureguline-1 induit des changements au sein des CSPs similaires à ceux induits par une lésion axonale (Trachtenberg and Thompson, 1997; Hayworth et al., 2006). Cependant, ce mécanisme serait potentiellement de nature autocrine, puisque la Neureguline-1, normalement d'origine neuronale aux JNMs innervées, serait synthétisée et sécrétée par les CSPs elle-même suite à une dénervation (Carroll et al., 1997; Rosenbaum et al., 1997; Trinidad et al., 2000). Ainsi, si tel est le cas, la Neureguline-1 ne peut être le signal par lequel les CSPs détectent une atteinte de l'élément présynaptique puisqu'il est d'origine glial aux JNMs dénervées. Un autre inducteur potentiel du phénotype pro-régénérateur serait la capacité des CSPs à détecter l'activité synaptique (section 1.3.1.3.1). En effet, l'activation des récepteurs muscarinique semble intimement liée à leur capacité à réguler la réinnervation (Figure 1.12). Un blocage de la transmission synaptique induit des changements similaires à la dénervation au sein des CSPs (Georgiou et al., 1994; Son and Thompson, 1995b). De même, le blocage des récepteurs muscariniques des CSPs chez la grenouille induit une augmentation de l'expression de la GFAP, alors que l'application de muscarine suite à une lésion axonale la prévient (Georgiou et al., 1994; Georgiou et al., 1999). Finalement, le blocage ou l'absence de certains types de récepteurs muscariniques déstabilise les JNMs murines, induisant plusieurs changements morphologiques,

dont certains reproduisant ceux induits par la voie de signalisation de la Neureguline-1 (Wright et al., 2009).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les CSPs sont essentielles au processus de réinnervation, favorisant le bourgeonnement terminal et la croissance axonale. Ces fonctions compensatoires sont permises grâce à l'adaptabilité des CSPs, notamment grâce à leur capacité à détecter une interruption de l'activité synaptique.

1.4 Changements locaux à la JNM dans la SLA

Tel que mentionné précédemment, la perte de la JNM est un événement précoce mais peu caractérisé dans la SLA (Fischer et al., 2004; Pun et al., 2006; Vinsant et al., 2013; Tallon et al., 2016). La perte de JNMs semble indépendante de la dégénérescence du corps cellulaire des motoneurones- α (Gould et al., 2006; Suzuki et al., 2007; Parone et al., 2013), mais les mécanismes moléculaires et cellulaires menant à cette perte restent peu définis. Cela n'empêche pas que certaines études ont identifié des changements moléculaires et fonctionnels précoces à la JNM de modèles animaux de la SLA. Ces changements pourraient contribuer à la dégénérescence de cette synapse lors de la maladie, bien qu'un lien de causalité clair reste à démontrer. De manière intéressante, certains de ces changements semblent reliés aux mécanismes de réinnervation des JNMs, suggérant que ce processus compensatoire puisse être altéré ou sous-optimal durant la progression de la maladie.

1.4.1 Les altérations précoces moléculaires et fonctionnelles de la JNM

1.4.1.1 L'altération précoce de l'activité synaptique

L'un des changements les plus précoces à la JNM dans la SLA est l'altération de l'activité synaptique (Rocha et al., 2013; Arbour et al., 2015), étant observable plus de 12 mois avant l'apparition des premiers symptômes dans un modèle murin lent de la SLA (SOD1^{G37R} ligne 29). Ces changements ne sont pas spécifiques aux modèles SOD1, ayant été observés chez des souris TDP-43^{Q331K} (Chand et al., 2018), des poissons zébrés (*Danio rerio*) (Armstrong and Drapeau, 2013a, b) ou des drosophiles (*Drosophila melanogaster*) (Shahidullah et al., 2013; Machamer et al., 2014) porteurs de divers mutations associées à la SLA, ainsi que chez des patients (Maselli et al., 1993). Cependant, ces études semblent contradictoires, certaines rapportant une diminution (Maselli et al., 1993; Armstrong and Drapeau, 2013a, b; Shahidullah et al., 2013; Machamer et al., 2014; Chand et al., 2018) ou une augmentation de la transmission synaptique (Arbour et al., 2015), ou les deux (Rocha et al., 2013). Face à cette controverse, notre laboratoire a récemment effectué une analyse systématique de l'activité synaptique à la JNM dans des souris SOD1^{G37R} (Tremblay et al., 2017) (annexe 1), montrant que ces changements d'activité évoluaient au fil du temps, et dépendaient du type d'unité motrice. En effet, la

transmission synaptique était constamment diminuée aux JNMs associées à des unités motrices FF, alors qu'elle était initialement augmentée aux JNMs d'unités motrices S avant de revenir à la normale peu avant l'apparition des symptômes. Dans tous les cas, ces changements semblent d'origine présynaptique, étant associés à une diminution ou une augmentation de la quantité de vésicules synaptiques libérées (la force synaptique) (Figure 1.13). Bien que la cause et l'impact de cette altération de la fonction synaptique demeurent encore incertains à ce jour, elle démontre que la JNM est affectée à un stade très précoce et de façon ubiquitaire dans la SLA, longtemps avant l'apparition des premiers changements structuraux.

1.4.1.2 L'apparition de facteurs déstabilisant la synapse

D'autre part, plusieurs études rapportent des changements précoces dans diverses voies de signalisation régulant la stabilité ou la réparation de la JNM dans des modèles de la SLA (Gonzalez de Aguilar et al., 2008; Moloney et al., 2014), et précédant ou coïncidant avec la dénervation ou l'apparition des symptômes moteurs. Notamment, les changements liés à des molécules de guidage axonale (Nogo-A et la sémaphorine-3A (Sema-3A)), à la protéine précurseur de l'amyloïde (« amyloid precursor protein », APP) et au micro-ARN 206 (miR-206) sont les mieux documentés.

Nogo-A et Sema-3A sont deux facteurs chémiorepulsifs qui inhibent la croissance axonale. Tel que mentionné précédemment, les niveaux de Nogo-A et de la Sema-3A augmentent au niveau postsynaptique avant la dénervation des JNMs chez des souris SOD1^{G93A} (Dupuis et al., 2002; Bruneteau et al., 2015; Maimon et al., 2018), et les niveaux de Nogo-A corrélaient avec les niveaux de dénervation dans les muscles de patients (Jokic et al., 2005; Bruneteau et al., 2015). De plus, les CSPs expriment également la Sema-3A suite à la dénervation (De Winter et al., 2006). De manière intéressante, l'excision du gène Nogo-A ralentit la progression de la maladie chez des souris SOD1^{G93A} alors que la surexpression de Nogo-A semble suffisante pour induire une dénervation des JNMs (Jokic et al., 2006). De même, bloquer l'expression de la Sema-3A ou l'activité de son récepteur ralentit la dénervation des JNMs chez ces mêmes souris (Venkova et al., 2014; Maimon et al., 2018). Ces études suggèrent que Nogo-A et la Sema-3A déstabiliseraient les JNMs et provoqueraient la rétraction de la terminaison axonale dans la SLA. Cependant, l'administration d'un anticorps bloquant la

signalisation Nogo-A à des patients SLA ne prodigue aucun effet bénéfique (Meininger et al., 2017), suggérant que ce mécanisme soit plus complexe chez l'humain.

L'APP est une protéine transmembranaire dont l'un des produits de clivage est l'amyloïde- β (A β), la principale composante des plaques amyloïdes observées dans la maladie d'Alzheimer. Bien qu'immédiatement associée à cette maladie, l'APP joue également un rôle dans la formation des JNMs. En effet, l'APP est absente à la JNM adulte (Akaaboune et al., 2000), mais est exprimée par les fibres musculaires lors du développement, régulant la signalisation de MuSK et LRP4, et la production de GDNF (Choi et al., 2013; Stanga et al., 2016). De manière intéressante, l'APP est également nécessaire à l'élimination de branches axonales aberrantes (poussant au-delà des JNMs et de leurs cibles) durant le développement (Nikolaev et al., 2009). Cependant, les niveaux d'APP musculaires (Koistinen et al., 2006; Bryson et al., 2012) et neuronaux (Ferraiuolo et al., 2007) augmentent drastiquement chez les souris SOD1 et chez les patients atteints de la SLA. Cette expression coïncide avec la dénervation des JNMs. Le croisement de souris SOD1^{G93A} avec des souris déficientes en APP améliore grandement l'innervation des JNMs et la fonction musculaire, sans grandement affecter la mort neuronale et la survie des animaux (Bryson et al., 2012). Ces résultats suggèrent que l'APP contribuerait à la dégénérescence axonale et à la perte des JNMs dans la SLA.

Un autre facteur important à la JNM dans la SLA est miR-206, un micro-ARN localisé au niveau de l'élément postsynaptique et favorisant la réinnervation (Williams et al., 2009). En effet, l'expression de miR-206 augmente durant la SLA et ralentit considérablement la progression de la maladie. Cet effet compensatoire serait entre autres attribuable à son rôle dans la régulation de FGFBP1 (« Fibroblast growth factor binding protein 1 »), un facteur favorisant la différenciation de la terminaison axonale (Williams et al., 2009). Cependant, une étude récente montre que l'expression et la sécrétion de FGFBP1 musculaire est diminuée avant même l'apparition des premiers signes de dénervation chez les souris SOD1^{G93A} (Taetzsch et al., 2017). De manière intéressante, cette diminution serait attribuable à une augmentation précoce des niveaux de TGF β 1 (« transforming growth factor ») musculaires, observée chez des souris SOD1^{G93A} et des patients atteints de la SLA (Si et al., 2015; Taetzsch et al., 2017). En effet, le TGF β 1 réprime la synthèse et la sécrétion de FGFBP1 (Taetzsch et al., 2017), potentiellement en régulant l'expression de miR-206 (Winbanks et al., 2011).

Dans l'ensemble ces études documentent l'activation précoce de plusieurs voies de signalisation pouvant contribuer ou moduler la dénervation des JNMs dans la SLA (Figure 1.13). Cependant, ces changements moléculaires sont-ils des éléments causaux induits par les mutations associées à la SLA ou représentent-ils une adaptation délétère du système neuromusculaire ? Dans tous les cas, ces altérations suggèrent que des changements neuromusculaires locaux peuvent induire, ou à tout le moins favoriser, la dénervation des JNMs dans la SLA.

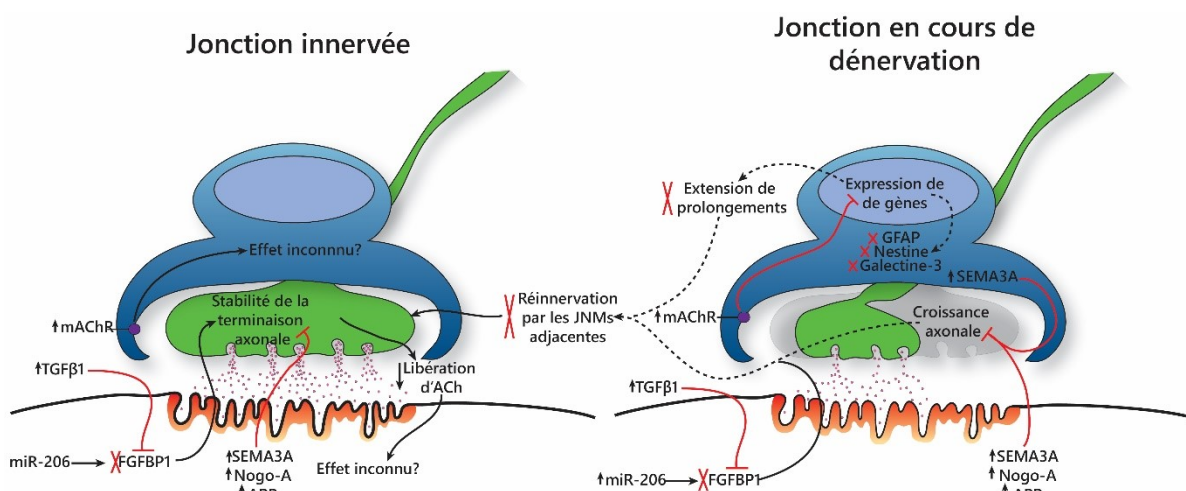


Figure 1.13. Altérations moléculaires et fonctionnelles précoces aux JNMs dans la SLA. Schéma représentant deux JNMs, l'une innervée et l'autre en cours de dénervation, à des stades précoces de la SLA. Les lignes noires pleines représentent des liens démontrés alors que les lignes pointillées démontrent des liens hypothétiques. Les lignes rouges représentent un effet inhibiteur et les « X » rouges représentent une absence du facteur ou de la fonction en raison de cette interaction inhibitrice.

1.4.1.3 L'altération précoce de l'activité des CSPs

Finalement, une autre altération précoce importante de la JNM dans la SLA est celle de l'activité des CSPs. Une étude récente de notre laboratoire a montré que l'activité calcique des CSPs était altérée longtemps avant la dénervation des JNMs chez des souris $SOD1^{G37R}$ (Arbour et al., 2015) (annexe 2). Similairement aux changements d'activité synaptique, ce phénotype empirait peu avant l'apparition des premiers symptômes et dépendait du type d'unité motrice auquel les CSPs appartenaient. Ces changements dans la capacité des CSPs à détecter l'activité présynaptique étaient associés à une augmentation de l'activation de leur mAChRs. Or, tel que mentionné précédemment, l'activation de ces récepteurs empêche la transcription de gènes associés à la réparation des JNMs, tel la GFAP chez la grenouille (Georgiou et al., 1994; Georgiou et al., 1999). Ces résultats suggèrent que la capacité des CSPs à adopter un

phénotype « pro-régénérateur » et à promouvoir la réinnervation des JNMs pourrait être inhibé ou altéré (Figure 1.13). En accord avec cette possibilité, une étude par Liu et al. (2013) montre qu'un autre marqueur associé à ce phénotype, le récepteur des neutrophines P75, semble absent des JNMs de souris ou humaine dans la SLA.

1.4.2 La réinnervation de la JNM durant la SLA

L'altération précoce de la voie de signalisation de miR-206 et l'altération de l'activité des CSPs suggèrent que les mécanismes de réinnervation des JNMs pourraient être altérés dans la SLA (Figure 1.13). Une dysfonction de ces mécanismes compensatoires pourrait potentiellement limiter la réinnervation des JNMs et exacerber la perte de fonction musculaire dans la SLA.

Afin d'évaluer cette possibilité, quelques études se sont attardées à évaluer l'efficacité de la réinnervation des JNMs suite à une lésion axonale à un stade présymptomatique dans des modèles SOD1 ou TDP-43. La plupart de ces études rapportent un délai dans la réinnervation des JNMs suite à ces lésions (Sharp et al., 2005; Pun et al., 2006; Henriques et al., 2011; Swarup et al., 2012; Mesnard et al., 2013; Carrasco et al., 2016b). Cependant, ces études utilisaient une lésion complète du nerf, induisant une dénervation de la totalité des JNMs dans les muscles étudiés. Tel que mentionné à la section 1.3.2, la réinnervation suite à ce type de lésion, ne permettant pas le bourgeonnement compensatoire, dépend uniquement de la repousse axonale. Or, la dénervation des JNMs au sein d'un même muscle est progressive durant la SLA et de nombreuses études rapportent une présence de bourgeons axonaux et terminaux et une augmentation de la taille des unités motrices survivantes (McComas et al., 1971; Dengler et al., 1990; Dantes and McComas, 1991; Schmied et al., 1999; Schaefer et al., 2005; Valdez et al., 2012; Tallon et al., 2016). En ce sens, la dénervation des JNMs dans la SLA s'apparente vraisemblablement plus à une lésion axonale partielle. Ainsi, bien que ces études suggèrent que la croissance axonale et le rétablissement des JNMs suite à une lésion axonale soient ralentis dans la SLA, l'efficacité des mécanismes de réinnervation pertinents, tel que le bourgeonnement compensatoire, demeure incertaine.

1.5 Objectifs et buts de la thèse

Dans l'ensemble, de nombreux éléments suggèrent que des facteurs périphériques, au niveau des JNMs, pourrait contribuer à, et potentiellement causer, la dénervation précoce observée dans la SLA. En effet, la présence précoce de facteurs déstabilisants et l'altération de la fonction synaptique et gliale suggèrent que la perte de JNMs pourrait être un événement local et non la conséquence de la dégénérescence globale des motoneurones et de leur arborisation axonale. Cette possibilité concorderait notamment avec l'observation que la mort neuronale semble dissociée de la perte de JNMs, chez les souris SOD1 à tout le moins (Gould et al., 2006; Suzuki et al., 2007; Parone et al., 2013). Néanmoins, de nombreuses études utilisant des enregistrements EMG chez la souris et l'humain suggèrent que le nombre d'axones moteurs innervant un muscle diminue parallèlement à la force musculaire (McComas et al., 1971; Dantes and McComas, 1991; Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008). Ces données suggèrent que la perte d'axones moteurs serait à l'origine de la perte de JNMs et de force. De même, la taille moyenne des unités motrices survivantes ne diminue pas, et voir même augmente, suggérant qu'une perte asynchrone de JNMs ne précède pas la dégénérescence globale des axones (McComas et al., 1971; Dengler et al., 1990; Dantes and McComas, 1991; Schmied et al., 1999; Schaefer et al., 2005). Finalement, les études histologiques montrent que la perte de JNMs est initialement restreinte aux régions innervées par des axones moteurs vulnérables (Schaefer et al., 2005; Pun et al., 2006), et qu'elle est relativement rapide et synchrone si ces régions ne contiennent pas d'axones moins vulnérables (Pun et al., 2006). En effet, seul un sous-groupe d'axones moteurs partiellement résistants semble en mesure de compenser et d'augmenter la taille de leur arborisation (Schaefer et al., 2005).

Cette apparente contradiction met en lumière le fait que la séquence d'événements prenant place à la JNM n'a jamais été clairement décrite. Les axones moteurs dégénèrent-ils subitement ou perdent-ils leurs JNMs graduellement? Bien que les études histologiques ou utilisant des EMG semblent suggérer une perte synchrone, ces techniques ne permettent pas de suivre un axone moteur unique au fil du temps, et ne permettent donc que d'inférer la séquence d'évènements. D'autre part, quelle est l'ampleur de la réinnervation compensatoire durant la progression de la SLA? En effet, plusieurs études ont documenté une augmentation de la taille de certaines arborisations axonales survivantes alors que d'autres suggèrent que les mécanismes

de réinnervation sont potentiellement altérés et inefficaces. Notamment, l'augmentation de la signalisation muscarinique au sein des CSPs pourrait nuire au bourgeonnement terminal et à la réinnervation, mais ces événements sont-ils moins fréquents ou inefficaces durant la progression de la maladie chez des souris SOD1?

Basés sur cette problématique et notre connaissance actuelle des changements ayant lieu à la JNM dans la SLA, nous émettons l'hypothèse générale suivante :

La SLA est associée à une perte locale de JNMs et à des déficits de réinnervation contribuant à la progression de maladie

Ainsi nous avons identifié deux objectifs majeurs pour cette thèse. Premièrement, nous souhaitons clarifier la séquence d'événements ayant lieu au sein d'un axone moteur unique afin de déterminer si la perte de JNMs est synchrone ou non. Deuxièmement, nous voulions évaluer si les mécanismes de réinnervation, notamment ceux dépendant des CSPs, fonctionnaient normalement durant la progression. En lien avec cet aspect, nous voulions déterminer si les CSPs étaient en mesure d'adopter un phénotype « prorégénérateur » afin de favoriser la réinnervation des JNMs dénervées.

CHAPITRE II :

Le réarrangement dynamique de l'arborisation axonale des motoneurones précède leur dégénérescence dans un modèle murin de la SLA

2.1. Résumé

Bien qu'elle soit un événement précoce durant la SLA, il demeure incertain si la dénervation des jonctions neuromusculaires (JNM) est simplement la première manifestation d'une cascade dégénérative globale au sein d'un motoneurone. En imageant à répétition des axones uniques et leurs JNMs *in vivo* sur une période de plus de trois mois, nous avons observé que les unités motrices sont désassemblées de manière asynchrone chez des souris *SOD1^{G37R}*. Durant les semaines précédant la dégénérescence complète de l'axone moteur, le désassemblage de branches individuelles coïncidait avec le bourgeonnement de nouvelles branches axonales, formant de nouveaux contacts synaptiques sur des JNMs avoisinantes. La dénervation avait tendance à se propager à partir de la première JNM perdue, suggérant que des facteurs extrinsèques aux motoneurones puissent contribuer à cette perte. De plus, les branches distales semblaient être plus susceptibles à être démantelées que les branches proximales. Ces résultats montrent que la dénervation des JNMs dans la SLA est initialement une cooccurrence complexe et dynamique du désassemblage et du réassemblage de branches axonales spécifiques plutôt que la manifestation d'une cascade dégénérative globale au sein d'un motoneurone.

Contribution des auteurs

Éric Martineau a participé à la conceptualisation des expériences, à la mise au point méthodologique, à la cueillette et l'analyse des données, à leur représentation visuelle et à l'écriture du manuscrit. Adriana Di Polo et Christine Vande Velde ont participé au financement, au développement d'outils méthodologiques, à la supervision du projet et à la révision du manuscrit. Richard Robitaille a participé à la conceptualisation des expériences, au financement, à la supervision du projet et à l'écriture du manuscrit.

2.2 Texte intégral du premier article

Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS

Éric Martineau^{1,2}, Adriana Di Polo^{1,3}, Christine Vande Velde^{1,3}, Richard Robitaille^{1,2*}

Affiliations:

¹ Département de neurosciences, Université de Montréal.

² Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal.

³ Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM).

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS); Neuromuscular Junction; Motor-unit; Reinnervation; Superoxide Dismutase (SOD1), Synapse loss.

2.2.1 Abstract

Despite being an early event in ALS, it remains unclear whether the denervation of neuromuscular junctions (NMJ) is simply the first manifestation of a globally degenerating motor neuron. Using *in vivo* imaging of single axons and their NMJs over a three-month period, we identify that single motor-units are dismantled asynchronously in *SOD1^{G37R}* mice. We reveal that weeks prior to complete axonal degeneration, the dismantling of axonal branches is accompanied by contemporaneous new axonal sprouting resulting in synapse formation onto nearby NMJs. Denervation events tend to propagate from the first lost NMJ, consistent with a contribution of neuromuscular factors extrinsic to motor neurons, with distal branches being more susceptible. These results show that NMJ denervation in ALS is a complex and dynamic process of continuous denervation and new innervation rather than a manifestation of sudden global motor neuron degeneration.

2.2.2. eLife digest: What happens to motoneurons in ALS?

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), also known as Lou Gehrig's disease, is a fatal neurodegenerative disorder. It occurs when the neurons that control muscles – the motoneurons – disconnect from their target muscles and die. This causes the muscles to weaken and waste away. More and more muscles become affected over time until eventually the muscles that control breathing also become paralyzed. Most patients die within two to five years of diagnosis. Motoneurons consist of a cell body plus a cable-like structure called the axon. The cell body of each motoneuron sits within the spinal cord, and the axon extends out of the spinal cord to the motoneuron's target muscle. Within the muscle the axon divides into branches, each of which connects with multiple muscle fibers. The breakdown of these connections, known as neuromuscular junctions, is one of the first signs of ALS.

Does a motoneuron lose all of its connections with muscle fibers at once, or do the connections break down a few at a time? This distinction is important as it will help to identify the events that lead to muscle paralysis in ALS. To find out, Martineau et al. studied mice that had two genetic mutations: one that causes ALS and another that produces fluorescent molecules in some motoneurons. This allowed the branches of the motoneurons to be tracked over time with a fluorescence microscope.

Martineau et al. found that individual neurons lose their connections to muscle fibers gradually. Moreover, motoneurons grow new branches and form new connections even while losing their old ones. This dual process of pruning and budding lasts for several weeks, until eventually the motoneuron dies.

Developing drugs to stabilize neuromuscular junctions during the period when motoneurons gradually disconnect from muscles could be a promising avenue to explore to improve the quality of life of ALS patients. One advantage of this treatment strategy is that neuromuscular junctions in muscles are easier to access than motoneurons inside the spinal cord. To identify potential drugs, future studies will need to focus on the proteins and signals that cause the neuromuscular junctions to break down.

2.2.3 Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by upper and lower motor neuron (MN) loss. Loss of neuromuscular junctions (NMJs) is a key pathological event in ALS patients (Fischer et al., 2004; Killian et al., 1994) and in animal models of the disease (Clark et al., 2016; Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Pun et al., 2006; Tallon et al., 2016). Denervation of NMJs is observed prior to symptom onset (Clark et al., 2016; Fischer et al., 2004; Pun et al., 2006; Tallon et al., 2016; Vinsant et al., 2013) and before any significant MN axonal or cell body loss (Fischer et al., 2004; Vinsant et al., 2013). However, whether early NMJ denervation arises from local branch-specific degeneration (“dying-back hypothesis”) or is merely the manifestation of a diseased and globally degenerating motor neuron remains ill-defined.

There is considerable evidence which suggests that a subset of degenerating motor-units (MU, a motor neuron and the muscle fibers it innervates) swiftly lose their NMJs while a distinct, yet unaffected, population compensates via axonal sprouting (Pun et al., 2006; Schaefer et al., 2005), somewhat akin to a nerve injury. Indeed, NMJs innervated by fast-fatigable MNs are lost early, followed by fast-fatigue resistant and slow MNs (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006). This is further supported by electromyographic (EMG) recordings showing that the number of MUs declines in parallel with muscle strength (Azzouz et al., 1997; Dantes et al., 1991; Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008; Kennel et al., 1996; McComas et al., 1971) and that surviving MUs increase in size in animal models and in patients (Dantes et al., 1991; Dengler et al., 1990; McComas et al., 1971; Schmied et al., 1999). Taken together, these results strongly suggest that the loss of NMJs within a single MU is a dichotomous and mostly synchronous event and that local synaptic events have a limited impact on the denervation process. Under this monotonic paradigm, degenerating MUs are irrevocably caught in a degenerative cascade while surviving MUs attempt to compensate, consequently undermining the relevance of the NMJ as a disease-modifying therapeutic target.

However, the rescue of neuronal loss in SOD1 mice does not necessarily improve NMJ denervation (Gould et al., 2006; Parone et al., 2013; Suzuki et al., 2007) suggesting that local branch-specific events may play a key role in NMJ denervation. In ALS, local alterations of synaptic function and molecular signaling take place very early at the NMJ (Arbour et al., 2015;

De Winter et al., 2006; Jokic et al., 2006; Rocha et al., 2013; Taetzsch et al., 2017; Tremblay et al., 2017), implying that local, MU-independent, structural changes could occur. Finally, ALS is a non-cell autonomous disease where cell types other than motor neurons contribute to the disease pathogenesis (Boillee et al., 2006a; Ilieva et al., 2009). Contribution of various cell types known to interact with NMJs and motor axons has been suggested (Arbour et al., 2015; Chiu et al., 2009; Keller et al., 2009; Lobsiger et al., 2009; Loeffler et al., 2016; Nardo et al., 2016; Turner et al., 2010; Wang et al., 2012), which could contribute to NMJ loss. In this scenario, asynchronous branch-specific synaptic changes would take place over time within single MUs.

Altogether, these divergent paradigms highlight that the precise sequence of events taking place at the NMJ in ALS remains ill-defined. From a therapeutic viewpoint, this distinction is of high importance since it could pinpoint the NMJ as an accessible target that can be exploited within a time window between the onset of structural changes and the global degeneration of the MU, as previously suggested (Cantor et al., 2018; Miyoshi et al., 2017; Perez-Garcia et al., 2012). Here, we used longitudinal repeated *in vivo* imaging of single motor neuron axonal arbors and their NMJs to directly assess the time course and dynamics of structural changes during ALS progression. We predict that a MU-dependent mechanism would result in the more or less synchronous degeneration of the whole MU over a brief period, while a contribution of local neuromuscular changes would result in the asynchronous loss of NMJs within a single MU.

2.2.4 Results

2.2.4.1 *In vivo* imaging of single MU arbors

SOD1^{G37R} mice (loxSOD1^{G37R}) are well known for their slow disease progression, making it an ideal model to follow single MU changes over time (Boillee et al., 2006b; Lobsiger et al., 2009). To visualize and follow single MUs in control and ALS mice, we crossed SOD1^{G37R} mice to animals expressing a cytoplasmic fluorescent marker in a small random subset of MNs (*Thy1*-YFP line H, Figure 2.1A) (Feng et al., 2000). Repeated *in vivo* imaging was performed on the *Tibialis anterior* muscle since numerous NMJs can be observed near the surface when exposed following a minimally invasive surgery (WT/YFP: N=5; SOD1^{G37R}/YFP: N=11). Postsynaptic sites were identified *in vivo* by staining nicotinic receptors (nAChR) with fluorescently labeled α -bungarotoxin (Li et al., 2011; Turney et al., 2012). Except for two cases (animal #23 and #21), all imaging sessions were performed at two-week intervals for up to 5-6 sessions (56-76 days). The same MU arbor (axon and its NMJs) was identified on every imaging session through the unique “pretzel” shape of its NMJs, the branching pattern of the motor axon, and the position of nearby postsynaptic sites (Figure 2.1A, landmarks, Δ , *, \bullet). NMJs were classified based on their innervation status over time (Figure 2.7 - Supplement 1 for figure 1).

We first confirmed that the same MU arbor and its NMJs were reliably imaged over several weeks without inducing any structural damage. We followed single MUs in WT/YFP animals and found that YFP-labeled axons stayed precisely overlapped with nAChR-rich postsynaptic sites over all imaging sessions performed (36/36 NMJs, 5/5 MU arbors, N=5; Figure 2.1C). Importantly, very few changes in axonal branching pattern, postsynaptic nAChRs and presynaptic nerve terminal organization were observed. Consistent with previous reports (Balice-Gordon et al., 1990; Li et al., 2011; Schaefer et al., 2005; Turney et al., 2012), our results show that NMJs of WT mice remained innervated by the same MU and were very stable over long periods of time.

2.2.4.2 Asynchronous NMJ dismantlement in SOD1^{G37R} mice

We next performed imaging in symptomatic SOD1^{G37R}/YFP animals (all animals at or past disease onset) to investigate whether the pattern of NMJ denervation in ALS mice was

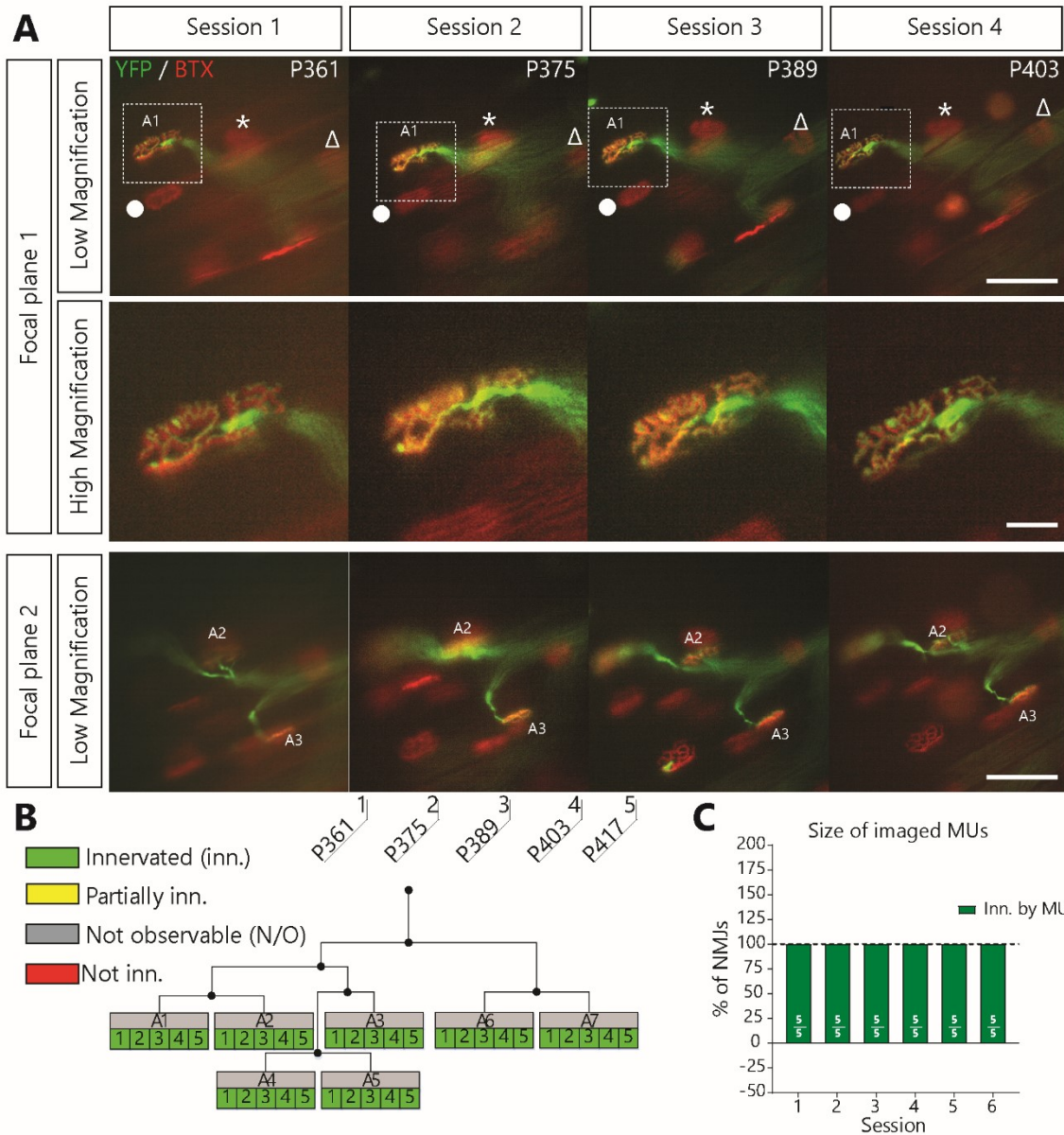


Figure 2.1. NMJs in a single motor-unit of WT/YFP mice are stable. **A**, Images at different focal planes of the same MU arbor from a WT/YFP mice during four sessions, with a higher magnification on-focus image of one NMJ (digital zoom, dashed box in low magnification). Green: YFP-labeled axon; Red: nAChR. Symbols (Δ , *, \bullet) identify landmarks used to confirm that the same region was imaged. **B**, MU dynamic diagram of the MU shown in (A) showing that all NMJs within that motor arbor are stable in WT/YFP mice. Black lines and dots represent the axonal arborization and branching points respectively, while each box represents a single NMJ. **C**, Histogram showing the average proportion of NMJs which are innervated (green) by the MU, showing that all MU preserved their NMJs in WT/YFP mice. Individual results for all MUs from WT mice (N=5), including graphical representations, are included in Figure 2.1 – Source data 1. Details on how NMJs were classified, with representative examples, are presented in Figure 2.7 (Supplement 1 for figure 1). Scale bar, low magnification: 100 μ m; high magnification: 25 μ m.

Source data 1. Spreadsheet for the innervation status of all NMJs in each MU arbor imaged in WT/YFP mice and individual graphical representations. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.41973.005>

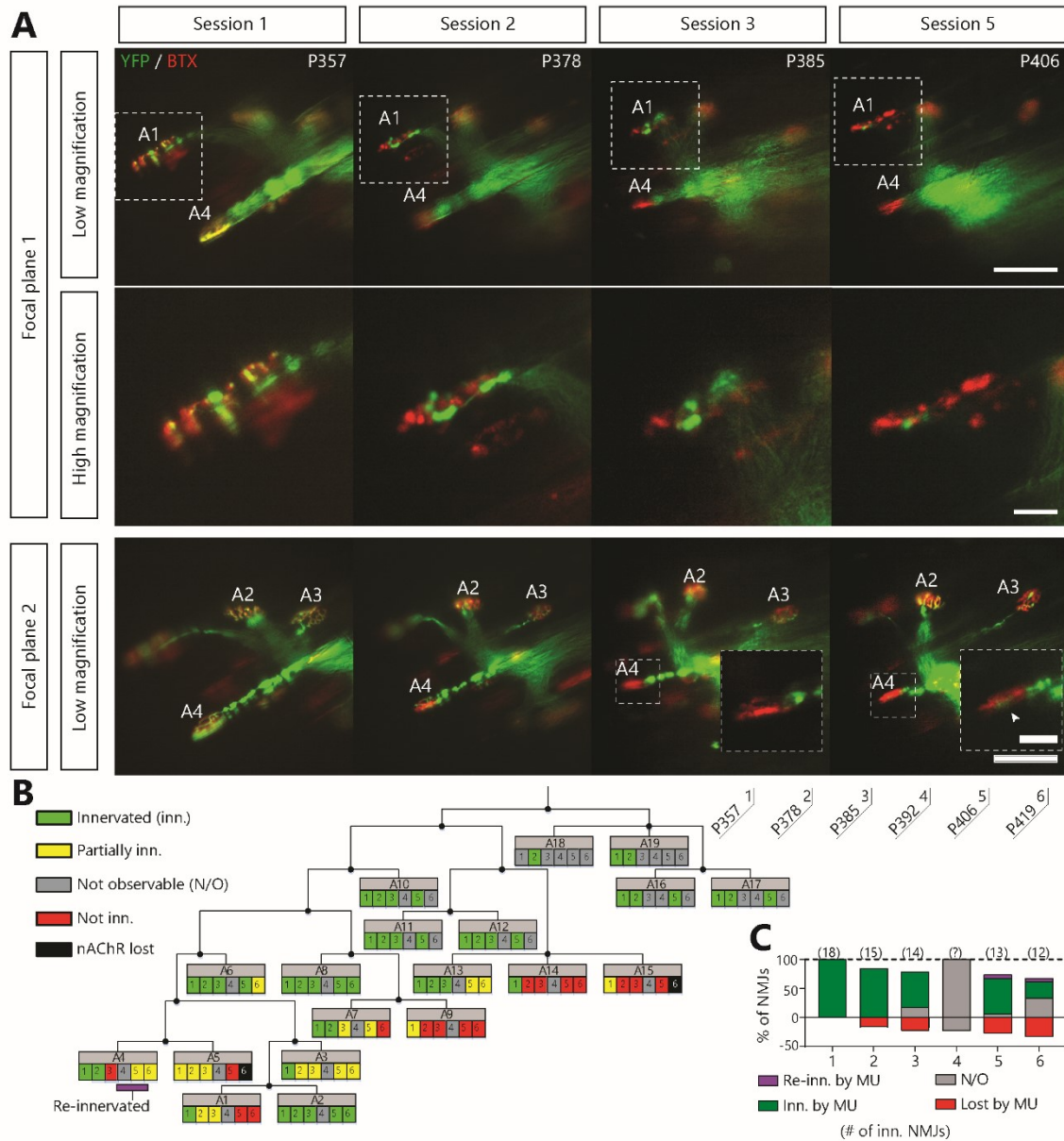


Figure 2.2. Single motor-unit degeneration is initially asynchronous and can last for several weeks in *SOD1^{G37R}/YFP* mice. **A**, Images at two different focal planes of the same MU arbor during four imaging sessions (1, 2, 3 and 5), with on-focus images at higher magnification of some NMJs (digital zoom, dashed boxes in low magnification). Green: YFP-labeled axon; Red: nAChR. Of note, A4 eventually gets partially re-innervated (inset, arrowhead, autologous reinnervation). **B**, MU dynamic diagram showing that NMJs within this motor axon branch were lost asynchronously over imaging sessions. **C**, Histogram showing the proportion of NMJs which are innervated (dark green), re-innervated (purple), not observable (gray) or lost (red) by the MU in A. (#): Number of NMJs observed in the MU arbor. Control experiments demonstrating that the *SOD1^{G37R}/YFP* mice progress identically to *SOD1^{G37R}* mice and that YFP expression does not exacerbate or affect motor neuron death are presented in Figure 2.8 (Supplement 1 for figure 2). Scale bar, low magnification: 100 μ m; high magnification: 25 μ m.

synchronous or asynchronous. Of note, SOD1^{G37R}/YFP mice were phenotypically and histologically indistinguishable from SOD1^{G37R} mice (Figure 2.8 - Supplement 1 for figure 2), showing that YFP expression did not alter the disease course and that YFP-expressing MNs are not more susceptible to the disease.

We found that YFP-labeled nerve terminals gradually retracted from some nAChR-rich postsynaptic sites (Figure 2.2A-C, e.g. NMJ A1, A3, A4) while other axonal branches remained perfectly overlapped (e.g. NMJ A2). Some NMJs were even re-innervated by the MU (Figure 2.2A, A4 inset, arrowhead, see below for more details) further suggesting that the MU arborization was not globally degenerating at this stage. Strikingly, most MUs in SOD1 mutant mice (16/19 arbors, 10/11 animals) behaved in a similar fashion, i.e. losing NMJs over several imaging sessions rather than abruptly. These include partial (29/253 imaged NMJs, 12/19 arbors) and complete NMJ losses (38/253 imaged NMJs, 10/19 arbors). Thus, NMJ loss within a single MU starts as a slow asynchronous process, occurring independently of axonal degeneration.

2.2.4.3 Local NMJ loss precedes global MU degeneration

A number of visualized motor axons and their remaining NMJs were eventually lost in a synchronous manner (7/19 MU arbors, 5/11 mice; Figure 2.3A) showing that global MU degeneration ultimately occurs. This phenomenon likely reflects an axonal or central event, such as MN death. Importantly, signs of NMJ denervation preceded most of these MU degenerations (Figure 2.3B, 6/7 MU arbors). In several cases (11/19 MU arbors), asynchronous NMJ dismantling started more than a month (≥ 3 sessions) prior to global degeneration of the MU, again showing that NMJ loss is initially a slow asynchronous process (Figure 2.3B). Hence, we identified two phases of NMJ loss within a MU: an initial slow local branch-specific dismantlement, followed by a sudden global axonal degeneration. These different patterns of MU degeneration are unlikely to be due to differences in MU types (Frey et al., 2000; Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008; Pun et al., 2006). Indeed, fiber type (indicative of MU type) composition was examined on *Tibialis anterior* cross sections and revealed that nearly all superficial fibers in SOD1^{G37R}/YFP were fast-fatigable during the period of imaging (myosin heavy-chain isoforms type IIb or IIx; Figure 2.9 - Supplement 1 for figure 3).

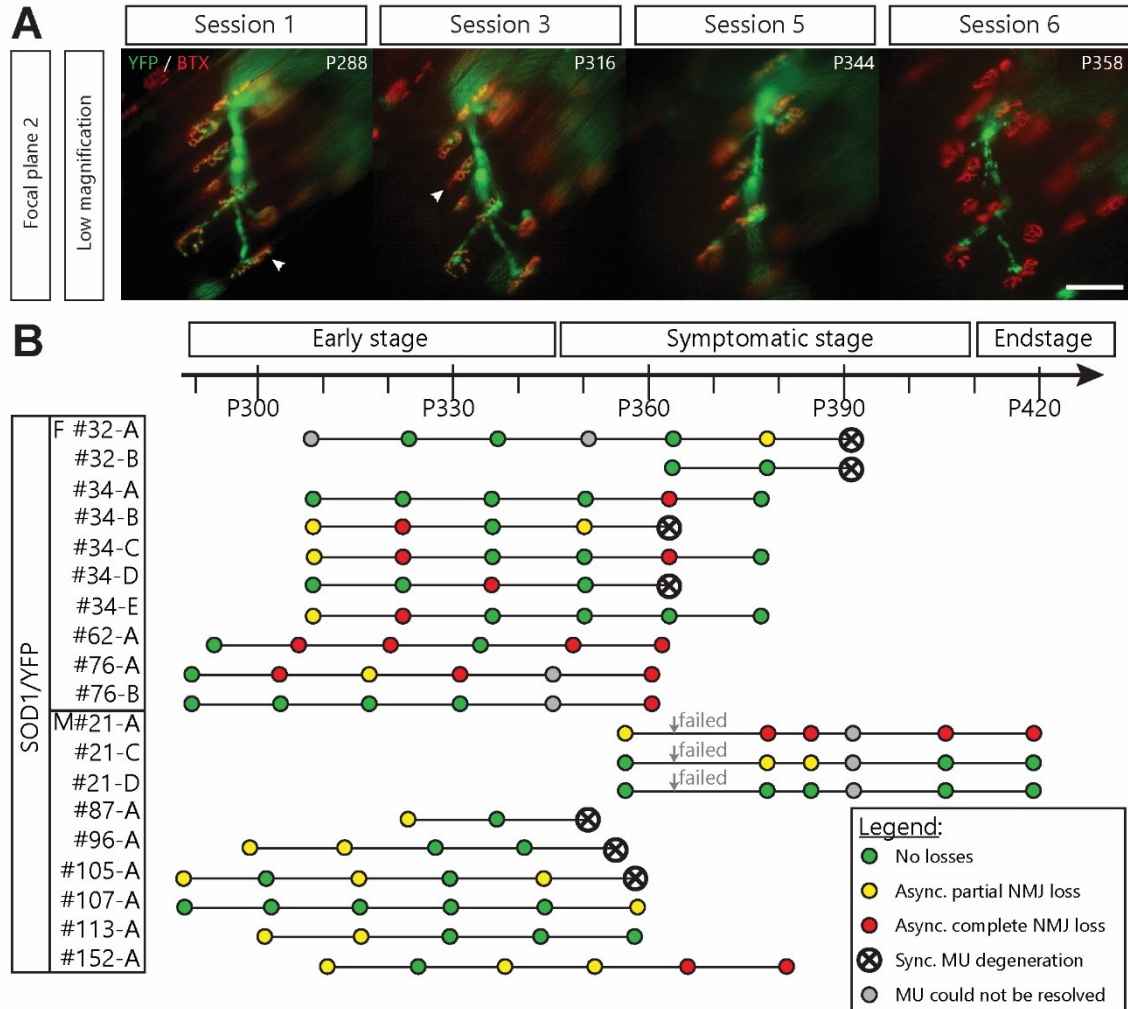


Figure 2.3. Asynchronous branch-specific dismantlement precedes synchronous motor-unit degeneration in *SOD1^{G37R}/YFP* mice. **A**, Example of another MU arbor showing two partially innervated NMJs (arrowheads) on session 1 and 2, before the whole motor axon degenerated on session 6. Note the presence of YFP fragments along the axonal tract. **B**, Time course of repeated in vivo imaging in *SOD1^{G37R}/YFP* mice showing sessions where no losses, at least one partial NMJ loss, at least one complete NMJ loss or synchronous MU degeneration were observed (green, yellow, red and black dots respectively). Gray dots represent session where the MU could not be resolved while “Failed” identifies session terminated for animal care reasons. Notice how synchronous global MU degenerations were almost always preceded by weeks of asynchronous branch-specific changes, even at later stages of the disease. The distribution of surface muscle fiber types (MU types) is presented in Figure 2.9 (Supplement 1 for figure 3), showing that these different patterns of degeneration are unlikely due to differences in MU types.

2.2.4.4. MUs expand their axonal arbor but do not reinnervate their lost NMJs

Surprisingly, a vast majority of MUs in SOD1^{G37R}/YFP also sprouted towards nearby nAChR-rich postsynaptic sites, forming new synaptic contacts on muscle fibers that they did not innervate initially (MU expansions or “heterologous re-innervation”, Figure 2.4A, B; 76/253 NMJs, 14/19 arbors, 9/11 animals). These numerous expansions resulted in a net increase in MU size which masked the contemporaneous NMJ dismantlement (Figure 2.4C; $26.0 \pm 10.2\%$ loss vs $80.7 \pm 32.2\%$ expansions on session 6). Importantly, we found that over half of analyzed MUs both lost and formed new NMJs throughout the imaging process (Figure 2.10 - Supplement 1 for figure 4, 13/19 arbors, 8/11 animals), showing that these opposite processes can occur simultaneously within a single MU.

Interestingly however, there was an inverse relationship between the propensity of axonal branches to be lost or to expand (Figure 2.4D). Indeed, NMJs arising from distal axonal branches were more susceptible to being lost (Figure 2.4D, red dots, 38 events, $n=253$, $N=11$, *logistic regression*, $p=0.010$), while MU expansions were more likely to occur on proximal branches (mainly first order branches) (Figure 2.4D, blue dots, 76 events, $n=253$, $N=11$, *logistic regression*, $p=0.001$). Hence, proximal branches preserve their capacity to re-innervate heterologous NMJs despite the ongoing degeneration of distal branches at the single MU level.

Regardless of this extensive compensation, few MUs re-innervated their own lost NMJs (“autologous re-innervation”) and most partial losses were not repaired (Figure 2.4C, purple; 2/21 and 15/40 possibilities, respectively). Immunolabeling of all motor axons after the last *in vivo* session showed that some of these asynchronously lost NMJs had been reinnervated by other MUs (Figure 2.11 – Supplement 2 for figure 4, $N=4$), confirming that these vacated postsynaptic sites were not refractory to reinnervation in general. This process led the initial NMJ pool of surviving MUs to gradually recede (Figure 2.4C, green) even though their total size remained stable or increased in most cases due to heterologous expansions (Figure 2.4C, blue).

Altogether, these results show that rather than being exclusively degenerating or compensating, MUs are highly dynamic during disease progression, with specific branches either expanding or disassembling.

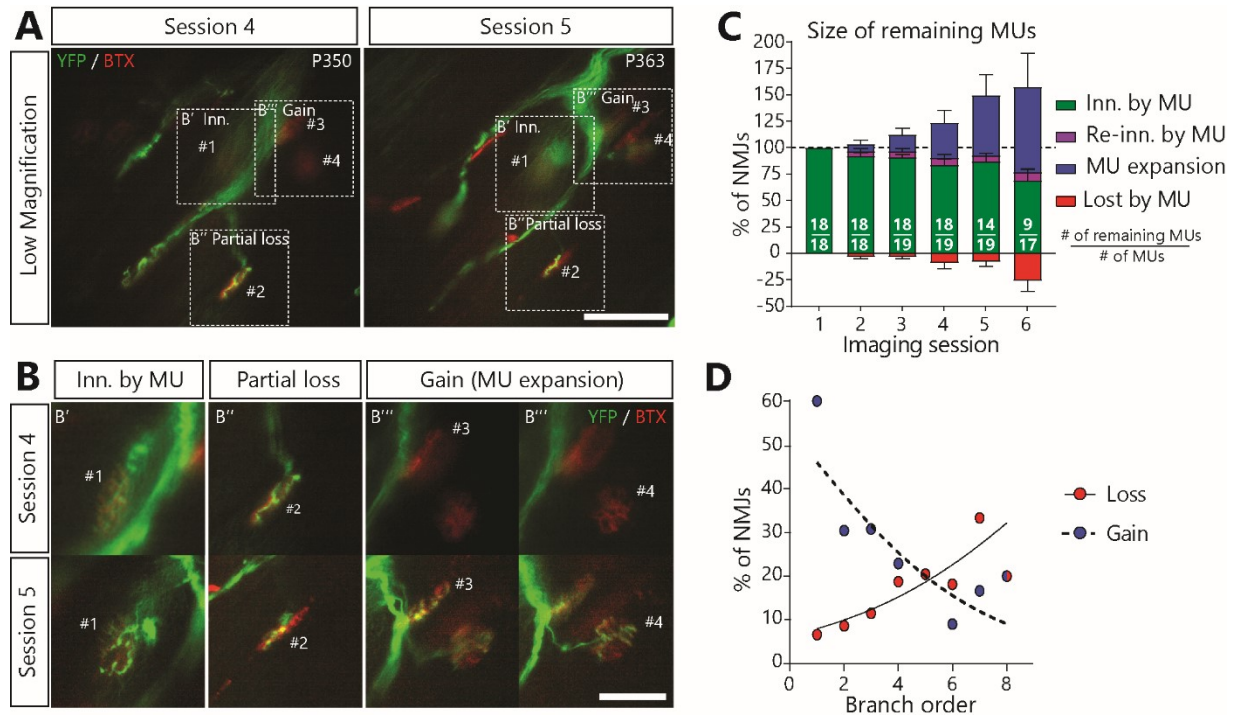


Figure 2.4. MUs retracted and expanded constantly during disease progression in *SOD1^{G37R}/YFP* mice. **A, B**, Images of a MU branch on 2 sessions (A), with on-focus high magnification images of 4 NMJs (B) (dashed boxes in A), where one NMJ remained innervated (#1, B'), one was partially lost (#2, B'') and two others were newly innervated by this MU through axonal sprouting (#3 and #4, B'''; heterologous reinnervation) (Green: YFP-labeled axon; Red: nAChR). **C**, Histogram showing the average proportion of NMJs from the initial pool which are innervated (green), re-innervated (purple, "autologous reinnervation") or lost (red) by the MU and the proportion which are gained through expansions (blue, "heterologous reinnervation"). Note that the overall size of MUs increased over time despite the loss of NMJs from their initial pool. Numbers in brackets represent the number of remaining MU arbors over the total number of MU arbors observed (N=11). Figure 2.10. (Supplement 1 for figure 4) illustrates how these opposing changes could alternate within the same MU over time. Controls showing that heterologous reinnervation (MU expansions) occurs on NMJs lost by the imaged MU are presented in Figure 2.11 (Supplement 2 for figure 4). **D**, Correlation between MU expansions (blue) or asynchronous complete NMJ losses (red) and their branch order (n=253; 19 arbors; N=11) showing the inverse relationship between the propensity of axonal branches to expand (logistic regression, $p = 0.001$) or to be lost (logistic regression, $p = 0.010$). Each dot represents a data point while the solid and the dotted lines represent the logistic regression curves. Individual results for all MUs from *SOD1* mice (N=11), including graphical representations, are included in Figure 2.4 – Source data 1. The raw values for the graph in panel D are presented in Figure 2.4 – Source data 2. Data are presented as mean \pm SEM. Scale bar, low magnification: 100 μ m; high magnification: 25 μ m.

Source data 1: Spreadsheet for the innervation status of all NMJs in each MU arbor imaged in *SOD1*/YFP mice and individual graphical representations. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.41973.015>

Source data 2: Spreadsheet including the number and the percentage of lost and gained NMJs as a function of their branch order. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.41973.016>

2.2.4.5. NMJ dismantlement seems to propagate

To gain further insight into the mechanisms underlying NMJ dismantlement, we next examined the spatial and temporal relationship between denervation events taking place within a MU. Indeed, local signals emanating from muscle fibers, glial cells or a damaged axonal

branch (e.g. chemorepulsive molecules (De Winter et al., 2006; Maimon et al., 2018) or misfolded proteins (Ayers et al., 2016; Grad et al., 2014)) could potentially propagate through the extracellular space and contribute to NMJ loss in ALS. If such local signals in the neuromuscular environment influence NMJ dismantlement, one would predict that these events may tend to propagate from one or several focal points. To test this possibility, we performed a Sholl-like analysis on all MU arbors bearing multiple complete NMJ losses (37 events out of 141 NMJs over 9 MU arbors, N=6; see material and methods). Interestingly, asynchronous NMJ dismantling tended to propagate from the first lost NMJ (Figure 2.5A and B; *multivariate repeated-measures GLM with logistic distribution*, interaction between distance and time: $p < 0.001$). Indeed, adjacent events ($< 300 \mu\text{m}$ away) occurred preferentially, but not exclusively, within the next two sessions (T_2), while remote events ($> 300 \mu\text{m}$) occurred exclusively three or more sessions later (T_3+). These results unravel a propagation pattern and suggest that factors extrinsic to motor axons (i.e. the local neuromuscular environment) interact with the intrinsic properties of motor axons (e.g. susceptibility of specific branches), to shape the pattern of NMJ loss in ALS.

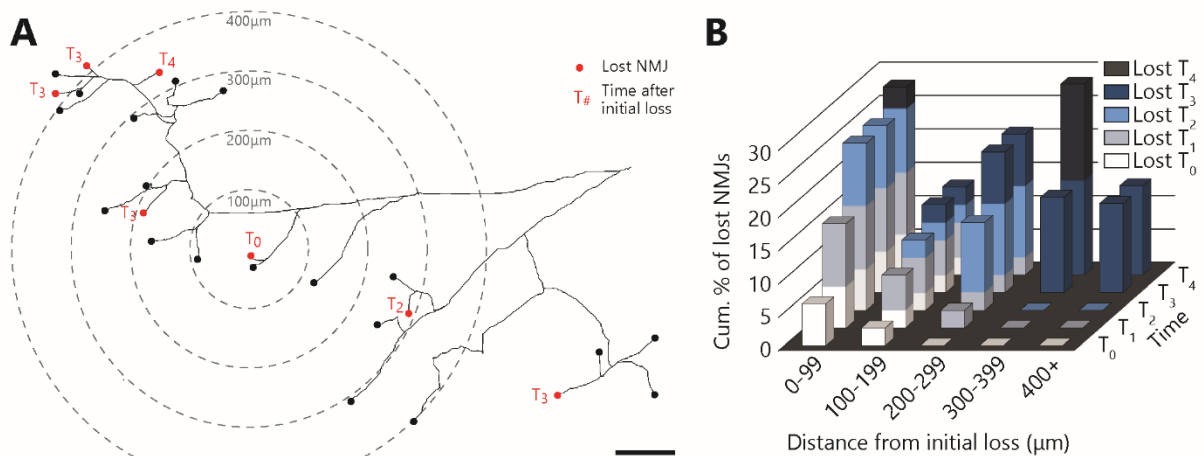


Figure 2.5. Denervation events tended to propagate from the first lost NMJ in the MU, with a higher susceptibility of distal branches. **A**, Example of a full MU arbor tracing used to calculate the distance of every NMJ from the first one lost (T_0). Red dots indicate denervation events and their time (in session numbers) from the initial loss while black dots mark conserved NMJs. **B**, Histogram showing the cumulative probability of an NMJ being lost as a function of distance and time from the initial loss, and for all MU arbors bearing multiple losses. Note how NMJs close to the initial loss ($< 300 \mu\text{m}$) are frequently lost in the following sessions while distant NMJs are exclusively lost 3 or 4 sessions after ($n=141$; 9 arbors, N=6; repeated measures GLM with logistic distribution, effect of time: $p=0.251$; effect of distance: $p=0.004$; interaction between time and distance: $p < 0.001$). The raw values for graphs in panel B are presented in Figure 2.5 – Source data 1. Scale bar: $100 \mu\text{m}$.

Source data 1: Spreadsheet of the innervation status of all NMJs in each MU arbor with their distance from first lost NMJ in the arbor (in μm) and timing of subsequent losses relative to the initial losses (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 and T_4). DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.41973.017>

2.2.5. Discussion

Our data reveal that single MNs initially lose NMJs asynchronously while they contemporaneously expand their axonal arbors to form new synaptic contacts in a mouse model of inherited ALS (Figure 2.6). The resulting increase in axonal arbor size masks the underlying NMJ dismantlement, effectively reconciling the “dying-back hypothesis” with the observed MU enlargement in animal models and ALS patients (Dantes et al., 1991; Dengler et al., 1990; Fischer et al., 2004; McComas et al., 1971; Pun et al., 2006; Schaefer et al., 2005). Interestingly, these results are also in line with functional single MU recordings obtained from ALS patients identifying a majority of enlarged MUs and a subset of abnormally small MUs reflecting extensive NMJ dismantlement (Dengler et al., 1990; Schmied et al., 1999).

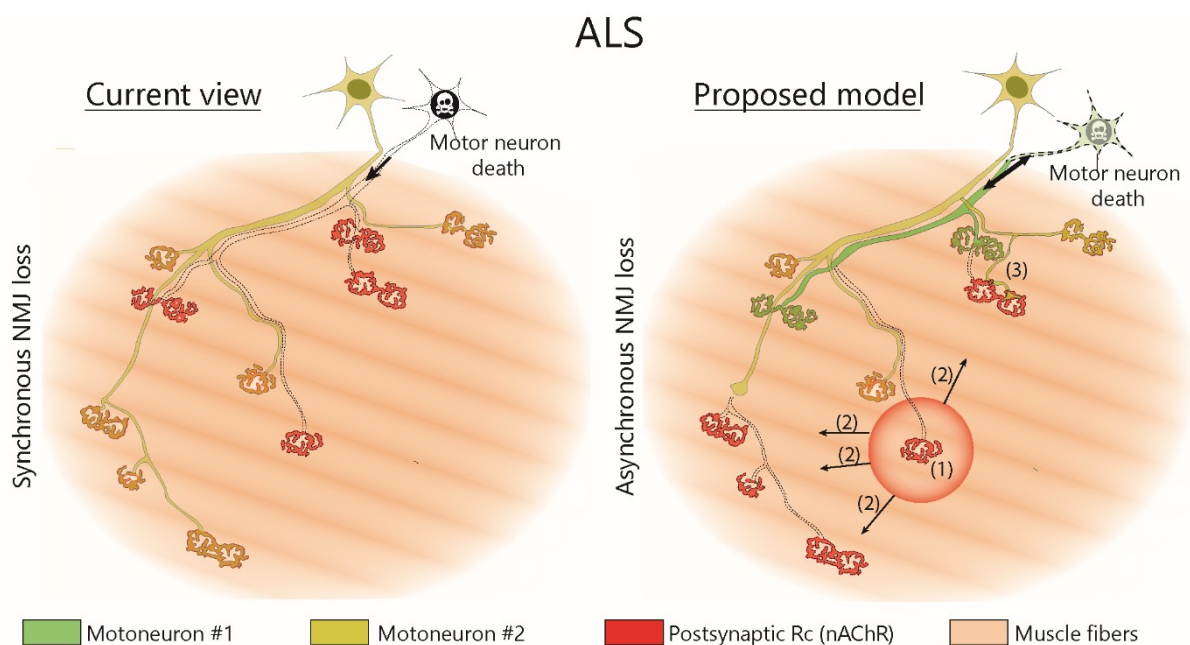


Figure 2.6. Proposed model of NMJ dynamism in ALS. NMJs within single MUs are lost asynchronously independently of motor axon degeneration (1). Local neuromuscular factors contribute to denervation events, which thus propagate from the first lost NMJ in the arbor (2), with distal branches being more susceptible than proximal ones. Nevertheless, MUs preserve their sprouting capability and extend toward heterologous, postsynaptic sites (3).

One of our key findings is that NMJ denervation in a MU is initially slow and takes place over more than a month in a single motor neuron in $SOD1^{G37R}$ mice. This time course reveals a long time-window after the onset of NMJ loss during which MNs are not globally degenerating and preserve their capacity to reinnervate NMJs. Peripheral stabilization of NMJs and MUs thus represents an attractive therapeutic target in the context of ALS (Cantor et al., 2018; Miyoshi et

al., 2017), particularly when considering the accessibility of the neuromuscular system (i.e. no blood-brain-barrier). The propagating pattern of events and the asynchronous or multidirectional changes within a single MU suggest that neuromuscular factors extrinsic to motor axons (i.e. the local neuromuscular environment) affect or contribute to NMJ loss in ALS. These factors would presumably interact with the intrinsic vulnerability of axonal branches (distal vs proximal, etc.) to shape MU dynamism in ALS. Notably, chemo-repulsive molecules (De Winter et al., 2006; Jokic et al., 2006; Maimon et al., 2018; Moloney et al., 2014), availability of trophic factors (Moloney et al., 2014; Taetzsch et al., 2017), enhancement of NMJ stabilizing signals (Miyoshi et al., 2017; Perez-Garcia et al., 2012), secreted pathological proteins or dysfunctional glial cells (Arbour et al., 2015; Arbour et al., 2016) are mechanisms of therapeutic interest.

Another main finding is that MUs are not segregated as either degenerating or compensating (Pun et al., 2006; Schaefer et al., 2005). Rather, we observed a broad spectrum of MU phenotypes (Figure 2.10 - Supplement 1 for figure 4), with the majority continuously alternating between expansion and disassembly for weeks. This asynchronous branch-specific behavior contrasts with previous observations made by Schaefer and colleagues using single time point MU imaging in the fast-progressing SOD1^{G93A} model (Schaefer et al., 2005). They reported that MUs with fragmented (degenerating) branches lacked thin axons (sprouts) while enlarged MUs lacked signs of degeneration. A number of observations can explain this apparent discrepancy. First, our time lapse analysis revealed that only some MUs underwent gains and losses in the same session (Figure 2.10 – Supplement 1 for figure 4), thus often giving the impression that they are either degenerating or compensating if only a single time point is considered. Second, we seldom observed a degenerating fragmented branch (9/38, Figure 2.2A, A1 and A4 for example), which led us to believe that the complete dismantlement of a single axonal branch can easily be missed if identified only by the fragmented axonal morphology. Another possibility would be that different MU types were considered in these studies whereas the present study only focused on fast-fatigable MUs (MHC IIb and IIx fibers). However, Pun et al. (2006) reported no signs of compensatory reinnervation on the surface of the TA (same region as the present study) while Schaefer et al. (2005) imaged a mixture of fast-fatigable and fast-resistant MUs (*Sternomastoid*, *Cleidomastoid* and *Clavotrapezius*), with the former

presumably behaving similarly to what we describe here. Hence, we do not believe these discrepancies can be attributed to differences between MU types. Nevertheless, these studies raise the possibility that slower MU types may behave differently in ALS. One might speculate that the fast-resistant and slow MUs may be resistant to the asynchronous dismantlement and only exhibit late synchronous degeneration. Alternatively, these MUs may degenerate similarly to fast-fatigable MUs, but at a later time point, in part due to their small axonal arborization size (see below). Further examination of MU dynamism in a slow-twitch muscle, which could not be achieved here due to technical and ethical considerations, could shed light on these possibilities.

Interestingly, this pattern is reminiscent of post-natal synapse elimination at the NMJ, where the elimination of supernumerary axonal branches is also asynchronous and branch-specific within single MUs (Keller-Peck et al., 2001). This resemblance suggests that similar molecular mechanisms could be involved. A recent study has shown that selective axonal branch loss during post-natal synapse elimination was mediated by branch-specific microtubule destabilization (Brill et al., 2016). Interestingly, pharmacological stabilization of microtubules is beneficial to ALS mice (Fanara et al., 2007), suggesting that microtubule instability could underly the increased MU dynamism described here.

One unexpected finding was that MNs failed to re-innervate their lost NMJs, despite preserving their capacity to sprout and form new synaptic contacts onto other heterologous postsynaptic sites. Indeed, motor axons usually autologously reinnervate their original postsynaptic sites with great fidelity following an axonal lesion (Nguyen et al., 2002). It could be argued that MU expansions represent the autologous re-innervation of NMJs that were dismantled before session 1. However, this scenario seems unlikely considering that some YFP-negative axons reinnervated NMJs lost by the imaged YFP-positive motor axon (Figure 2.11 – Supplement 2 for figure 4). One possible explanation may be that either the heterologous sprout itself or a molecular signal at the endplate prevents the original axon from reinnervating its target. Alternatively, asynchronous losses occur more frequently on distal branches, which seem intrinsically less likely to form sprouts (Figure 2.4D), thus reducing the likelihood of autologous reinnervation occurring.

Consistent with previous results (Tallon et al., 2016), we report that NMJs arising from distal branches in complex arbors (higher branch order) are more susceptible than proximal ones at the single MN level in ALS. These results support the notion that a larger axonal arborization size increases the energetic load on neurons, thus making them more vulnerable to pathological insults in neurodegenerative disease (Le Masson et al., 2014; Pacelli et al., 2015). One could speculate that the constant dynamism and the excessive MU expansions further increases the energetic load of MNs thus adding to their stress during disease progression.

2.2.6. Concluding remarks

Overall, this detailed in vivo analysis reveals a previously unsuspected dynamism at the NMJ in an animal model of ALS. Our findings highlight a long temporal window between early branch-specific dismantling and global motor axon degeneration which could be therapeutically exploited in ALS (Arbour et al., 2016; Moloney et al., 2014).

2.2.7 Supplementary figures

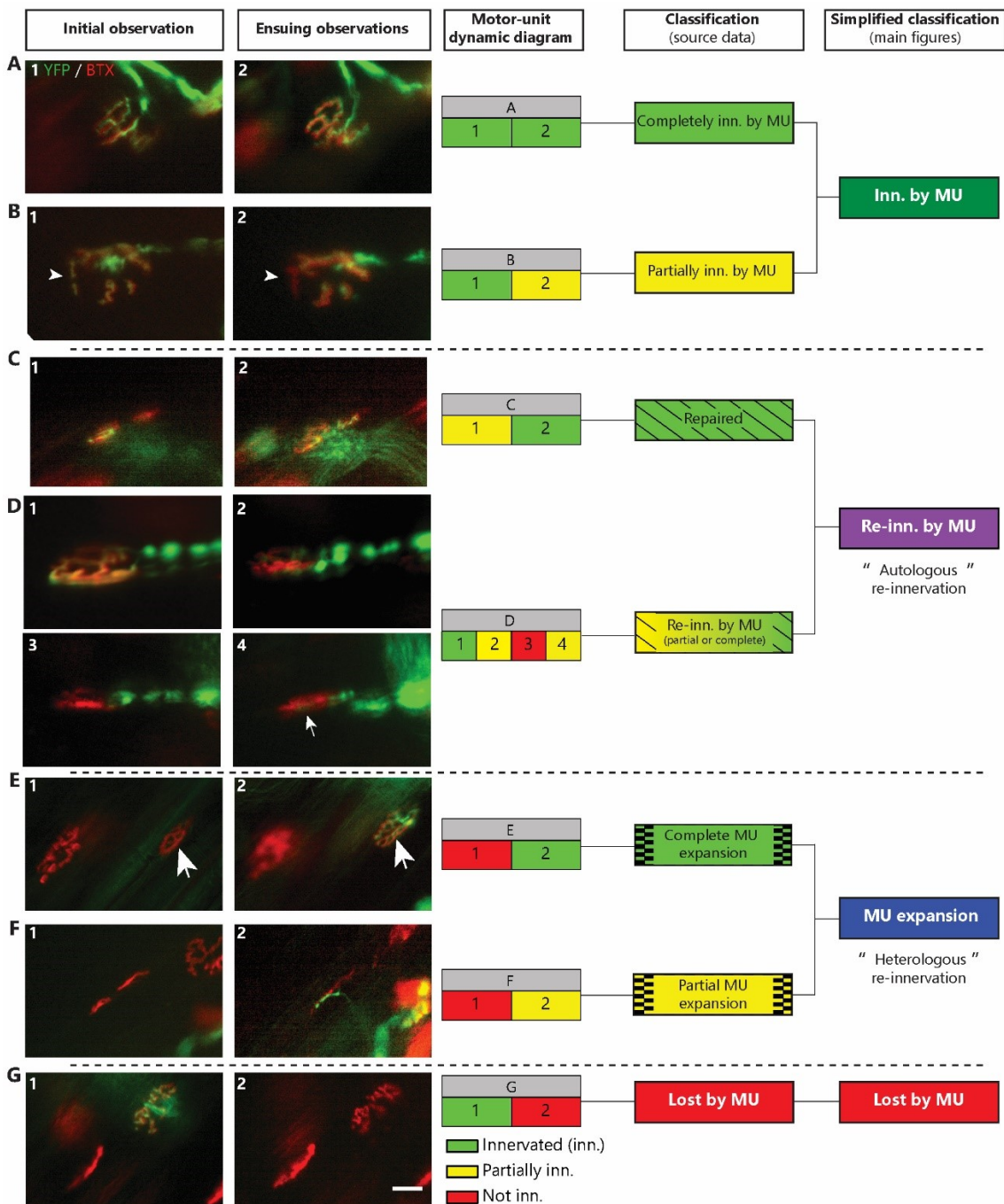


Figure 2.7 - Supplement 1 for figure 1: Classification of NMJs within single MUs. Representative examples of the initial and subsequent observation of NMJs classified as completely innervated (inn.) (A) or partially innervated (B), repaired (C), re-innervated (partially or completely) by the MU (D), as a complete (E), or a partial (F) MU expansion or finally as lost by the MU (G) (Green: YFP-labeled axon; Red: nAChR). For each example, the MU dynamic diagram and the color- and pattern-coded classification for the supplementary and main figures (simplified) is shown. Arrowheads in C indicate the postsynaptic site which re-innervated, the arrow in D (3) shows that a small part of the endplate re-innervated and big arrows in E represent newly innervated NMJ (expansion). Note that the NMJ presented in D is the same as the one presented in Figure 2.2A4. Scale Bar: 25 μ m.

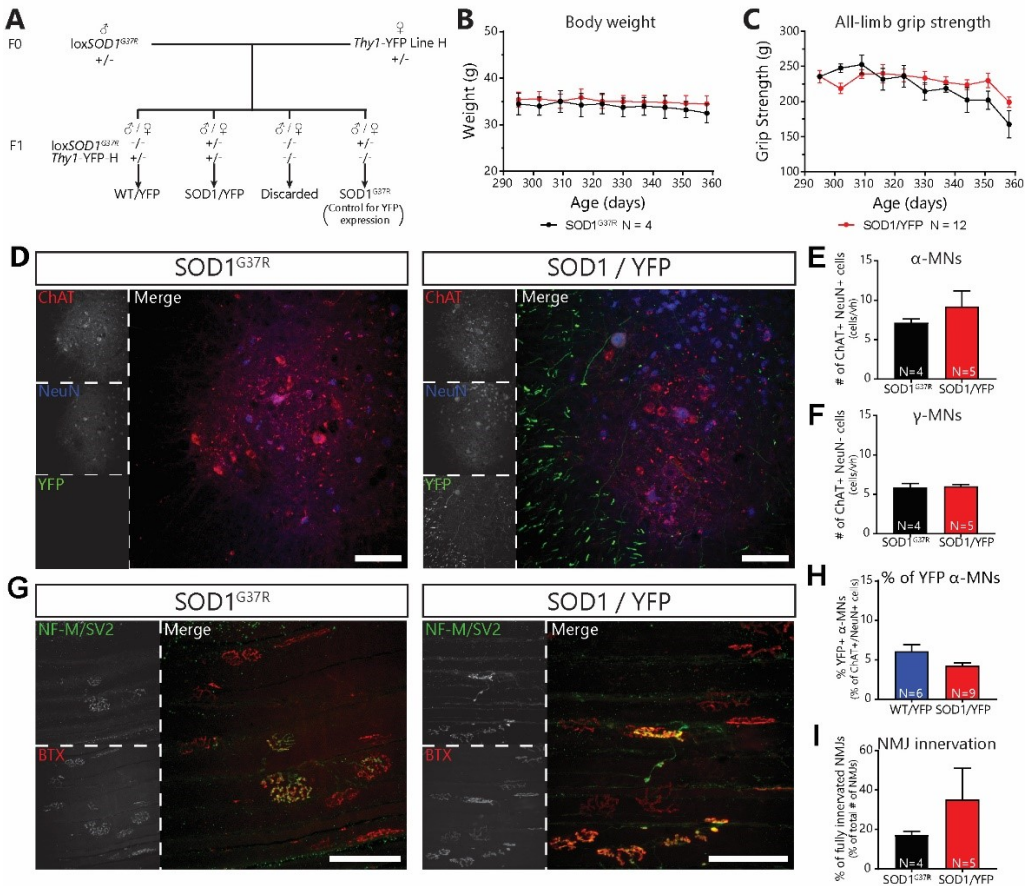


Figure 2.8 - Supplement 1 for figure 2: Mating of loxSOD1^{G37R} to thyl-YFP-H mice did not alter disease course or mutant SOD1 levels. **A**, Mating scheme for SOD1^{G37R}/YFP and WT/YFP mice. **B**, Body weight curve of SOD1^{G37R} and SOD1^{G37R}/YFP mice (black and red respectively), showing a similar weight between both groups (*repeated measures two-way ANOVA*; Effect of genotype: $p=0.7059$; Effect of time: $p=0.1237$; Interaction: $p=0.8874$). **C**, All-limb grip strength curve of SOD1^{G37R} and SOD1^{G37R}/YFP mice (black and red respectively), showing a parallel grip strength loss between both groups (*repeated measure two-way ANOVA*; Effect of genotype: $p=0.3186$; Effect of time: $p<0.0001$; Interaction: $p=0.2189$). **D**, Representative example of lumbar spinal cord sections from SOD1^{G37R} (left) and SOD1^{G37R}/YFP (right) mice at P360 (Red: ChAT; Blue: NeuN; Green: YFP). Note the presence of YFP-positive neuronal cell bodies and projecting axons (in the white matter) in SOD1^{G37R}/YFP mice. **E**, **F**, Quantification of the number of α -MNs (**E**; ChAT+ NeuN+ cells) and γ -MNs (**F**; ChAT+ NeuN- cells) per ventral horn at P360, showing that SOD1^{G37R}/YFP and SOD1^{G37R} mice had similar levels of α -MN loss (*unpaired t-test*; $p=0.3648$) and that γ -MNs were unaffected (*unpaired t-test*; $p=0.8624$). **H**, Percentage of YFP-expressing α -MNs in WT/YFP and SOD1^{G37R}/YFP mice, illustrating that, although the proportion of YFP-expressing MNs tended to be lower in SOD1^{G37R}/YFP mice, the difference was not statistically significant (*Mann-Whitney test*; $p=0.1447$). **G**, Representative images of NMJs in the *Tibialis anterior* muscle of SOD1^{G37R} (left) and SOD1^{G37R}/YFP mice (right) at P360 (Red: α -BTX; Green: NF-M and SV2). **I**, Quantification of the percentage of fully innervated NMJs in the *Tibialis anterior* at P360, demonstrating that SOD1^{G37R}/YFP and SOD1^{G37R} mice had similar levels of denervation (*GLM effect of genotype*: $p=0.214$; *post-test*; $p=0.316$). The number of replicates for each experiment are indicated in the figure directly for clarity. Animals were sex-matched and age-matched between groups for each experiment. Data presented as mean \pm SEM. The raw values for graphs in panels **B**, **C**, **E**, **F**, **H** and **I** are presented in Figure 2.8 - Source data 1 with the full results of the statistical tests for **B** and **C**. Scale bars: 100 μ m.

Source data 1: Raw values of body weight, grip strength, α - and γ -motor neuron counts, percentages of YFP-expression motor neurons and NMJ innervation as depicted in Figure 2 – Supplement 1 B, C, E, F, H and I respectively. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.41973.008>

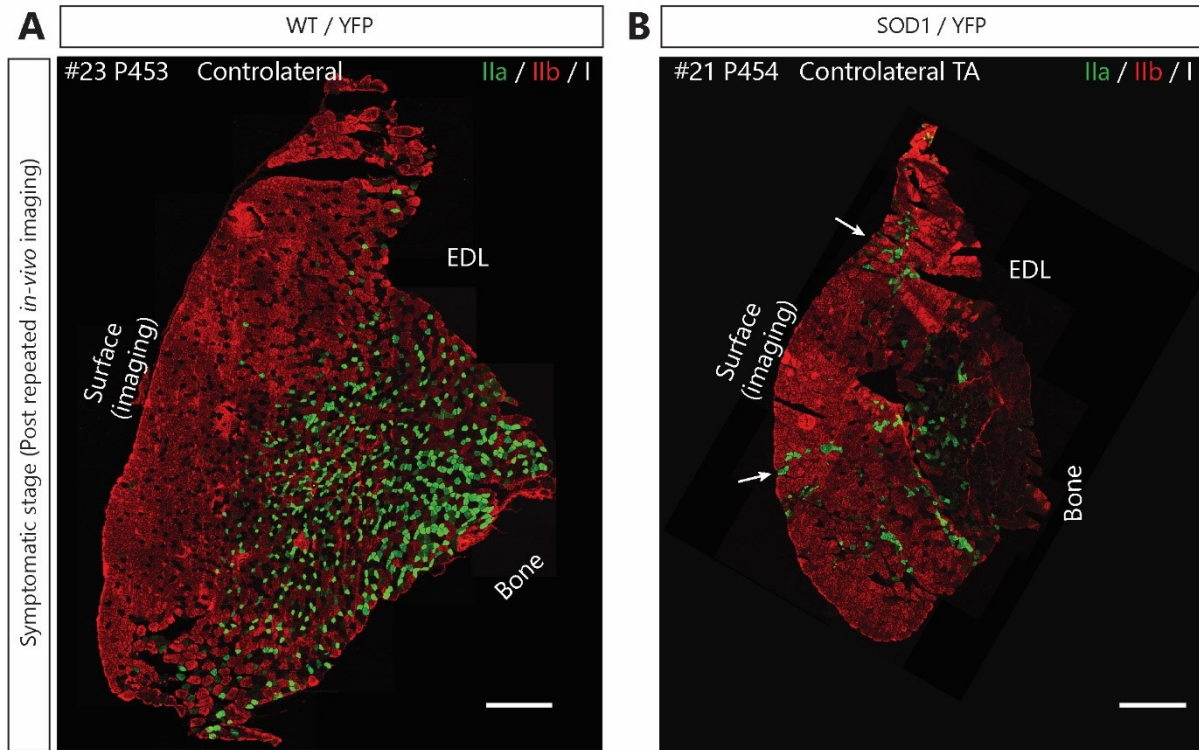


Figure 2.9 - Supplement 1 for figure 2.3: Motor-units are mainly fast-fatigable on the surface of the Tibialis anterior in $SOD1^{G37R}/YFP$ mice. Fiber type composition of TA muscles from WT/YFP (A) and $SOD1^{G37R}/YFP$ (B) after repeated in vivo imaging (symptomatic stage, contralateral TA). Muscle cross-sections were stained with antibodies against myosin heavy-chain type I (white), type IIa (green) and type IIb (red). Note that the vast majority of fibers near the surface are type IIb or IIx (unlabeled) fibers in WT/YFP (3/3 animals) and $SOD1^{G37R}$ mice (5/5 animals). Also, note the presence of a few type IIa fiber groupings near the surface (arrows) in $SOD1^{G37R}/YFP$ mice (4/5 animals). Hence, no slow MUs could have been imaged in $SOD1^{G37R}/YFP$ mice and the probability of imaging a fast-fatigue-resistant MU is very low. Scale bar: 500 μm .

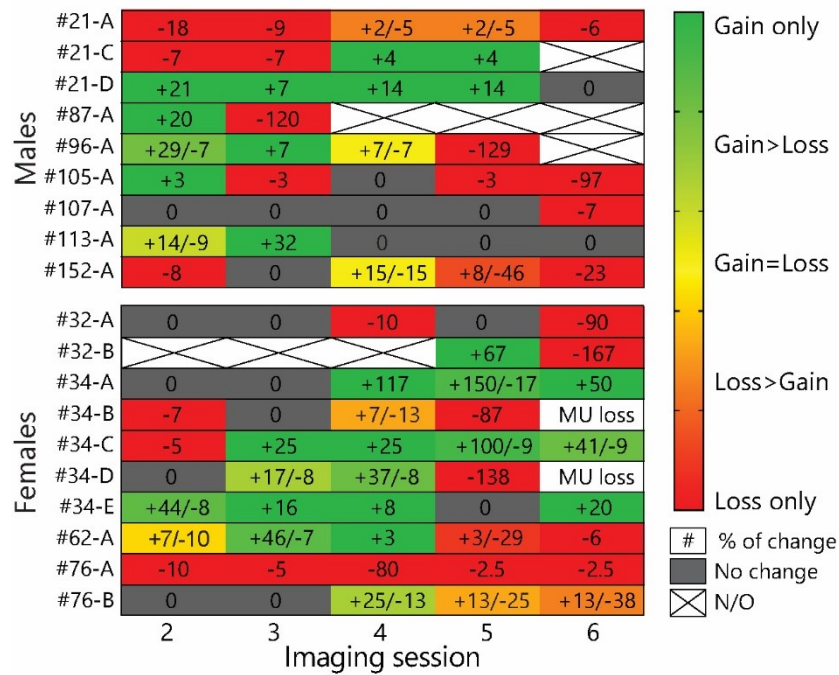


Figure 2.10 - Supplement 1 for figure 2.4: Heat-map of all MU changes across all sessions. The green-red gradient represents the ratio of gains over losses, while the numbers indicate the % of gains/losses on a given session relative to the first session. Note that most MU underwent gains and losses, although mostly not simultaneously. The values for the heat-map are presented in Figure 2.10 – Source data 1

Source data 1: Percentage of change (gains, losses, total or delta) on each session relative to the first session. This data was obtained from the data presented in Figure 2.4 – Source data 1. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.41973.014>

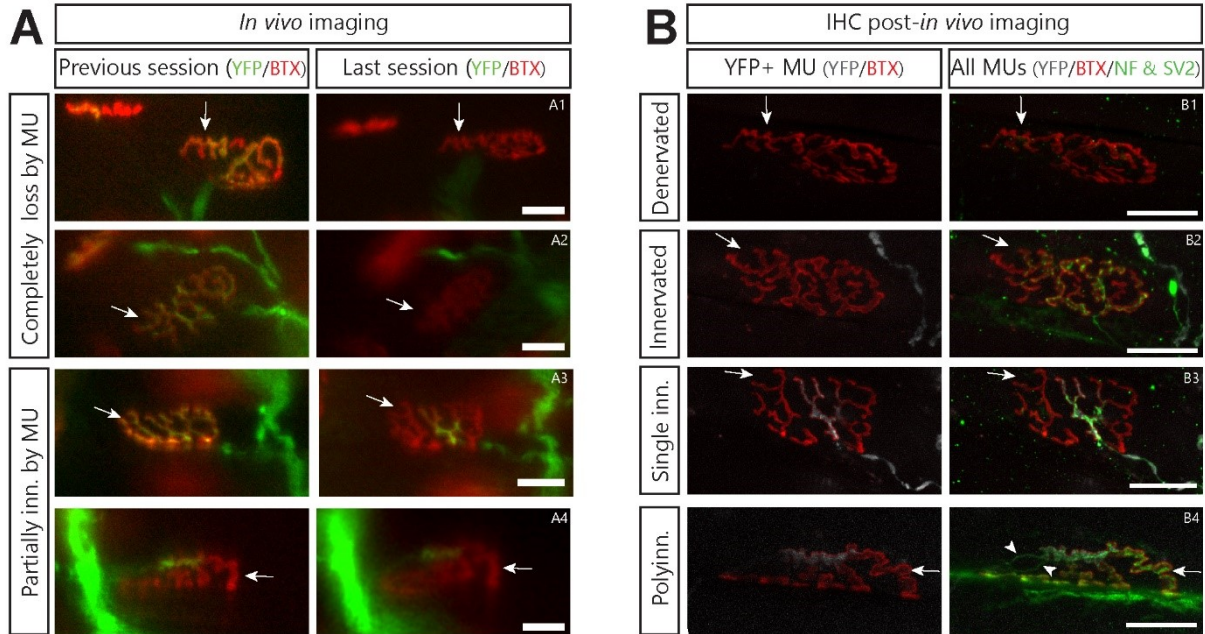


Figure 2.11 - Supplement 2 for figure 2.4: Asynchronously lost postsynaptic sites do not become refractory to other MUs. **A** and **B** illustrate the same NMJ during *in vivo* and after IHC respectively. Arrows point to a distinctive landmark of postsynaptic area. **A.** Examples of NMJs that were asynchronously lost by the imaged MU (A1 & A2), partially lost by the MU (A3) or partially innervated by the MU for several weeks (A4). Green: YFP-labeled axon; Red: nAChR labeled with BTX. Note the slight change in the appearance of A1 and A2 is due to a change in the imaging angle (tilting) due to variable leg placement. This is also notable by the apparent change in distance between the NMJ of interest and another nearby NMJ. **B.** Confocal images of the same NMJs as in **A** after immunolabeling for the presynaptic markers NF-M and SV2. Note how vacated postsynaptic sites in A2 and A4 were innervated by another, YFP-negative, motor axon, while those in A1 and A3 were not. The stable partial innervation by the imaged MU in A4 was thus likely due to lasting polyinnervation (B4, arrowhead). Green: NF-M and SV2 (all MUs); Gray: YFP-labeled axon; Red: nAChR labeled with BTX. Note how distinctive parts of the “pretzel” shape of postsynaptic receptors is identical between the *in vivo* the post-*in vivo* confocal image. Importantly, the main axonal branch visible in A4 is not visible in B4 as it was at a lower focal plane which was not included in the confocal stack shown in B4. Scale bars: 25 μ m.

2.2.8. Material and Methods

Table 2.1: Key Resource Table

<u>Reagent type</u> <u>(species) or</u> <u>resource</u>	<u>Designation</u>	<u>Source or</u> <u>reference</u>	<u>Identifiers</u>	<u>Additional</u> <u>information</u>
strain, strain background (<i>Mus musculus</i> , C57BL/6J)	loxSOD1 ^{G37R}	PMID: 16741123; now also available from Jax mice (stock number 016149)	RRID:MGI:3629226	Originally imported from Don W. Cleveland's facilities (UCSD).
strain, strain background (<i>Mus musculus</i> , C57BL/6J)	<i>Thy1</i> -YFP line H	Jax mice (stock number 003782)	RRID:MGI:3497947	
antibody	Goat polyclonal anti- choline acetyl-transferase	EMD Millipore (AB144P)	RRID:AB_207951	1:100
antibody	Mouse monoclonal IgG1 anti-NeuN, clone A60	EMD Millipore (MAB377)	RRID:AB_2298772	1:300
antibody	Rabbit polyclonal anti- S100 β	Agilent Dako (Z0311)	RRID:AB_10013383	1:250
antibody	Chicken polyclonal anti- neurofilament M	Rockland Inc. (212-901-D84)	RRID:AB_11182576	1:2000
antibody	Mouse monoclonal IgG1 anti-SV2	DSHB (SV2)	RRID:AB_2315387	1:2000
antibody	Mouse monoclonal IgG2b anti-MHC1	DSHB (BA-D5c)	RRID:AB_2235587	1:100
antibody	Mouse monoclonal IgG1 anti-MHC2a	DSHB (SC-71c)	RRID:AB_2147165	1:200
antibody	Mouse monoclonal IgM anti-MHC2b	DSHB (BF-F3c)	RRID:AB_2266724	1:200
antibody	Mouse monoclonal IgM anti-MHC2x	DSHB (6H1s)	RRID:AB_1157897	1:10
antibody	Mouse monoclonal IgG1 anti-MHC all-but-Ilx	DSHB (BF-35c)	RRID:AB_2274680	1:200

antibody	Goat polyclonal anti-mouse IgG1 DyLight 405	Jackson ImmunoResearch (115-475-205)	RRID:AB_2338799	1:500
antibody	Donkey polyclonal anti-goat Alexa 594	Jackson ImmunoResearch (705-585-147)	RRID:AB_2340433	1:500
antibody	Goat polyclonal anti-mouse IgG1 Alexa 647	Jackson ImmunoResearch (115-605-205)	RRID:AB_2338916	1:500
antibody	Donkey polyclonal anti-chicken Alexa 647	Jackson ImmunoResearch (703-605-155)	RRID:AB_2340379	1:500
antibody	Donkey polyclonal anti-rabbit Alexa 405	Jackson ImmunoResearch (711-475-152)	RRID:AB_2340616	1:500
antibody	Goat polyclonal anti-mouse IgM Alexa 647	Jackson ImmunoResearch (115-605-020)	RRID:AB_2338905	1:500
antibody	Goat polyclonal anti-mouse IgG2b Alexa 488	Jackson ImmunoResearch (115-545-207)	RRID:AB_2338856	1:500
antibody	Goat polyclonal anti-mouse IgG1 Alexa 594	Jackson ImmunoResearch (115-585-205)	RRID:AB_2338885	1:500
chemical compound, drug	Alexa 594-conjuguated α -Bungarotoxin	Thermofisher (B13423)	n/a	1:750 (1.33 μ g/mL)

2.2.8.1. Animals

WT/YFP (*SOD1*^{-/-};YFP^{+/-}) and *SOD1*^{G37R}/YFP (*SOD1*^{+/-};YFP^{+/-}) double transgenic mice were obtained by crossing transgenic males heterozygote for the human *SOD1*^{G37R} transgene (flanked by LoxP sites; lox*SOD1*^{G37R}) to transgenic females heterozygote for the *Thy1*-YFP transgene (line H; [B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)HJrs/J]; The Jackson laboratories, Bar Harbor, ME, stock number 003782) (Feng et al., 2000). Lox*SOD1*^{G37R} mice have been described previously

(Boillee et al., 2006b; Lobsiger et al., 2009). Single transgenic lines were maintained on a C57BL/6J background. Progenies were genotyped for the *SOD1* and the YFP transgenes by PCR performed on a tail sample or an ear punch extract. Mice of both sexes were used. Disease progression was monitored through weekly weighing and all-limb grip strength measurements (BioSeb, FL; BIO-GS3). Animals were sacrificed using a lethal dose of isoflurane. All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care, the Comité de Déontologie sur l'Expérimentation Animale of Université de Montréal (protocol #18-040) and the CRCHUM Institutional Committee for the Protection of Animals (protocol #N16008CVV and #N15047ADPs).

2.2.8.2. Repeated in vivo imaging

Procedures for repeated *in vivo* imaging of the *Tibialis anterior* muscle were adapted from previous reports (Li et al., 2011; Schaefer et al., 2005; Turney et al., 2012). Mice were anaesthetized with isoflurane (2-3% in 98-97-% O₂) in an induction chamber and maintained under anesthesia using a breathing mask. Mice were placed on their side and a hind limb was immobilized on a custom-made stand. Eye drying was prevented by applying a lubricant (Vaseline). The *Tibialis anterior* muscle was exposed through an incision made on the external side of the leg (from ~5-10 mm proximal to the knee to ~5 mm proximal the ankle). The skin was drawn tight using four hooks (Guthrie Retractors; #17021-13; FST, Canada) mounted on custom-made blocks around the leg. The muscle was immersed in a physiological solution by regular irrigation with sterile lactated Ringer (B. Braun Medical, CDMV, Canada). Postsynaptic nAChRs were labeled with a non-blocking concentration of Alexa594-conjugated α -Bungarotoxin (BTX, 5 μ g/mL in sterile lactated Ringer for 10 minutes; Molecular Probes, Fischer Scientific, Canada). α -BTX was applied on the first session and was reapplied once (if necessary) only when the labeling was too dim, usually on session 5 or 6. Muscle contractions and synaptic transmission) are known to be preserved at this concentration of α -BTX (Arbour et al., 2015; Li et al., 2011; Turney et al., 2012; Zuo et al., 2004) and unpublished observations). NMJs near the surface were imaged using a 20X water immersion objective (0.4 NA, Nikon, Japan) mounted on an upright epifluorescent microscope (Nikon, Optiphot-2) equipped with a Neo-sCMOS camera (Andor, UK). Fluorescence excitation and emission were filtered using a Brightline Pinkel filter set optimized for CFP/YFP/HcRed (CFP/YFP/HcRed-3X-A-000;

Semrock, NY). Images of the whole superficial MU axonal arborization at multiple focal planes were acquired using the Metafluor software (Molecular Devices, CA). After the imaging session, the wound was sutured using 5-0 or 6-0 vicryl suture (Johnson & Johnson), followed by tissue glue (GLUture; Abbot Laboratories, WPI, FL). Buprenorphine ($3\mu\text{g}/10\text{g}$ body weight; Temgesic, CEVA Animal Health Ltd, UK) was administered by subcutaneous injections three times a day for 24 hours following the surgery. Antibiotics ($0.1\text{mg}/10\text{g}$ body weight; Baytril; Bayer.Inc, Canada) were administered subcutaneously every 24h for 72h. Mice were given a small treat after each surgery (Nutella) to reduce stress and improve recovery. Except for two cases, imaging sessions were performed 2 weeks apart.

2.2.8.3. In vivo images and data analysis

All available SOD1 animals with YFP-positive surface motor axons, were included in the *in-vivo* analysis (16/44 mice tested). Only mice in which the MU arbor could be reliably followed for at least three sessions, with at least three NMJs near the surface, were included in the analysis (11/16 mice). NMJs which were too deep to be fully resolved were discarded. Images were analyzed using the Fiji software. First, focal planes from the same region were aligned using the “StackReg” plugin. MU branches were traced using the “Simple Neurite Tracer” plugin. The clearest session (generally session 1) was chosen for tracing. All segments of the MU arbor (from each region imaged) were merged in Photoshop (Adobe) and BTX labelling (in the overlap between the regions) was used as a reference for alignment. Tracings were used as a map to identify each NMJ on subsequent imaging sessions. For the purpose of this analysis, two labeled branches that could not be undoubtedly linked to the same main motor axon were considered as independent MNs. Then, the state of innervation of each NMJ was determined and a MU dynamic diagram showing the state of each NMJ within the arborization on each session was created using Visio2013 (Microsoft). NMJs were then classified based on their dynamic changes (Figure 2.7). For figure representations, contrast was linearly adjusted to facilitate observations.

For the spatio-temporal analysis (Sholl-like analysis) of asynchronous NMJ dismantling (Figure 2.5), distance between NMJs and the initial loss was measured on the full MU tracings or, for a few cases, directly on the raw aligned images. The initial event (center) was defined as the first completely lost NMJ. When two or more NMJs were lost simultaneously, the one which first

showed signs of denervation (partial loss) was defined as the center. If they could not be distinguished in this manner, the analysis was carried out with multiple centers (2/9 MU arbors). For one animal (#34), several branches were fairly close to each other, i.e. in the same field of view (branches A and B, C and D). To more accurately assess the presence of a spreading pattern, a single center per field of view was determined. Branch order was determined using the motor-unit dynamic diagrams. MU expansions were assigned the same branch order as the branch from which they originated from, to determine likelihood of sprouting of axonal branches.

To create the heat map (Figure 2.10), the % of change was calculated by counting the number of gained or lost NMJs over the number of initial NMJs. Partial gains/losses counted as half an event. When an NMJ could not be observed, the % of change was spread across the sessions where it could have occurred.

2.2.8.4. Myosin heavy chains labeling

Procedures for tissue preparation and immunostaining were done as previously described (Tremblay et al., 2017) Briefly, the *Tibialis anterior* was dissected in an oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Ringer REES solution and mounted in 10% Tragacanth (Sigma-Aldrich, Canada). Muscles were frozen in isopentane cooled to -80°C in liquid nitrogen. Transverse cryosections (10 µm) were incubated in blocking solution (10% normal donkey serum in PBS; Jackson ImmunoResearch, PA) for 30 min, then with primary antibodies for 1h, and then with secondary antibodies for 1h. Sections were finally mounted in Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Fischer Scientific). Sections were rinsed three times with PBS 1X for 5 minutes between each step. Primary antibodies, all from the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, IA), were either mouse IgG1 α -MHC type IIa (SC-71c, 1:200), mouse IgG2b α-MHC type I (BA-D5c, 1:100) and mouse IgM α -MHC type IIb (BF-F3c, 1:200) or mouse IgM α -MHC type IIx (6H1s; 1:10) and mouse IgG1 α -MHC all but IIx (BF-35c, 1:200). Secondary antibodies were goat α-mouse IgG1 Alexa 594 (#115-585-205), goat α-mouse IgG2b Alexa 488 (#115-545-207) and goat α-mouse IgM Alexa 647(#115-605-020), all from Jackson ImmunoResearch (all 1:500). Observations were made using an Olympus FV1000 or a Zeiss LSM880 confocal microscope with a 20X water immersion objective (N.A 0.95 or 1.0, respectively). Whole

muscle sections were reconstructed by superimposing maximum intensity projections of each stack in Photoshop (Adobe).

2.2.8.5. Whole-mount NMJ immunolabeling and motor neuron counts

Procedures for whole-mount muscle preparation, spinal cord sectioning and immunostaining were performed as previously described (Tremblay et al., 2017), with some minor adjustments. Mice were transcardially perfused with cold PBS 1X and 4% formaldehyde. Both *Tibialis anterior*s were then dissected and post-fixed for 20 minutes in 4% formaldehyde while the whole mouse was further fixed overnight at 4°C. Lumbar spinal cords were dissected, post-fixed for 2 hours, cryoprotected in a 30% sucrose-PBS solution for 72 hours at 4°C and frozen in cooled isopentane (-40 to -50°C).

Floating 30µm-thick spinal cord cryosections were washed twice in PBS 1X, incubated in a donkey blocking solution (10% NDS, 0.3% Triton X-100 in PBS 1X) for 1 hour and then incubated overnight with primary antibodies against Choline Acetyl-Transferase (ChAT; 1:100; Goat; Millipore, Canada; AB144P) and Neuronal Nuclei (NeuN; 1:300; Mouse IgG1; Millipore; MAB377) in donkey blocking solution, then incubated with the secondary antibody donkey anti-goat Alexa 594 (1:500; #705-585-147; Jackson ImmunoResearch) in donkey blocking solution for 1 hour, then incubated in a goat blocking solution (10% Normal Goat Serum, 0.3% Triton X-100 in PBS 1X) for 1 hour, then incubated with the goat anti-mouse IgG1 DyLight 405 secondary antibody (1:500; #115-475-205; Jackson ImmunoResearch) in goat blocking solution for 1 hour and then finally mounted with Prolong Diamond antifade reagent (Molecular Probes). Sections were washed thrice with PBS 1X (5 minutes each) between each antibody incubation.

Tibialis anterior muscles were permeabilized in 100% cold methanol at -20°C for 6 minutes, then incubated for 1 hour in blocking solution (10% NDS, 1% of Triton-X100 diluted in PBS 1X). Muscles were then incubated with a rabbit anti-S100β antibody (1:250, Z0311, Dako) in blocking solution for 23h at 4°C, then with chicken anti-neurofilament M, (NF-M, 1:2000, Rockland Immunochemicals Inc) and mouse IgG1 anti-synaptic vesicular protein 2 (SV2, 1:2000, Developmental Studies Hybridoma Bank) for 23h at 4°C, then with the secondary antibodies goat anti-mouse IgG1 Alexa 647 (#115-605-205), donkey anti-chicken Alexa 647 (#703-605-155) and donkey anti-rabbit DyLight 405 (#711-475-152) (all 1:500; Jackson

Immunoresearch) simultaneously with Alexa594-conjugated- α -BTX (1.33 μ g/ml, Molecular Probes, Fischer Scientific, Canada) for 2 hours. Finally, whole muscle preparations were mounted in Prolong Diamond antifade reagent (Molecular Probes). Muscles were washed six times (10 min each) in PBS 1X-Triton 0.01%.

Observations and image acquisition were performed on a Zeiss LSM 880 confocal microscope with a 20X water immersion objective (N.A. 1.0) or a 63X oil immersion objective (N.A. 1.4). No image manipulations were performed after acquisition, except for linear contrast adjustments for figure presentation. For motor neuron counts, MNs in both ventral horns were counted from 15 to 20 sections per animal, at least 90 μ m apart. ChAT- and NeuN-positive cells in the ventral horn were counted as α -MNs while ChAT-positive and NeuN-negative cells were counted as γ -MNs as previously described (Lalancette-Hebert et al., 2016; Tremblay et al., 2017). The Allan Brain Atlas Mouse Spinal cord reference set was used as a reference to ensure that all analysed sections were in the lumbar spinal cord. Results are expressed as the average number of cells counted per ventral horn in each animal.

2.2.8.6. Statistical analysis

For the Sholl-like analysis, each lost NMJ represented an event in time (time after initial loss) and space (distance from the initial loss) occurring over a given number of trials (total number of NMJs). This type of data (i.e. number of observations over a number of trials as a % of events) follows a logistic distribution rather than a Gaussian distribution. Hence, a *multivariate repeated-measures Generalized linear models (GLM)* using a *logistic distribution* was created to test the effects of time and space on the likelihood of observing an event. The time after the initial loss was set as a “within-NMJ” factor (the repeated measure) while distance from the initial loss was set as a continuous “between-NMJs” variable. The raw measured distance was used rather than the range bins presented in Figure 2.5. For the branch order analysis, a similar approach was used. Each lost or gained NMJ represented an event occurring over a given number of trials (number of NMJs within that branch order) in eight conditions (branch orders). Hence, a *logistic regression* was used to test the effect of the branch order on the likelihood of an NMJ being loss (using the *univariate GLM with logistic distribution* command). The branch order was set as an ordinal variable (continuous). For these analyses, “n” (the number of trials,

i.e. the sample size) represent the number of NMJs observed while “N” (the biological replicates) represents the number of animals. *P-values* smaller than 0.05 ($\alpha=5\%$) were considered statistically significant. Analyses were performed in the SPSS 24.0.0.0 (IBM) software.

When two independent groups were compared, *unpaired two-tailed t-tests* were performed using *Welch's correction* for unequal variance or a *Mann-Whitney test* when data did not follow the assumption of a Gaussian distribution. Variances were compared using the F-test. When the effect of one variable was compared over time (motor behavior, Figure 2.8), *two-way ANOVAs* with repeated measures (*RM*) were used. For the post-test, Holm-Sidak's correction was used. For NMJ innervation (Figure 2.8), the effect of genotype was analyzed using a *GLM* with a logistic distribution and Holm-Sidak's correction was applied for the post-test as previously described (Tremblay et al., 2017). Importantly, a GLM with a logistic distribution was used for NMJ innervation instead of a *t-test* (as for motor neuron counts) because NMJ innervation data (# of denervated NMJs/ # of total NMJs for each animal) does not follow a Gaussian distribution. Unless otherwise stated, data are presented as mean \pm SEM in the histograms and in the text. For these analyses, “N” represents the number of biological replicates (animals, i.e. the sample size) while “n” represents the number of observations (number of NMJs unless otherwise stated). *P-values* smaller than 0.05 ($\alpha=5\%$) were considered statistically significant. These analyses were performed in the GraphPad Prism 7.0 software, with the exception of the analysis for the NMJ innervation was made in SPSS 24.0.0.0.

No sample size estimations were performed before the experiments. All available SOD1 animals which met our inclusion/exclusion criteria were included (see In vivo images and data analysis). For the NMJ innervation and motor neuron counts experiments, sample sizes similar to previous experiments were used (Tremblay et al., 2017). No test to detect outliers was performed.

2.2.9. Acknowledgments

We thank Dr. Keith Murai and Dre. Janice Robertson for reading and commenting on the manuscript. We thank Sarah Peyrard and Joanne Vallée for essential help with animal husbandry, logistics for animal transfers between facilities and technical support. We also thank Dre. Danielle Arbour, Dr. Sébastien Barbat-Artigas and Alexandre St-Pierre-See for the invaluable discussions regarding data analysis, presentation and statistical testing. This work was funded by grants from the Canadian Institutes for Health Research (R.R. MOP-111070; A.D.P. PJT-152934), Robert Packard Center for ALS Research (R.R.), Canadian Foundation of Innovation (R.R., C.V.V), ALS Society of Canada (C.V.V.), Muscular Dystrophy Association (C.V.V.) and an infrastructure grant from the Fonds Recherche Québec-Santé to the GRSNC. C.V.V. is an FRQS Senior Research Scholar. É.M. held a doctoral studentship from the ALS Society of Canada.

2.2.10. References

- Arbour, D., Tremblay, E., Martineau, E., Julien, J. P., & Robitaille, R. (2015). Early and Persistent Abnormal Decoding by Glial Cells at the Neuromuscular Junction in an ALS Model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *35*(2), 688-706. doi:10.1523/JNEUROSCI.1379-14.2015
- Arbour, D., Vande Velde, C., & Robitaille, R. (2016). New perspectives on ALS: The role of glial cells at the neuromuscular junction. *The Journal of physiology*. doi:10.1113/JP270213
- Ayers, J. I., Fromholt, S. E., O'Neal, V. M., Diamond, J. H., & Borchelt, D. R. (2016). Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta neuropathologica*, *131*(1), 103-114. doi:10.1007/s00401-015-1514-0
- Azzouz, M., Leclerc, N., Gurney, M., Warter, J. M., Poindron, P., & Borg, J. (1997). Progressive motor neuron impairment in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve*, *20*(1), 45-51.
- Balice-Gordon, R. J., & Lichtman, J. W. (1990). In vivo visualization of the growth of pre- and postsynaptic elements of neuromuscular junctions in the mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *10*(3), 894-908.
- Boillee, S., Vande Velde, C., & Cleveland, D. W. (2006a). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, *52*(1), 39-59. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.018
- Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., . . . Cleveland, D. W. (2006b). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, *312*(5778), 1389-1392. doi:10.1126/science.1123511
- Brill, M. S., Kleele, T., Ruschkies, L., Wang, M., Marahori, N. A., Reuter, M. S., . . . Misgeld, T. (2016). Branch-Specific Microtubule Destabilization Mediates Axon Branch Loss during Neuromuscular Synapse Elimination. *Neuron*, *92*(4), 845-856. doi:10.1016/j.neuron.2016.09.049
- Cantor, S., Zhang, W., Delestree, N., Remedio, L., Mentis, G. Z., & Burden, S. J. (2018). Preserving neuromuscular synapses in ALS by stimulating MuSK with a therapeutic agonist antibody. *Elife*, *7*. doi:10.7554/eLife.34375
- Chiu, I. M., Phatnani, H., Kuligowski, M., Tapia, J. C., Carrasco, M. A., Zhang, M., . . . Carroll, M. C. (2009). Activation of innate and humoral immunity in the peripheral nervous system of ALS transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(49), 20960-20965. doi:10.1073/pnas.0911405106
- Clark, J. A., Southam, K. A., Blizzard, C. A., King, A. E., & Dickson, T. C. (2016). Axonal degeneration, distal collateral branching and neuromuscular junction architecture alterations occur prior to symptom onset in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Chem Neuroanat*, *76*(Pt A), 35-47. doi:10.1016/j.jchemneu.2016.03.003
- Dantes, M., & McComas, A. (1991). The extent and time course of motoneuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve*, *14*(5), 416-421. doi:10.1002/mus.880140506
- De Winter, F., Vo, T., Stam, F. J., Wisman, L. A., Bar, P. R., Niclou, S. P., . . . 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. *Molecular and cellular neurosciences*, 32(1-2), 102-117. doi:10.1016/j.mcn.2006.03.002
- Dengler, R., Konstanzer, A., Kuther, G., Hesse, S., Wolf, W., & Struppler, A. (1990). Amyotrophic lateral sclerosis: macro-EMG and twitch forces of single motor units. *Muscle & nerve*, 13(6), 545-550. doi:10.1002/mus.880130612
- Fanara, P., Banerjee, J., Hueck, R. V., Harper, M. R., Awada, M., Turner, H., . . . Hellerstein, M. K. (2007). Stabilization of hyperdynamic microtubules is neuroprotective in amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry*, 282(32), 23465-23472. doi:10.1074/jbc.M703434200
- Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., . . . Sanes, J. R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, 28(1), 41-51.
- Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., . . . Glass, J. D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental neurology*, 185(2), 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(7), 2534-2542.
- Gould, T. W., Buss, R. R., Vinsant, S., Prevet, D., Sun, W., Knudson, C. M., . . . Oppenheim, R. W. (2006). Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(34), 8774-8786. doi:10.1523/JNEUROSCI.2315-06.2006
- Grad, L. I., Yerbury, J. J., Turner, B. J., Guest, W. C., Pokrishevsky, E., O'Neill, M. A., . . . Cashman, N. R. (2014). Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(9), 3620-3625. doi:10.1073/pnas.1312245111
- Hegedus, J., Putman, C. T., & Gordon, T. (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease*, 28(2), 154-164. doi:10.1016/j.nbd.2007.07.003
- Hegedus, J., Putman, C. T., Tyreman, N., & Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of physiology*, 586(14), 3337-3351. doi:10.1113/jphysiol.2007.149286
- Ilieva, H., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of cell biology*, 187(6), 761-772. doi:10.1083/jcb.200908164
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J. L., Dimou, L., Lin, S., Fergani, A., Ruegg, M. A., . . . Loeffler, J. P. (2006). The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO reports*, 7(11), 1162-1167. doi:10.1038/sj.embor.7400826
- Keller-Peck, C. R., Walsh, M. K., Gan, W. B., Feng, G., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2001). Asynchronous synapse elimination in neonatal motor units: studies using GFP transgenic mice. *Neuron*, 31(3), 381-394.

- Keller, A. F., 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*(10), 1130-1142. doi:10.1002/glia.20836
- Kennel, P. F., Finiels, F., Revah, F., & Mallet, J. (1996). Neuromuscular function impairment is not caused by motor neurone loss in FALS mice: an electromyographic study. *Neuroreport*, *7*(8), 1427-1431.
- Killian, J. M., Wilfong, A. A., Burnett, L., Appel, S. H., & Boland, D. (1994). Decremental motor responses to repetitive nerve stimulation in ALS. *Muscle & nerve*, *17*(7), 747-754. doi:10.1002/mus.880170708
- Lalancette-Hebert, M., Sharma, A., Lyashchenko, A. K., & Shneider, N. A. (2016). Gamma motor neurons survive and exacerbate alpha motor neuron degeneration in ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(51), E8316-E8325. doi:10.1073/pnas.1605210113
- Le Masson, G., Przedborski, S., & Abbott, L. F. (2014). A computational model of motor neuron degeneration. *Neuron*, *83*(4), 975-988. doi:10.1016/j.neuron.2014.07.001
- Li, Y., Lee, Y., & Thompson, W. J. (2011). Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *31*(42), 14910-14919. doi:10.1523/JNEUROSCI.3590-11.2011
- Lobsiger, C. S., Boillee, S., McAlonis-Downes, M., Khan, A. M., Feltri, M. L., Yamanaka, K., & Cleveland, D. W. (2009). Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(11), 4465-4470. doi:10.1073/pnas.0813339106
- Loeffler, J. P., Picchiarelli, G., Dupuis, L., & Gonzalez De Aguilar, J. L. (2016). The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain pathology*, *26*(2), 227-236. doi:10.1111/bpa.12350
- Maimon, R., Ionescu, A., Bonnie, A., Sweetat, S., Wald-Altman, S., Inbar, S., . . . Perlson, E. (2018). miR126-5p Downregulation Facilitates Axon Degeneration and NMJ Disruption via a Non-Cell-Autonomous Mechanism in ALS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *38*(24), 5478-5494. doi:10.1523/JNEUROSCI.3037-17.2018
- McComas, A. J., Sica, R. E., Campbell, M. J., & Upton, A. R. (1971). Functional compensation in partially denervated muscles. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *34*(4), 453-460.
- Miyoshi, S., Tezuka, T., Arimura, S., Tomono, T., Okada, T., & Yamanashi, Y. (2017). DOK7 gene therapy enhances motor activity and life span in ALS model mice. *EMBO Mol Med*, *9*(7), 880-889. doi:10.15252/emmm.201607298
- Moloney, E. B., 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
- Nardo, G., Trolese, M. C., de Vito, G., Cecchi, R., Riva, N., Dina, G., . . . Bendotti, C. (2016). Immune response in peripheral axons delays disease progression in SOD1(G93A) mice. *J Neuroinflammation*, *13*(1), 261. doi:10.1186/s12974-016-0732-2
- Nguyen, Q. T., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2002). Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nature neuroscience*, *5*(9), 861-867. doi:10.1038/nn905

- Pacelli, C., Giguere, N., Bourque, M. J., Levesque, M., Slack, R. S., & Trudeau, L. E. (2015). Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current biology : CB*, 25(18), 2349-2360. doi:10.1016/j.cub.2015.07.050
- Parone, P. A., Da Cruz, S., Han, J. S., McAlonis-Downes, M., Vetto, A. P., Lee, S. K., . . . 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(11), 4657-4671. doi:10.1523/JNEUROSCI.1119-12.2013
- Perez-Garcia, M. J., & Burden, S. J. (2012). Increasing MuSK activity delays denervation and improves motor function in ALS mice. *Cell Rep*, 2(3), 497-502. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.004
- Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L., & Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nature neuroscience*, 9(3), 408-419. doi:10.1038/nn1653
- Rocha, M. C., Pousinha, P. A., Correia, A. M., Sebastiao, A. M., & 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(9), e73846. doi:10.1371/journal.pone.0073846
- Schaefer, A. M., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2005). A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of comparative neurology*, 490(3), 209-219. doi:10.1002/cne.20620
- Schmied, A., Pouget, J., & Vedel, J. P. (1999). Electromechanical coupling and synchronous firing of single wrist extensor motor units in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol*, 110(5), 960-974.
- Suzuki, M., McHugh, J., Tork, C., Shelley, B., Klein, S. M., Aebischer, P., & 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(8), e689. doi:10.1371/journal.pone.0000689
- Taetzsch, T., Tenga, M. J., & Valdez, G. (2017). Muscle Fibers Secrete FGFBP1 to Slow Degeneration of Neuromuscular Synapses during Aging and Progression of ALS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(1), 70-82. doi:10.1523/JNEUROSCI.2992-16.2017
- Tallon, C., Russell, K. A., Sakhalkar, S., Andrapallayal, N., & Farah, M. H. (2016). Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice. *Neuroscience*, 312, 179-189. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.11.018
- Tremblay, E., Martineau, E., & Robitaille, R. (2017). Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model: When Motor Units Matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(37), 8901-8918. doi:10.1523/JNEUROSCI.3090-16.2017
- Turner, B. J., Ackerley, S., Davies, K. E., & Talbot, K. (2010). Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. *Human molecular genetics*, 19(5), 815-824. doi:10.1093/hmg/ddp550

- Turney, S. G., Walsh, M. K., & Lichtman, J. W. (2012). In vivo imaging of the developing neuromuscular junction in neonatal mice. *Cold Spring Harbor protocols*, 2012(11), 1166-1176. doi:10.1101/pdb.prot072082
- Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T. G., . . . Milligan, C. (2013). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav*, 3(4), 431-457. doi:10.1002/brb3.142
- Wang, L., Pytel, P., Feltri, M. L., Wrabetz, L., & Roos, R. P. (2012). Selective knockdown of mutant SOD1 in Schwann cells ameliorates disease in G85R mutant SOD1 transgenic mice. *Neurobiology of disease*, 48(1), 52-57. doi:10.1016/j.nbd.2012.05.014
- Zuo, Y., Lubischer, J. L., Kang, H., Tian, L., Mikesh, M., Marks, A., . . . Thompson, W. J. (2004). Fluorescent proteins expressed in mouse transgenic lines mark subsets of glia, neurons, macrophages, and dendritic cells for vital examination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(49), 10999-11009. doi:10.1523/JNEUROSCI.3934-04.2004

CHAPITRE III

Différences liées au sexe dans le réarrangement axonal des motoneurones dans un modèle murin de la SLA

3.1 Résumé

La perte progressive de jonctions neuromusculaires (JNM) est un événement précoce durant la sclérose latérale amyotrophique (SLA), précédant la dégénérescence globale des axones moteurs et étant accompagnée par le bourgeonnement d'autres branches au sein de la même arborisation axonale. Plusieurs aspects liés à la manifestation et à la progression de la SLA sont affectés par le sexe chez les modèles animaux de la maladie et chez les patients. Cependant, il est incertain si des différences liées au sexe affectent le patron et le déroulement temporel du démantèlement des JNMs et de la formation de nouvelles branches axonales au sein d'un axone moteur unique. Ainsi, nous avons effectué une analyse secondaire de données préalablement publiées obtenues à partir de souris $SOD1^{G37R}$, et avons observé que les pertes de JNMs au sein d'axones moteurs uniques étaient aussi fréquentes chez les mâles que les femelles. Cependant, nous avons observé que le bourgeonnement axonal était nettement plus fréquent chez les souris femelles, provoquant une augmentation nette de la taille de l'arborisation axonale exclusivement chez les femelles. De manière intéressante, la formation de ces nombreuses branches axonales était associée à un déclin légèrement plus rapide de la force de préhension, une augmentation du nombre de JNMs dénervées et une diminution de la survie des motoneurones α chez les femelles. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le bourgeonnement axonal excessif et l'expansion des unités motrices chez les femelles $SOD1^{G37R}$ seraient des adaptations nuisibles durant la progression de la SLA.

Contribution des auteurs

Éric Martineau a participé à la conceptualisation des expériences, à la mise au point méthodologique, à la cueillette et l'analyse des données, à leur représentation visuelle et à l'écriture du manuscrit. Adriana Di Polo et Christine Vande Velde ont participé au financement, au développement d'outils méthodologiques, à la supervision du projet et à la révision du manuscrit. Richard Robitaille a participé à la conceptualisation des expériences, au financement, à la supervision du projet et à l'écriture du manuscrit.

3.2 Texte intégral du deuxième article

Sex-specific differences in motor-unit remodeling in a mouse model of ALS

Éric Martineau^{1,2}, Adriana Di Polo^{1,3}, Christine Vande Velde^{1,3}, Richard Robitaille^{1,2*}

Affiliations:

¹ Département de neurosciences, Université de Montréal.

² Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal.

³ Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM).

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS); Neuromuscular Junction; Motor-unit; Reinnervation; Superoxide Dismutase (SOD1), Sex-specific differences.

3.2.1 Abstract

Progressive loss of neuromuscular junctions (NMJ) is an early event in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), preceding the global degeneration of motor axons and being accompanied by new axonal sprouting within the same axonal arbor. Some aspects of ALS onset and progression seem to be affected by sex in animal models of the disease and in patients. However, whether there are sex-specific differences in the pattern or time course of NMJ loss and repair within single motor axons remains unknown. Hence, we performed a secondary analysis of a previously published *in vivo* dataset, obtained from male and female SOD1^{G37R} mice, and found that NMJ losses were as frequent between male and female motor axons. However, we found that axonal sprouting was much more frequent in female mice, resulting in a net increase in axonal arborization size in female but not in male mice. Interestingly, the formation of these numerous new axonal branches was associated with a slightly faster decline in grip strength, an increase in NMJ denervation and a reduced α -motor neuron survival in female mice. Altogether, these results suggest that excessive axonal sprouting and motor-unit expansion in female SOD1^{G37R} mice is maladaptive during ALS progression.

3.2.2 Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease affecting motor neurons. One of the first pathological events in patients and animal models of the disease is the progressive retraction of motor axons from neuromuscular junctions (NMJs) (Fischer et al., 2004; Pun et al., 2006; Clark et al., 2016; Tallon et al., 2016). We have recently shown in SOD1^{G37R} mice that NMJ loss is initially slow and asynchronous within single motor axons and is accompanied by the formation of new collateral axonal branches (expansions), reinnervating other nearby NMJs (Martineau et al., 2018). Importantly, this period of dynamism preceded global axonal degeneration by several weeks, showing that NMJ loss is a key event in ALS pathogenesis.

Slight sex-specific differences in disease onset and progression have been observed in patients and animal models of ALS (McCombe and Henderson, 2010). Notably, ALS onset seem delayed in females, the mean age of onset being slightly lower in males and the male-to-female ratio in the incidence normalizing from 3.98:1 for patients under 49 years, of age to reach 1:1 in octogenarians (McCombe and Henderson, 2010). Similarly, disease onset is slightly delayed in SOD1^{G93A} female mice compared to male mice (Pfohl et al., 2015). However, whether sex affects neuromuscular dysfunction in ALS remains ill-defined. Previous studies did not identify sex-specific differences in the global time course and pattern of motor axon loss in SOD1^{G93A} mice (Hegedus et al., 2009) or in ALS patients (McComas et al., 1971; Dengler et al., 1990; Dantes and McComas, 1991; Schmied et al., 1999) using electromyographic (EMG) recordings. However, whether NMJ denervation and reinnervation within single motor axons occur similarly between males and females remains unknown.

In the present study, we addressed this question by performing a secondary analysis of the dataset recently published in Martineau et al. (2018). We found that motor axons were more likely to form new axonal branches in female than in male SOD1^{G37R} mice. Interestingly, these compensatory expansions were associated with an increased neuronal loss and NMJ denervation in female mice, suggesting that they may be detrimental to disease progression.

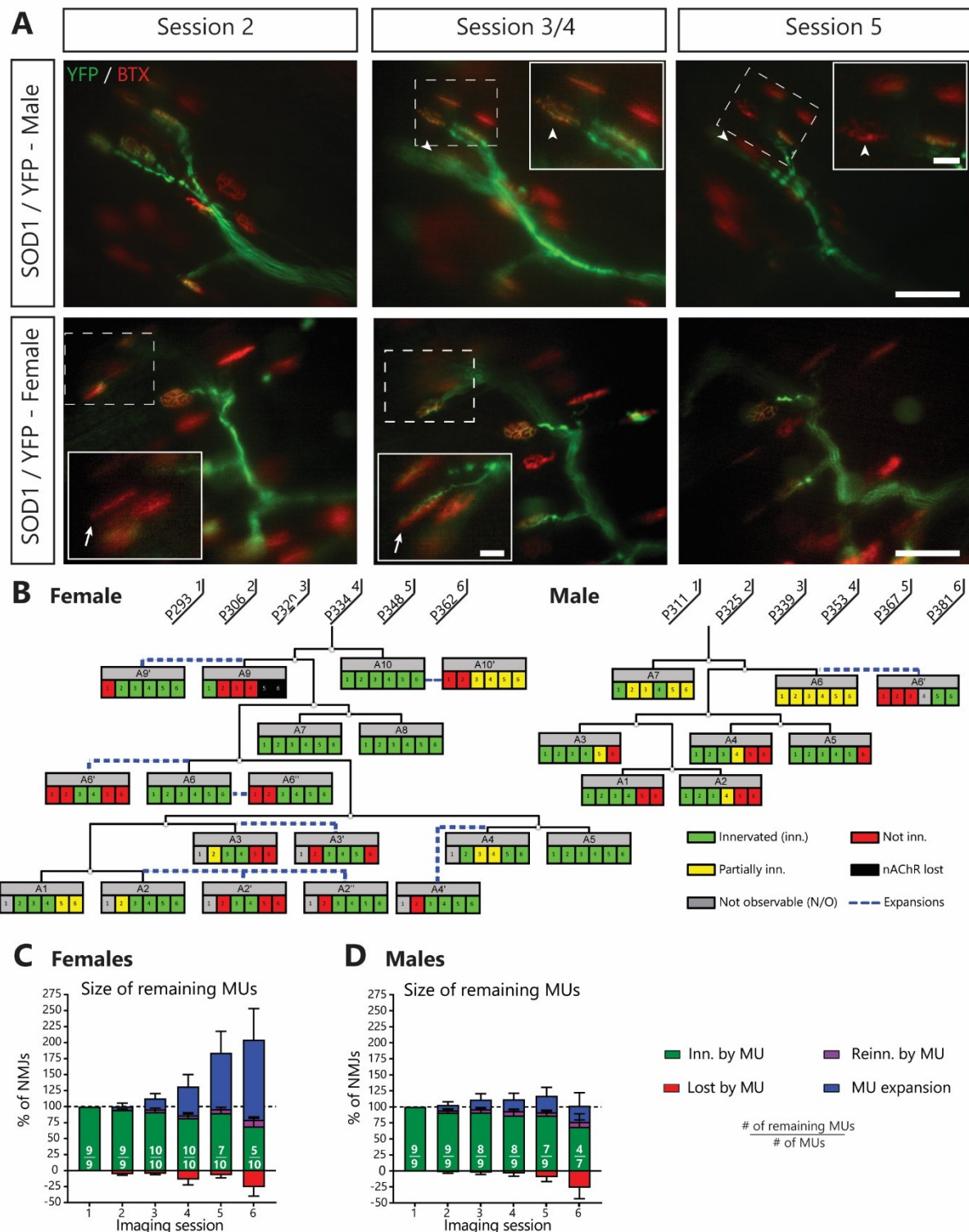


Figure 3.1. Sex-specific differences in MU dynamics in female $SOD1^{G37R}/YFP$ mice. **A**, Examples of MU arbors from a male and a female $SOD1/YFP$ mice during three sessions (Male: session 2, 3 and 5; Female: session 2, 4 and 5), with higher magnification on-focus insets of NMJs of interest (digital zoom, dashed box in low magnification). Green: YFP-labeled axon; Red: nAChR. Note how the imaged motor axon retracted from two NMJs (arrowheads) between sessions 3 and 5 in the male example. *Legend continues on next page.*

3.2.3 Results

3.2.3.1 MU expansions are more frequent in females SOD1^{G37R} mice

We previously performed repeated *in vivo* imaging of single motor axons in SOD1^{G37R} (loxSOD1^{G37R}) by crossing them with animals expressing the “yellow fluorescent protein” (YFP) in a small subset of motor neurons (*thyl*-YFP line H) (Martineau et al., 2018). Postsynaptic nicotinic receptors were labeled with a non-blocking dose of Alexa-594-conjugated α -bungarotoxin (α -BTX, 5 μ g/mL for 10 minutes). To investigate if sex affects asynchronous NMJ losses and expansions within single motor units (one motor neuron and the muscle fibers it innervates), we performed a secondary analysis of the dataset from SOD1^{G37R}/YFP mice (males: 102 NMJs, 9 MU arbors, 7 animals; females: 151 NMJs, 10 arbors, 4 animals).

Interestingly, we observed that MU dynamics were vastly different between males and females (Figure. 3.1A-B). While MUs in males and female mice suffered a similar amount of asynchronous complete losses over all imaging sessions (Figure 3.1C-D, M: 12/102 NMJs vs F: 26/151 NMJs; *multivariate GLM with logistic distribution*; $p=0.592$), female MUs were strikingly more likely to form expansions (Figure 3.1C-D, M: 14/102 NMJs vs F: 62/151 NMJs; *multivariate GLM with Poisson’s distribution*; $p=0.004$). This difference was so pronounced that only female MUs exhibited a net increase in size, while expansions barely masked the losses in male MUs (Figure. 3.1C-D; average MU size on session 6, ♂: 98.75 ± 31.41 % vs ♀: 204.4 ± 58.0 %). Moreover, male MUs exhibited slightly more partial losses than female MUs (M 18/102 NMJs vs F: 12/151; *multivariate GLM with logistic distribution*; $p=0.029$). Importantly, these differences are not due to differences in observation times or in the initial size of axonal arbors between sexes, i.e. more observations due to having observed one group for a longer

Furthermore, note the formation of a new axonal branch between sessions 2 and 4 in the female example (arrow), innervating an NMJ that previously did not belong to this MU (MU expansion). **B**, MU dynamic diagram of the MUs shown in **(A)**, showing that MU are much more likely to expand in female SOD1^{G37R}/YFP mice. Black lines represent the axonal arborization and each box represents a single NMJ. Note how asynchronous NMJ losses occurred in both these MUs, but how partial losses seem more frequent in the male MU. **C**, **D**, Histograms showing the average proportion of NMJs from the initial pool which are innervated (green), re-innervated (purple) or lost (red) by the MU and the proportion which are gained (blue) for female **(C)** and male **(D)** SOD1^{G37R}/YFP mice. Numbers in the histogram bars represent the number of remaining MU arbors (those which did not globally degenerate) over the total number of MUs observed. Again, note how MU expansions are more frequent in female than in male mice. Scale bar, low magnification: 100 μ m; high magnification: 25 μ m.

period of time or having imaged bigger arbors, as these parameters were comparable between groups (females MUs: 58 sessions, 88 initial NMJs vs male MUs: 48 sessions, 88 initial NMJs).

3.2.3.2 Grip strength, but not body weight, declines slightly faster in female SOD1^{G37R} mice

To investigate whether these differences in MU dynamism were associated with differences in disease progression in this mouse line, we analyzed the disease course of male and female SOD1^{G37R} mice during the symptomatic phase by using two well-described and reliable methods: all-limb grip strength and body weight (Figure 3.2 and Table 3.1) (Lobsiger et al., 2009; Lobsiger et al., 2013; Mesci et al., 2015). Male and female SOD1^{G37R}/YFP mice exhibited a parallel decline in body weight relative to sex-matched WT/YFP animals (Figure 3.2A, *repeated measures three-way ANOVA*; interaction between time and genotype: $p < 0.001$; interaction between time, genotype and sex: $p = 0.397$) as previously reported (Lobsiger et al., 2013). Surprisingly though, decline in all-limb grip strength was observable almost a month earlier in female than in male SOD1^{G37R}/YFP mice (Figure 3.2B; *repeated measures three-way ANOVA*; interaction between time, genotype and sex: $p = 0.011$). Hence, motor deficits occur earlier in female SOD1^{G37R}/YFP mice compared to male mice.

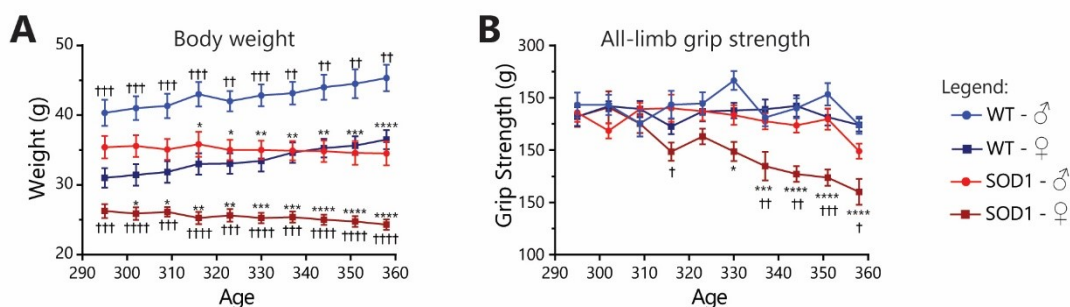


Figure 3.2. Motor function declines slightly faster in female SOD1^{G37R}/YFP mice. **A** and **B**, body weight (**A**) and all-limb grip strength (**B**) curves of male and female (light and dark colors respectively) WT/YFP and SOD1^{G37R}/YFP mice (blue and red respectively) during the symptomatic stages (WT♀: N=14; WT♂: N=6; SOD1♀: N=8; SOD1♂: N=12). Data are presented as mean ± SEM. Main effects and interactions are reported in Table 1 and in the text. Asterisks and crosses represent biologically relevant statistically significant differences in the post-test (Tukey's multiple comparisons). Asterisks represent differences compared to the other genotype, while crosses represent differences compared to the other sex. * / †: $p < 0.05$; ** / ††: $p < 0.01$;

Table 3.1: Effect of time, sex and genotype on disease progression in *SOD1^{G37R}* mice.

Analysis	Statistical Test	Main effect	<i>p</i> -value
Body weight (Figure. 3.2A)	Repeated-measures three-way ANOVA	Time	<0.001***
		Genotype	<0.001***
		Sex	<0.001***
		Time * Genotype	<0.001***
		Time * Sex	0.854
		Sex * Genotype	0.868
		Time * Sex * Genotype	0.397
Grip strength (Figure. 3.2B)	Repeated-measures three-way ANOVA	Time	<0.001***
		Genotype	<0.001***
		Sex	<0.001***
		Time * Genotype	<0.001***
		Time * Sex	0.007**
		Sex * Genotype	0.023*
		Time * Sex * Genotype	0.011*

3.2.3.3 Motor neuron loss and NMJ denervation are slightly exacerbated in female *SOD1^{G37R}* mice

To further validate this tendency, we analyzed NMJ innervation in the *Tibialis anterior* and quantified α -motor neuron (α -MN) survival in the lumbar spinal cord of male and female

SOD1^{G37R}/YFP mice at P360 by performing immunolabeling (Figure 3.3 and Table 3.2). Consistent with our *in vivo* results, α -MN degeneration and NMJ denervation were already severe at P360 in both male and female *SOD1^{G37R}* mice (respectively, Figure. 3.3A, C and E; *two-way ANOVA*; effect of genotype: $p=0.0002$; Figure. 3.3B, D and G; *GLM with logistic distribution*; effect of genotype: $p<0.001$). Importantly, survival of γ -MNs was unchanged in *SOD1^{G37R}/YFP* mice compared to WT/YFP mice, despite females having slightly less γ -MNs in general (Figure 3.3F; *two-way ANOVA*; effect of genotype: $p=0.673$; effect of sex: $p=0.0420$).

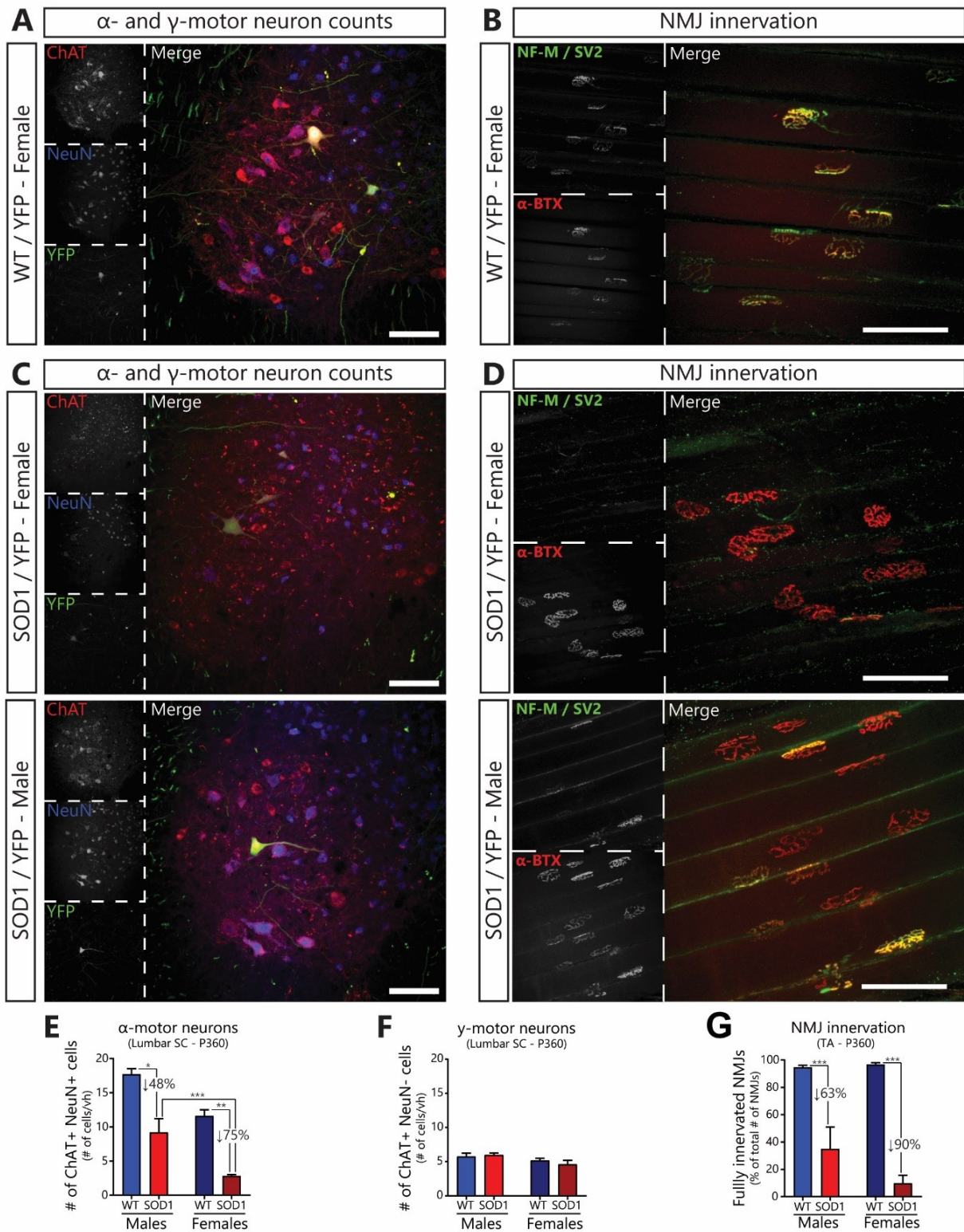


Figure 3.3. α -motor neuron loss and NMJ denervation are slightly more pronounced in female $SOD1^{G37R}/YFP$ mice at P360. **A**, Representative example of lumbar spinal cord sections from a female WT/YFP mice at P360 (Red: ChAT; Blue: NeuN; Green: YFP). **B**, Representative image of NMJs in the *Tibialis anterior* muscle of a female WT/YFP mice at P360 (Red: α -BTX; Green: NF-M and SV2). Legend continues on next page.

Consistent with our grip strength results, we found that α -MN degeneration was slightly increased in female SOD1^{G37R}/YFP mice compared to male SOD1^{G37R}/YFP mice (Figure 3.3E; SOD1 ♂, 48% reduction, vs SOD1 ♀, 75% reduction; *Tukey's multiple comparisons*; $p=0.0304$), even though the global interaction term was not significant (*two-way ANOVA*; interaction: $p=0.9410$). Similarly, loss of NMJ innervation in SOD1^{G37R}/YFP mice tended to be greater in females than in males (*GLM with logistic distribution*, interaction; $p=0.019$), even though no specific differences were observed between male and female SOD1^{G37R}/YFP mice (Figure. 3.3G; SOD1 ♂ vs SOD1 ♀; *GLM post-test*; $p=0.121$). Importantly, NMJ innervation and α -MNs counts seemed more variable in SOD1^{G37R}/YFP males than in SOD1^{G37R}/YFP females (Figure 3.3E and G), further suggesting that some male individuals may have been less affected at that time point. In sum, these results confirm that ALS pathology seems to be slightly more advanced in female than in male SOD1^{G37R}/YFP mice at P360.

Table 3.2: Effect of sex and genotype on neuron survival and innervation in SOD1^{G37R} mice.

Analysis	Statistical Test	Main effect	<i>p</i> -value
α -MNs counts (Figure. 3.3E)	Two-way ANOVA	Genotype	<0.001***
		Sex	0.002**
		Sex * Genotype	0.941
γ -MNs counts (Figure. 3.3F)	Two-way ANOVA	Genotype	0.673
		Sex	0.042*
		Sex * Genotype	0.365
NMJ innervation (Figure. 3.3G)	GLM - logistic distribution	Genotype	<0.001***
		Sex	0.431
		Sex * Genotype	0.019*

C, Representative examples of lumbar spinal cord sections from female (top) and male (bottom) SOD1^{G37R}/YFP mice at P360. **D**, Representative images of NMJs in the *Tibialis anterior* muscle of female (top) and male (bottom) SOD1^{G37R}/YFP mice at P360. **E** and **F**, Quantification of the number of α -MNs (**E**, ChAT+ NeuN+ cells) and γ -MNs (**F**, ChAT+ NeuN- cells) per ventral horn at P360 (WT♀: N=4; WT♂: N=2; SOD1♀: N=4; SOD1♂: N=5). **G**, Quantification of the percentage of fully innervated NMJs in the *Tibialis anterior* at P360 (WT♀: N=4, n=1078; WT♂: N=2, n=446; SOD1♀: N=4, n=977; SOD1♂: N=5, n=820). Data are presented as mean \pm SEM. Main effects and interactions are reported in Table 2 and in the text. Asterisks represent biologically relevant statistically significant differences in the post-test (Tukey's multiple comparisons). * : $p<0.05$; ** : $p<0.01$; *** : $p<0.001$. Scale bar: 100 μ m.

3.2.4 Discussion

In summary, our results show that female MUs are much more likely to form expansions in SOD1^{G37R}/YFP mice, resulting in a net increase in motor-unit size in females but not in males. Interestingly, this increased dynamism is associated with an earlier onset of motor deficits and a slightly exacerbated pathology in female mice. These results raise the possibility that excessive MU expansions may be maladaptive and detrimental to motor neuron survival in the long run.

A number of factors could explain this apparently surprising result. One interesting possibility is that excessive MU expansions are detrimental to motor neuron survival. Indeed, previous studies identified that a large axonal arborization size is associated with an increased energetic load and an enhanced vulnerability to neurodegenerative disease (Le Masson et al., 2014; Pacelli et al., 2015). Indeed, axonal length and complexity is predictive of NMJ vulnerability in ALS at the single motoneuron level (Tallon et al., 2016; Martineau et al., 2018). Hence, one could hypothesize that the excessive expansions in female SOD1^{G37R} mice could increase their energetic load during disease progression, exacerbating their stress. This possibility is consistent with the theoretical work of Le Masson et al. (2014) suggesting that local energetic imbalance in distal axonal branches in ALS could propagate and give rise to global energetic failures, contributing to global neuronal degeneration. This would also be consistent with our observation that NMJ loss is increased in female mice despite that asynchronous branch-specific NMJ loss was unchanged compared to males. Inversely, increased MU expansions could be a compensatory response to the increased loss of motor neurons and NMJs in female SOD1^{G37R} mice. However, this scenario seems less likely considering that these compensatory expansions would partly mask the increased NMJ loss, presumably resulting in a less pronounced sex-specific difference in NMJ loss than in motor neuron survival.

Consistent with previous reports, we found no difference in disease progression, measured by weight loss, between sexes in loxSOD1^{G37R} mice (Lobsiger et al., 2013; Mesci et al., 2015). However, we detected a difference in the loss of grip strength and a slight difference in the neuromuscular and the spinal cord histopathology, which is not inconsistent with these reports. Interestingly, sex-specific differences have been identified in other ALS mouse models and in patients, but they did not consistently point toward a faster or more severe disease in one

sex (Hayworth and Gonzalez-Lima, 2009; McCombe and Henderson, 2010; Kim et al., 2012; Zwiegers et al., 2014; Pfohl et al., 2015; Liu et al., 2016; Curtis et al., 2017). For instance, male SOD1^{G93A} mice have an earlier onset than female SOD1^{G93A} mice (Hayworth and Gonzalez-Lima, 2009; Kim et al., 2012; Pfohl et al., 2015). Importantly, however, these differences depend on the presence of genetic modifiers (Heiman-Patterson et al., 2005). Furthermore, in another SOD1^{G37R} mouse line (line 29), female mice have a reduced survival and tend to have a slightly delayed onset (Zwiegers et al., 2014), consistent with our present finding in loxSOD1^{G37R} mice. In patients, the incidence and prevalence of sporadic ALS, but not familial ALS, are higher in men than in women, but bulbar onset of ALS is more common in women and is associated with a poor prognosis (McCombe and Henderson, 2010; Kiernan et al., 2011). Hence, sex seems to affect ALS onset and progression through a complex interplay with several other factors, including the disease mutation and the genetic background.

Interestingly, previous studies identified marked sex-specific differences in mitochondrial function in SOD1^{G93A} mice. Notably, increased activation of the mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}) (Riar et al., 2017), reduced mitochondrial calcium accumulation (Kim et al., 2012) and improved preservation of complex I function (Cacabelos et al., 2016) have been suggested to underly female resilience to the disease in this line. Together with the potential increased bioenergetic load in female motor axons, these results suggest that alterations in mitochondrial function could contribute to the sex-linked phenotypic differences observed in ALS. Nevertheless, additional studies are required to evaluate whether these alterations are mutation- or genetic-background-dependent. Altogether these findings suggest that additional detailed analyses would clarify the prevalence of sex-specific differences across animal models of the disease, and eventually in ALS patients, and may further our understanding of ALS pathogenesis.

3.2.5 Material and Methods

3.2.5.1 Animals

SOD1^{G37R}/YFP (*SOD1*^{+/-}; YFP^{+/-}) transgenic mice were previously described (Martineau et al., 2018). Briefly, they were obtained by breeding male lox*SOD1*^{G37R} mice (ref; RRID:MGI:3629226) with heterozygote female *thy1*-YFP mice (B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)HJrs/J; The Jackson laboratories, Bar Harbor, ME, stock number 003782; RRID:MGI: 3497947). Parent lines were maintained on a C57BL6/J background. Disease progression and motor function were monitored through weekly weighting and grip strength measurements (BioSeb, FL BIO-GS3). Animals were sacrificed using a lethal dose of isoflurane. All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care, the Comité de Déontologie sur l'Expérimentation Animale of Université de Montréal (protocol #18-040) and the CRCHUM Institutional Committee for the Protection of Animals (protocol #N16008CVV and #N15047ADPs).

3.2.5.2 Repeated *in vivo* imaging and image analysis

Procedures for the repeated *in vivo* imaging of the *Tibialis anterior* muscle and image analysis were described in the original publication of this dataset (Martineau et al. 2018; DOI: 10.7554/eLife.41973). Notably, images were obtained using a Neo-sCMOS camera (Andor, UK) mounted on an upright Optiphot-2 microscope (Nikon) equipped with a 20X water immersion objective (0.4 NA, Nikon, Japan). Postsynaptic nAChRs were labeled by applying a non-blocking concentration of Alexa 594-conjugated α -bungarotoxin (BTX, 5 μ g/mL, in sterile lactated Ringer for 10 minutes; Molecular Probes, Fischer Scientific, Canada) on the first session. α -BTX was reapplied only when the labeling was too dim, on session 5 or 6. All SOD1 animals with YFP-positive surface motor axons which could be reliably followed for at least three sessions and with at least three NMJs near the surface were included in this dataset.

3.2.5.3 Whole-mount NMJ immunolabeling and motor neuron counts

Procedures for the whole-mount muscle and spinal cord immunostaining were previously described in detail (Martineau et al., 2018). Images were acquired on a Zeiss LSM 880 confocal microscope with a 20X water immersion objective (N.A. 1.0). No image manipulations were

performed after acquisition, except for linear contrast adjustments for figure presentation. Motor neurons in both ventral horns were counted from 15 to 20 sections per animal, separated by at least 90 μm . The Allan Brain Atlas Mouse Spinal cord reference set was used to ensure that all analyzed sections were in the lumbar spinal cord. All ChAT-positive cells in the ventral horn were considered as motor neurons. NeuN-positive motor neurons were counted as α -motor neurons while NeuN-negative motor neurons were counted as γ -motor neurons.

3.2.5.4 Statistical analysis

Comparison of the frequency of expansions and asynchronous losses between male and female SOD1^{G37R} mice was performed by using a *GLM with Poisson's or logistic distribution*. The cumulative number of expansions or the cumulative number of asynchronous losses over the total number of NMJs innervated by that MU at any time points for each animal were used as the dependent variables. A logistic distribution was used for asynchronous losses as they represent a number of events over a define number of trials (number of imaged NMJs innervated by that MU). Poisson's distribution was used for the expansions as they represent events which occur over a period of observation (as opposed to a define number of trials). For this analysis, the sample size (number of MU arbors) and the number of biological replicates (number of animals) are indicated in the text. *P-values* smaller than 0.05 ($\alpha=5\%$) were considered statistically significant. Analyses were performed in the SPSS 24.0.0.0 (IBM) software.

When the effect of two or three independent variables were compared (Figure. 3.2 and 3.3), *two- or three-way ANOVAs* were used, with (for motor behavior) or without repeated measures (*RM*; for motor neuron counts). For the post-test, Tukey's multiple comparisons was used. For NMJ innervation (Figure. 3.3), the main effects of each variable were compared using a *GLM* with a logistic distribution and Holm-Sidak's correction was applied to all pairwise comparisons for the post-test as previously described (Tremblay et al., 2017). Data are presented as mean \pm SEM in the histograms and in the text. "N" represents the number of biological replicates (animals) while "n" represents the number of observations (number of NMJs unless otherwise stated). *P-values* smaller than 0.05 ($\alpha=5\%$) were considered statistically significant. These analyses were performed in the GraphPad Prism 7.0 software, with the exception of the analysis for the NMJ innervation and the three-way ANOVAs with repeated measures which were made in SPSS 24.0.0.0. For the purpose of clarity, only essential main effects and post-

hoc comparisons are presented in the text. All other comparisons are reported in Table 1 and 2 (main effects) or are represented in the graphs (post hoc comparisons).

3.2.6 Acknowledgments

We thank Sarah Peyrard and Joanne Vallée for their crucial help with animal husbandry, logistics and technical support. This work was funded by grants from the Canadian Institutes for Health Research (R.R. MOP-111070; A.D.P. PJT-152934), Robert Packard Center for ALS Research (R.R.), Canadian Foundation of Innovation (R.R., C.V.V), ALS Society of Canada (C.V.V.), Muscular Dystrophy Association (C.V.V.) and an infrastructure grant from the Fonds Recherche Québec-Santé Leader Opportunity Fund to the GRSNC. C.V.V. is an FRQS Senior Research Scholar. É.M. held a doctoral studentship from the ALS Society of Canada.

3.2.7 References

- Cacabelos D, Ramirez-Nunez O, Granado-Serrano AB, Torres P, Ayala V, Moiseeva V, Povedano M, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M, Boada J (2016) Early and gender-specific differences in spinal cord mitochondrial function and oxidative stress markers in a mouse model of ALS. *Acta neuropathologica communications* 4:3.
- Clark JA, Southam KA, Blizzard CA, King AE, Dickson TC (2016) Axonal degeneration, distal collateral branching and neuromuscular junction architecture alterations occur prior to symptom onset in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of chemical neuroanatomy* 76:35-47.
- Curtis AF, Masellis M, Hsiung GR, Moineddin R, Zhang K, Au B, Millett G, Mackenzie I, Rogaeva E, Tierney MC (2017) Sex differences in the prevalence of genetic mutations in FTD and ALS: A meta-analysis. *Neurology* 89:1633-1642.
- Dantes M, McComas A (1991) The extent and time course of motoneuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 14:416-421.
- Dengler R, Konstanzer A, Kuther G, Hesse S, Wolf W, Struppeler A (1990) Amyotrophic lateral sclerosis: macro-EMG and twitch forces of single motor units. *Muscle Nerve* 13:545-550.
- 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.
- Hayworth CR, Gonzalez-Lima F (2009) Pre-symptomatic detection of chronic motor deficits and genotype prediction in congenic B6.SOD1(G93A) ALS mouse model. *Neuroscience* 164:975-985.
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T (2009) Progressive motor unit loss in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis is unaffected by gender. *Muscle Nerve* 39:318-327.
- Heiman-Patterson TD, Deitch JS, Blankenhorn EP, Erwin KL, Perreault MJ, Alexander BK, Byers N, Toman I, Alexander GM (2005) Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS. *J Neurol Sci* 236:1-7.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC (2011) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377:942-955.
- Kim HJ, Magrane J, Starkov AA, Manfredi G (2012) The mitochondrial calcium regulator cyclophilin D is an essential component of oestrogen-mediated neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 135:2865-2874.
- Le Masson G, Przedborski S, Abbott LF (2014) A computational model of motor neuron degeneration. *Neuron* 83:975-988.
- Liu Y, Pattamatta A, Zu T, Reid T, Bardhi O, Borchelt DR, Yachnis AT, Ranum LP (2016) C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron* 90:521-534.
- Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, Cleveland DW (2009) Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4465-4470.
- Lobsiger CS, Boillee S, Pozniak C, Khan AM, McAlonis-Downes M, Lewcock JW, Cleveland DW (2013) C1q induction and global complement pathway activation do not contribute to ALS toxicity in mutant SOD1 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E4385-4392.

- Martineau E, Di Polo A, Vande Velde C, Robitaille R (2018) Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS. *eLife* 7.
- McComas AJ, Sica RE, Campbell MJ, Upton AR (1971) Functional compensation in partially denervated muscles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 34:453-460.
- McCombe PA, Henderson RD (2010) Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend Med* 7:557-570.
- Mesci P, Zaidi S, Lobsiger CS, Millecamps S, Escartin C, Seilhean D, Sato H, Mallat M, Boillee S (2015) System xC⁻ is a mediator of microglial function and its deletion slows symptoms in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Brain* 138:53-68.
- Pacelli C, Giguere N, Bourque MJ, Levesque M, Slack RS, Trudeau LE (2015) Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Curr Biol* 25:2349-2360.
- Pfohl SR, Halicek MT, Mitchell CS (2015) Characterization of the Contribution of Genetic Background and Gender to Disease Progression in the SOD1 G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. *J Neuromuscul Dis* 2:137-150.
- 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.
- Riar AK, Burstein SR, Palomo GM, Arreguin A, Manfredi G, Germain D (2017) Sex specific activation of the ERalpha axis of the mitochondrial UPR (UPRmt) in the G93A-SOD1 mouse model of familial ALS. *Hum Mol Genet* 26:1318-1327.
- Schmied A, Pouget J, Vedel JP (1999) Electromechanical coupling and synchronous firing of single wrist extensor motor units in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 110:960-974.
- Tallon C, Russell KA, Sakhalkar S, Andrapallayal N, Farah MH (2016) Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice. *Neuroscience* 312:179-189.
- Tremblay E, Martineau E, Robitaille R (2017) Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model: When Motor Units Matter. *J Neurosci* 37:8901-8918.
- Zwiegers P, Lee G, Shaw CA (2014) Reduction in hSOD1 copy number significantly impacts ALS phenotype presentation in G37R (line 29) mice: implications for the assessment of putative therapeutic agents. *Journal of negative results in biomedicine* 13:14.

CHAPITRE IV

Les propriétés des cellules gliales à la JNM sont incompatibles avec la réinnervation dans un modèle murin de la SLA

4.1 Rationnelle

Dans les chapitres précédents, nous avons observé que les terminaisons axonales des JNMs semblaient instables. Notamment, nous avons observé que certaines branches axonales étaient démantelées sans que l'arborisation axonale complète ne dégénère dans un muscle constitué majoritairement d'unités motrices de type FF. Ce phénomène semble suggérer que des mécanismes moléculaires locaux régulent la perte initiale de JNMs chez des souris SOD1^{G37R}. D'autre part, nous avons vu que les axones moteurs réinnervaient très rarement les JNMs desquelles ils s'étaient rétractés et qu'ils ne formaient que rarement des bourgeons terminaux. Ces éléments sont en accord avec la possibilité que les mécanismes de réinnervation soient altérés chez les souris SOD1^{G37R}. Or, les CSPs ont la capacité de stabiliser les JNMs et de réguler la réinnervation. Une étude antérieure du laboratoire a identifié que l'activation des récepteurs mAChR des CSPs associées aux unités motrices de type FR et S était augmentée chez des souris SOD1^{G37R} (Arbour et al., 2015). Cette suractivation muscarinique pourrait empêcher les CSPs d'adapter leur phénotype et de promouvoir la réinnervation des JNMs, entre autres via le bourgeonnement terminal. Ainsi, nous émettons l'hypothèse qu'un des éléments locaux contribuant à l'instabilité des terminaisons axonales et aux déficits de réinnervation serait une altération de la fonction des CSPs.

Afin d'évaluer cette possibilité, nous avons entrepris d'évaluer les propriétés des CSPs aux JNMs les plus vulnérables chez des souris SOD1^{G37R}. Notamment, nous avons évalué si l'activation des récepteurs mAChR des CSPs était également augmentée au niveau des JNMs de type FF. De plus, nous avons directement évalué si les CSPs sont en mesure d'adopter un phénotype proregénérateur suite à la dénervation des JNMs. Dans l'ensemble, cette étude nous a permis d'évaluer si l'altération de la capacité des CSPs à détecter l'activité synaptique se traduit en une altération de leurs fonctions qui pourrait contribuer aux changements morphologiques que nous avons observés *in vivo*.

4.2 Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale affectant les motoneurons en fonction du type d'unité motrice auquel ils appartiennent. D'autre part, une dysfonction des cellules gliales contribue à de nombreux aspects de la maladie. À la jonction neuromusculaire (JNM), une altération précoce des cellules de Schwann pérисynaptique (CSPs), les cellules gliales associées à cette synapse, pourrait affecter leur capacité à réguler la stabilité et la réparation de la JNM durant la maladie. En effet, les récepteurs muscariniques (mAChR) des CSPs régulent leur phénotype proregénérateur et sont suractivés aux JNMs résistantes à la maladie (*Soleus*) chez les souris SOD1^{G37R}. Cependant, il demeure incertain si cette suractivation est également présente au niveau des JNMs vulnérables à la maladie, et si elle se traduit par une altération des mécanismes de réinnervation dépendant des CSPs. Nous avons utilisé les *Soleus* et les *Sternomastoidien* de souris SOD1^{G37R} afin d'examiner l'activité calcique des CSPs et d'évaluer leur capacité à promouvoir la réinnervation et la phagocytose de débris axonaux par marquage immunohistochimique. Dans cette étude, nous montrons que l'activité des CSPs dépendante des mAChR est augmentée au niveau des JNMs vulnérables (*Sternomastoidien*). De plus, les CSPs des deux muscles formaient des prolongements désorganisés à partir des JNMs dénervées et n'arrivaient pas à initier ou à guider les bourgeons terminaux adéquatement. Ces déficits étaient accompagnés d'une incapacité des CSPs à augmenter leur expression de la Galectine-3 (MAC-2), un marqueur de phagocytose gliale. Ces propriétés sont incompatibles avec la fonction des CSPs dans la phagocytose de débris axonaux. Finalement, cette altération du phénotype prorégénérateur des CSPs dépendait du type d'unité motrice, reflétant la vulnérabilité sélective des types de motoneurons dans la SLA. Dans l'ensemble, ces résultats révèlent que la communication neurone-glie est altérée de manière ubiquitaire à la JNM dans la SLA. Cette altération semble empêcher les CSPs d'adopter un phénotype proregénérateur, engendrant ainsi une réponse maladaptée suite à la dénervation des JNMs.

Contribution des auteurs

Éric Martineau a participé à la conceptualisation des expériences, à la mise au point méthodologique, à la cueillette et l'analyse des données, à leur représentation visuelle et à l'écriture manuscrite. Danielle Arbour a participé à la cueillette et l'analyse de données (non

incluses dans la version actuelle du manuscrit) et, à la révision du manuscrit. Joanne Vallée a participé à la mise au point méthodologique et à la cueillette données préliminaires. Richard Robitaille a participé à la conceptualisation des expériences, au financement, à la supervision du projet et à l'écriture du manuscrit.

4.3 Texte intégral du troisième article

Properties of Glial Cells at the Neuromuscular Junction are Incompatible with Reinnervation in the SOD1^{G37R} ALS mouse model

Martineau Éric^{1,2}, Danielle Arbour^{1,2}, Joanne Vallée^{1,2}, Robitaille Richard^{1,2*}.

Affiliations:

¹ Département de neurosciences, Université de Montréal.

² Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal.

4.3.1 Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease affecting motoneurons in a motor-unit (MU) dependent manner. Glial dysfunction contributes to numerous aspects of the disease. At the neuromuscular junction (NMJ), early alterations in perisynaptic Schwann cell (PSC), glial cells at this synapse, may impact their ability to regulate NMJ stability and repair during the disease. Indeed, PSC muscarinic receptors (mAChR) that regulate the repair phenotype of PSCs are overactivated at disease-resistant NMJs (*Soleus* muscle) of SOD1^{G37R} mice. However, it remains unknown whether this is the case at disease-vulnerable NMJs and whether it translates into an impairment of PSC-dependent repair mechanisms. We used *Soleus* and *Sternomastoid* muscles from SOD1^{G37R} mice and performed Ca²⁺-imaging to monitor PSC activity and used immunohistochemistry to analyze their repair and phagocytic properties. We show that PSC mAChR-dependent activity was increased at disease-vulnerable NMJs (*Sternomastoid* muscle). Furthermore, PSCs from both muscles extended disorganized processes from denervated NMJs and failed to initiate or guide nerve terminal sprouts, a phenomenon essential for compensatory reinnervation. This was accompanied by a failure of PSCs to upregulate Galectin-3 (MAC-2) in SOD1 mice, a marker of glial phagocytosis. This is incompatible with PSCs' normal role in phagocytosing axonal debris. Finally, differences in PSC repair properties were MU-type dependent, thus reflecting MU vulnerability in ALS. Together, these results reveal that neuron-glia communication is ubiquitously altered at the NMJ in ALS. This appears to prevent PSCs from adopting a repair phenotype, resulting in a maladapted response to denervation at the NMJ.

4.3.2 Significance Statement

Understanding how the complex interplay between neurons and glial cells ultimately lead to the degeneration of motor neurons and loss of motor function is a fundamental question to understand amyotrophic lateral sclerosis. An early and persistent alteration of glial cell activity takes place at the neuromuscular junction (NMJ), the output of motor neurons, but its impact on NMJ repair remains unknown. Here, we reveal that glial cells at the NMJ fail to guide compensatory nerve terminal sprouts and inconsistently adopt a phagocytic phenotype on denervated NMJs. These results show that glial cells at the NMJ elaborate an inappropriate response to NMJ degeneration in a manner which reflects motor-unit vulnerability and potentially impairs compensatory reinnervation.

4.3.3 Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of motoneurons (MNs), with fast-fatigable (FF) motor-units (MUs) being more vulnerable than fast-fatigue-resistant (FR) and slow (S) MUs (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006; Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008). Over the last decade, evidence of disease onset and progression being modulated by numerous non-cell autonomous mechanisms has highlighted the importance of glial cells in this disease (Boillee et al., 2006a; Ilieva et al., 2009; Kang et al., 2013; Ditsworth et al., 2017). Evidence from ALS patients and *SOD1* mouse models also shows early loss of neuromuscular junctions (NMJ) prior to disease onset (Fischer et al., 2004; Pun et al., 2006; Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008), supporting the notion that ALS has a long silent pre-symptomatic phase (Eisen et al., 2014). Interestingly, an early and persistent functional alteration of perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the NMJ, has recently been reported in the *SOD1*^{G37R} mouse model (Arbour et al., 2015).

Early PSC dysfunction in ALS could be of particular importance owing to their ability to detect and modulate synaptic communication, regulate NMJ stability and oversee NMJ repair. Importantly, these three functions are interdependent as PSC synaptic decoding regulates their ability to stabilize or repair the NMJ, notably through muscarinic receptors (mAChRs). Indeed, activation of PSC mAChRs and purinergic receptors triggers a transient increase in cytoplasmic Ca²⁺ (Ca²⁺ response), through which they can modulate neurotransmitter release (Robitaille, 1998; Rochon et al., 2001; Rousse et al., 2010; Todd et al., 2010). Interestingly, blockade of PSC mAChRs destabilizes NMJs (Wright et al., 2009), demonstrating that proper PSC synaptic decoding is necessary for NMJ maintenance.

Importantly, PSCs lead NMJ re-innervation following denervation of NMJs by adopting a “pro-regenerative” (repair) phenotype. For instance, PSCs extend long processes known to guide re-innervation through nerve terminal sprouting (Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995b, a; Son et al., 1996; O'Malley et al., 1999). Similarly to axonal Schwann cells (SCs) (Reichert et al., 1994; Painter et al., 2014; Brosius Lutz et al., 2017), PSCs also actively phagocytose presynaptic debris following denervation (Duregotti et al., 2015) which is essential for efficient axonal regrowth and NMJ re-innervation (Kang and Lichtman, 2013). Finally, recent evidence has highlighted that good PSC endplate coverage is essential for re-innervation

since parts of the endplate vacated by PSCs are forsaken during re-innervation (Kang et al., 2014). Interestingly, mAChRs modulate NMJ repair mechanisms as their activation regulates PSC gene expression and represses PSC's repair phenotype (Georgiou et al., 1994; Georgiou et al., 1999).

Arbour et al. (2015) recently reported an enhanced mAChR contribution to PSC Ca^{2+} responses at NMJs innervated by disease-resistant or moderately vulnerable MUs (S and FR MU respectively, *Soleus* (SOL) muscle) in *SOD1^{G37R}* mice. Hence, we postulated that inappropriate mAChR signaling could prevent PSCs from adopting a repair phenotype, thus hindering NMJ reinnervation in ALS. However, this phenotype has never been directly evaluated in symptomatic animals. Furthermore, recent evidence revealed opposite changes in the synaptic properties of NMJs from different MU types in *SOD1^{G37R}* mice (Tremblay et al., 2017). This raises the possibility that PSC properties, notably mAChR overactivation, may be different at NMJs innervated by vulnerable FF MUs.

In the present study, we assessed if PSCs mAChR overactivation was also present at NMJs innervated by vulnerable FF MUs in the *Sternomastoid* (STM) muscle. Next, we investigated if PSCs adopted a repair phenotype in presymptomatic animals following a nerve crush or in symptomatic animals. Notably, we evaluated the presence of extended processes, nerve terminal sprouts and the expression of phagocytic markers at vulnerable (STM or EDL) or partially resistant (SOL) NMJs. Albeit through a different mechanism, PSCs in the STM also displayed an early increase in mAChR-dependent decoding. Consistent with defects in PSC-dependent NMJ repair mechanisms in all these muscles, PSCs displayed abnormal process extension as well as paradoxical expression of Galectin-3 (MAC-2), a marker of glial phagocytosis. Altogether, these results suggest that changes in PSCs are maladapted in ALS.

4.3.4 Materials and Methods

4.3.4.1 Animals

Male transgenic mice heterozygote for the human *Sod1* gene carrying the *G37R* mutation (*SOD1^{G37R}*, line 29; [B6.Cg-Tg(SOD1*G37R)29Dpr/J]; stock number 008229), or, in some experiments, the *G93A* mutation (*SOD1^{G93A}*; [B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J]; stock number 002726), were obtained from The Jackson laboratories (Bar Harbor, ME). *SOD1^{G37R}* mice were maintained on a C57BL/6 background and were genotyped by PCR for the *hSOD1* gene performed on a tail sample taken at the time of the weaning.

For some experiments, transgenic mice expressing the “yellow fluorescent protein” (YFP) in all motor neurons (Feng et al., 2000) were used (homozygous *Thy1-YFP*, line 16; [B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J]; stock number 003709). These mice were also obtained from The Jackson laboratories (Bar Harbor, ME) and were maintained on a C57BL/6 background.

Pre-symptomatic *SOD1^{G37R}* mice were used at P119-131 (P120) and P179-194 (P180) (Figure 4.1A). Phenotypically matched late symptomatic *SOD1^{G37R}* mice were used between P512 and P548. Age-matched *wild-type* (*WT*) littermates were used as controls. Animals were sacrificed by exposition to a lethal dose of isoflurane (CDMV, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada, J2S 7C2). All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and the Comité de déontologie animale of Université de Montréal.

4.3.4.2 Phenotype evaluation

Starting at P290 or earlier, mice were weighted weekly to assess disease onset and progression as previously described (Lobsiger et al., 2009; Parone et al., 2013). Briefly, disease onset and early disease were defined as peak body weight and 10% loss from peak body weight respectively. Consistent with the recent reduction in transgene copy number in this line (Zwiegers et al., 2014), the median age of onset of the symptomatic animals used in this study was 452.5 days, while the median age of early disease was 502.5 days (Fig.4.1A; N=10). Symptomatic animals were sacrificed for experimentation when 3 criteria were met: (1) they passed the early disease stage (10% weight loss); (2) they displayed hindlimb paralysis as assessed by tail suspension; and (3) they showed a reduced grid hanging time (less than 10

seconds). The average duration of the disease progression (from age of onset to sacrifice) was 52.90 ± 5.85 days.

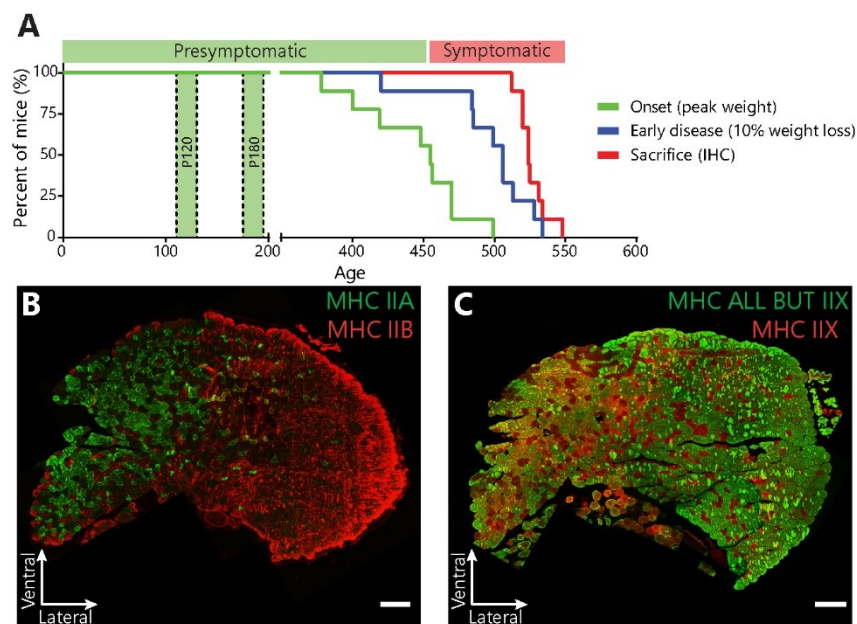


Figure 4.1. Disease progression in *SOD1^{G37R}* mice and fiber type composition of the Sternomastoid muscle. **A.** Kalpan-Meier plot of the ages at which disease onset (green; median age: 455 days) and early disease (blue; median age: 506 days) are reached in *SOD1^{G37R}* mice under our conditions. All the symptomatic animals displayed similar motor phenotypes and were sacrificed (red) after the early disease stage. Experiments on presymptomatic animals were carried at P120 and P180. **B-C.** Immunostaining of Sternomastoid cross-sections for Myosin Heavy Chain (MHC) type Iib (FF) and Iia (FR) (**B**) or all isotypes except Iix (all but Iix) and type Iix (FF) (**C**). Scale bars = 200 μ m.

4.3.4.3 Sciatic nerve crush surgery

Mice were anesthetized using isoflurane (2-3% in 98-97% O₂) in an induction chamber and anesthesia was then maintained under a breathing mask. Lubricant (Optixcare) was applied on the eyes to prevent dryness. Mice were placed in prone position and an incision was made on the left mid-thigh. The *gluteus maximus* and the *biceps femoris muscles* were delicately separated to expose the sciatic nerve. The nerve was then crushed with Moria microserrated curved forceps (MC31; maximal pressure for 15s). Muscles were then gently repositioned and the wound closed using 5-0 or 6-0 vicryl suture (CDMV). Buprenorphine (3 μ g/10g of body weight; Temgesic) was subcutaneously administered three times during the following 24 hours. Mice were also injected subcutaneously with 0.25 mL of 0.9% saline twice to prevent dehydration. For sham-operated animals, the same procedure was followed, with the exception that the sciatic nerve was only exposed and not crushed.

4.3.4.5 Sternomastoid calcium imaging

Both *STM* muscles and their nerves were dissected from the same animal in oxygenated Ringer REES solution containing (in mM): 110 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 Glucose, 0.3 Glutamic Acid, 0.4 Glutamine, 5 BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)taurine), 0.036 Choline Chloride, 4.34 x 10⁻⁴ cocarboxylase (all Sigma-Aldrich). Muscles were pinned in a Sylgard-coated (Dow Corning) recording chamber and the nerves were placed in two suction electrodes and were independently stimulated using a Pulsemaster A300 stimulator (square pulses: 20mV to 2V, 0.1ms duration; WPI). PSCs were loaded with the fluorescent Ca²⁺ indicator Rhod-3 (Life Technologies) by incubating muscles twice for 45 min in preoxygenated Ringer containing 5 μM Rhod-3 AM (Life Technologies), 0.02 % Pluronic acid (Life Technologies) and 0.15% dimethyl sulfoxide (DMSO) at 29 ± 2°C (Todd et al., 2010; Arbour et al., 2015). PSCs were easily identified using transmitted light microscopy and NMJs were further located by labelling nAChRs prior to the start of the experiment with a closed-bath application of Alexa 488-conjugated α-BTX (5 μg for 10 min; Life Technologies). Changes in fluorescence were monitored using a Zeiss LSM510 confocal microscope equipped with a 40x water-immersion lens (NA: 0.8; Zeiss). Rhod-3 was excited using a 543nm HeNe laser and emission was filtered using a 560nm long-pass filter. Changes in fluorescence were measured on the PSCs soma using the ImageJ software and were expressed as % $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$. Experiments were discarded when baseline fluorescence was unstable or a focus change occurred.

Ca²⁺ responses to endogenous neurotransmitter release were evoked by high-frequency stimulation of the nerve (50Hz, 20s). This pattern is known to elicit robust neurotransmitter release in this preparation (Wyatt and Balice-Gordon, 2008) and to efficiently trigger PSC Ca²⁺ responses in another fast-twitch muscle (Rousse et al., 2010). Alternatively, PSC mAChRs or purinergic receptors were activated by local application of agonists diluted in the extracellular Ringer REES solution, respectively muscarine (10 μM; Sigma) or ATP (1 μM; Sigma). Local drug application was achieved by applying a brief pulse of positive pressure (20 PSI, 150ms) using a Picospritzer II (Parker Instruments) through a glass micropipette (~2 μm tip, 5MΩ) positioned next to the NMJ. Because of the rundown of PSC Ca²⁺ responses following repeated activation (Jahromi et al., 1992; Rochon et al., 2001), each NMJ was only imaged once and local

applications of agonists were performed before the high-frequency nerve stimulation was performed. Only a single high-frequency stimulation was executed on each muscle.

In all experiments, muscles were perfused (80 mL/h) with heated (28 ± 1 °C) Ringer REES containing 2.3 µg/mL of D-tubocurarine (Sigma) to prevent muscle contraction during nerve stimulation. In some experiments, mAChRs were blocked by adding the non-selective antagonist Atropine (10 µM; Sigma) to the extracellular Ringer REES solution. To ensure efficient blocking of mAChRs, muscles were perfused at least 45 min prior to the start of the experiment. PSCs responding to local application of muscarine after Atropine blockade were automatically discarded.

4.3.4.6 Whole-mount muscle preparations and immunohistochemistry

The *Sternomastoid* (STM) muscle is divided in two easily distinguishable parts on its ventral side: a lateral part composed exclusively of fast-fatigable (FF) motor-units (MUs) on the surface (the “white” part), and a medial part composed of a mixture of FF and fast-fatigue-resistant (FR) MUs (the “red” part) as inferred by their fiber type composition (Fig.4.1B et C) (Brichta et al., 1987). To exclusively evaluate vulnerable FF MUs in all experiments, we restricted our analysis to the “white” part of the STM which is easily observable using transmitted light. All surface NMJs analyzed in the *Extensor digitorum longus* (EDL) were associated with vulnerable FF MUs as previously shown (Tremblay et al., 2017). All NMJs analyzed in the *Soleus* (SOL) were associated with either fast-fatigue-resistant (FR) or slow (S) motor-units (MUs) as previously described (Pun et al., 2006; Arbour et al., 2015; Tremblay et al., 2017).

Immunohistochemical labeling was performed as described elsewhere (Todd et al., 2010; Darabid et al., 2013b; Arbour et al., 2015). STM and SOL muscles were dissected in oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Ringer REES and were pinned in a Sylgard-coated (Dow Corning) 10 mm petri dish and fixed for 10 min in 4% formaldehyde diluted in PBS (in mM: 137 NaCl, 10 Na₂HPO₄, 2.7 KCl, 2 KH₂PO₄; all Sigma-Aldrich) at room temperature (RT). Then, muscles were permeabilized in 100% ice-cold methanol for 6 min at -20°C and non-specific labeling was reduced using 10 % normal donkey serum (NDS) diluted in PBS containing 0.01% Triton X-100 (20 min incubation). Muscles were incubated overnight at 4°C

with a rat IgG2a anti-MAC-2 (Galectin-3) antibody (1:250; clone M3/38; Cedarlane, cat# CL8942AP), then 2h at RT with a rabbit IgG anti-S100 β antibody (1:250; Dako-Agilent, cat# Z031101-2 or between 1:4 and 1:5, Dako-Agilent, cat#GA-504) followed by 2h at RT with the chicken IgY anti- Neurofilament medium chain (NF-M; 1:2000; Rockland Immunochemicals; cat# 212-901-D84) and the mouse IgG1 anti-synaptic vesicular protein 2 (SV2; 1:2000; Developmental Studies Hybridoma bank; concentrate) antibodies. Secondary antibodies donkey anti-rabbit IgG Alexa-594, donkey anti-rat IgG Alexa-647, goat anti-mouse IgG1 Alexa-488 and donkey anti-chicken Alexa-488 were incubated together for 1h at RT (all 1:500; Jackson ImmunoResearch). All antibody dilutions were made in PBS buffer containing 0.01% Triton X-100 and 2% NDS. Finally, postsynaptic nicotinic receptors (nAChRs) were labeled using α -Bungarotoxin (BTX) conjugated with CF405 (4 μ g/mL; Biotium; cat #00002) for 45 min in PBS. In some cases (nerve crush experiment at P90, Fig.4.5A), the anti-SV2 antibody was replaced with goat anti-synaptotagmin (SyT; 1:250). In these cases goat anti-mouse IgG1 Alexa-405, donkey anti-chicken Alexa-405 (both 1:250; Jackson ImmunoResearch), donkey anti-rabbit IgG Alexa 488 (1:500; Jackson ImmunoResearch) and α -BTX conjugated to Alexa-594 (1.33 μ g/mL; Life Technologies; cat# B13423) were used instead. After each incubation (except NDS blocking), muscles were rinsed three times for 5 min in PBS containing 0.01% Triton X-100. Muscles were mounted in ProlongGold anti-fade reagent (Life Technologies). Images were acquired on an Olympus FV1000 confocal microscope equipped with a 60x oil-immersion objective (N.A: 1.4; Olympus). For figure representation, gamma was adjusted to enhance visibility of certain NMJ structures using Adobe Photoshop. No quantitative measurements were performed on the adjusted images.

4.3.4.7 Gal-3 labelling on non-permeabilized whole-mount muscle tissue

To label extracellular *Gal-3*, muscles from Thy1-YFP animals were fixed in 4% formaldehyde and non-specific labeling was blocked using 10% NDS. Muscles were then incubated overnight at 4°C with the rat IgG2a anti-MAC-2 (Galectin-3) antibody (1:100), which was then revealed using a donkey anti-rat IgG Alexa-647 antibody (1:500; 60 min). Postsynaptic nAChRs were labeled with BTX conjugated to Alexa-594 (5 μ g/mL; 45 min). Muscles were rinsed three times for 5 min each between incubations and all dilutions and rinses were made in PBS buffer without Triton X-100. Muscles were then mounted in Prolong Diamond anti-fade

reagent containing DAPI (Life technologies). Using this approach, no labeling of the presynaptic markers SV2 and NF-M could be observed, confirming that cells were not inadvertently permeabilized during the procedure (*data not shown*).

4.3.4.8 Analysis of NMJ morphology

NMJ morphology was performed using the seven criteria previously described and illustrated by Tremblay et al. (2017). Briefly, NMJ innervation and postsynaptic receptor organization (faint clustered or ectopic nAChRs) were analyzed and the presence of nerve terminal sprouting, polyinnervation and PSC process extensions was quantified. Although PSCs downregulate the S100 β marker following denervation (Magill et al 2007), PSC somata on fully denervated endplates were still discernable, allowing quantification of Galectin-3 expressing PSCs. NMJs without any detectable S100 β staining (presumably denervated for a long time) were not included in this study. Notwithstanding the limitations of S100 β for the quantification of PSC process extensions in these conditions (Son and Thompson, 1995a), a large number of processes were labeled allowing quantification based on their presence on an NMJ rather than their number. Furthermore, we never observed a Galectin-3-positive S100 β -negative process or a presynaptic sprout in absence of S100 β staining, showing that S100 β is reliable for this analysis in these conditions.

4.3.4.9 Muscle cross-section immunohistochemistry

Immunostaining was performed similarly as previously described (Tremblay et al., 2017). Briefly, the *STM* muscle was dissected and frozen in cold optimal cutting medium compound (OCT; TissueTek) using isopentane at -80°C. Transverse cryosections (10 μ m) were made and incubated in blocking solution (10% NDS in PBS). Sections were incubated with either mouse IgG1 anti-MHC type IIa (SC-71, 1:200), mouse IgG2b anti-MHC type I (BA-D5, 1:100) and mouse IgM anti-MHC type IIb (BF-F3, 1:200) or mouse IgM anti-MHC type IIx (6H1; 1:10) and mouse IgG1 anti-MHC all but IIx (BF-35, 1:200) for 1h at room temperature (all from Developmental Studies Hybridoma bank; concentrates), revealed with appropriate secondary antibodies (1:500, Jackson ImmunoResearch) and mounted in Prolong Gold antifade reagent (Life Technologies).

4.3.4.10 Experimental design and statistical analyses

For Ca²⁺ imaging experiments, the number of animals used (N; biological replicates) and the number of PSCs analyzed (n; statistical replicates) are indicated in the text. Unpaired *t*-tests were performed to compare two different conditions from different experiments. *Two-way ANOVAs* tests were used to evaluate the effect of two independent variables on Ca²⁺-responses, using *Tukey's multiple comparisons (Tukey's test)* as a *post test*. To analyze the heterogeneity of Ca²⁺ responses belonging to the same NMJs, the amplitude of the response of each cell was expressed as a percentage of the average response of all imaged cells on that NMJ. Then, the standard deviation of the resulting distribution for each group were compared using the *F test for unequal variance*, using *Holm-Sidak's* method to correct for multiple comparisons. Statistical tests were performed in GraphPad Prism 7 software. Unless otherwise stated, all results are presented as mean ± SEM. All tests used a confidence interval of 95% ($\alpha = 0.05$).

For the morphological analysis, all visible surface NMJs from both STM and both SOL muscles were included. Number of animals used (N; representing both the biological and statistical replicates) and the number of NMJs or PSCs analyzed (n; number of observations) in each condition are indicated in the text. Due to the nature of the analysis (count data), the data does not meet the assumptions of following a Gaussian Distribution or having a variance equal between groups and symmetric (Crawley, 2007). Hence, *Generalized linear models (GLM)* were created, using a binomial error structure and a logit link function (logistic distribution), to analyze the results as previously described (Tremblay et al., 2017). For all criteria, the effect of the genotype (WT vs SOD1^{G37R}) and the muscle (STM vs SOL) were evaluated. Furthermore, the effect of the innervation status of NMJs (fully innervated vs completely denervated) on PSCs's repair response, i.e process extensions and Gal-3 expression, was also evaluated. The muscle and the innervation status were defined as within-subject factors. The effects of all *2-way* and *3-way* interactions were also evaluated. Finally, biologically relevant pairwise comparisons are illustrated in Figure 4.7A and were made using the estimated marginal means (EM means), using *Holm-Sidak's* method to correct for multiple comparisons (hereafter referenced by *GLM post test*). All analyses were made using the SPSS software (v.24.0.0.0; IBM). All tests used a confidence interval of 95% ($\alpha = 0.05$).

4.3.5 Results

The state of PSCs (maintenance or repair) relies on their ability to decode synaptic activity, notably through mAChR activation (Georgiou et al., 1994; Son et al., 1996; Georgiou et al., 1999; Wright et al., 2009). We have previously shown an increased activation of PSC mAChR during synaptic communication at S and FF NMJs in presymptomatic *SOD1^{G37R}* mice (P120 and P380) (Arbour et al., 2015), which we postulated would impinge on their capacity to compensate for NMJ denervation in ALS. However, NMJs innervated by different MU-types display opposite changes in their synaptic properties in *SOD1^{G37R}* mice, i.e. neurotransmitter release is increased at S NMJs and decreased at FF NMJs (Tremblay et al., 2017). Knowing that alterations of synaptic activity can induce plastic changes in PSC activity (Belair et al., 2010), one could argue that PSC excitability may be different at FF NMJs. In the present study, we first tested whether PSCs at vulnerable FF NMJs also displayed an enhance mAChR activation during synaptic communication (mAChR contribution) in *SOD1^{G37R}* mice. Next, we evaluated if PSCs adopted a repair phenotype, either in presymptomatic *SOD1^{G37R}* animals, after experimentally inducing the denervation of NMJs, or in symptomatic *SOD1^{G37R}* mice, when the progressive denervation of NMJs is ongoing. The STM, (FF MUs on its ventro-lateral face; Fig. 4.1B and 1C), the EDL (FF MUs on its surface (Tremblay et al., 2017)) and the SOL (FR and S MUs; Arbour et al., 2015)) nerve muscle preparations were used. For most experiments, the SOL and STM were chosen, due to their similar rate of denervation in *SOD1* mice despite their different MU type composition (Valdez et al., 2012), thereby allowing the analysis of the impact of the MU type on PSC repair properties under similar levels of denervation. The EDL was used instead of the STM for nerve-crush experiments, since the denervation of SOL and EDL NMJs can be induced using the same surgical procedure (sciatic nerve crush), thereby reducing inter-animal and inter-procedure variability. Furthermore, the surgery to induce the denervation of STM NMJs is much more invasive, causing a strong inflammatory response in the muscle in our hands and possibly altering PSC properties.

4.3.5.1 PSC Ca^{2+} activity is reduced in the STM of *SOD1^{G37R}* mice

First, we examined the ability of PSCs to detect endogenous neurotransmitter release elicited by a motor nerve stimulation (50 Hz 20 sec) in the STM. PSC activity was monitored

by imaging transient intracellular Ca^{2+} changes, a well-established reporter of their decoding activity (Rochon et al., 2001; Rouse et al., 2010). Experiments were performed at P120, age when the first alterations were observed in the SOL of *SODI^{G37R}* mice (Arbour et al., 2015).

At P120, all PSCs of *WT* (18 PSCs; 9 NMJs; N=6) and *SODI^{G37R}* mice (19 PSCs; 7 NMJs; N=4) responded to nerve stimulation-induced neurotransmitter release in the STM. PSC Ca^{2+} response amplitudes were similar between *WT* and *SODI^{G37R}* mice (333.7 ± 31.1 % $\Delta\text{F}/\text{F}_0$, n=18 vs 279.2 ± 27.4 % $\Delta\text{F}/\text{F}_0$, n=19 respectively; $t_{(35)}=1.320$; $p=0.1954$ *Unpaired t-test*). This is consistent with the different progression of limb and trunk muscles and the observation that PSC Ca^{2+} responses were unchanged in the SOL 2 months earlier (P60) (Arbour et al., 2015).

Hence, we hypothesized that changes in PSC activity may be delayed in the STM compared to the SOL. We next examined PSC properties in the STM at P180. Again, PSCs responsiveness in *SODI^{G37R}* mice to nerve stimulation was similar than in *WT* mice (*SODI^{G37R}*: 31 out of 33 PSCs; 12 NMJs; N=8; *WT*: 20 out 22 PSCs; 11 NMJs; N=8). However, unlike at P120, PSC Ca^{2+} responses at P180 were significantly smaller in *SODI^{G37R}* mice (Fig 2A and 2D; *WT-Ctrl* : 403.2 ± 22.8 % $\Delta\text{F}/\text{F}_0$, n=20 vs *SODI-Ctrl*: 270.6 ± 24.3 % $\Delta\text{F}/\text{F}_0$, n=31; Effect of genotype: $F_{(1,77)}=25.13$; $p<0.0001$, *Two-way ANOVA*; $p=0.0005$, *Tukey's test on Two-way ANOVA*). Hence, PSC properties are also altered in the STM of *SODI^{G37R}* mice at an early presymptomatic stage, but in an opposite manner to what was observed in the SOL (Arbour et al., 2015).

4.3.5.2 Increased relative mAChR-dependent PSC activity in the STM

Next, we tested whether the contribution of mAChR activation to PSC Ca^{2+} activity (mAChR contribution) was also increased in the STM, despite the smaller PSC Ca^{2+} responses.

For this, Ca^{2+} imaging was performed in presence of the general mAChR antagonist atropine (10 μM) at P180. As shown in Figure 4.2B, blockage of PSC mAChRs was confirmed by local application of muscarine (10 μM) before the nerve stimulation. Out of the 32 cells analyzed (14 in *WTs* and 18 in *SODIs*), only 2 PSCs from *WT* mice exhibited a small response to local application of muscarine in presence of atropine and were discarded. In the presence of atropine, all PSCs responded to nerve stimulation-induced neurotransmitter release in both *WT* (12 PSCs; 7 NMJs; N=4) and *SODI^{G37R}* mice (18 PSCs; 8 NMJs; N=4). As expected, the

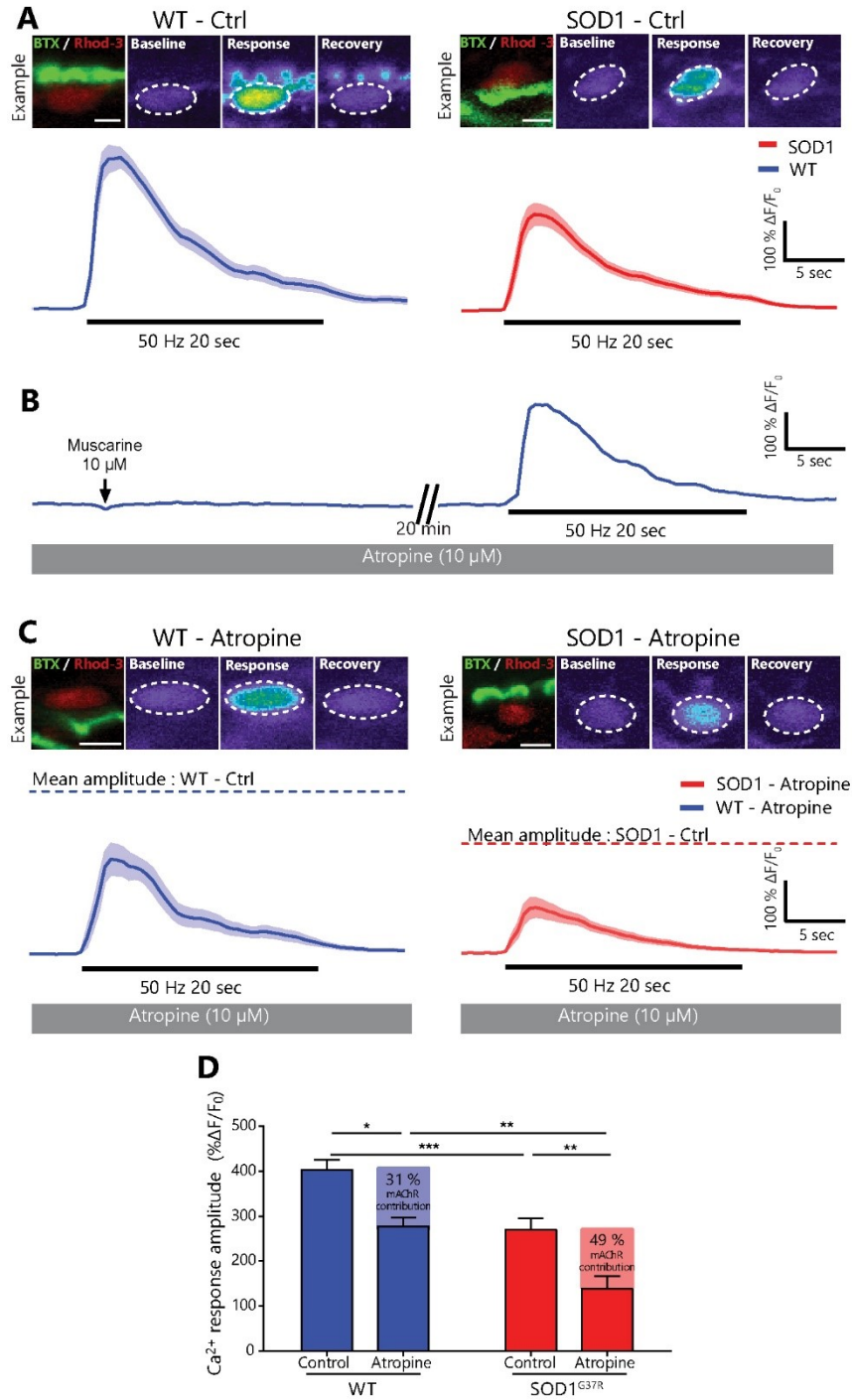


Figure 4.2. Relative increase of mAChR-dependent PSC activity in SOD1^{G37R} mice at a presymptomatic stage.
A. Average PSC Ca²⁺ responses \pm SEM (pale area) in SOD1^{G37R} mice (right) and WT controls (left) induced by high-frequency nerve stimulation at P180 in absence of atropine (Ctrl). Top, localization of the PSC on an endplate (left, apposed over BTX staining) and representative false color images of the changes in Rhod-3 fluorescence representing changes in intracellular Ca²⁺ levels before, during and after motor nerve stimulation.
B. Example of PSC Ca²⁺ responses in WT controls evoked by local application of muscarine (left) or nerve stimulation (right) in presence of 10 μ M atropine. *Legend continues on next page.*

amplitudes of PSC Ca^{2+} responses were significantly decreased in both groups (Effect of atropine: $F_{(1,77)}=22.63$ $p<0.0001$; *Two-way ANOVA*; Interaction: $F_{(1,77)}=0.01446$, $p=0.9046$). More precisely, the amplitude of PSC Ca^{2+} responses in *WTs* was reduced from 403.2 ± 22.8 % $\Delta\text{F}/\text{F}_0$, (n=20) to 277.5 ± 18.4 % $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ in presence of atropine (n=12; $p=0.0194$; *Tukey's test on Two-way ANOVA*). This represents a 31% contribution of mAChRs to PSC Ca^{2+} responses which is similar to our observation in the adult SOL (Arbour et al., 2015). Likewise, PSC Ca^{2+} responses in *SODI^{G37R}* mice had a significantly smaller amplitude in presence of atropine (Fig. 4.2D; *SODI*-Ctrl: 270.6 ± 24.3 % $\Delta\text{F}/\text{F}_0$, n=31 vs *SODI*-Atropine: 138.5 ± 27.6 % $\Delta\text{F}/\text{F}_0$, n=18; $p=0.0013$; *Tukey's test on Two-way ANOVA*). However, this represents a 49% mAChR contribution in *SODI^{G37R}* mice, which is a 1.6-fold increase compared to *WT* animals. Hence, the contribution of mAChR activation to PSC Ca^{2+} -activity is also increased in the STM of *SODI^{G37R}* mice.

Furthermore, PSC Ca^{2+} responses in *SODI^{G37R}* mice remained significantly smaller than in *WT* mice in presence of atropine ($p=0.0094$; *Tukey's test on Two-way ANOVA*). As such, the reduction of the amplitude of PSC Ca^{2+} responses in the STM of *SODI^{G37R}* seem to be attributable to the reduced activation of non-muscarinic PSC receptors. The other major type of receptors by which PSCs detect synaptic activity at the mammalian NMJ are purinergic receptors (Rochon et al., 2001). However, their specific contribution to nerve-evoked PSC Ca^{2+} -response was not evaluated as the underlying set of receptors remain undetermined at the adult mammalian NMJs (Rochon et al., 2001; Arbour et al., 2015).

As a whole, these results suggest that a relative increase in the contribution of mAChR to PSC activity is a common pathological feature between both fast-twitch and slow-twitch muscles in *SODI^{G37R}* mice.

Note the blockade of muscarine-induced Ca^{2+} response and the reduced amplitude of nerve stimulation-evoked Ca^{2+} responses (left, compared with A). C. Average PSC Ca^{2+} responses \pm SEM (pale area) in *SODI^{G37R}* mice (right) and *WT* controls (left) induced by high-frequency nerve stimulation at P180 in presence of 10 μM atropine. Note the reduced amplitude of nerve stimulation-evoked Ca^{2+} responses compared with the average peak amplitude without atropine (dashed lines) Top, localization of the PSC on an endplate (left) and representative false color images of the changes in Rhod-3 fluorescence representing changes in Ca^{2+} levels before, during and after motor nerve stimulation. D. Histogram of the amplitude of PSC Ca^{2+} responses in all conditions P180. Scale bar = 5 μm . *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$.

4.3.5.3 Nerve-induced PSC activity is heterogeneous at individual NMJs in *SOD1^{G37R}* mice

Interestingly, PSCs belonging to the same NMJ in the STM of *SOD1^{G37R}* mice displayed abnormally heterogeneous responses to nerve stimulation compared to *WT* mice (Fig. 4.3A). When only considering NMJs where multiple PSCs were imaged, PSC Ca^{2+} responses were all within $\pm 20\%$ of the average response on their NMJ in *WT* animals (Fig. 4.3B; SD = 11.17%; N=8; n=20). However, in *SOD1^{G37R}* mice, PSC Ca^{2+} responses ranged from -99% up to +85% of the average response on their NMJ (Fig. 4.3B; SD = 43.65%; N=8; n=31), which is significantly more than in *WT* mice ($F_{(30,19)}=15.27$; $p=0.0004$; *F-test*). This suggests that the excitability of PSCs is unevenly altered at presymptomatic stage.

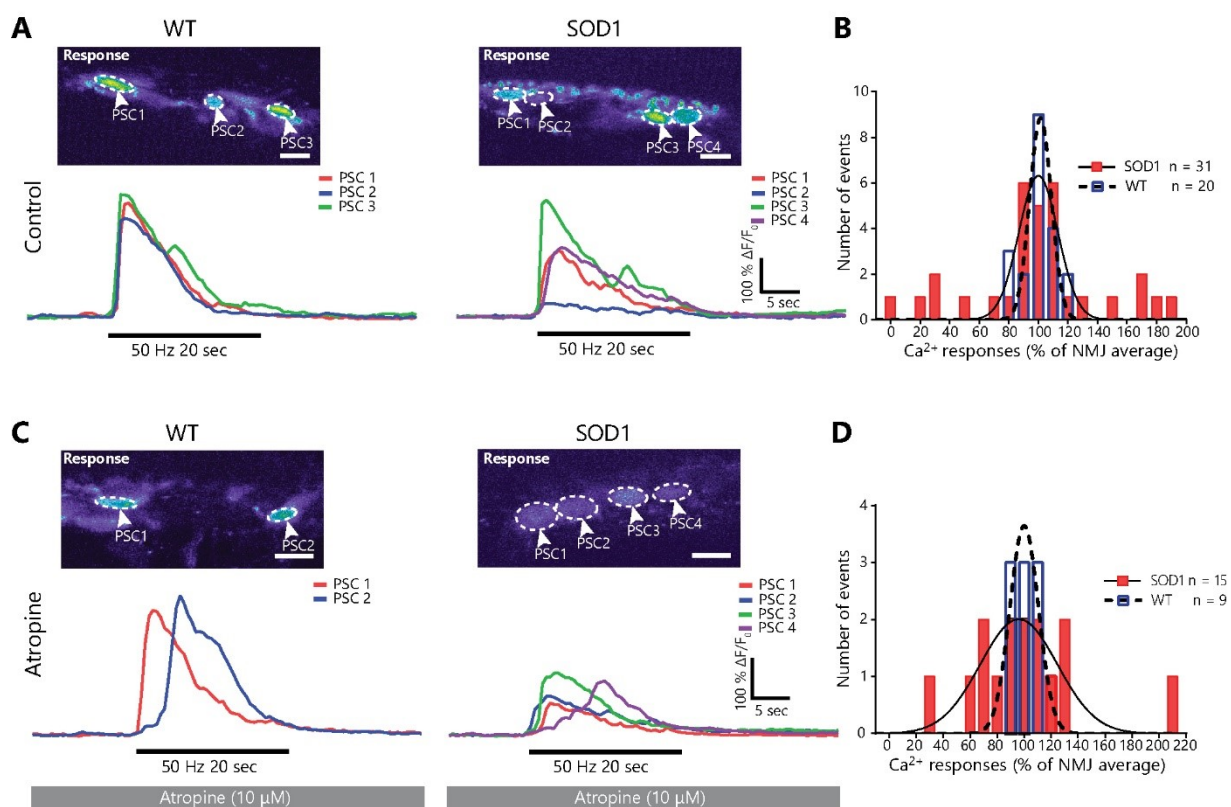


Figure 4.3. Muscarinic receptor-independent heterogeneity in PSC activity at individual NMJs in presymptomatic *SOD1^{G37R}* animals. **A.** Examples of PSC Ca^{2+} responses from a single NMJ in *SOD1^{G37R}* mice (right) and *WT* controls (left) in absence of atropine. Note the greater heterogeneity in Ca^{2+} responses in *SOD1^{G37R}* mice. **B.** Frequency distribution of PSC Ca^{2+} in *WT* (blue, dashed line) and *SOD1^{G37R}* (red, solid line) mice normalized to the average response of all PSCs on their NMJ. **C.** Example of individual PSC Ca^{2+} responses from an NMJ in *SOD1^{G37R}* mice (right) and *WT* controls (left) in presence of Atropine. **D.** Frequency distribution of PSC Ca^{2+} in *WT* (blue, dashed line) and *SOD1^{G37R}* (red, solid line) mice normalized to the average response of all PSCs on their NMJ in presence of atropine. Lines in **B** and **C** represent best-fit Gaussian curves for each sample (*WT*: dashed line; *SOD1^{G37R}*: solid line). Scale bar = 10 μm .

These results could imply that the increased mAChR-dependent PSC activity is also uneven in the STM of *SOD1^{G37R}* mice and therefore may not be a common feature to all PSCs. If this was the case, blockade of PSC mAChRs would restore homogeneity in Ca²⁺ responses over a single NMJ. However, heterogeneity in PSC Ca²⁺ responses was maintained following blockade of mAChRs in *SOD1^{G37R}* mice (Fig. 4.3C). In presence of atropine, PSC Ca²⁺ responses in *WT* animals varied between -20 % to +30 % of each other on a given NMJ (Fig. 4.3D; N=4; n=9; SD=15.12 %;) while PSC Ca²⁺ responses in *SOD1^{G37R}* mice varied between -71 % and +113 % (Fig. 4.3D; N=3; n=15; SD=47.51 %), thus maintaining the difference observed in control condition ($F_{(14,8)}=9.877$; $p=0.0087$; *F-test*). Indeed, presence of atropine did not significantly affect the variability of Ca²⁺-responses on single NMJs in *WT* (*WT-Ctrl* vs *WT-Atropine*: $F_{(8,19)}=1.832$; $p=0.4610$; *F-test*) or in *SOD1^{G37R}* mice (*SOD1-Ctrl* vs *SOD1-Atropine*: $F_{(14,30)}=1.185$; $p=0.6702$; *F-test*). These results reveal that heterogeneity in PSC Ca²⁺ responses in *SOD1^{G37R}* mice is independent of mAChR activation. Hence, increased relative mAChR contribution to PSC synaptic decoding appears to be present in all PSCs in the STM.

4.3.5.4 PSC detection of purinergic signals is reduced in the STM of *SOD1^{G37R}* mice

PSC Ca²⁺ activity heavily depends on their intrinsic properties (Belair et al., 2010; Rousse et al., 2010; Darabid et al., 2013b; Arbour et al., 2015), such as the presence and sensitivity of their muscarinic and purinergic receptors. To further investigate PSC properties in the STM of *SOD1^{G37R}* mice we first tested PSCs sensitivity to cholinergic signals by monitoring PSC Ca²⁺ responses elicited by local application of the mAChR agonist muscarine (10 μM). As shown in Figure 4.4A, PSCs in both groups exhibited similar responsiveness to muscarine (*WT*: 28 out 32; 17 NMJs; N=10 vs *SOD1*: 32 out of 33; 16 NMJs; N=8), where the amplitude of PSC Ca²⁺ responses to muscarine was unchanged in *SOD1^{G37R}* compared to *WT* mice (Fig. 4.4B; 191.6 ± 23.1 % $\Delta F/F_0$, n=28 vs 228.0 ± 23.0 % $\Delta F/F_0$, n=32, respectively; $t_{(58)}=1.127$; $p=0.2644$; *Unpaired t-test*). Thus, these results are consistent with the suggested reduced activation of another type of PSC receptors during synaptic communication in the STM of *SOD1^{G37R}* mice.

Next, PSCs' sensitivity to purinergic agonists was examined by monitoring PSC Ca²⁺ responses after local application of the general purinergic agonist ATP (1 μM). Local application of ATP robustly triggered a Ca²⁺ response in 100% of PSC in both groups (*WT*: 32 out of 32;

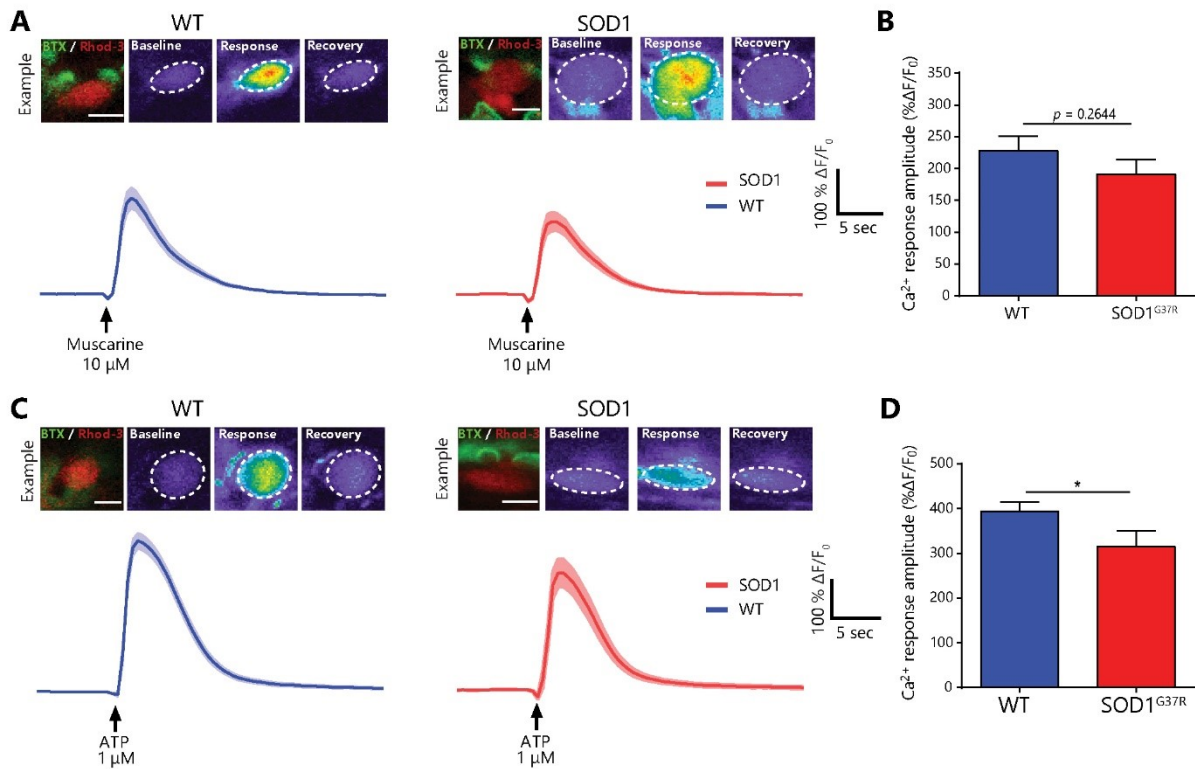


Figure 4.4. PSC Ca²⁺ responses elicited by local application of muscarine or ATP. **A.** Average PSC Ca²⁺ responses \pm SEM (pale area) in SOD1^{G37R} mice (right) and WT controls (left) induced by local application of muscarine at P180. Top, localization of the PSC on an endplate (left, apposed over BTX staining) and representative false color images of the changes in Rhod-3 fluorescence representing changes in intracellular Ca²⁺ levels before, during and after the response. **B.** Histogram of the amplitude of PSC Ca²⁺ responses induced by muscarine application at P180. **C.** Average PSC Ca²⁺ responses \pm SEM (pale area) in SOD1^{G37R} mice (right) and WT controls (left) induced by local application of ATP at P180. Top, localization of the PSC on an endplate and representative false color images of the changes in Rhod-3 fluorescence representing changes in Ca²⁺ levels before, during and after the response. **D.** Histogram of the amplitude of PSC Ca²⁺ responses induced by ATP application at P180. Scale bar = 5 μ m. *, $p < 0.05$.

15 NMJs; N=9 vs *SOD1*: 21 out 21; 13 NMJs; N=7). As shown in Figure 4.4C, ATP-induced PSC Ca²⁺ responses in the STM of SOD1^{G37R} mice were slightly smaller than in WT mice (Fig. 4.4D; 315.2 ± 35.6 % $\Delta F/F_0$, n=21 vs 394.3 ± 20.2 % $\Delta F/F_0$, n=32, respectively; $t_{(51)}=2.078$; $p=0.0429$; *Unpaired t-test*). These results suggest that PSCs are less sensitive to purinergic signals in the STM of SOD1^{G37R} mice.

Altogether, our results obtained by imaging PSC Ca²⁺ activity show that the relative contribution of mAChR to PSC activity is increased, while PSCs' sensitivity to purinergic signals is decreased at FF NMJs in SOD1^{G37R} mice. Despite having slightly different properties depending on the MU type they are associated with (Arbour et al., 2015), these results show that the contribution of mAChR to PSCs' activity increases at all NMJ types in SOD1^{G37R} mice.

4.3.5.5 PSCs express and secrete the phagocytic marker Gal-3 following denervation in WT mice

Knowing that PSC mAChR activation regulates gene expression and represses their repair phenotype, we postulated that these changes would be associated with defects in PSC-dependent NMJ repair mechanisms. Notably, PSCs become phagocytic and participate in the clearance of nerve terminal debris following denervation (Duregotti et al., 2015) similarly to axonal SCs (Reichert et al., 1994; Brosius Lutz et al., 2017). Axonal debris clearance is essential for efficient NMJ reinnervation cellular debris hindering axonal growth in the endoneural tube (Kang and Lichtman, 2013).

Interestingly, phagocytic axonal SCs express the β -galactoside-binding lectin Galectine-3 (Gal-3, a.k.a MAC-2) (Reichert et al., 1994; Rotshenker et al., 2008), similarly to other phagocytic glial cells (Rotshenker, 2009; Nguyen et al., 2011a; Morizawa et al., 2017), suggesting that its expression could also reflect PSC phagocytic activity. However, Gal-3 expression has never been evaluated in PSCs. Thus, we first investigated whether PSCs expressed Gal-3 at denervated NMJs in *WT* animals by performing an IHC for the three synaptic components (presynaptic, postsynaptic and glia) and Gal-3. We induced the complete denervation of SOL NMJs in adult *WT* animals by sciatic nerve crush and monitored the presence of Gal-3 two days later (Fig. 4.5A; Nerve crush: N=3, n=43; Sham: N=3, n=42). As expected, we observed a robust expression of Gal-3 in the soma and processes of PSCs following sciatic nerve crush (Fig. 4.5A, E; 85.66 ± 2.02 % of PSCs, n=134) compared to sham surgery (2.883 ± 1.92 % of PSCs, n=105; $p < 0.001$; *GLM post test*). These results confirm that PSCs express Gal-3 following NMJ denervation in *WT* animals.

Gal-3 can be present intracellularly, secreted or associated with transmembrane proteins (Dumic et al., 2006; Yang et al., 2008). Previous studies on axonal SCs suggested that Gal-3 may exert its function in the extracellular space (Reichert et al., 1994). To further characterize its role at the NMJ, we examined whether Gal-3 was present in the extracellular space two days after sciatic nerve crush by performing an IHC in absence of membrane permeabilization. Since

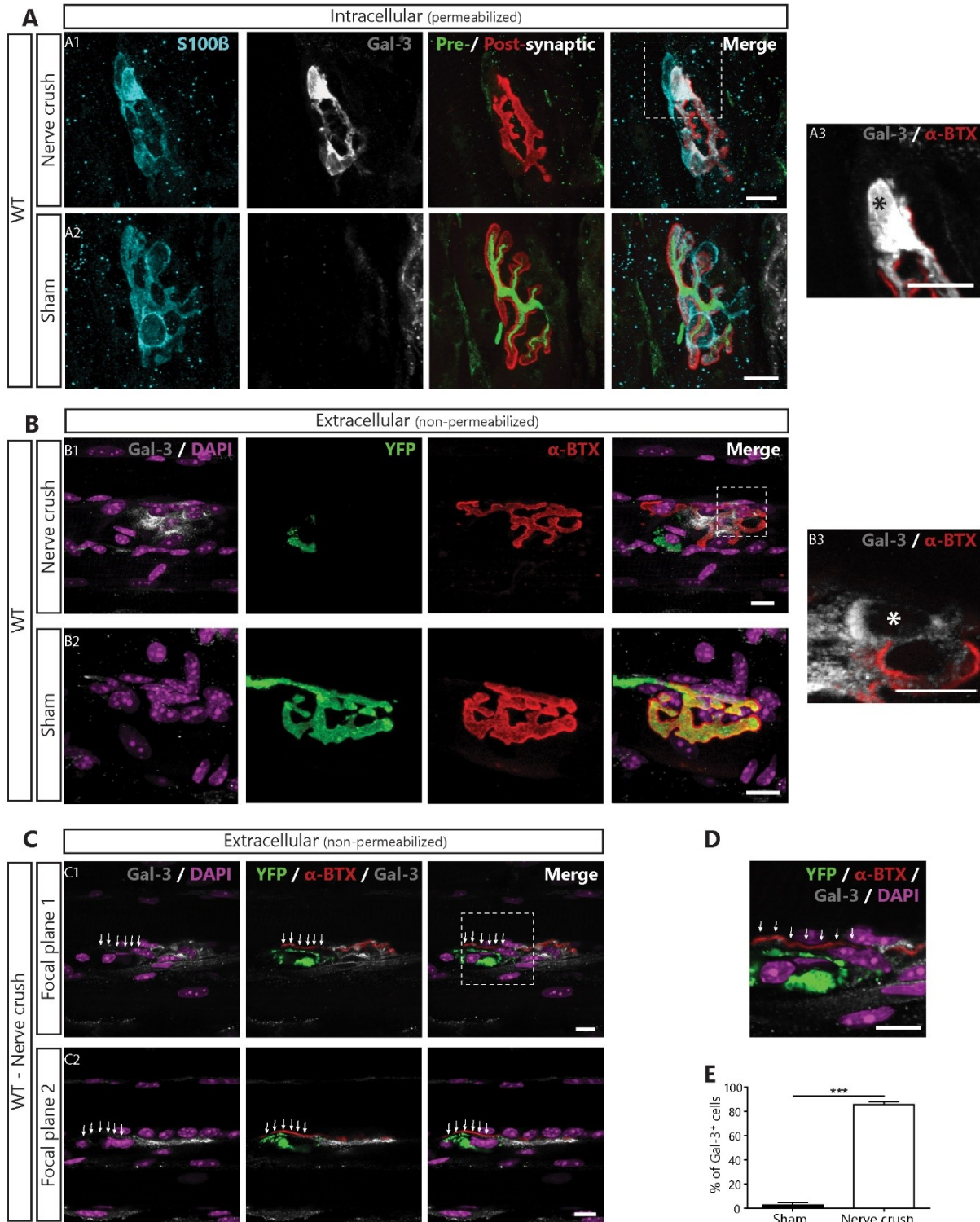


Figure 4.5. PSCs express the phagocytic marker Gal-3 following denervation. **A.** Representative confocal images of immunolabeling of glial cells (blue; S100 β), Gal-3 (white), presynaptic nerve terminals and postsynaptic nAChR (merged: respectively green, SyT; red, α -BTX,) from the SOL of WT mice following a sciatic nerve crush of WT mice following a sciatic nerve crush (A1), or in Sham operated animal (A2). (A3) High magnification image of the region identified in A1 showing that Gal-3 is present inside the soma (*). *Legend continues on next page.*

our presynaptic markers are intracellular, the efficacy of the denervation was validated by performing experiments on animals expressing the “yellow fluorescent protein” (YFP) in all motor neurons (homozygous Thy1-YFP16 mice). As shown in Figure 4.5B, Gal-3 was present in the extracellular space following sciatic nerve crush (Fig. 4.5B₁; N=3, n=45) but not sham surgery (Fig. 4.5B₂; N=2, n=27). Extracellular Gal-3 seemed membrane bound as it was present all around the PSC somata (Fig. 4.5B₃). However, close comparison of Gal-3 staining in permeabilized and non-permeabilized tissue (Fig 4.5A₃ and 4.5B₃ respectively) reveals that part of the staining was missing in non-permeabilized tissues (asterisk). This difference shows that Gal-3 was also present in the cytoplasm and possibly in the nucleus. Interestingly, accumulation of YFP⁺ axonal debris on the endplate almost always correlated with the lack of extracellular Gal-3 on neighboring PSCs (Fig. 4.5C and D, arrows; 6 out of 7 observations). Altogether, these results show that Gal-3 is expressed by PSCs following denervation, is present in the extracellular space at the NMJ and correlates with efficient clearance of presynaptic debris on the endplate.

4.3.5.6 Some PSCs fail to upregulate Gal-3 following denervation in presymptomatic *SOD1*^{G37R} mice

Based on these results, we next asked whether the alteration of PSCs’ decoding properties was associated with an inability to adopt a phagocytic phenotype on denervated NMJs in presymptomatic *SOD1*^{G37R} mice.

To test this possibility, we went on to test if PSCs would upregulate Gal-3 two days following an experimentally-induced denervation in presymptomatic *SOD1*^{G37R} mice (Sciatic nerve crush at ~P180). Considering the differences between PSC decoding properties at vulnerable FF NMJs (STM, shown above) and at partially resistant FR and S NMJs SOL, (Arbour et al., 2015)), we evaluated PSC Gal-3 expression in the EDL (FF NMJs) and the SOL

B. Representative images of the extracellular labelling of postsynaptic nAChR (red), Gal-3 (white) and nuclei (DAPI; purple) from the SOL of Thy1-YFP mice following sciatic nerve crush (B1) or Sham surgery (B2). (B3) High magnification image of the region identified in B1 showing that Gal-3 is present around the soma (*). Note that Gal-3 appears to be both intracellular and extracellular following NMJ denervation. **C.** Two single confocal planes of a denervated NMJ showing that YFP⁺-debris accumulation on the endplate (arrows) correlates with the lack of extracellular Gal-3 following sciatic nerve crush. **D.** High magnification of the region in C1 showing that Gal-3 is absent next to YFP⁺-debris. **E.** Percentage of PSCs expressing Gal-3. Quantification is based on permeabilized immunolabeling. Scale bar = 10µm. ***, p<0.005.

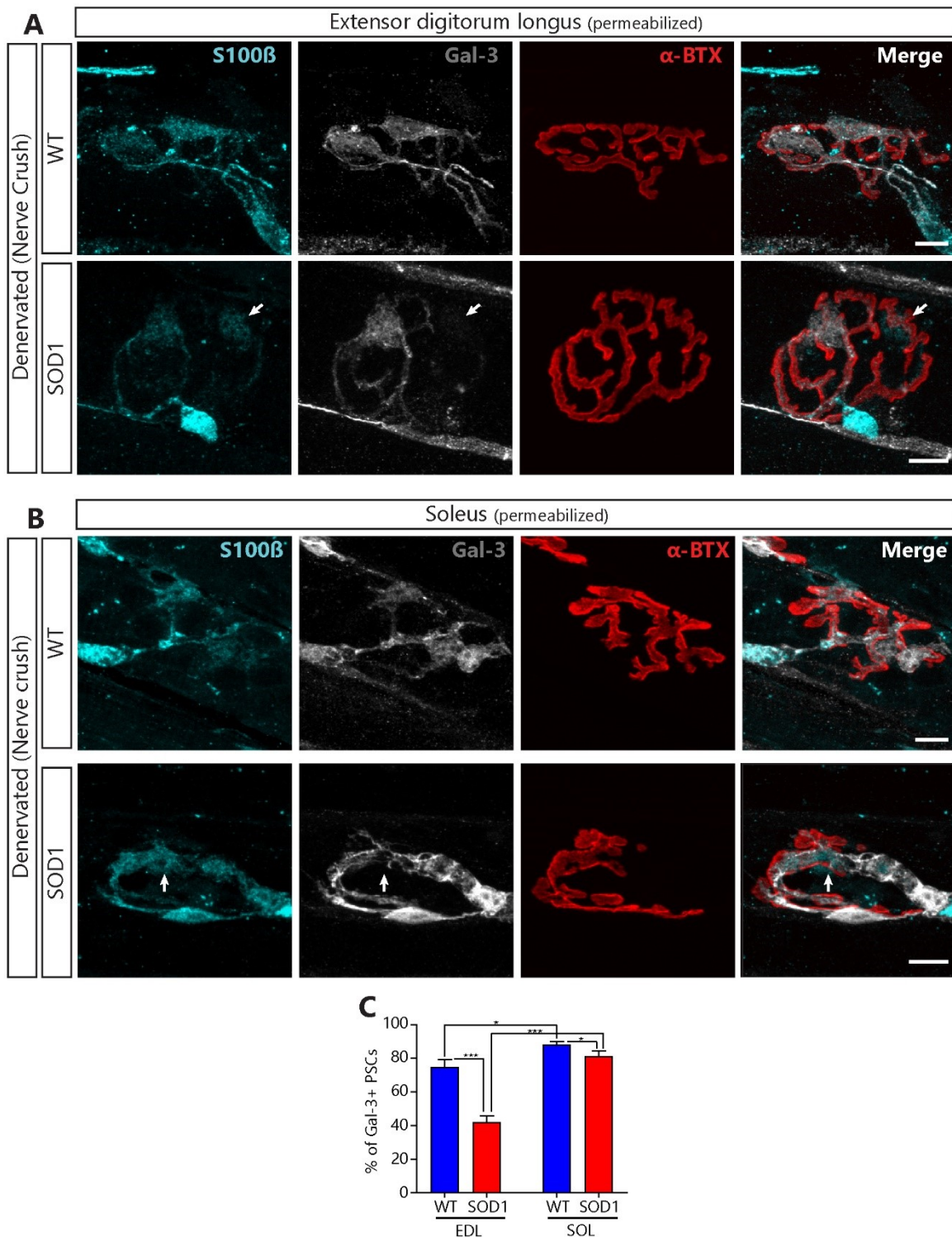


Figure 4.6. More PSCs fail to express the phagocytic marker Gal-3 in presymptomatic *SOD1^{G37R}* mice than in *WT* mice following denervation. **A-B.** Representative confocal images of the immunolabeling of glial cells (blue; S100 β), Gal-3 (white) and postsynaptic nAChR (red, α -BTX,) from the EDL (**A**) or the SOL (**B**) of *WT* (top) and *SOD1^{G37R}* mice (bottom) two days after a sciatic nerve crush. Legend continues on next page.

(FR and S NMJs) to assess any MU-type dependent differences. Based on our hypothesis, we predicted that PSC Gal-3 expression would be reduced at denervated NMJs of both types in *SOD1^{G37R}* mice.

Consistent with our hypothesis, we observed that some PSCs failed to upregulate Gal-3 in the EDL and the SOL following denervation in P180 *SOD1^{G37R}* mice (Fig. 4.6A and B, arrows, WT EDL: N=4, 83 NMJs, n=246 PSCs; WT SOL: N=4, 108 NMJs, n=288 PSCs; *SOD1* EDL: N=4, 90 NMJs, n=252 PSCs; *SOD1* SOL: N=4, 89 NMJs, 205 PSCs). Indeed, significantly less PSCs expressed Gal-3 two days after sciatic nerve crush in *SOD1* mice compared with *WT* mice (Fig. 4.6C, Effect of genotype: $p < 0.001$, *GLM*). However, PSC Gal-3 expression was also dependent on the muscle type (Fig. 4.6C, Effect of muscle: $p < 0.001$, *GLM*) in such a way that the effect of the genotype varied depending on the muscle (Interaction between genotype*muscle: $p = 0.028$, *GLM*). More specifically, the proportion of PSCs expressing Gal-3 following denervation was significantly lower in the EDL than in the SOL in *WT* mice (Fig. 4.6C, $74.65 \pm 4.73\%$ vs $88.25 \pm 1.65\%$ respectively, $p = 0.022$, *GLM post test*) and in *SOD1^{G37R}* mice (Fig. 4.6C, $42.00 \pm 3.85\%$ vs $81.25 \pm 3.01\%$ respectively; $p < 0.001$, *GLM post test*). Even though more PSCs failed to upregulate Gal-3 in both muscles in *SOD1^{G37R}* mice compared to *WT* mice (Fig. 4.6C, EDL: *WT* vs *SOD1*, $p < 0.001$; SOL: *WT* vs *SOD1* $p = 0.022$, *GLM post test*), this effect was much more pronounced in the EDL than in the SOL. Hence, PSCs seem less likely to adopt a phagocytic phenotype at denervated NMJs in presymptomatic *SOD1^{G37R}* mice in a manner which reflects of NMJ vulnerability in ALS.

4.3.5.7 Similar level of denervation in STM and SOL muscles of symptomatic *SOD1^{G37R}* mice

These results suggest that PSCs may not adequately promote NMJ repair upon the endogenous denervation of NMJs during the symptomatic phase in *SOD1^{G37R}* mice. To test this possibility, we examined PSCs's ability to upregulate Gal-3 in the symptomatic period in *SOD1^{G37R}*. Furthermore, we characterized another fundamental PSC mechanism contributing

Note the absence of Gal-3 expression in some of the PSCs from *SOD1* mice (arrows). C. Quantification of the percentage of PSCs expressing Gal-3 two days following a sciatic nerve crush as a function of the genotype and the muscle type. Experiments were performed at P180. Scale bar = 10 μ m. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

to NMJ repair: the extension of glial processes and the guidance of terminal sprouting. Importantly, this aspect of PSC repair properties could not be evaluated in presymptomatic animals following a complete nerve crush, since this procedure only poorly induces the extension of PSC processes (Love and Thompson, 1999).

PSCs' repair properties (Gal-3 expression, PSC process extensions and nerve terminal sprouting) were evaluated in the STM and the SOL of phenotypically matched late symptomatic *SOD1^{G37R}* animals using IHC (P512-548; Fig. 4.1A). Observations were analyzed as a function of the innervation state of the NMJs (innervated vs denervated) on top of the muscle type (STM vs SOL) and the genotype (*WT* vs *SOD1^{G37R}*) as illustrated in Figure 4.7A. Consistent with previous observations in the *SOD1^{G93A}* mice (Schaefer et al., 2005; Valdez et al., 2012), we confirmed that the extent of denervation (partial or complete) was comparable between the STM and the SOL in symptomatic *SOD1^{G37R}* mice, not being significantly higher in the STM than in the SOL (Fig. 4.7B; STM: $21.71 \pm 5.76\%$, N=9 vs SOL: $11.51 \pm 1.98\%$, N=7; $p=0.116$; *GLM post test*). Indeed, we found that 11.63% of NMJs in the STM were completely denervated (31 out of 266, N=9) compared to $6.80 \pm 1.84\%$; in the SOL (20 out of 282, N=7). Similar results were obtained for partially denervated NMJs (STM, $10.08 \pm 3.36\%$; 29 out of 266 NMJs, N=9 vs SOL, $4.11 \pm 1.97\%$; 15 out of 282, N=7). Of note, only 1 out of the 156 NMJs analyzed in the STM of *WT* animals ($0.54 \pm 0.54\%$; N=6) was completely denervated and none were partially denervated. In the SOL, none of the 152 NMJs analyzed in *WT* animals (N=5) showed any sign of denervation. A partially denervated NMJ could be either undergoing denervation or re-innervation, which are two very distinct physiological states (Martineau et al., 2018). Due to this uncertainty, partially denervated NMJs were excluded from the following analyses.

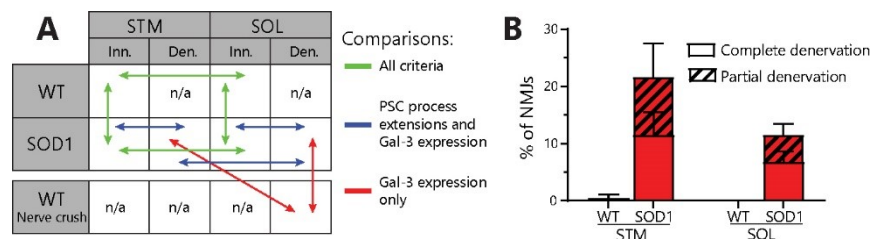


Figure 4.7. Experimental design for the morphological analysis. **A**. Schematic of the biologically relevant pairwise comparisons to assess the effect of genotype (*WT* vs *SOD1^{G37R}*), muscle type (STM vs SOL) and innervation status (innervated vs denervated). **B**. Histogram of the percentage of completely and partially denervated NMJs across all groups. Den., denervated; Inn., innervated.

As mentioned previously, comparison of PSCs' phenotype between the STM and the SOL allowed us to isolate the effect of the muscle type on the repair properties owing to the delayed progression of the STM, avoiding a bias due to non-comparable amount of denervation. Indeed, denervation levels in leg fast-twitch muscles, such as the EDL, are drastically higher than in the SOL at this stage with only few NMJs being fully innervated (*unpublished observations* and Tremblay et al. 2017). Such levels of denervation imply that only few NMJs remain capable of providing compensatory terminal sprouts. Furthermore, extension of PSC processes upon denervation of NMJs is dependent on the presence of nearby innervated NMJs (Love and Thompson, 1999).

4.3.5.8 Lack of Gal-3 at denervated NMJs in symptomatic SOD1 animals

First, we examined Gal-3 expression in PSCs NMJs in the STM and the SOL of symptomatic *SOD1^{G37R}* mice. To rule out age-related changes in the debris clearance pathway (Kang and Lichtman, 2013), we also performed a sciatic nerve crush in aged *WT* mice (P450-P500). PSCs in the SOL of aged *WT* mice robustly expressed Gal-3 following sciatic nerve crush (Fig. 4.8A; 85.03 ± 4.07 %, N=4, n=120) and at similar levels than in P180 mice (Fig. 4.6). Hence, PSCs maintain their ability to upregulate Gal-3 with normal aging in *WT* mice.

As expected, we found that PSC Gal-3 expression varied according to state of innervation and the muscle in *SOD1^{G37R}* mice and in age-matched controls (Effect of genotype: $p < 0.001$, Effect of innervation: $p < 0.001$, Genotype*innervation interaction: $p < 0.001$; Muscle*innervation interaction: $p < 0.001$, *GLM*). Interestingly however, numerous PSCs did not express Gal-3 on completely denervated NMJs in *SOD1^{G37R}* mice in both muscles (Fig. 4.8B₁ and 8C₁, arrowheads). Consistent with our finding in presymptomatic mice, significantly less PSCs expressed Gal-3 in the STM of *SOD1^{G37R}* animals when compared to nerve crush-induced denervated NMJs in *WT* mice (Fig. 4.8A and D; 18.94 ± 8.32 % of PSCs; n=136 vs 85.03 ± 4.07 % of PSCs n=120; $p < 0.001$; *GLM post test*). Furthermore, presence of Gal-3 was highly variable in the SOL, ranging from 0.00% to 77,78% of PSCs (51.81 ± 13.56 %, n=49), and an overall trend towards lower levels was observed when compared to nerve crush-induced denervation (Fig. 4.8D; *SOD1^{G37R}* SOL vs Nerve crush WT SOL; $p = 0.074$; *GLM post test*). Interestingly, PSCs Gal-3 expression on denervated NMJs was significantly higher in the SOL than in the

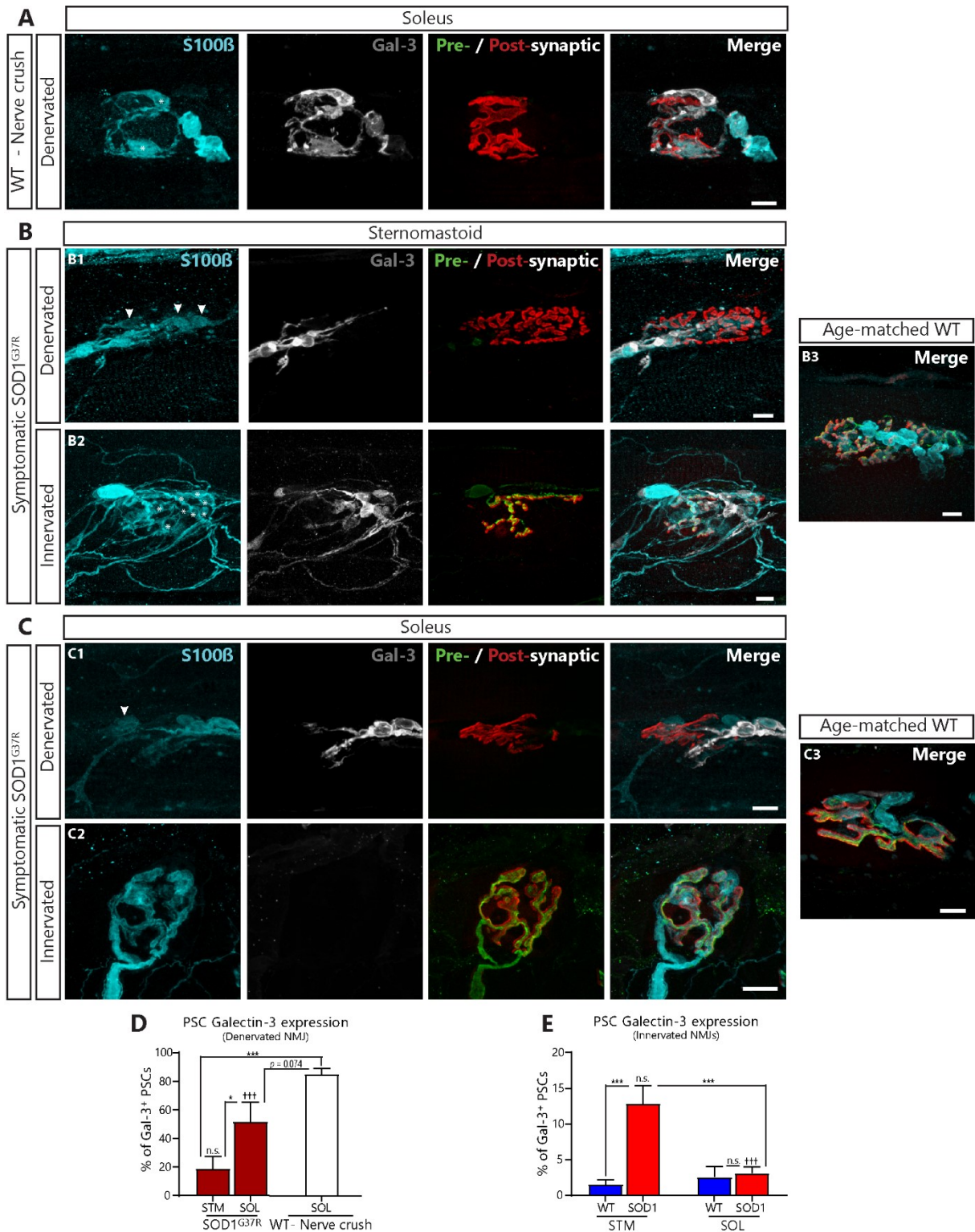


Figure 4.8. Paradoxical expression of Gal-3 in the STM and the SOL of symptomatic SOD1^{G37R} mice. Immunolabeling of glia (blue; S100 β), Gal-3 (white), presynaptic nerve terminals and postsynaptic nAChR receptors (merged: respectively green, SV2 and NF-M; red, α -BTX). **A.** Representative confocal images of NMJs from the SOL of aged WT mice following nerve-crush induced denervation. *Legend continues on next page.*

STM (Fig. 4.8D; *SOD1^{G37R}* SOL vs STM; $p=0.020$; *GLM post test*), again reflecting the higher vulnerability of FF NMJs. Importantly, axonal SCs in both muscles robustly expressed Gal-3 when associated with denervated NMJs, suggesting that this alteration is specific to PSCs (Fig 4.8B₁ and C₁). Altogether these results show that PSCs unreliably upregulate Gal-3 on denervated NMJs in symptomatic *SOD1^{G37R}* mice, especially on vulnerable NMJs.

4.3.5.9 Gal-3 is expressed on some innervated STM NMJs in symptomatic SOD1 mice

Paradoxically, while Gal-3 was absent from PSCs on denervated STM NMJs in *SOD1^{G37R}* mice, it was expressed in some PSCs on fully innervated STM NMJs (Fig. 4.8B₂₋₃, asterisks and 4.8E; *SOD1^{G37R}*: 12.84 ± 2.54 % of PSCs, $n=866$ vs *WT*: 1.55 ± 1.68 % of PSCs, $n=618$; $p<0.001$; *GLM post test*). More importantly, a similar proportion of PSCs expressed Gal-3 whether the NMJ was innervated or denervated in the STM of *SOD1^{G37R}* mice (12.84 ± 2.54 % vs 18.94 ± 8.32 %; $p=0.132$; *GLM post test*) suggesting that Gal-3 expression in PSCs was independent of the state of innervation in this ALS model. This upregulation of Gal-3 on innervated NMJs was not observed in the SOL of *SOD1^{G37R}* animals (Fig. 4.8C₂₋₃; *SOD1^{G37R}* SOL Innervated: 3.12 ± 0.92 %, $n=708$ vs *WT* SOL Innervated: 2.59 ± 1.50 , $n=435$; $p=0.231$; *GLM post test*), where its expression was specific to denervated NMJs (Innervated: 3.12 ± 0.92 % vs Denervated : 51.81 ± 13.56 %; $p<0.001$; *GLM post test*).

4.3.5.10 Gal-3 expression on partially innervated NMJs in the STM

In line with the notion that Gal-3 expression is paradoxical in the STM of symptomatic *SOD1^{G37R}* mice, a number PSCs on partially innervated NMJs also expressed Gal-3 and were usually associated with the nerve terminal in the STM (Fig. 4.9A₁). Again, this was not observed in the SOL (Fig. 4.9A₂). Indeed, 20 out of 29 (69.97 %) partially innervated NMJs had at least 1 Gal-3⁺-PSC in the STM compared to only 2 out 15 (13.33 %) in the SOL. In 80% of these

B. Representative confocal images of denervated (B1) and innervated (B2) NMJs from the STM of symptomatic *SOD1^{G37R}* mice or of age-matched WT controls (B3). Note the presence of Gal-3 in PSCs (*) on an innervated NMJ in the STM of *SOD1^{G37R}* mice. Also note the disorganization of PSC processes. **C.** Representative confocal images of denervated (C1) and innervated (C2) NMJs from the SOL of *SOD1^{G37R}* mice or from WT animals (C3). Note the presence of Gal-3 in axonal Schwann cells and its absence from PSCs (B and C, arrowheads). **D.** Percentage of PSCs expressing Gal-3 on denervated NMJs and, **(E)** innervated NMJs in all groups. Symbols on the top of histogram bars represent the difference between innervated and denervated NMJs (D vs E). Scale bars = 10 μ m. ns, nonsignificant; ***, $p<0.005$; †††, $p<0.005$.

cases in the STM Gal-3⁺-PSCs were preferentially associated with the presynaptic nerve terminal. These results could suggest that PSCs are actively phagocytosing the presynaptic element on denervating or reinnervating NMJs.

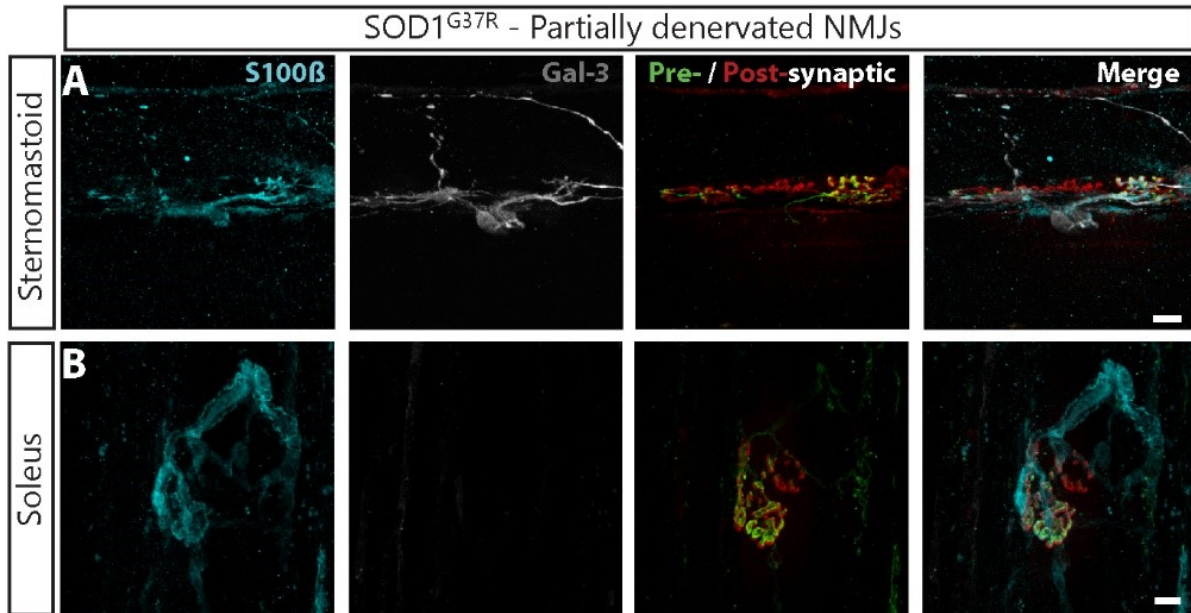


Figure 4.9. Gal-3 in PSCs associated with nerve terminals on partially innervated NMJs in the STM of symptomatic *SOD1^{G37R}* mice. Immunolabeling of glia (blue; S100 β), Gal-3 (white), presynaptic nerve terminals and postsynaptic nAChR receptors (merged: respectively green, SV2 and NF-M; red, α -BTX). **A**. Representative confocal images of partially innervated NMJs from the STM and **(B)** the SOL of symptomatic *SOD1^{G37R}* mice. Note that Gal-3⁺-PSCs are preferentially associated with the innervated part of the endplate rather than the denervated part. Scale bars = 10 μ m

4.3.5.11 PSCs extend disorganized processes in both the STM and the SOL

Next, we wanted to examine if PSC responded to NMJ denervation by monitoring the presence and targeting of PSC process extensions in symptomatic *SOD1^{G37R}* animals. Indeed, PSCs on denervated NMJs normally extend processes towards nearby innervated NMJs, a phenomenon essential in the initiation and guidance of nerve terminal sprouting (Reynolds and Woolf, 1992; Son and Thompson, 1995b, a; Son et al., 1996; O'Malley et al., 1999).

In general, we found significantly more NMJs associated with extended PSC processes in *SOD1^{G37R}* than in WT mice (Fig. 4.10A and B; Effect of genotype: $p < 0.001$, *GLM*) but this effect varied slightly according to the muscle type (Interaction genotype*muscle: $p = 0.044$; *GLM*). Denervated NMJs were more likely to be associated with extended PSC processes than

innervated NMJs (Effect of innervation: $p < 0.001$, *GLM*), but this effect also varied depending on the muscle (Interaction innervation*muscle: $p = 0.013$, *GLM*).

Indeed, in the STM, completely denervated NMJs were not significantly more likely to be associated with extended PSC processes than innervated NMJs in *SOD1^{G37R}* mice (Fig. 4.10A₃ arrowheads and C; $51.05 \pm 14.99\%$, $n = 31$ vs $38.48 \pm 7.11\%$, $n = 206$, respectively; $p = 0.858$; *GLM post test*). Conversely, innervated NMJs in *SOD1^{G37R}* mice were more likely to be associated with extended glial processes than innervated NMJs in *WT* mice (Fig. 4.10A and C, $13.73 \pm 4.05\%$ $n = 155$; $p = 0.047$; *GLM post test*). Hence, PSCs in the STM of *SOD1^{G37R}* extended their processes but this did not seem to be dependent on the innervation state of NMJs. These results contrast with those obtained in the SOL. Indeed, PSCs on denervated NMJs in the SOL of *SOD1^{G37R}* mice robustly extended their processes compared to PSCs on innervated NMJs (Fig. 4.10B and C, 71.67 ± 13.76 , $n = 36$ vs 15.65 ± 3.68 , $n = 247$; $p < 0.001$; *GLM post test*). Hence, while PSC process extensions from denervated NMJs occurred as often in both muscles ($p = 0.858$; *GLM post test*), they were abnormally more likely to be associated with innervated NMJs in the STM than in the SOL ($p = 0.047$; *GLM post test*).

Importantly though, these results also show that 49 % of denervated NMJs in the STM and 28% in the SOL lacked extended PSC processes (see Fig.4.6A₂ for example). These proportions are higher than the expected 1% based on studies using partial denervation (Son and Thompson, 1995b) and, in most cases, only one process per NMJ was observed (1.13 ± 0.67 processes on average) (Son and Thompson, 1995b; O'Malley et al., 1999). Furthermore, PSC processes were often highly disorganized in the STM and SOL of *SOD1^{G37R}* mice ($47.09 \pm 9.87\%$ and $31.02 \pm 18.62\%$ of processes on average respectively; see Fig 10A₃, 10B₂ and 10B₂ for example), often changing direction, not following muscle fibers and frequently making loops around themselves. Hence, although present, PSC process extensions were often disorganized and less abundant than expected on denervated NMJs regardless of the muscle type. These results further suggest that PSC properties are heterogeneous, which is reminiscent of the heterogeneity in PSC decoding properties observed at a presymptomatic stage.

4.3.5.12 Nerve terminal sprouting is absent in the STM and disorganized in the SOL

Extended PSC processes contacting nearby innervated NMJs can initiate and guide nerve terminal sprouting back to denervated NMJs (Son and Thompson, 1995b; Son et al., 1996; O'Malley et al., 1999). However, previous studies reported conflicting results whereby nerve terminal sprouting is absent (Schaefer et al., 2005; Tallon et al., 2016) or abundant in *SOD1^{G93A}* mice (Valdez et al., 2012). Hence, we next tested whether nerve terminal sprouting would be present, albeit disorganized, on innervated NMJs in *SOD1* animals. Based on the lower, but not null, ability of FF NMJs to elaborate terminal sprouts (O'Malley et al., 1999; Frey et al., 2000; Wright et al., 2009), we expected fewer terminal sprouts in the STM compared with the SOL.

In general, we found significantly more NMJs associated with nerve terminal sprouts in the SOL of *SOD1^{G37R}* animals than any other groups (Fig. 4.10A - C; Effect of genotype: $p=0.001$; Effect of muscle: $p<0.001$; Interaction genotype*muscle: $p=0.015$; *GLM*). Indeed, $30.26\pm 6.96\%$ of innervated NMJs in the SOL of *SOD1^{G37R}* mice (Fig. 4.10B₃; $n=259$) formed sprouts compared to $2.89 \pm 1.46\%$ of SOL NMJs in *WT* mice and $5.26 \pm 1.37\%$ of STM NMJs in *SOD1^{G37R}* mice (Fig. 4.10A₃, 10B₁ and 10D; $n=152$ and $n=206$, $p<0.001$ and $p<0.001$ respectively; *GLM post test*) which suggests an active re-innervation effort in the SOL. Consistent with previous observations made on FF NMJs though (Martineau et al., 2018), we did not observe significantly more nerve terminal sprouts at STM NMJs in *SOD1^{G37R}* mice than in *WT* mice ($5.26 \pm 1.37\%$, $n=206$ vs $2.56 \pm 1.64\%$, $n=155$; $p=0.311$). This finding was nevertheless surprising considering that over a third of them were being contacted by extended PSC processes (Fig. 4.10A₃ for example). Therefore, initiation of nerve terminal sprouting in symptomatic *SOD1* mice appears deficient in the STM, but not the SOL, resulting in “empty” extended PSCs processes contacting both innervated and denervated endplates (Fig. 4.10C).

Importantly though, nerve terminal sprouts in the SOL were often disorganized, going in many directions and even “avoiding” nearby denervated NMJs (Fig. 4.10B₂, arrowheads). Indeed, $33.46 \pm 6.50 \%$ of sprouting NMJs had disorganized sprouts in the SOL of *SOD1^{G37R}* mice, which is consistent with the muddled PSC process extensions. As a whole, these results show that nerve terminal sprouting was almost completely absent in the STM and disorganized in the SOL of symptomatic *SOD1^{G37R}* animals.

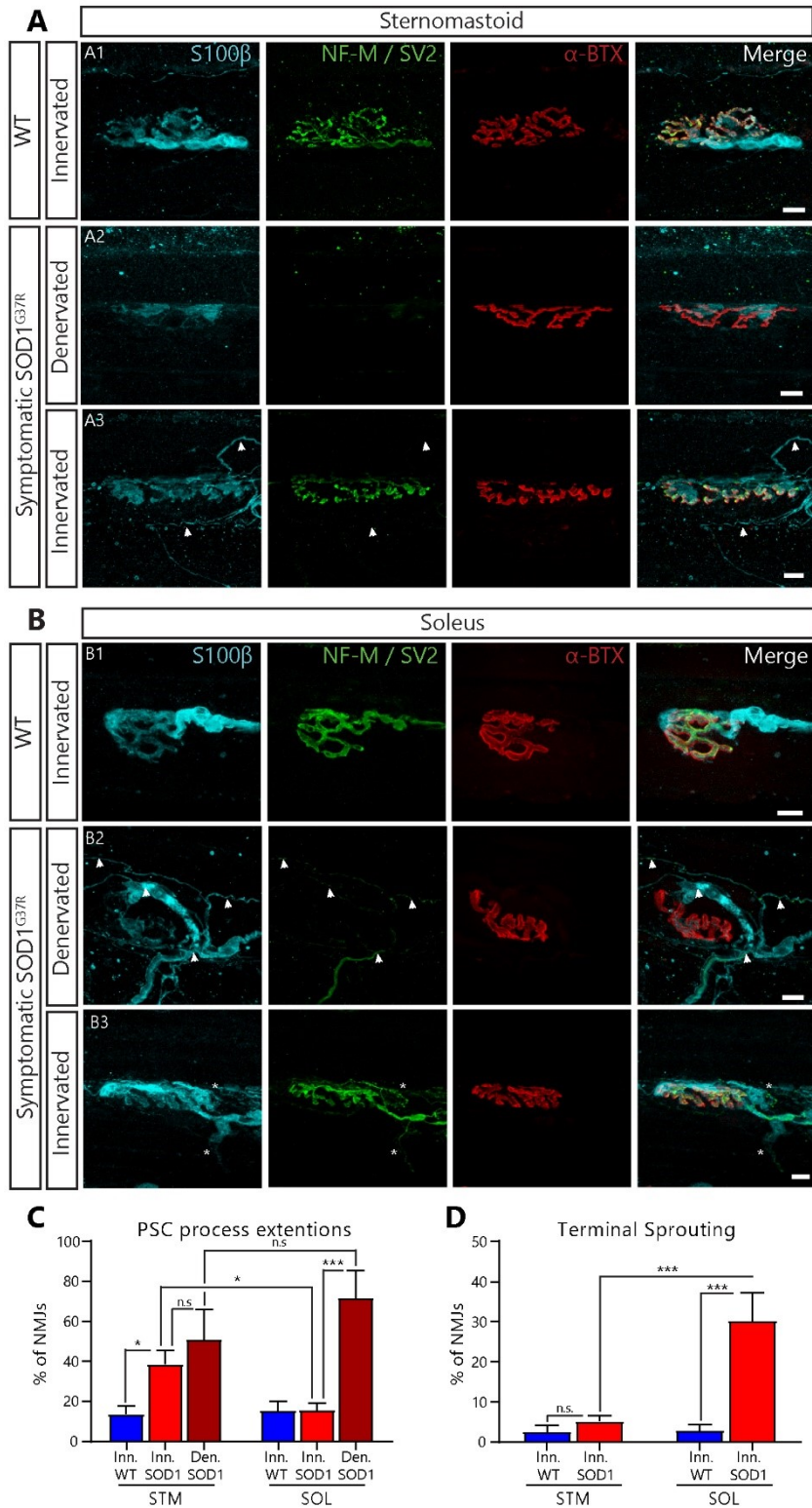


Figure 4.10: Abnormal and disorganized nerve terminal sprouting and PSC process extension in the STM and the SOL of symptomatic SOD1^{G37R} mice. Immunolabeling of glial cells (blue; S100 β), presynaptic nerve terminals (green; NF-M and SV2) and postsynaptic nAChR receptors (red; α -BTX). Legend continues on next page.

In summary, these results show that PSCs display a paradoxical Gal-3 expression in symptomatic *SOD1*^{G37R} animals, being inconsistent on denervated NMJs of both muscles and unexpectedly present on innervated and partially innervated NMJs in the STM. This suggests that PSCs do not adopt a phagocytic phenotype upon denervation of vulnerable NMJs, and also to a lesser extent of partially resistant NMJs. Along with the disorganized processes and the abnormal nerve terminal sprouting, these results suggest that PSCs do not adopt an appropriate phenotype for re-innervation in ALS. Importantly, these main findings were replicated in the STM of a small number of pre-onset (P70) *SOD1*^{G93A} animals. Namely, PSCs on denervated NMJs failed to upregulate Gal-3 and to extend processes, resulting in the absence of nerve terminal sprouting (*data not shown*). Altogether, these results show that alteration PSC repair properties are not specific to a single *SOD1* model.

A. Representative confocal images of NMJs from the STM of age-matched WT controls (A1) and of symptomatic *SOD1*^{G37R} mice (A2: denervated; A3: innervated). **B.** Representative confocal images of NMJs from the SOL of WT animals (B1) and of symptomatic *SOD1*^{G37R} mice (B2: denervated; B3: innervated). Note the nerve terminal sprouting “avoiding” the nearby denervated NMJ (B2; arrowheads). **C.** The percentage of NMJs associated with PSC processes in the STM or the SOL according to the state of innervation. **D.** Percentage of innervated NMJs displaying nerve terminal sprouting. Scale bars = 10 μ m. ns, nonsignificant; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.005$.

4.3.6 Discussion

Our results reveal inappropriate glial repair properties at the NMJs of a fast- and a slow-twitch muscle in symptomatic *SOD1* animals. These changes are associated with an altered PSC excitability, long before disease onset. Despite multiple differences in PSC properties (decoding and repair) between muscles and the heterogeneity in PSC properties, our data converges towards the same end results whereby PSCs on denervated NMJs inconsistently adopted a phagocytic phenotype, formed muddled processes, failed to guide nerve terminal sprouting appropriately and presented an increased mAChR-dependent activity. Thus, PSC excitability and repair properties are incompatible with NMJ reinnervation across all MU types in *SOD1* models.

4.3.6.1 NMJ repair defects in ALS

Here, we show that numerous PSC-dependent NMJ repair mechanisms are abnormal in *SOD1* animals, suggesting that NMJ reinnervation may be deficient during the progression of ALS. Although compensatory reinnervation is known to occur during the disease (Schaefer et al., 2005; Martineau et al., 2018), this process may be suboptimal, resulting in inefficient or unstable NMJ repair. Such bungled compensation could contribute to the loss of motor function in ALS by exacerbating loss of NMJs. Consistent with this hypothesis, numerous studies documented delays in NMJ reinnervation following axonal injury in ALS models (Sharp et al., 2005; Pun et al., 2006; Henriques et al., 2011; Swarup et al., 2012; Mesnard et al., 2013; Carrasco et al., 2016b). These observations suggest that a number of core NMJ repair mechanisms are altered in these models such as slower axonal growth or cellular debris accumulation in the endoneural tube and at the NMJ (Kang and Lichtman, 2013). Our observation that PSCs fail to adopt a phagocytic phenotype on denervated NMJs (Fig. 4.8) is consistent with the latter possibility. However, this alteration was specific to PSCs as axonal SCs robustly expressed Gal-3 in that context, suggesting that other mechanisms could contribute to the delay in NMJ reinnervation after nerve injury.

Importantly, global nerve injuries do not recapitulate the progressive denervation occurring in ALS. Hence, evaluating NMJ repair following partial denervation would be more instructive as it would allow compensatory reinnervation to take place through nodal (axonal)

and nerve terminal sprouting of intact motor axons (Thompson and Jansen, 1977; Son and Thompson, 1995b). Since PSCs unreliably extended muddled processes (Fig. 4.10), we predict that reinnervation based on these sprouting events would also be drastically impaired. Indeed, despite being more abundant than in controls, PSC processes were less abundant than expected (Son and Thompson, 1995b; O'Malley et al., 1999) which could underlie the reduced terminal sprouting observed following blockade of neurotransmission in *SOD1* mice (Frey et al., 2000). Interestingly, Schaefer et al. (2005) observed substantial motor-unit enlargement in the STM during disease progression, but these events appeared to be mostly due to nodal sprouts. This is consistent with the absence or disorganization of nerve terminal sprouts (Fig. 4.10) and the apparent sparing of axonal SCs that we documented here (Fig. 4.8).

4.3.6.2 Motor-unit type-dependent and independent diversity in PSC properties

Results presented here and previously (Arbour et al., 2015) show (1) that increased mAChR-dependent PSC activity is present long before disease onset, (2) that this alteration is associated with an inability to adopt a phagocytic phenotype upon denervation in presymptomatic animals, and (3) that PSCs' phenotype is incompatible with NMJ repair in symptomatic animals, regardless of the MU-type they are associated with. However, excitability and repair properties of PSCs associated with vulnerable FF MUs (STM) contrasted with those observed on PSCs associated with less vulnerable FR and S MUs (SOL).

Indeed, PSC Ca^{2+} signaling is affected differentially depending on the MU-type in *SOD1^{G37R}* mice, revealing a unique set of complementary changes in PSC activity at FF NMJs in contrast with those reported at FR and S MUs (Arbour et al., 2015). For instance, while maintaining a higher relative mAChR contribution, nerve-induced PSC Ca^{2+} responses on FF MUs were smaller, possibly due to a reduced sensitivity of the purinergic system (Fig. 4.2 and 4.4). In contrast, PSC Ca^{2+} responses on FR and S MUs were larger due to an increased activation of mAChRs (FR and S) and an increased sensitivity of the purinergic system (FR, late stages only) (Arbour et al., 2015). This highlights the importance of the balanced regulation of PSCs activity between muscarinic and purinergic receptors.

Moreover, PSC repair properties varied according to the MU type in symptomatic *SOD1^{G37R}* animals, where PSC properties on FF NMJs were out of phase with the innervation

status while PSCs on FR or S NMJs adopted an intermediate phenotype (Fig. 4.8F). PSCs on FF NMJs, but not FR or S NMJs, also selectively increased their expression of the chemorepellent Semaphorin 3A following denervation or blockage of neurotransmitter release (De Winter et al., 2006). All these results are consistent with the known vulnerability of FF MUs compared to FR and S MUs in the disease (Frey et al., 2000; Atkin et al., 2005; Pun et al., 2006). Hence, PSC properties seem to reflect MU vulnerability at presymptomatic and symptomatic stages of the disease.

An additional level of complexity arises from the increased heterogeneity in PSC activity (nerve-induced Ca^{2+} -responses) and repair properties (Gal-3 expression and process extensions) at individual NMJs in *SOD1* animals. Heterogeneity in PSC responses to synaptic activity could arise from two scenarios. First, a mAChR-independent component of PSC Ca^{2+} responses could be inconsistently decreased amongst PSCs. Second, knowing that PSCs cover exclusive synaptic territories (Brill et al., 2011) and that synaptic activity is altered at the NMJ in ALS (Armstrong and Drapeau, 2013a, b; Rocha et al., 2013; Shahidullah et al., 2013; Arbour et al., 2015; Tremblay et al., 2017), neurotransmitter release could be more heterogeneous between active zones, thus inducing variable levels of Ca^{2+} activity in PSCs depending on the active zones they cover.

Altogether, common pathological alterations in PSC properties are complemented by numerous context-dependent differences that could contribute to, or at least reflect, NMJ dysfunction and MU-vulnerability in ALS.

4.3.6.3 Non-cell autonomy at the NMJ and impact of PSC dysfunction on the disease.

Similarly to glial cells in the CNS (Boillee et al., 2006a; Boillee et al., 2006b; Yamanaka et al., 2008b; Ilieva et al., 2009; Haidet-Phillips et al., 2011; Kang et al., 2013; Meyer et al., 2014; Ditsworth et al., 2017), results presented here and in recent studies (Carrasco et al., 2016a; Van Dyke et al., 2016), suggest that alterations in PSC properties could contribute to ALS onset and progression. Direct manipulation of mutant *SOD1* levels in astrocytes, microglia or oligodendrocyte progenitors directly affected their function and revealed their contribution to the disease. These results raise the question of whether changes in PSCs are directly caused by the expression of the mutant protein or reflect a maladaptive response to the diseased

motoneuron. Previous studies evaluating the contribution of mutant SOD1 expression in SCs (both PSCs and axonal SCs) to the disease provided disparate results depending on the dismutase competency of the mutated SOD1 protein (Lobsiger et al., 2009; Turner et al., 2010; Wang et al., 2012). However, the P0 promoter used in these studies poorly targets PSCs (Lobsiger et al., 2009). Furthermore, we show here that axonal SCs robustly adopted a phagocytic phenotype following denervation in symptomatic *SOD1* mice, while PSCs failed to do so (Fig. 4.8), suggesting that these two cell types may be affected differently in the disease. Unfortunately, lack of a known specific PSC promoter has so far prevented a direct manipulation of mutant SOD1 expression in PSCs. Hence, the contribution of mutant SOD1 expression in PSCs to their dysfunction and to ALS onset and progression remains to be determined.

4.3.6.4 Role of Gal-3 in ALS

Numerous studies have evaluated the role of Galectin-3 (MAC-2) in ALS and its usefulness as a potential biomarker for the disease (Zhou et al., 2010b). For instance, Gal-3 expression is increased early in the spinal cord of *SOD1*^{G93A} mice and ALS patients, in skeletal muscles of *SOD1*^{G86R} mice (possibly in axonal SCs based on our results), and rises throughout disease progression (Ferraiuolo et al., 2007; Gonzalez de Aguilar et al., 2008; Zhou et al., 2010b; Lerman et al., 2012; Baker et al., 2015). Its expression correlates with microglial activation (Yamanaka et al., 2008b; Lerman et al., 2012) and is also inexplicably upregulated in motoneurons during disease progression (Ferraiuolo et al., 2007). These observations suggest that Gal-3 expression is detrimental to disease progression and would reflect increasing levels of neuroinflammation.

Gal-3 has been implicated in numerous other cellular functions (Dumic et al., 2006; Yang et al., 2008). Indeed, Gal-3 is also associated with phagocytosis in astrocytes (Nguyen et al., 2011a; Baker et al., 2015; Morizawa et al., 2017) and is required for myelin phagocytosis in axonal SCs (Reichert et al., 1994). Although still debated, evidence suggests it could play a similar role in microglia (Rotshenker, 2009; Lalancette-Hebert et al., 2012). These results suggest that its upregulation may be linked to increased cellular debris clearance in ALS. Our results suggest that extracellular Gal-3 at the NMJ and in peripheral nerves would exert a beneficial effect on disease progression, being inversely correlated to the accumulation of

axonal debris. However, a role of intracellular Gal-3 cannot be cast out as both fractions could not be labeled simultaneously. The ensuing delay in NMJ reinnervation (Kang and Lichtman, 2013) would result in PSCs gradually abandoning parts of the endplate, thus leading to incomplete NMJ reinnervation (Kang et al., 2014). In agreement with this possibility, crossing *SOD1^{G93A}* mice to Gal-3 knock-out (*lgal3^{-/-}*) mice significantly accelerated disease progression (Lerman et al., 2012), further supporting a protective role of Gal-3 in ALS. Overall, these results suggest that the effect of Gal-3 in ALS is context-specific, exerting different adaptive or maladaptive roles in different cell types.

4.3.6.5 Conclusion

We show that PSC excitability and repair properties are incompatible with NMJ repair across all MU types, in two *SOD1* ALS mice models, in a manner which reflects their selective vulnerability. These results suggest that compensatory NMJ reinnervation may be defective in ALS due to misguided nerve terminal sprouting and inadequate endplate debris clearance. Further studies aimed at understanding the molecular basis of the diversity and the changes in PSCs in ALS could unravel novel therapeutic targets. Restoring PSCs' repair capabilities could enhance synaptic reestablishment which could improve motor function in ALS patients.

4.3.7 Acknowledgements

This work was funded by grants from the Canadian Institutes for Health Research (R.R. MOP-111070), Robert Packard Center for ALS Research (R.R.), Canadian Foundation for Innovation (R.R), and an infrastructure grant from the Fonds Recherche Québec-Santé Leader Opportunity Fund to the GRSNC. É.M. held a doctoral studentship from the ALS Society of Canada and a master's degree studentship from the Fonds Recherche Québec-Santé. We thank Joanne Vallée and Julie Pépin for essential help with animal husbandry and technical support. We thank Félix-Antoine Robert for help regarding the statistical analysis.

4.3.8 References

- 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) Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS. *Hum Mol Genet* 22:4282-4292.
- Armstrong GA, Drapeau P (2013b) Calcium channel agonists protect against neuromuscular dysfunction in a genetic model of TDP-43 mutation in ALS. *J Neurosci* 33:1741-1752.
- 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. *Neuromuscular disorders : NMD* 15:377-388.
- Baker DJ, Blackburn DJ, Keatinge M, Sokhi D, Viskaitis P, Heath PR, Ferraiuolo L, Kirby J, Shaw PJ (2015) Lysosomal and phagocytic activity is increased in astrocytes during disease progression in the SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:410.
- Belair EL, Vallee J, Robitaille R (2010) In vivo long-term synaptic plasticity of glial cells. *J Physiol* 588:1039-1056.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006a) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52:39-59.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW (2006b) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312:1389-1392.
- Brichta AM, Callister RJ, Peterson EH (1987) Quantitative analysis of cervical musculature in rats: histochemical composition and motor pool organization. I. Muscles of the spinal accessory complex. *J Comp Neurol* 255:351-368.
- Brill MS, Lichtman JW, Thompson W, Zuo Y, Misgeld T (2011) Spatial constraints dictate glial territories at murine neuromuscular junctions. *J Cell Biol* 195:293-305.
- Brosius Lutz A, Chung WS, Sloan SA, Carson GA, Zhou L, Lovelett E, Posada S, Zuchero JB, Barres BA (2017) Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E8072-E8080.
- Carrasco DI, Seburn KL, Pinter MJ (2016a) Altered terminal Schwann cell morphology precedes denervation in SOD1 mice. *Exp Neurol* 275 Pt 1:172-181.
- Carrasco DI, Bahr BA, Seburn KL, Pinter MJ (2016b) Abnormal response of distal Schwann cells to denervation in a mouse model of motor neuron disease. *Exp Neurol* 278:116-126.
- Crawley MJ (2007) *The R book*. Chichester, England ; Hoboken, N.J.: Wiley.
- Darabid H, Arbour D, Robitaille R (2013) Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 33:1297-1313.
- De Winter 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.

- Ditsworth D, Maldonado M, McAlonis-Downes M, Sun S, Seelman A, Drenner K, Arnold E, Ling SC, Pizzo D, Ravits J, Cleveland DW, Da Cruz S (2017) Mutant TDP-43 within motor neurons drives disease onset but not progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133:907-922.
- Dumic J, Dabelic S, Flogel M (2006) Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et biophysica acta* 1760:616-635.
- 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 U S A* 112:E497-505.
- Eisen A, Kiernan M, Mitsumoto H, Swash M (2014) Amyotrophic lateral sclerosis: a long preclinical period? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:1232-1238.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41-51.
- Ferraiuolo L, Heath PR, Holden H, Kasher P, Kirby J, Shaw PJ (2007) Microarray analysis of the cellular pathways involved in the adaptation to and progression of motor neuron injury in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J Neurosci* 27:9201-9219.
- 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.
- Gonzalez de Aguilar JL, Niederhauser-Wiederkehr C, Halter B, De Tapia M, Di Scala F, Demougin P, Dupuis L, Primig M, Meininger V, Loeffler JP (2008) Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiological genomics* 32:207-218.
- Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK (2011) Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature biotechnology* 29:824-828.
- 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.
- 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.
- Henriques A, Pitzer C, Dittgen T, Klugmann M, Dupuis L, Schneider A (2011) CNS-targeted viral delivery of G-CSF in an animal model for ALS: improved efficacy and preservation of the neuromuscular unit. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19:284-292.
- Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187:761-772.

- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069-1077.
- 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.
- 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.
- Lalancette-Hebert M, Swarup V, Beaulieu JM, Bohacek I, Abdelhamid E, Weng YC, Sato S, Kriz J (2012) Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *J Neurosci* 32:10383-10395.
- Lerman BJ, Hoffman EP, Sutherland ML, Bouri K, Hsu DK, Liu FT, Rothstein JD, Knoblach SM (2012) Deletion of galectin-3 exacerbates microglial activation and accelerates disease progression and demise in a SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain and behavior* 2:563-575.
- Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, Cleveland DW (2009) Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4465-4470.
- Love FM, Thompson WJ (1999) Glial cells promote muscle reinnervation by responding to activity-dependent postsynaptic signals. *J Neurosci* 19:10390-10396.
- Martineau E, Di Polo A, Vande Velde C, Robitaille R (2018) Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS. *eLife* 7.
- Mesnard NA, Haulcomb MM, Tanzer L, Sanders VM, Jones KJ (2013) Delayed functional recovery in presymptomatic mSOD1 mice following facial nerve crush axotomy. *Journal of neurodegeneration & regeneration* 4:21-25.
- Meyer K, Ferraiuolo L, Miranda CJ, Likhite S, McElroy S, Rensch S, Ditsworth D, Lagier-Tourenne C, Smith RA, Ravits J, Burghes AH, Shaw PJ, Cleveland DW, Kolb SJ, Kaspar BK (2014) Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:829-832.
- Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y, Nabekura J, Sato K, Okajima F, Takebayashi H, Okano H, Koizumi S (2017) Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nature communications* 8:28.
- Nguyen JV, Soto I, Kim KY, Bushong EA, Oglesby E, Valiente-Soriano FJ, Yang Z, Davis CH, Bedont JL, Son JL, Wei JO, Buchman VL, Zack DJ, Vidal-Sanz M, Ellisman MH, Marsh-Armstrong N (2011) Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:1176-1181.
- O'Malley JP, Waran MT, Balice-Gordon RJ (1999) In vivo observations of terminal Schwann cells at normal, denervated, and reinnervated mouse neuromuscular junctions. *Journal of neurobiology* 38:270-286.
- Painter MW, Brosius Lutz A, Cheng YC, Latremoliere A, Duong K, Miller CM, Posada S, Cobos EJ, Zhang AX, Wagers AJ, Havton LA, Barres B, Omura T, Woolf CJ (2014)

- Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. *Neuron* 83:331-343.
- Parone PA, Da Cruz S, Han JS, McAlonis-Downes M, Vetto AP, Lee SK, Tseng E, Cleveland DW (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.
- 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.
- Reichert F, Saada A, 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 ML, Woolf CJ (1992) Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *Journal of neurocytology* 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, Rousse I, Robitaille R (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21:3819-3829.
- Rotshenker S (2009) The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. *Journal of molecular neuroscience* : MN 39:99-103.
- Rotshenker S, Reichert F, Gitik M, Haklai R, Elad-Sfadia G, Kloog Y (2008) Galectin-3/MAC-2, Ras and PI3K activate complement receptor-3 and scavenger receptor-AI/II mediated myelin phagocytosis in microglia. *Glia* 56:1607-1613.
- 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.
- 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.
- Sharp PS, Dick JR, Greensmith L (2005) The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 130:897-910.
- Son YJ, Thompson WJ (1995a) Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 14:125-132.
- Son YJ, Thompson WJ (1995b) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14:133-141.
- Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ (1996) Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci* 19:280-285.
- Swarup V, Audet JN, Phaneuf D, Kriz J, Julien JP (2012) Abnormal regenerative responses and impaired axonal outgrowth after nerve crush in TDP-43 transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 32:18186-18195.

- Tallon C, Russell KA, Sakhalkar S, Andrapallayal N, Farah MH (2016) Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice. *Neuroscience* 312:179-189.
- Thompson W, Jansen JK (1977) The extent of sprouting of remaining motor units in partly denervated immature and adult rat soleus muscle. *Neuroscience* 2:523-535.
- 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.
- Tremblay E, Martineau E, Robitaille R (2017) Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model: When Motor Units Matter. *J Neurosci* 37:8901-8918.
- Turner BJ, Ackerley S, Davies KE, Talbot K (2010) Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. *Hum Mol Genet* 19:815-824.
- Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Fox MA, Sanes JR (2012) Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One* 7:e34640.
- Van Dyke JM, Smit-Oistad IM, Macrander C, Krakora D, Meyer MG, 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.
- 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.
- 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.
- Wyatt RM, Balice-Gordon RJ (2008) Heterogeneity in synaptic vesicle release at neuromuscular synapses of mice expressing synaptobluorin. *J Neurosci* 28:325-335.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11:251-253.
- Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT (2008) Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine* 10:e17.
- Zhou JY, Afjehi-Sadat L, Asress S, Duong DM, Cudkowicz M, Glass JD, Peng J (2010) Galectin-3 is a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: discovery by a proteomics approach. *Journal of proteome research* 9:5133-5141.
- Zwiegers P, Lee G, Shaw CA (2014) Reduction in hSOD1 copy number significantly impacts ALS phenotype presentation in G37R (line 29) mice: implications for the assessment of putative therapeutic agents. *Journal of negative results in biomedicine* 13:14.

CHAPITRE V : Discussion

5.1 Résumé des résultats

Dans le cadre de cette thèse, nous avons vu que la perte de JNMs est un événement précoce, mais relativement incompris, dans la SLA. Nos travaux ont montré qu'initialement la perte de JNMs dans la SLA est due à la rétraction progressive et asynchrone de terminaisons axonales de leur élément postsynaptique. Conjointement à cette élimination de branches axonales spécifiques, les axones moteurs forment de nombreux bourgeons axonaux afin de réinnervier des JNMs appartenant à d'autres unités motrices. De façon surprenante, ces bourgeons axonaux ne réinnervaient que très rarement leurs propres JNMs et les bourgeons terminaux étaient très rares. Ces éléments indiquent que, bien que de nombreux bourgeons soient formés, les mécanismes de réinnervation semblent être perturbés dans la SLA. Or, cette période d'instabilité axonale est associée à de nombreux changements cellulaires et moléculaires, dont une incapacité des CSPs à adopter un phénotype « prorégénérateur ». Cette altération de la fonction des CSPs pourrait certainement expliquer les déficits de réinnervation, voir même contribuer à l'instabilité globale de cette synapse durant la maladie.

Ces travaux ont un impact sur notre compréhension des événements précoces ayant lieu à la JNM dans la SLA et sur la contribution des cellules non neuronales à ce phénomène. Notamment, nos travaux révèlent des liens intéressants entre des mécanismes de toxicité ayant été proposés dans la SLA et la perte de JNM. Ces liens nous permettent notamment d'émettre plusieurs hypothèses quant à l'origine cellulaire et moléculaire de ces changements précoces et à leur impact sur la pathogenèse de la SLA. De plus, la ressemblance frappante entre ce processus et l'élimination synaptique durant le développement suggère que des mécanismes similaires pourraient être à l'origine de ces événements. Des études plus approfondies portant sur la contribution de ces mécanismes à l'instabilité des JNMs pourraient permettre d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la SLA. Néanmoins, de nombreuses questions demeurent en suspens, notamment en ce qui a trait à l'applicabilité de ces concepts aux autres causes génétiques de la SLA, à la SLAs ou même à la JNM humaine.

5.2 L'instabilité des terminaisons axonales dans la SLA: un processus autonome ou non autonome?

Dans le chapitre II, nous avons montré que les terminaisons axonales des motoneurones α étaient hautement dynamiques et instables, se rétractant et bourgeonnant, constamment durant la progression de la maladie chez des souris *SOD1^{G37R}*. Plusieurs mécanismes pathologiques intrinsèques aux motoneurones pourraient être à l'origine de cette instabilité, dont notamment une perturbation du cytosquelette et du transport axonal ou une altération du métabolisme énergétique. Or, la pathogenèse de la SLA ne dépend pas d'un seul type cellulaire, soulevant la possibilité que cette instabilité puisse également dépendre de facteurs non neuronaux. En accord avec cette possibilité, nous avons observé que les pertes asynchrones de JNMs semblaient se propager à partir d'un point focal au fil du temps (section 2.2.4.5). De même, dans le chapitre IV et lors de travaux antérieurs (Arbour et al., 2015) (annexe 2), nous avons identifié que les propriétés des CSPs étaient altérées dans la SLA, suggérant qu'elles puissent contribuer à cette instabilité. Dans l'ensemble, plusieurs éléments semblent invoquer un mécanisme non autonome.

5.2.1 L'instabilité du cytosquelette et le transport axonal

Étant donné la nature des changements structuraux décrits dans la présente thèse, il est facile d'imaginer que les déficits liés au transport axonal et à la stabilité du cytosquelette dans la SLA puissent être à l'origine de l'instabilité des terminaisons axonales. En effet, la dysfonction du cytosquelette neuronale est l'un des premiers mécanismes de toxicité à avoir été énoncé dans la SLA (section 1.2.1.3). Notamment, le réseau de microtubules axonal semble instable dès les stades précoces de la maladie (60 jours) chez des souris *SOD1^{G93A}* (Fanara et al., 2007). Plusieurs études suggèrent que la SOD1 mutée interagit avec certaines composantes du réseau de microtubules ainsi que plusieurs protéines motrices (revue par (Clark et al., 2016)). Ces interactions pathologiques pourraient notamment expliquer la vulnérabilité accrue des JNMs distales (Figure 2.4; (Tallon et al., 2016)). D'autre part, plusieurs mutations dans le gène de la tubuline α 4A (*TUBA4A*) ont récemment été associées à quelques cas de SLAf (Smith et al., 2014), suggérant qu'une altération du réseau de microtubules soit suffisante pour causer la maladie.

5.2.1.1 Dysfonction du transport axonal antérograde

La perturbation du cytosquelette neuronal est associée à un dysfonctionnement précoce du transport axonal antérograde chez les souris SOD1 (Williamson and Cleveland, 1999; Fanara et al., 2007). Cette diminution du transport antérograde concorde avec l'accumulation de neurofilaments - l'un des cargos antérograde majeur - observée au niveau du corps cellulaire chez les patients SLA (Hirano et al., 1984). Des déficits dans le transport axonal antérograde pourraient notamment limiter l'approvisionnement des terminaisons en facteurs clés, telles les mitochondries, les granules d'ARNm, ou les composantes du cytosquelette elles-mêmes (tubuline et neurofilaments) (Chevalier-Larsen and Holzbaur, 2006; Fallini et al., 2012; Alami et al., 2014). Cette attrition des composantes essentielles à l'axone pourrait mener à son instabilité, et éventuellement au désassemblage des branches axonales les plus affectées.

5.2.1.2 Dysfonction du transport axonal rétrograde

D'autre part, le transport axonal rétrograde est également altéré à un stade très précoce (36 jours) chez les souris SOD1^{G93A}, avant même les premiers signes de perte de JNMs (Perlson et al., 2009; Bilstrand et al., 2010). Bien qu'il soit généralement associé à l'acheminement de facteur trophique vers le corps cellulaire, une dysfonction précoce du transport rétrograde pourrait également contribuer à l'instabilité des terminaisons axonales. En effet, le transport rétrograde contribue également au transport et à l'élimination de déchets cellulaires périphériques tels que les protéines mal-repliées ou les organelles dysfonctionnelles (Chevalier-Larsen and Holzbaur, 2006). Ainsi, cette diminution du transport rétrograde dans la SLA pourrait contribuer à une déstabilisation des terminaisons axonales en y favorisant l'accumulation de déchets toxiques (Chevalier-Larsen and Holzbaur, 2006). En accord avec cette possibilité, l'inhibition chronique du transport axonal rétrograde induit progressivement une perte modérée de JNMs et une dégénérescence des motoneurones chez la souris (LaMonte et al., 2002). Ce mécanisme pourrait notamment être à l'origine de l'accumulation périphérique de mitochondries gonflées et endommagées chez les souris SOD1 et les patients SLA (Vande Velde et al., 2004; Vinsant et al., 2013) et, surprenamment, de l'accumulation de neurofilaments au niveau du corps cellulaire (LaMonte et al., 2002).

5.2.1.3 Désassemblage du cytosquelette d'actine

En plus de l'instabilité du réseau de microtubules et du transport axonal, une déstabilisation du cytosquelette d'actine au niveau des terminaisons axonales pourrait également contribuer au désassemblage de l'élément présynaptique dans la SLA. En effet, plusieurs des facteurs déstabilisants apparaissant à la JNM dans la SLA (section 1.4.1.2) agissent en favorisant la dépolymérisation du cytosquelette d'actine (Moloney et al., 2014). En effet, la SEMA3A agit via son récepteur, la neuropiline-1, afin d'induire un effondrement du cône de croissance en induisant une dépolymérisation du cytosquelette d'actine et du réseau de microtubules (Moloney et al., 2014; Alto and Terman, 2017). De même, Nogo-A induit un désassemblage du cytosquelette d'actine via ses corécepteur LINGO et p75 (Pernet and Schwab, 2012). Ainsi l'apparition précoce de ces facteurs à la JNM dans la SLA pourrait venir déstabiliser les terminaisons axonales des motoneurones.

Dans l'ensemble, ces données suggèrent qu'une désorganisation du cytosquelette neuronal, tant au niveau du réseau de microtubules que du cytosquelette d'actine, pourrait contribuer à la déstabilisation précoce des JNMs que nous avons observée (Figure 5.1). En accord avec ces possibilités, la stabilisation pharmacologique des microtubules retarde le déclenchement de la maladie chez des souris SOD1^{G93A} (Fanara et al., 2007). Ces données semblent ainsi supporter un mécanisme de nature autonome menant à une perte sélective de branches axonales. Néanmoins, ce mécanisme semble insuffisant pour d'expliquer l'entière des événements ayant lieu à la JNM. Notamment, le fait que les pertes de JNMs semblaient se propager à partir d'un point focal est incohérent avec ce mécanisme (section 2.2.4.5). De plus, la SEMA-3A et Nogo-A sont d'origine musculaire ou gliale à la JNM (Dupuis et al., 2002; Jokic et al., 2005; De Winter et al., 2006; Jokic et al., 2006; Maimon et al., 2018), suggérant que ces types cellulaires puissent contribuer à la déstabilisation du cytosquelette neuronal. Finalement, l'inhibition chronique du transport axonal, via la mutation de protéines motrices, est associée à des déficits neuromusculaires moindres ou progressant plus lentement que la SLA chez la souris et l'humain (LaMonte et al., 2002; Chevalier-Larsen and Holzbaur, 2006). De même, certains modèles SOD1, tel la SOD1^{G85R}, ne semblent pas avoir de déficits de transport axonal (au niveau des nerfs périphérique à tout le moins) alors que les souris surexprimant la SOD1 humaine non mutée affichent de légers déficits de transport axonal (Marinkovic et al., 2012). Ainsi, une

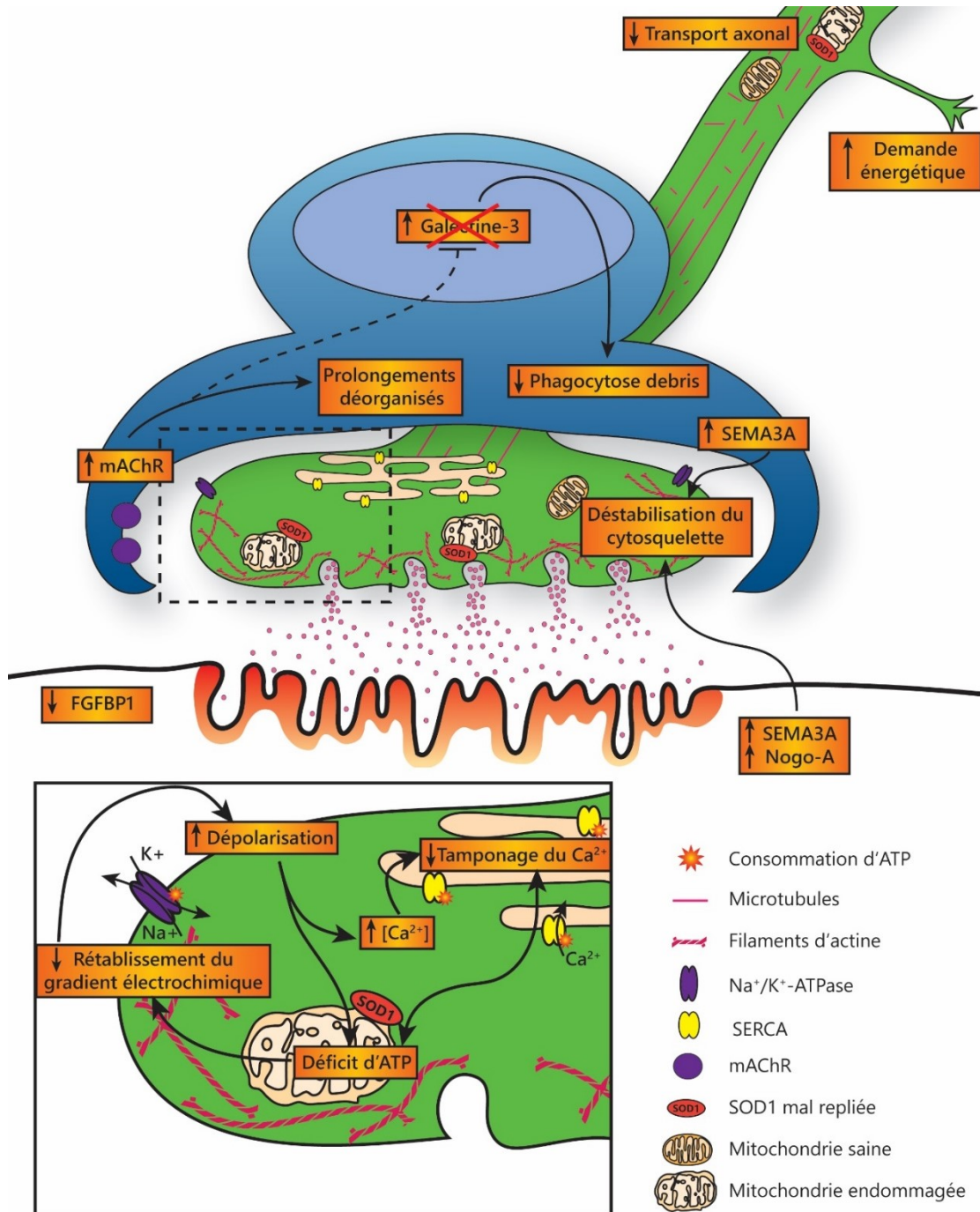


Figure 5.1. Mécanismes autonomes et non autonomes contribuant à l'instabilité des terminaisons axonales dans la SLA. Notamment, une diminution du transport axonal, une perturbation du métabolisme énergétique (encadré), une altération de la capacité des CSPs à promouvoir la réinnervation, notamment l'absence du facteur phagocytaire Gal-3 et la désorganisation des prolongements gliaux, ainsi l'apparition signaux déstabilisateurs (SEMA3A et Nogo-A) provenant de la fibre musculaire pourraient tous contribuer à la perte de JNMs dans la SLA. Les flèches pointillées représentent des liens hypothétiques. Encadré : une perturbation locale du métabolisme énergétique peut créer une boucle de rétroaction où le manque d'ATP ralentit le rétablissement du gradient électrochimique, augmentant ainsi la dépolarisation et l'entrée de calcium et ralentissant également le tamponage du calcium via la SERCA. La propagation de cette dépolarisation crée une demande énergétique accrue dans les régions avoisinantes, propageant ainsi le déficit énergétique.

perturbation du transport axonal en soi semble insuffisante afin d'expliquer la perte de JNMs dans la SLA. Ces résultats n'excluent cependant pas qu'une désorganisation du cytosquelette axonale ait d'autres conséquences délétères sur les terminaisons axonales.

5.2.2 L'altération du métabolisme énergétique : un lien entre la perte de JNMs, la taille de l'axone et la vulnérabilité sélective.

5.2.2.1 L'impact d'un déficit énergétique

Étant de grandes cellules polarisées ayant une fonction complexe, les motoneurones, comme bien d'autres neurones, ont une demande énergétique élevée. Ils doivent notamment supporter un transport axonal efficace, maintenir l'homéostasie ionique et de l'excitabilité, et entretenir une activité synaptique robuste et soutenue (Vandoorne et al., 2018). Or, les neurones ont peu de réserves énergétiques et sont quasi entièrement dépendants de la phosphorylation oxydative afin de générer de l'ATP (Vandoorne et al., 2018). Cette caractéristique les rend particulièrement vulnérables à une perturbation de leur métabolisme énergétique.

Ainsi, un autre mécanisme pouvant contribuer à l'instabilité des terminaisons axonales que nous avons observée serait une altération du métabolisme énergétique neuronal. Cette hypothèse est notamment basée sur des travaux théoriques effectués par Le Masson et al. (2014) montrant que des déficits énergétiques au niveau des branches distales pourraient se propager et créer une panoplie de dysfonctions neuronales ayant été observées dans la SLA. En effet, selon leur modèle, une baisse locale d'ATP ralentirait le rétablissement du gradient électrochimique et la recapture du calcium suite à un potentiel d'action, créant une dépolarisation accrue lors d'une décharge soutenue (bloc de dépolarisation) et augmentant donc la quantité d'ATP nécessaire à rétablir le gradient électrochimique (Figure 5.1). Cette dépolarisation accrue se propage à travers l'axone et vers le corps cellulaire, créant ainsi des déficits en ATP de plus en plus généralisés et une accumulation de calcium cytosolique. Ainsi, des déficits énergétiques locaux au niveau des JNMs pourraient créer une boucle sans fin où des déficits fonctionnels se propagent et engendrent de plus grands déficits énergétiques.

En accord avec ce modèle théorique, une décharge soutenue des axones moteurs induit une dépolarisation transitoire accrue et prolongée des mitochondries au niveau des terminaisons

chez des souris SOD1 (Nguyen et al., 2009; Nguyen et al., 2011b). Ce phénomène est généralement associé à une diminution de la synthèse d'ATP et de la capacité à tamponner le calcium. De surcroît, cette dépolarisation s'amplifie lors de décharges répétées et semble induire une ouverture momentanée du pore de perméabilité transitoire mitochondrial chez les animaux symptomatiques (mPTP; « mitochondrial permeability transition pore ») (Nguyen et al., 2011b). Ce phénomène est entre autres associé à une surcharge de calcium et peut provoquer une sortie massive d'ions, un gonflement de la mitochondrie, un arrêt de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP, et potentiellement une induction de la nécrose (Tsujimoto and Shimizu, 2007).

Ensemble, ces données supportent un modèle selon lequel des déficits énergétiques locaux pourraient enclencher une cascade menant à une propagation de déficits énergétiques et fonctionnels, et éventuellement à une perte sélective des JNMs affectées. Néanmoins, tout comme pour la perturbation du cytosquelette, cette altération seule ne semble pas suffisante pour expliquer la perte de JNMs. En effet, l'augmentation de la capacité des mitochondries à tamponner le calcium et la prévention de l'ouverture du mPTP (via l'inactivation du gène de la cyclophiline-D) n'ont pas d'effet sur la perte de JNMs (Parone et al., 2013). En effet, le croisement de plusieurs modèles SOD1 à des souris déficientes en cyclophiline-D ralentissait la perte de motoneurone et réduisait la réactivité astrocytaire sans affecter la perte de JNMs. Ainsi, cette étude semble suggérer que ce mécanisme ne soit pas la cause primaire de la perte de JNMs. Néanmoins, la fonction mitochondriale suite à la délétion de la cyclophiline-D fut évaluée au niveau de la moelle épinière, là où les signes pathologiques furent largement diminués. Ainsi, il demeure incertain si cette manipulation génétique fut suffisante afin de rétablir la fonction des mitochondries périphériques.

5.2.2.2 La taille de l'arborisation axonale et le métabolisme énergétique

Un élément important à considérer dans ce mécanisme est l'expansion progressive de la taille de l'arborisation axonale des motoneurones que nous avons observée, principalement chez les femelles *loxSOD1^{G37R}* (section 3.2.3.1). Malgré le désassemblage progressif des terminaisons axonales, les axones moteurs forment de nombreux bourgeons axonaux, masquant la perte de JNMs et augmentant même souvent la taille de l'arborisation axonale. Cet assemblage de nouvelles branches axonales est certainement très énergivore et vient

potentiellement accentuer le fardeau énergétique déjà imposé aux motoneurones. De manière intéressante, des études récentes sur une autre population de neurones ayant une grande arborisation axonale, les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte, ont montré que la taille de l'arborisation axonale d'un neurone semblait en effet intimement liée à son métabolisme énergétique (Pacelli et al., 2015). Dans le contexte de la maladie de Parkinson, ces neurones sont largement plus vulnérables qu'une autre population de neurones dopaminergiques voisine, les neurones de l'aire tegmentaire ventrale, ayant une arborisation axonale environ deux fois plus petite (Pacelli et al., 2015). Ce concept concorderait avec le patron de vulnérabilité sélective observée dans la SLA au niveau des motoneurones inférieurs. Les motoneurones α de type FF ont une grande arborisation axonale comparativement à ceux de type FR ou S ou aux motoneurones γ (Kanning et al., 2010). Le modèle proposé par Le Masson et al. (2014) est également en accord avec ce principe, ayant montré que la taille de l'arborisation axonale d'un motoneurone de type FF facilitait l'accumulation de déficits énergétiques comparativement à celle d'un type S.

En ce sens, le bourgeonnement excessif des axones moteurs chez les femelles *loxSOD1^{G37R}* pourrait ultimement avoir un effet néfaste sur la perte de JNMs et la survie neuronale. En accord avec cette possibilité, nous avons observé que la progression des symptômes moteurs était légèrement plus rapide chez les femelles *loxSOD1^{G37R}* que chez les mâles (section 3.2.3.2). Cette perte de fonction accrue chez les femelles était associée à une augmentation de la perte de JNMs et de la mort neuronale (section 3.2.3.3). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le bourgeonnement excessif des axones moteurs vers des JNMs n'appartenant pas à leur unité motrice pourrait avoir l'effet pervers d'augmenter le fardeau énergétique des motoneurones, contribuant ainsi à leur perte.

5.2.2.3 La SOD1 mal-repliée et l'altération de la fonction mitochondriale

Une question demeure cependant : d'où émanerait le déficit énergétique initial postulé par Le Masson et al. (2014) ? Une explication intéressante pourrait être l'association des formes mal-repliées de SOD1 avec la membrane mitochondriale externe (Pickles and Vande Velde, 2012). En effet, des études récentes ont montré que plusieurs isoformes distinctes de SOD1 mal-repliées coexistaient au sein d'un même motoneurone, et que certains s'associaient

préférentiellement avec les mitochondries. Cette association des SOD1 mal-repliées avec les mitochondries est un évènement précoce, précédant l'apparition des symptômes dans plusieurs modèles SOD1 (Vande Velde et al., 2008; Gros-Louis et al., 2010; Vande Velde et al., 2011; Pickles et al., 2013; Pickles et al., 2016). Notamment, les isoformes reconnus par les anticorps conformationnels B8H10, AMF7-63 et DSE2-3H1 s'associent avec la membrane mitochondriale externe et sont associées avec une perturbation de la morphologie et de la fonction mitochondriale, incluant une augmentation de la production d'anion superoxyde et une diminution de la conductance du canal anionique VDAC (Vande Velde et al., 2008; Israelson et al., 2010; Pickles et al., 2013; Pickles et al., 2016). Ce dernier est notamment responsable du transport de plusieurs métabolites, dont l'ATP et l'ADP. Cette association entre la SOD1 mal-repliée et les mitochondries perturbent donc de nombreuses fonctions mitochondriales, expliquant potentiellement pourquoi l'inactivation de la cyclophiline D n'a affecté que certains éléments de la dégénérescence neuronale dans la SLA (Parone et al., 2013). De manière intéressante cependant, l'antigène B8H10 n'est pas détecté à la JNM de souris SOD1^{G37R} (données non publiées liées à mon projet), suggérant que l'association de cette isoforme avec les mitochondries au niveau des terminaisons axonales ne puisse être à l'origine de déficits mitochondriaux à ce niveau. Un autre isoforme cependant, celui reconnu par l'anticorps A5C3, s'associe avec les mitochondries axonales des motoneurones (au niveau des racines ventrales à tout le moins) (Vande Velde et al., 2011), mais son impact sur la fonction mitochondriale demeure inconnu. Des études additionnelles évaluant la présence des diverses espèces de SOD1 mal-repliée à la JNM, notamment les isoformes DSE2-3H1-, AMF7-63- et A5C3-positifs, et leur impact sur la fonction mitochondriale pourraient élucider si ce mécanisme contribue à l'instabilité des terminaisons axonales dans la SLA SOD1-dépendante.

D'autre part, une étude récente suggère que la mitophagie, l'un des mécanismes responsables de l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles, est altérée chez des souris SOD1^{G93A}, notamment au niveau des JNMs (Rogers et al., 2017). En effet, contrairement aux corps cellulaires, le nombre de mitophagosomes n'augmenterait pas au niveau des terminaisons axonales malgré la présence de mitochondries endommagées. Cette diminution de l'élimination de mitochondries dysfonctionnelles pourrait causer des déficits énergétiques locaux et contribuer à la perte de JNMs. En effet, l'accumulation de mitochondries endommagées au

niveau des terminaisons axonales, via l'excision conjointe des gènes Parkin et Pink-1 impliqués dans la mitophagie, semble suffisante afin d'induire une légère dénervation des JNMs (Rogers et al., 2017).

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le métabolisme énergétique des motoneurones et de leur axone serait un facteur contribuant à leur susceptibilité dans la SLA. En effet, une perturbation de ce métabolisme ou une diminution locale de la disponibilité de l'ATP peuvent engendrer une cascade d'évènements se propageant au sein de leur arborisation axonale (Figure 5.1). Au fil du temps, il est possible de concevoir qu'une répétition de ces déficits énergétiques pourrait mener à des dommages cellulaires substantiels, notamment aux mitochondries, et ainsi créer de l'instabilité au niveau des branches axonales les plus affectées. Néanmoins, une validation expérimentale de ce modèle demeure nécessaire. De plus, ce modèle n'exclut pas que les déficits énergétiques initiaux ne soient pas un élément déclencheur, mais plutôt une conséquence d'autres dysfonctions au sein de l'axone ou une prédisposition au déclenchement d'une cascade dégénérative en réponse à d'autres éléments perturbateurs. En effet, l'expression de la SOD1 mutée dans les motoneurones, malgré son association avec les mitochondries, n'est ni suffisante ni nécessaire au déclenchement de la maladie (Pramatarova et al., 2001; Lino et al., 2002; Boillee et al., 2006b).

5.2.3 Les CSPs : un élément crucial régulant la stabilité et la réinnervation

De manière intéressante, un autre facteur pouvant contribuer à l'instabilité des terminaisons axonales serait une altération de la fonction des CSPs. Les CSPs sont essentielles au maintien de la stabilité de cette synapse (Reddy et al., 2003) (section 1.3.1.3). D'autre part, les CSPs régulent de nombreux aspects de la réinnervation des JNMs (Son et al., 1996; Ko and Robitaille, 2015) et contribuent vraisemblablement à l'absence de bourgeonnement terminal, et potentiellement à l'absence de réinnervation autologue, que nous avons observée (section 2.2.4.4 et 4.3.5.12). Fait intrigant, les CSPs peuvent interagir avec les mécanismes pathologiques proposés ci-dessus, ayant la capacité de sécréter la SEMA3A (De Winter et al., 2006), et de réguler la réinnervation et donc l'expansion de l'arborisation axonale (Ko and Robitaille, 2015), et ainsi indirectement leur consommation d'ATP.

5.2.3.1 L'altération de la signalisation calcique

La première altération dans la fonction des CSPs à être observée est l'altération de leur signalisation calcique. Ce changement se manifeste dès l'âge de 120 jours dans le *Soleus* de souris *SOD1^{G37R}*, précédant l'apparition des symptômes par plus de 10 mois (Arbour et al., 2015). De plus, cette altération s'accroît avec la progression de la maladie et dépend du type d'unité motrice auxquelles les CSPs sont associées (Arbour et al., 2015) (section 4.3.5.1). De manière simplifiée, ces changements se traduisent par une augmentation de la signalisation muscarinique ainsi qu'une légère diminution de la signalisation purinergique aux JNMs les plus vulnérables (Arbour et al., 2015) (section 4.3.5.4).

Bien que, selon nos connaissances actuelles, la signalisation calcique des CSPs soit principalement importante pour la régulation de l'activité présynaptique (section 1.3.1.3.2), elle reflète également l'activité des récepteurs à travers lesquels elles détectent l'activité synaptique (mAChR et P2YR). Cette fonction des CSPs est à la base de leur capacité à adapter leur phénotype selon le contexte synaptique. En effet, le blocage de la transmission synaptique ou des mAChRs reproduit des changements analogues à ceux induits par une dégénérescence de la terminaison axonale (Georgiou et al., 1994; Georgiou et al., 1999). De même, l'activation des mAChR suite à un blocage de la transmission synaptique prévient cette adaptation des CSPs (Georgiou et al., 1994; Georgiou et al., 1999), suggérant que l'augmentation de la signalisation muscarinique que nous avons observée chez les souris *SOD1* pourrait reproduire ce phénomène et nuire à la réinnervation. En contrepartie, le blocage chronique de ces mêmes récepteurs à des JNMs saines a pour effet de les déstabiliser, induisant de nombreux changements incluant une formation excessive de bourgeons terminaux et parfois même une dénervation partielle ou complète de certaines JNMs (Wright et al., 2009). Ainsi, une augmentation de la signalisation muscarinique pourrait représenter une adaptation compensatoire des CSPs afin de stabiliser les JNMs chez les souris *SOD1*. En accord avec cette possibilité, l'augmentation de l'activité des mAChRs semble plus prononcée au niveau des unités motrices S et FR (Arbour et al., 2015) qu'au niveau des unités motrices FF (section 4.3.5.2).

5.2.3.2 La réponse inadéquate à la dénervation et l'impact sur la réinnervation

Afin de tenter de distinguer ces deux possibilités, nous avons évalué si les changements dans la signalisation calcique étaient associés à une incapacité des CSPs à adopter un phénotype « prorégénérateur » suite à la dénervation des JNMs. Nos résultats montrent qu'un grand nombre de CSPs semblent incapables d'adapter leur phénotype dans des souris *SOD1^{G37R}*, autant suite à une lésion axonale présymptomatique que durant le désassemblage des JNMs durant la phase symptomatique (section 4.3.5.6 et 4.3.5.8). Notamment, la majorité des CSPs n'augmentent pas leur expression de la Galectine-3, et forment des prolongements désorganisés et souvent dépourvus de bourgeons terminaux lorsqu'ils contactent des JNMs innervées de type FF.

Ce dernier aspect suggère que les mécanismes responsables de l'initiation du bourgeonnement lorsque deux JNMs sont liées par un pont glial sont altérés au niveau des unités motrices FF dans la SLA. Ce phénomène explique vraisemblablement l'absence de bourgeonnement terminal qui a été observé lors de l'imagerie *in vivo* répétée des arborisations axonales uniques (65/76 expansions par bourgeonnement axonal). Néanmoins, l'identité de ces mécanismes demeure inconnue. Une hypothèse intéressante pourrait être liée à l'expression de la SEMA3A. En effet, les CSPs associées aux unités motrices FF expriment la SEMA3A suite à une dénervation chez des souris *SOD1* (De Winter et al., 2006). Les prolongements issus de ces CSPs aux JNMs dénervées pourraient donc sécréter cette molécule chémorepulsive, empêchant ainsi la croissance axonale à travers ce prolongement. En accord avec cette possibilité, l'administration d'un anticorps anti-neuropiline-1, le récepteur de la SEMA3A sur les motoneurones, ralentit légèrement la perte globale de JNMs chez des souris *SOD1^{G93A}* (Venkova et al., 2014).

D'autre part, l'absence d'augmentation de l'expression de la Galectine-3 suggère que l'élimination des débris axonaux soit retardée. En effet, bien que le mécanisme exact demeure inconnu, l'expression de Galectine-3 est associée à une augmentation de la phagocytose gliale (Reichert et al., 1994; Morizawa et al., 2017) et son absence corrèle avec la présence de débris extracellulaires aux JNMs (section 4.3.5.5). De même, l'expression d'un autre membre de la famille des galectines dans les CSPs, la Galectine-1, est également associée à l'élimination de l'élément présynaptique suite à une lésion (Plachta et al., 2007). L'accumulation de débris

axonaux ralentit considérablement la croissance axonale (Kang and Lichtman, 2013) et pourrait induire des délais dans la réinnervation des JNMs. En effet, bien que l'échantillon soit petit, nous avons observé que seulement certaines des JNMs ayant été perdues par l'unité motrice imagée avaient été réinnervées par l'unité motrice voisine, malgré la présence d'une branche axonale à proximité (section 2.2.7, figure 2.11 par exemple). Ce phénomène pourrait être lié à un délai dans l'élimination des débris au niveau de la plaque motrice, bloquant l'accès aux axones régénérant. De même, une accumulation de « débris autologues » pourrait être à l'origine de l'incapacité des unités motrices à réinnervier leurs propres JNMs.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la capacité des CSPs à adopter un phénotype « prorégénérateur » soit altérée dans la SLA. Cette altération du phénotype des CSPs aux JNMs dénervées pourrait contribuer aux divers déficits de réinnervation observés *in vivo*, supportant l'idée que l'augmentation de leur signalisation muscarinique serait néfaste pour la réinnervation dans la SLA. Tel que mentionné précédemment, ce processus semble ralenti suite à une lésion axonale complète (Sharp et al., 2005; Pun et al., 2006; Henriques et al., 2011; Swarup et al., 2012; Mesnard et al., 2013; Carrasco et al., 2016b). Bien que ce modèle expérimental ne reproduise pas fidèlement les événements ayant lieu durant la progression de la SLA, excluant notamment plusieurs mécanismes dépendants des CSPs, ces données abondent néanmoins dans le même sens que celles présentées dans cette thèse en suggérant que plusieurs mécanismes favorisant la réinnervation soient altérés dans la SLA. Afin de valider cette hypothèse, il demeure néanmoins nécessaire de mesurer directement l'impact du phénotype des CSPs sur la réinnervation dans un contexte expérimental plus représentatif de la dénervation endogène dans la SLA, tel que suite à la lésion de branches axonales individuelles. Un tel type de lésion peut notamment être induit *in vivo* grâce à la microscopie à deux photons chez des souris exprimant un marqueur fluorescent dans leurs motoneurones (Turney and Lichtman, 2012; Turney et al., 2012).

5.2.3.3 Les CSPs et la vulnérabilité sélective

Un autre aspect suggérant que les CSPs puissent jouer un rôle clé dans l'instabilité des terminaisons axonales est le fait que leur phénotype corrèle globalement avec la vulnérabilité sélective des JNMs dans la SLA. En effet, nous avons observé qu'une plus grande proportion

de CSPs avait adopté un phénotype « prorégénérateur » au niveau des JNMs dénervés du *Soleus* que du *Sternomastoïdien*. De plus, seules les CSPs aux JNMs de type FF expriment la SEMA3A suite à une dénervation (De Winter et al., 2006). Finalement, les CSPs associées aux unités motrices FF semblaient incapables d'induire le bourgeonnement des terminaisons axonales voisines contrairement à celles associées aux unités motrices FR ou S (section 4.3.5.12). Ainsi, en tirant profit du rythme de dénervation similaire du *Soleus* et du *Sternomastoïdien*, nous avons pu évaluer l'impact du type d'unité motrice sur le phénotype des CSPs en présence d'un taux similaire de dénervation. Ces résultats suggèrent que la différence de phénotype entre les CSPs pourrait contribuer à la différence de vulnérabilité entre les JNMs dans la SLA. L'évaluation du phénotype des CSPs à des JNMs résistantes à la SLA, telles les JNMs des muscles oculomoteurs ou celles des motoneurons γ au sein des fuseaux neuromusculaires, pourrait certainement venir confirmer cette tendance.

De manière intéressante, les propriétés des CSPs chez l'animal sain semblent également dépendre du type d'unité motrice auxquelles elles sont associées. En effet, la proportion de CSPs exprimant la Galectine-3 après une dénervation était légèrement inférieure pour les JNMs de type FF que celles de type FR ou S (section 4.3.5.8). De même, les JNMs de type FF sont moins susceptibles de former des bourgeons terminaux que les JNM de type FR ou S (Brown et al., 1980; Frey et al., 2000) bien qu'autant de prolongements gliaux semblent être formés suite à une dénervation (section 4.3.5.11). De même, les propriétés calciques des CSPs semblent également varier selon le type d'unités motrices auxquelles elles sont rattachées (Rousse et al., 2010). Ces résultats suggèrent que des différences intrinsèques entre les CSPs associées aux différents types d'unités motrices pourraient contribuer à la différence dans leur réponse à la dénervation dans la SLA.

Néanmoins, une des propriétés des CSPs ne semble pas concorder avec le gradient de vulnérabilité des JNMs dans la SLA. En effet, l'augmentation de la signalisation muscarinique des CSPs était largement plus marquée au niveau des JNMs de type S et FR que des JNMs de type FF (Arbour et al., 2015) (section 4.3.5.2). Ainsi, bien qu'elle soit présente à tous les types de JNMs et qu'elle puisse prévenir l'adoption d'un phénotype de réparation à tous les types de JNMs, l'augmentation de la signalisation muscarinique semble refléter l'inverse du gradient de vulnérabilité sélective. Une explication possible pour ce phénomène serait que l'augmentation

de la signalisation muscarinique ait un effet biphasique, augmentant initialement la stabilité des JNMs, mais nuisant à la réinnervation lorsque la JNM finit par être dénervée. Alternativement, une autre possibilité serait que la signalisation purinergique contribue également à l'altération du phénotype des CSPs. L'évaluation isolée de l'activité des récepteurs mAChR prodiguerait ainsi un portrait incomplet des propriétés des CSPs. En accord avec cette possibilité, la sensibilité des récepteurs purinergiques semblait inchangée ou légèrement augmentée aux JNMs de type S ou FR (Arbour et al., 2015), mais diminuée aux JNMs de type FF. De plus, bien qu'elle n'ait pu être mesurée directement, leur activité semblait également diminuée lors de la communication synaptique (section 4.3.5.4). De manière intéressante, l'activation des récepteurs purinergiques au niveau des CSMs semble favoriser la réinnervation suite à une lésion axonale (Vrbova et al., 2009), suggérant très indirectement que ceux-ci pourraient jouer un rôle similaire au niveau des CSPs. Néanmoins, contrairement aux mAChRs l'impact de ces récepteurs sur le phénotype « prorégénérateur » des CSPs et sur la stabilité et la réinnervation des JNMs demeure largement inconnu et devrait être investigué plus en profondeur. Ainsi, l'évaluation des sous-types de récepteurs purinergiques présents à la JNM adulte, notamment grâce au séquençage d'ARNm de cellules uniques (« single-cell RNA sequencing », scRNAseq, voir section 5.2.3.5), et l'évaluation de leur fonction à la JNM adulte pourraient nous éclairer quant à cette possibilité.

5.2.3.5 Les CSPs contribuent-elles pour autant à la perte de JNM et à la SLA?

Dans l'ensemble, les changements que nous avons observés semblent indiquer que les CSPs peuvent contribuer à la perte de JNMs chez les souris SOD1 et semblent même être un facteur clé lors de la progression de la maladie. Néanmoins, l'impact de ces changements reste à mesurer directement, et la contribution de la SOD1 mutée reste à évaluer. En effet, tel que mentionné précédemment, les études antérieures ayant tenté d'évaluer l'impact de la présence de SOD1 mutée dans les CSPs sur la maladie n'ont pas réussi à cibler un grand nombre de CSPs (Lobsiger et al., 2009; Turner et al., 2010; Wang et al., 2012). Le promoteur utilisé dans ces études, P0, n'est pas fortement exprimé par les CSPs contrairement aux CSMs et, selon les auteurs de l'une d'entre elles, seulement 30 à 50% des CSPs semblaient avoir été affectées (Lobsiger et al., 2009). D'autre part, les CSPs pourraient contribuer à la maladie indépendamment de l'expression de SOD1, au même titre que les lymphocytes T par exemple

(section 1.2.3.4). Cette éventualité signifierait simplement que les CSPs ne sont pas le site primaire de la toxicité de SOD1, mais plutôt qu'elles réagissent de manière mal-adaptée à l'atteinte des motoneurones. Néanmoins, aucune étude à ce jour n'a tenté de rétablir spécifiquement leurs fonctions, notamment en raison de l'absence d'outils génétiques permettant de les cibler spécifiquement et chroniquement. Ainsi, la contribution des CSPs au déclenchement et à la progression de la maladie, bien que probable, demeure non quantifiée. Une étude approfondie du transcriptome des CSPs, notamment en relation avec celui des CSMs, permettra probablement d'identifier des marqueurs et des promoteurs spécifiques aux CSPs qui pourraient être utilisés afin de répondre à ces questions. Le développement récent de technologies permettant le séquençage des ARNs messagers provenant d'une multitude de cellules uniques et leur regroupement selon leur profil d'expression (scRNAseq, technologie 10X (Zeisel et al., 2018)) rend réalistement possible l'atteinte de cet objectif sans avoir à physiquement isoler les CSPs des CSMs.

Nonobstant cet aspect, une autre question importante demeure quant à la contribution des CSPs aux changements à la JNM chez des souris SOD1 : sont-elles bénéfiques ou délétères? En effet, leur incapacité à adopter un phénotype « prorégénérateur », tel que montré au chapitre IV, et leur expression de la SEMA3A suggèrent un effet délétère favorisant le désassemblage des JNMs et limitant la réinnervation lors de la période symptomatique de la maladie. Néanmoins, tel que mentionné précédemment l'augmentation précoce de la signalisation muscarinique pourrait refléter un mécanisme compensatoire visant à préserver la stabilité des JNMs. En ce sens, les CSPs pourraient également avoir un rôle biphasique chez les souris SOD1, ayant un rôle neuroprotecteur durant la phase présymptomatique, mais mal-adapté et délétère une fois la dénervation des JNMs entamée. Cette possible contribution ne serait pas sans rappeler celle de la microglie et des autres cellules immunitaires. Néanmoins, certains de nos résultats ne semblent pas en accord avec cette idée. Notamment, certaines CSPs associées aux JNMs de type FF innervées exprimaient la Galectine-3 de façon aberrante (section 4.3.5.9) suggérant un rôle délétère ou maladapté aux JNMs innervées. De même, l'expression de la Galectine-3 concordait avec l'élément présynaptique aux JNMs partiellement dénervées (section 4.3.5.10).

Dans l'ensemble, l'altération de la fonction des CSPs suggère fortement qu'elles pourraient être impliquées dans le démantèlement et l'altération de la réinnervation des JNMs chez les souris SOD1, bien que les données disponibles à ce jour ne soient pas suffisantes afin de l'affirmer (Figure 5.1). Des études ultérieures, utilisant notamment des outils génétiques permettant de cibler spécifiquement les CSPs, permettront certainement d'évaluer plus précisément leur contribution à ce phénomène.

5.2.4 Et les autres types cellulaires présents à la JNM?

Outre les CSPs, les fibres musculaires elles-mêmes pourraient être en mesure de contribuer à la déstabilisation des terminaisons axonales et au remodelage des unités motrices présentées dans cette thèse. Premièrement, plusieurs des molécules déstabilisantes ayant été identifiées sont d'origine musculaire (SEMA3A, Nogo-A, APP) (Jokic et al., 2005; Jokic et al., 2006; Bryson et al., 2012; Maimon et al., 2018). Deuxièmement, plusieurs études ont montré qu'il était possible de ralentir la dénervation en modulant des voies de signalisation musculaires, notamment l'axe Agrine-MuSK-LRP4 via la surexpression de MuSK ou de son coactivateur Dok7 (Perez-Garcia and Burden, 2012; Miyoshi et al., 2017; Cantor et al., 2018). Bien qu'il soit incertain que l'expression de l'un de ces facteurs ou de l'Agrine soit altérée dans la SLA, ces études montrent que les fibres musculaires peuvent affecter la perte de JNMs. Finalement, les facteurs miR-206 et FGFBP1 sont également d'origine musculaire et contribuent à favoriser le maintien et/ou la réinnervation des JNMs dans la SLA (Williams et al., 2009). Ainsi, la réduction de l'expression musculaire de FGFBP1, potentiellement liée à l'augmentation des niveaux de TGF β 1, contribue donc potentiellement aux déficits de réinnervation et à l'instabilité des JNMs dans la SLA (Williams et al., 2009; Taetzsch et al., 2017). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que les fibres musculaires soient en mesure d'affecter la perte de JNMs dans la SLA.

Néanmoins, plusieurs éléments restent à déterminer dans l'évaluation de la controversée contribution des fibres musculaires à la perte de JNMs chez les souris SOD1. Notamment, pour la plupart des voies de signalisation mentionnées ci-dessus, il est incertain si elles sont nécessaires et/ou suffisantes afin d'induire une perte locale de JNMs, ou si elles ne font que moduler ce processus. De plus, tel que mentionné précédemment, un élément central de cette controverse repose sur le lien incertain entre ces effets dépendants des fibres musculaires et

l'expression de la SOD1 mutée (section 1.2.3.3). En effet, à l'instar des CSPs, il est incertain que l'expression de la SOD1 mutée par les fibres musculaires soit nécessaire pour induire les changements moléculaires ci-dessus, et si elle contribue à la perte de JNMs et à la progression de la maladie. Néanmoins, tout comme pour les CSPs et les lymphocytes T, les fibres musculaires pourraient contribuer à la maladie indépendamment de leur expression de la SOD1 mutée. Ainsi, bien que des études ultérieures permettront certainement d'approfondir nos connaissances de la contribution des fibres musculaires à la SLA, il semble clair qu'elles soient à tout le moins en mesure de moduler la perte et la réinnervation des JNMs.

D'autre part, les cellules immunitaires périphériques ne contribuent pas nécessairement à la SLA en agissant exclusivement au niveau du SNC. En effet, les monocytes/macrophages n'infiltrant pas la moelle épinière de souris SOD1 (Ajami et al., 2007), infiltrant plutôt les nerfs périphériques (Chiu et al., 2009; Graber et al., 2010) et les muscles (Chiu et al., 2009; Wang et al., 2017). Notamment, l'inactivation du gène du C5αR1 (CD88), le récepteur d'un élément chémoattractif de la cascade du complément, ralentit la dénervation des JNMs et réduit l'infiltration des macrophages au niveau des muscles chez souris SOD1^{G93A}. Ces données suggèrent indirectement que ceux-ci pourraient influencer l'innervation des JNMs (Wang et al., 2017). De même, certaines études rapportent la présence d'anticorps contre certains éléments des terminaisons axonales chez les patients atteints de la SLA (Appel et al., 1993). La présence de ces anticorps pourrait suggérer une implication des lymphocytes T et B au niveau des JNMs dans la SLA, bien que ces hypothèses demeurent à être validées. Finalement, deux études récentes documentent une présence accrue de neutrophiles et de mastocytes au niveau des JNMs et des nerfs périphériques chez des rats SOD1^{G93A} et des patients atteints de la SLA (Trias et al., 2017; Trias et al., 2018), suggérant que ces types cellulaires puissent également être impliqués via un mécanisme demeurant encore à être démontré. Bien que non spécifique à ce phénomène, l'administration d'un anticorps bloquant plusieurs types de récepteurs tyrosine-kinase semble diminuer l'infiltration de ces types cellulaires et améliorer l'innervation des JNMs chez ces rats, suggérant, encore indirectement, que ces deux phénomènes puissent être liés (Trias et al., 2017; Trias et al., 2018). Ainsi, bien qu'aucune association concrète et claire n'ait été faite entre la perte de JNMs et le système immunitaire périphérique, plusieurs éléments suggèrent qu'il serait pertinent d'évaluer cette possibilité.

Dans l'ensemble, ces études suggèrent qu'en plus des CSPs, les fibres musculaires et les cellules immunitaires périphériques semblent en mesure d'influencer la perte de JNMs. Ainsi, bien que plusieurs questions demeurent en suspens, il est aisément envisageable que le démantèlement des terminaisons présynaptiques et l'altération de la réinnervation des JNMs soient des processus non autonomes chez des souris SOD1. Des études futures visant à préciser les mécanismes par lesquels ces différents types cellulaires interagissent avec la perte de JNMs et à quantifier leur contribution au déclenchement et à la progression de la maladie demeurent néanmoins nécessaires.

5.3 La ressemblance avec l'élimination synaptique postnatale

La perte asynchrone de branches axonales que nous avons observée chez les souris SOD1^{G37R} n'est pas sans rappeler l'élimination synaptique ayant lieu à la JNM durant le développement. En effet, lors du développement embryonnaire, plusieurs motoneurons α forment une terminaison axonale sur un même site postsynaptique, créant une JNM dite polyinnervée (Bennett and Pettigrew, 1974; Purves and Lichtman, 1980; Darabid et al., 2014). S'en suit une élimination progressive des terminaisons surnuméraires durant le développement postnatal jusqu'à ce que chaque fibre musculaire soit innervée par une seule terminaison (Bennett and Pettigrew, 1974; Balice-Gordon and Lichtman, 1993; Darabid et al., 2014). De manière intéressante, de nombreuses études provenant des laboratoires du Dr Jeff Lichtman ont pu mettre en lumière que ce processus était de nature asynchrone, et impliquait des mécanismes locaux où la terminaison axonale maintenue favorisait l'élimination spécifique des autres terminaisons voisines. Notamment, les terminaisons d'un axone unique se rétractent progressivement de certaines JNMs tout en maintenant ou en élargissant leur couverture au niveau d'autres JNMs (Keller-Peck et al., 2001; Walsh and Lichtman, 2003). Ces changements au niveau de branches individuelles s'échelonnent sur environ trois semaines au sein de chaque arborisation axonale chez la souris. D'autre part, l'ablation de la terminaison « gagnante » (celle ayant une couverture postsynaptique quasi complète) mène à la repousse et au maintien de la terminaison « perdante » (Turney and Lichtman, 2012). Ces données montrent clairement que la terminaison éliminée n'était pas non-fonctionnelle et qu'un signal local, relié à la présence de l'autre terminaison dans ce cas-ci, favorisait leur rétraction. La période servant à déterminer la terminaison qui sera maintenue porte le nom de « compétition synaptique ». Ainsi, tout comme pour le démantèlement des JNMs chez les souris SOD1^{G37R}, l'élimination synaptique est un processus progressif et asynchrone au sein d'une arborisation axonale unique. Ce processus semble également être causé par des mécanismes locaux menant au désassemblage d'une terminaison sans affecter l'ensemble de l'arborisation axonale.

Ensemble, ces ressemblances suggèrent que des mécanismes similaires puissent être à l'origine du désassemblage des terminaisons axonales durant le développement et la SLA. En effet, certains facteurs clés durant l'élimination synaptique à la JNM ont été impliqués dans la SLA, comme la stabilité du cytosquelette (section 5.2.1). Cette idée serait en accord avec un

modèle mis de l'avant par Dre Beth Stevens, suggérant qu'une réactivation des mécanismes développementaux d'élimination synaptique puisse contribuer à la perte de synapses lors de plusieurs maladies neurodégénératives (Stephan et al., 2012; Salter and Stevens, 2017; Hammond et al., 2018). Selon cette idée, il pourrait être pertinent d'évaluer si d'autres facteurs jouant un rôle crucial dans l'élimination synaptique à la JNM, tels que l'activité synaptique, sont impliqués dans la perte de JNMs chez les souris SOD1. De manière intéressante, des études récentes ont montré que la régulation de l'activité synaptique par les CSPs durant le développement serait un facteur servant à déterminer l'issue de la compétition synaptique (Darabid et al., 2013a; Darabid et al., 2014; Darabid et al., 2018). Ce mécanisme pourrait ainsi représenter une autre façon par lequel l'altération des propriétés calciques des CSPs que nous avons observée pourrait affecter la perte de JNMs.

5.3.1 Désassemblage sélectif du cytosquelette

De manière intéressante, l'élimination synaptique postnatale semble dépendre d'une déstabilisation locale et sélective du cytosquelette axonale, renforçant l'idée qu'un tel mécanisme puisse être impliqué dans le démantèlement des terminaisons axonales chez les souris SOD1^{G37R} (section 5.2.1). En effet, une étude récente a montré, grâce à des souris transgéniques dans lesquels les mitochondries ou les extrémités positives des microtubules étaient couplées à des marqueurs fluorescents, que le réseau de microtubules des branches axonales « perdantes » se déstabilisait graduellement, menant à une diminution du transport axonal antérograde et rétrograde (Brill et al., 2016). Les niveaux d'instabilité des microtubules et de transport axonal variaient graduellement selon le territoire postsynaptique couvert par la terminaison « perdante », suggérant que le réseau de microtubule se déstabilise progressivement plutôt que subitement à la fin du processus d'élimination. De manière intéressante, la stabilisation des microtubules par une approche pharmacologique ou génétique, via l'excision du gène d'un facteur sectionnant les microtubules, la spastine, ralentit considérablement le processus d'élimination synaptique (Brill et al., 2016). Cette expérience confirme que la déstabilisation du réseau de microtubule n'est pas une simple manifestation de l'élimination d'une terminaison axonale durant le développement, mais qu'elle est nécessaire au processus d'élimination synaptique.

Ainsi, une déstabilisation locale du réseau de microtubules pourrait-elle être à l'origine de l'instabilité des terminaisons axonales dans la SLA? Tel que mentionné précédemment, la stabilisation du réseau de microtubule semble légèrement ralentir la progression de la maladie chez des souris SOD1^{G93A} (Fanara et al., 2007). Néanmoins, il est incertain si cet effet est dû à une stabilisation des terminaisons axonales des motoneurones plutôt qu'à un autre effet dans le SNC. D'autre part, l'expression de deux enzymes associés à la déstabilisation des microtubules, la stathmine-1 et la stathmine-2, augmente progressivement dès la naissance chez des souris SOD1^{G93A} et SOD1^{G85R} (Bellouze et al., 2016). De plus, des mutations dans le gène de la spastine ont été associées à une autre maladie des motoneurones, la paraplégie spastique héréditaire, affectant principalement les motoneurones supérieurs contrôlant les membres inférieurs (Solowska and Baas, 2015). Néanmoins, certaines variantes bénignes de ce gène (ne causant pas la paraplégie spastique héréditaire) ont été associées avec un risque légèrement plus élevé de développer la SLA (Meyer et al., 2005; Munch et al., 2008; Cirulli et al., 2015). Bien que deux de ces dernières études soient antérieures à la découverte de la plupart des gènes causant la SLA, ensembles elles suggèrent qu'une perturbation des mécanismes régulant le sectionnement et la stabilité des microtubules pourrait être associée à la SLA.

Ainsi, il pourrait être intéressant de tester l'implication d'un tel mécanisme dans la déstabilisation et le démantèlement des terminaisons axonales durant la SLA. Par exemple, il serait possible de combiner les approches utilisées par Brill et al. (2016) à celles que nous avons utilisées aux chapitres II et III afin d'évaluer *in vivo* si l'instabilité du réseau de microtubule précède le désassemblage asynchrone des terminaisons axonales chez des souris SOD1^{G93A}. En effet, l'utilisation de souris dans lesquels les extrémités positives des microtubules sont marquées (*thy1-EB3-YFP*) a permis de confirmer l'instabilité précoce du réseau de microtubules au niveau du nerf sciatique chez des souris SOD1^{G93A} et SOD1^{G85R} (Kleele et al., 2014). Néanmoins, la stabilité des microtubules au niveau des terminaisons axonales n'a jamais été évaluée. Cette information permettrait de valider si l'instabilité du réseau de microtubules au niveau de branches axonales individuelles est corrélée à la probabilité que ces JNMs soient perdus dans les semaines suivantes. D'autre part, cette approche permettrait d'évaluer le rôle de l'instabilité du réseau de microtubule dans la réinnervation hétérologue et l'expansion des unités motrices que nous avons mis en évidence. En effet, plusieurs facteurs impliqués dans le

sectionnement des microtubules, telle la spastine, sont également impliqués dans la formation de nouvelles branches axonales chez l'animal sain (Yu et al., 2008; Sharp and Ross, 2012). Bien qu'il puisse apparaître contre-intuitif qu'un même facteur soit impliqué dans le démantèlement ou la formation d'une branche axonale, cet effet peut être expliqué par le fait que le sectionnement local des microtubules est nécessaire à l'initiation d'un nouveau segment et à la construction d'un embranchement (Figure 5.2) (Sharp and Ross, 2012). Ainsi un dérèglement des mécanismes régulant l'activité de ces enzymes au sein de l'arborisation axonale d'un neurone pourrait à la fois être à l'origine du démantèlement de branches existantes et de la formation de nouvelles branches. En résumé, l'utilisation de souris *thy1-EB3-YFP* et d'outils génétiques afin de moduler et de tester l'implication de facteurs sectionnant les microtubules au sein des motoneurones semble être une avenue intéressante afin de comprendre les mécanismes menant à la perte de JNMs chez les souris SOD1 et dans la SLA.

5.3.2 Un lien entre l'activité synaptique et l'instabilité des JNMs?

Un autre élément crucial régulant l'élimination synaptique lors du développement postnatal est l'activité synaptique. En effet, de nombreuses études ont permis de clairement établir que ce processus suivait le principe Hebbien voulant qu'une connexion favorisant la décharge de l'élément postsynaptique soit stabilisée (Lichtman and Colman, 2000; Darabid et al., 2014). Notamment, deux études pionnières par Colman et al. (1997) et Kopp et al. (2000) ont montré que la disparité de force synaptique (le contenu quantique, soit la quantité de vésicules libérées par potentiel d'action) entre les deux terminaisons en compétition s'accroissait plus le processus était avancé. Cette augmentation de la disparité entre l'activité des deux terminaisons n'était pas simplement due à une augmentation du territoire couvert par la terminaison « gagnante », mais aussi à une augmentation de la probabilité de relâche de ses zones actives, suggérant que l'augmentation de l'activité présynaptique favorise la croissance de cette terminaison (Kopp et al., 2000). En accord avec ce mécanisme, l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs d'un sous-groupe de motoneurone, via la surexpression du transporteur vésiculaire de l'ACh (vAChT), biaise le processus de compétition synaptique en leur faveur (Buffelli et al., 2003). D'autre part, le taux de décharge des motoneurones se désynchronise progressivement durant le développement, favorisant l'apparition d'un taux de décharge distinct pour chaque motoneurone (Personius and Balice-Gordon, 2001; Buffelli et al.,

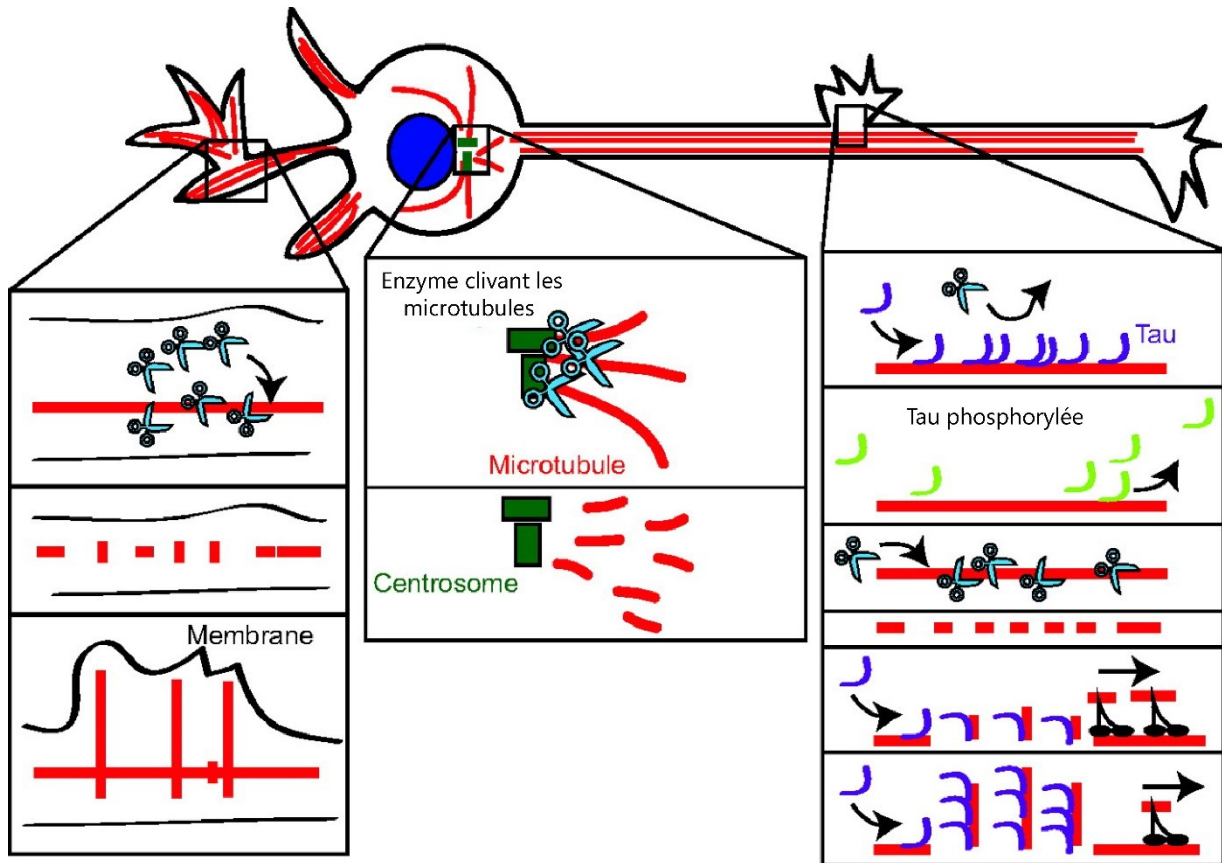


Figure 5.2. Rôles des enzymes clivant les microtubules dans la morphogénèse neuronale. Les enzymes clivant les microtubules (ciseaux bleus) sont enrichies dans les trois compartiments majeurs des neurones adultes et durant le développement. Dans les dendrites (panneau à gauche), les protéines telles la spastine et la katanine coupe les microtubules à chaque embranchement pour promouvoir l'arborisation. Dans le corps cellulaire (panneau central), la katanine est requise pour créer des courts segments de microtubules qui seront transportés le long de l'axone. L'activité de la katanine est régulée par la protéine Tau, dont la déphosphorylation (mauve) protège les microtubules de l'activité de la katanine. L'activité d'autres enzymes, telles que la spastine, n'est pas régulée par Tau, et sert à contrôler la formation d'embranchements dans l'axone. Adapté de (Sharp and Ross, 2012). Droits obtenus de COMPANY OF BIOLOGISTS LTD via le Copyright Clearance Center.

2002). Précipiter la désynchronisation ou augmenter le taux de décharge d'un sous-groupe d'axones accélère l'élimination synaptique (Personius et al., 2007; Favero et al., 2012), alors que la synchronisation du taux de décharge des motoneurones produit l'effet inverse (Busetto et al., 2000; Personius et al., 2008). Dans l'ensemble, ces données montrent que la force relative d'une terminaison axonale et son taux de décharge régule sa stabilité et son maintien lors du développement.

Tel que mentionné précédemment, il semblerait que cet effet trophique de l'activité synaptique ne soit pas dû à une rétroaction stabilisatrice sur la terminaison « gagnante », mais plutôt à la génération d'un signal déstabilisateur ou « punitif » envers la terminaison

« perdante ». Ce modèle, dit « de punition », fut basé sur une expérience pionnière à la JNM adulte (monoinnervée) montrant que le blocage irréversible d'un petit regroupement de récepteurs postsynaptiques à la JNM menait à l'élimination de la portion de la terminaison axonale superposée à ces récepteurs, alors que le blocage complet de toute la surface postsynaptique n'affectait pas le maintien de la terminaison (Balice-Gordon and Lichtman, 1994). Cette expérience fut importante, car elle dévoila deux aspects clés gouvernant le maintien de la structure des JNMs adultes, et contribuant potentiellement à la compétition synaptique. Premièrement, elle mit en évidence l'existence d'un signal « de punition », favorisant l'élimination d'une portion d'une terminaison axonale, ou présumément d'une terminaison axonale entière lors du développement, n'étant pas capable d'activer suffisamment l'élément postsynaptique. Deuxièmement, elle démontra que ce processus nécessite qu'une portion de l'élément postsynaptique soit encore activée par l'élément présynaptique.

Or, plusieurs études ont démontré que la force synaptique et le patron de décharge des motoneurones, deux facteurs clés régulant l'élimination synaptique, sont altérés à un stade précoce chez des souris SOD1. En effet, Martinez-Silva et al. (2018) ont récemment montré, grâce à des enregistrements électrophysiologiques *in vivo*, que la capacité des motoneurones de type FF à décharger de manière soutenue est diminuée avant l'apparition des premiers symptômes. D'autre part, tel que mentionné précédemment, la libération de neurotransmetteur est fortement diminuée au niveau des terminaisons axonales de type FF avant l'apparition des premiers symptômes chez des souris SOD1^{G37R}, tandis que les terminaisons de type FR et S libèrent graduellement moins de neurotransmetteurs durant la progression de la maladie malgré une augmentation initiale (Tremblay et al., 2017). Bien que cette diminution de la force synaptique soit insuffisante pour amener la dépolarisation postsynaptique sous le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action musculaire lors d'une décharge unique, elle vient réduire le facteur de sécurité des JNMs. Ainsi, lors d'une décharge répétée, il est possible que le PPM ainsi réduit ne puisse être maintenu au-dessus du seuil, découplant potentiellement la décharge du motoneurone et la contraction de ses fibres musculaires. Ce phénomène serait analogue à celui observé à la JNM de modèles d'une autre maladie affectant les motoneurones inférieurs, la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Spaulding et al., 2016). Conjointement, ces études suggèrent que la capacité des motoneurones vulnérables à décharger de manière soutenue serait

réduite, et que lors de ces décharges, leur capacité à activer l'élément postsynaptique serait réduite.

Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse que la réduction chronique de l'activation de l'élément postsynaptique puisse activer des mécanismes d'élimination synaptique et mener à une déstabilisation graduelle d'une portion de la terminaison axonale. En effet, dans un premier lieu, le modèle de punition a initialement été démontré à la JNM adulte (Balice-Gordon and Lichtman, 1994), montrant que ces mécanismes peuvent être recrutés hors du contexte développemental. Deuxièmement, la réduction de la transmission synaptique pourrait être liée à une perte de zones actives ou à une plus grande hétérogénéité dans l'activité des zones actives d'une même terminaison. Bien qu'il n'ait jamais été évalué dans le contexte de la SLA à ma connaissance, ce phénomène est observé dans plusieurs autres pathologies liées à une altération de la transmission synaptique à la JNM. Notamment, lors du vieillissement normal, plusieurs protéines régulant l'activité des zones actives semblent s'en dissocier (Chen et al., 2012; Nishimune, 2012). De même, la réduction de la transmission synaptique dans les modèles de la maladie de Charcot-Marie-Tooth est liée à une diminution du nombre de zones actives recrutées et de la quantité de vésicules synaptiques au sein des terminaisons axonales (Spaulding et al., 2016). Or, dans le contexte de la SLA, nous avons observé une plus grande hétérogénéité dans l'activation des CSPs au sein d'une même JNM (section 4.3.5.3). Sachant que chacune couvre un territoire synaptique lui étant exclusif (Brill et al., 2011), l'hétérogénéité dans leur activation pourrait indirectement refléter une hétérogénéité dans le recrutement des zones actives auxquelles elles sont associées. D'autre part, la diminution de la force synaptique des terminaisons FF n'était pas associée à une augmentation de la facilitation synaptique, tel qu'il aurait été attendu (Tremblay et al., 2017) (annexe 1). Sachant que la facilitation reflète indirectement la probabilité de relâche moyenne des sites actifs, cette absence d'augmentation suggère que la diminution de la libération de neurotransmetteurs serait due à une perte de zones actives plutôt qu'à une diminution de leur probabilité de relâche. Face à ces données, il est possible de conceptualiser un mécanisme selon lequel la diminution de l'activité présynaptique au niveau des terminaisons de type FF puisse être associée à une perte structurelle de zones actives, ou à une diminution de leur recrutement. S'en suivrait une diminution chronique de l'activation de certains regroupements de récepteurs postsynaptiques pouvant réactiver les

mécanismes d'élimination présynaptique (Figure 5.3). Ce mécanisme concorderait avec le grand nombre de pertes partielles, et parfois lentes, de terminaisons axonales que nous avons observées *in vivo* (Section 2.2.4.1, Figure 2.2A par exemple).

Un des éléments clés à démontrer afin de valider la plausibilité de ce modèle serait l'atteinte fonctionnelle et/ou structurelle de regroupements de zones actives au niveau des terminaisons FF dans un modèle de la SLA. Plusieurs expériences pourraient être réalisées dans ce but. Premièrement, une analyse de la densité et de la structure des zones actives de souris SOD1 par microscopie électronique permettrait d'évaluer l'aspect structurel. Deuxièmement, l'utilisation de souris transgéniques dans lesquels les vésicules synaptiques contiennent un indicateur sensible au pH (Wyatt and Balice-Gordon, 2008), et permettant donc de visualiser la libération du contenu acide de la vésicule vers la fente synaptique ayant un pH neutre, permettrait d'évaluer le patron de recrutement des zones actives lors de décharges uniques ou répétées. S'il s'avérait exact, une prédiction découlant de ce modèle serait qu'une augmentation de l'activité des terminaisons axonales de type FF favoriserait leur stabilisation. En accord avec cette idée, un traitement actuellement en évaluation pour la SLA, le pimozide, provoque une augmentation aiguë de la transmission synaptique à la JNM de souris SOD1^{G37R} et améliore la fonction motrice chez divers modèles de SLA, notamment le poisson zébré (Patten et al., 2017).

5.3.2 L'implication des CSPs et des récepteurs purinergiques

De manière intéressante, deux études récentes de notre laboratoire ont montré que les CSPs contribuaient à la compétition synaptique grâce à leur habilité à réguler la transmission synaptique (Darabid et al., 2013a; Darabid et al., 2014; Darabid et al., 2018). Lors du développement, seulement quelques CSPs sont généralement présentes aux JNMs bi-innervées (Darabid et al., 2013a). Or, ces CSPs ont la capacité de détecter l'activité des deux terminaisons axonales, et leur niveau d'activité calcique corrèle avec la force relative des terminaisons axonales (Darabid et al., 2013a). Une forte activation calcique des CSPs, telle que celle produite lors de l'activation de la terminaison la plus forte, induit une potentialisation à long terme de l'activité de cette terminaison (Darabid et al., 2018). À l'inverse, un faible niveau d'activité calcique des CSPs, tel que produit lors de l'activation de la terminaison la plus faible, n'induit aucun changement à long terme dans l'activité des terminaisons (Darabid et al., 2018). Ainsi, la

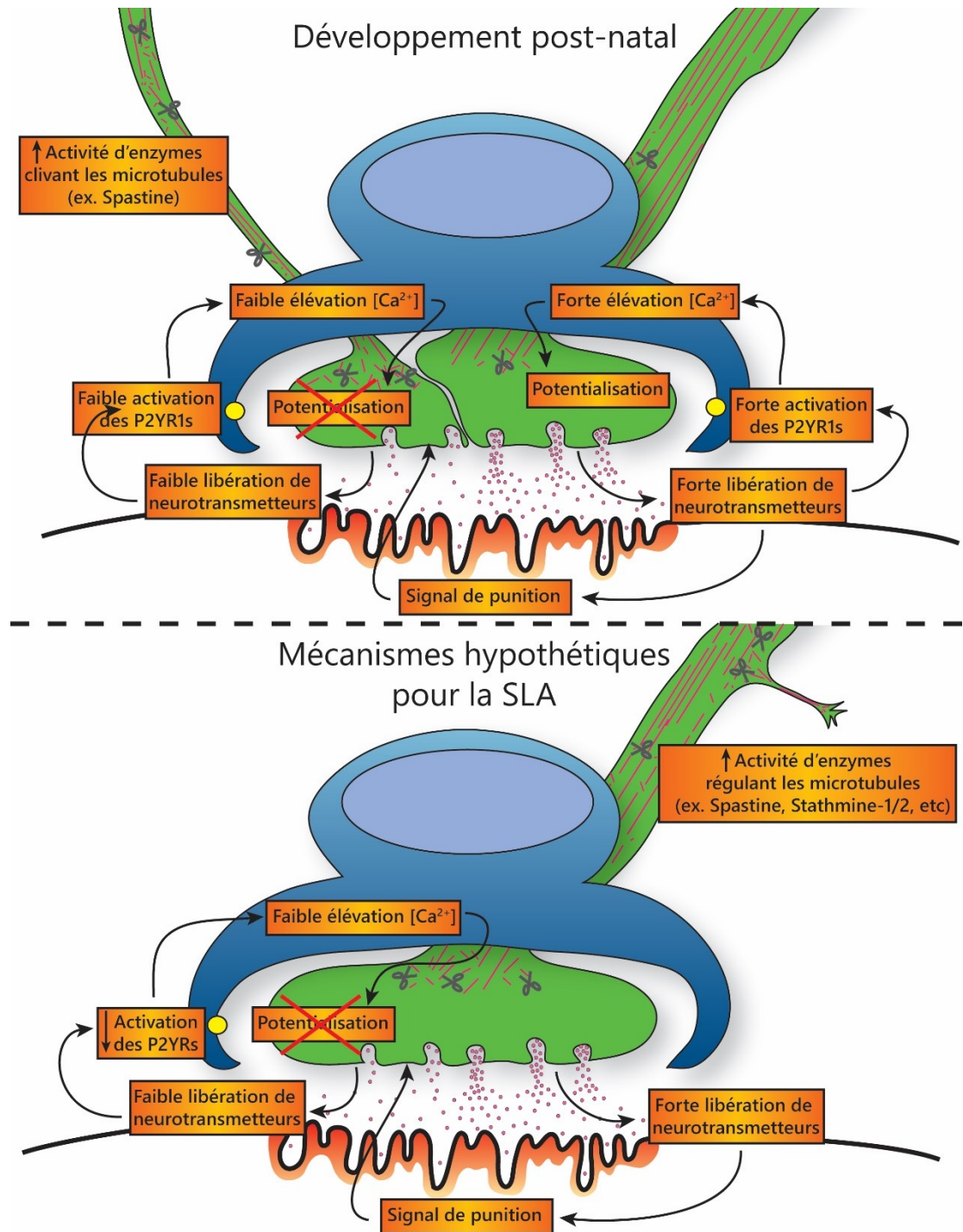


Figure 5.3. Mécanismes analogues entre l'élimination synaptique postnatale et le démantèlement des JNMs dans la SLA? Le fait que les terminaisons axonales des motoneurones soient démantelées de manière asynchrone durant le développement postnatal et chez des souris $SOD1^{G37R}$ suggère que des mécanismes similaires puissent être impliqués. Notamment, nos résultats et certaines autres études suggèrent qu'une altération des enzymes régulant les microtubules, qu'une disparité dans la libération de neurotransmetteurs entre les zones actives et que l'induction d'un signal de punition postsynaptique représentent des mécanismes intéressants à investiguer. Les traits rouges représentent des microtubules tandis que les ciseaux gris représentent des enzymes régulant ou clivant les microtubules.

capacité des CSPs à décoder la force des terminaisons axonales en compétition leur permet de potentialiser préférentiellement la terminaison la plus forte, augmentant ainsi la disparité de force synaptique entre les deux terminaisons. Ce mécanisme est entièrement dépendant de l'activation des récepteurs P2YR1 des CSPs, les récepteurs muscariniques ne participant pas à la détection de l'activité synaptique lors du développement (Darabid et al., 2013a). Le blocage chronique de ces récepteurs ralentit le processus d'élimination synaptique (Darabid et al., 2018), confirmant que ce mécanisme de plasticité synaptique dépendant des CSPs favorise l'élimination des terminaisons faibles.

De manière analogue, nous avons observé une diminution de l'activité calcique des CSPs associées à des JNMs de type FF qui semble vraisemblablement due à une diminution de l'activation des récepteurs purinergiques (section 4.3.5.4). D'autre part, tel que mentionné précédemment, l'activation de ces récepteurs semble très hétérogène entre les CSPs au sein d'une même JNM (section 4.3.5.3 figure 4.3D). Bien que les propriétés des CSPs diffèrent grandement entre ces deux contextes (activité calcique dépendante des P2YR1 vs contribution mixte de mAChR et P2YR), il est possible de conceptualiser qu'une mauvaise régulation de l'activité synaptique puisse contribuer ou exacerber les déficits liés à l'activité des terminaisons axonales. Ainsi, il pourrait être intéressant d'évaluer la capacité des CSPs à réguler l'activité synaptique chez des souris SOD1, notamment en portant une attention particulière à la contribution des récepteurs purinergiques. D'autre part, une meilleure caractérisation des sous-types de récepteurs purinergiques présents à la JNM adulte, et de leur rôle dans la régulation de l'activité synaptique, permettrait de mieux évaluer la plausibilité d'une telle contribution des CSPs aux déficits synaptiques chez les souris SOD1.

En résumé, les ressemblances entre le développement postnatal et le démantèlement des JNMs suggèrent qu'une réactivation des mécanismes d'élimination synaptique développementaux pourrait contribuer à la perte de JNM chez les souris SOD1 (Figure 5.3). Ainsi, il est possible de postuler qu'une déstabilisation locale du cytosquelette et que la diminution de l'activité des terminaisons axonales les plus vulnérables puissent contribuer à leur déstabilisation, et ultimement au désassemblage que nous avons observé.

5.4 Qu'en est-il des autres gènes associés à la SLA?

Les travaux présentés dans cette thèse et les mécanismes discutés ci-dessus sont basés sur des observations faites sur des souris ou des rats SOD1. Ainsi, il demeure incertain si ces concepts sont applicables aux modèles porteurs d'autres mutations causant la SLA. D'autres gènes liés à la SLA ont-ils un rôle dans le maintien et la fonction des JNMs? Par exemple, une altération des fonctions dépendant de TDP-43 ou de FUS, soit en raison de leur mutation ou de leur translocation vers le cytoplasme, peut-elle affecter la stabilité des terminaisons axonales et la perte de JNMs dans la SLA? La réponse à ces questions est d'une importance cruciale, car elle a un impact direct sur l'applicabilité et la portée de nos résultats dans le développement de biomarqueurs et de traitements pour la SLA. Or, malgré le peu d'éléments de réponse disponibles à ce jour, la JNM semble altérée de manière précoce chez des modèles non-SOD1. De plus, des études récentes ont révélé que TDP-43 et FUS exerçaient plusieurs fonctions au sein des axones. Ainsi, une altération de leurs fonctions pourrait mener à une déstabilisation des terminaisons axonales analogue à celle que nous avons observée chez des souris SOD1.

5.4.1 Altérations précoces de la JNM dans les modèles non-SOD1

Plusieurs des changements moléculaires, structurels et fonctionnels aux JNMs de modèles non-SOD1 sont similaires à ceux observés chez les souris SOD1. Notamment, quelques études récentes décrivent une perte de JNMs et une altération de leur morphologie chez des souris non-SOD1. En effet, chez les souris TDP-43^{Q331K} environ 50% des JNMs sont dénervées lors de la phase symptomatique de la maladie (Arnold et al., 2013). De même, l'expression de faibles niveaux de FUS muté dans les motoneurones induit une perte précoce de vésicules synaptiques au niveau des terminaisons axonales, une dénervation graduelle des JNMs, et éventuellement une dégénérescence des motoneurones (Sharma et al., 2016). Finalement, la lignée de souris porteuses de l'expansion pathogénique de *C9ORF72* ayant un phénotype moteur affiche également une perte fulgurante de JNMs (Liu et al., 2016). Ainsi, une perte sélective de JNMs est observée dans plusieurs modèles non-SOD1, bien qu'il soit incertain si celle-ci précède la mort neuronale dans certains cas.

De manière intéressante, Chand et al. (2018) ont récemment montré que la force synaptique des JNMs de type FF était diminuée avant l'apparition des symptômes chez les souris

TDP43^{Q331K}, ce qui correspond aux observations ayant été faites chez les souris SOD1 (Tremblay et al., 2017). Des changements similaires ont également été observés aux JNMs de poissons zébrés portant des mutations de *TARDBP* ou de *FUS* (Armstrong and Drapeau, 2013a, b). D'autre part, l'expression d'une mutation de TDP-43 ou de chaînes de dipeptides associée à l'expansion pathologique de *C9ORF72* dans des fibres musculaires en cultures induit l'expression de la SEMA3A et inhibe la croissance axonale des motoneurones, similairement à la présence de la SOD1 mutée (Maimon et al., 2018). Finalement, la surexpression de FUS induit une altération précoce de la morphologie mitochondriale au niveau des terminaisons axonales ainsi qu'une dénervation précoce des JNMs, similairement à ce qui est observé chez plusieurs souris SOD1 (So et al., 2018).

Dans leur ensemble, ces études documentent des changements moléculaires, morphologiques et fonctionnels précoces au niveau de JNMs similaire à ceux observés dans les modèles SOD1. Basé sur ce parallèle, il semble donc possible que la perte précoce des JNMs soit un élément commun à toutes les formes de SLA. Néanmoins, des études comparatives plus approfondies demeurent nécessaires afin notamment de confirmer que la perte de JNMs est asynchrone et que les CSPs sont altérées dans les modèles non-SOD1.

5.4.2 Rôles potentiels de TDP-43 à la JNM

De manière intéressante, plusieurs mécanismes liés à une dysfonction de TDP-43 pourraient mener à une atteinte des JNMs. En effet, certaines études récentes ont documenté des rôles de TDP-43 au niveau du transport axonal, des JNMs et des fibres musculaires. La translocation de TDP-43 vers le cytoplasme des motoneurones étant observée chez environ 97% des patients (Mackenzie et al., 2007; Ling et al., 2013), une atteinte des JNMs liée à une dysfonction de TDP-43 pourrait représenter un mécanisme pathogénique commun à la grande majorité des formes de SLA.

5.4.2.1 TDP-43 régule le transport d'ARN messager et est localisé au niveau des JNMs

Même s'il est majoritairement nucléaire en conditions normales, TDP-43 exerce plusieurs fonctions au sein du cytoplasme. Notamment, TDP-43 est transporté dans les axones et y régule leur croissance dans des neurones mis en culture (Fallini et al., 2012). Le transport

axonal de TDP-43 est nécessaire au transport de granules d'ARNm le long des axones des motoneurones dans des neurones corticaux en culture et *in vivo* chez la drosophile (Alami et al., 2014). De manière intéressante, les mutations de TDP-43 mènent à une réduction du transport antérograde de TDP-43, et donc à une réduction du transport de ses ARNm cibles vers les terminaisons axonales. Ainsi, ces études suggèrent que TDP-43 joue un rôle dans le transport, la localisation, et la régulation de la translation locale (Krichevsky and Kosik, 2001) de plusieurs ARNm au niveau des axones. En accord avec cette possibilité, la surexpression de TDP-43 réduit la taille de l'arborisation axonale de motoneurones en culture, alors que la réduction de son niveau induit l'effet inverse (Fallini et al., 2012). Cet effet pourrait notamment être dû au fait que TDP-43 régule les ARNm de certains éléments du cytosquelette axonal tels les neurofilaments légers (*Nefl*) ou la tubuline β (Polymenidou et al., 2011; Alami et al., 2014). D'autre part, Narayanan et al. (2013) ont observé que TDP-43 était localisé au niveau des JNMs chez des souris saines. De plus, en immunoprécipitant TDP-43 et en effectuant une analyse par biopuce (« microarray ») des ARNm y étant liés au sein du SNC, ils ont identifié plus de 1800 ARNm liant TDP-43, dont 103 (~5.5%) encodent des protéines associées à la fonction synaptique. De même, Polymenidou et al. (2011) ont observé que l'expression de nombreux ARNm impliqués dans la fonction synaptique était diminuée suite à une déplétion de TDP-43. Ces résultats confirment donc que plusieurs des ARNm régulés et transportés par TDP-43 encodent des protéines synaptiques. En accord avec ce rôle de TDP-43, la mutation ou l'augmentation des niveaux de TDP-43 sont associées à la perte d'une protéine (Hsc70-4) impliquée dans le recyclage de vésicules synaptique au niveau des JNMs et à une diminution de l'endocytose lors d'une stimulation de la terminaison axonale chez les souris TDP-43^{A315T} ou des drosophiles (Coyne et al., 2017). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que TDP-43 exerce un rôle dans la régulation et la localisation des ARNm axonaux et synaptiques.

De manière étonnante cependant, certaines études suggèrent que la surexpression de TDP-43 semble reproduire l'effet des mutations liées à la SLA (Fallini et al., 2012; Coyne et al., 2017), alors que d'autres suggèrent que la perte de fonctions endogènes puisse être impliquée (Alami et al., 2014). Ainsi, il n'est pas clair si un gain ou une perte de fonctions axonales liés à TDP-43 serait impliqué dans la SLA. Un élément important à considérer dans l'interprétation de ces études est que la surexpression de TDP-43 peut artificiellement induire son agrégation

(Baloh, 2011). Ainsi, des études visant à déterminer les cibles axonales exactes de TDP-43, et l'impact qu'un gain et qu'une perte de fonction de TDP-43 aurait sur la JNM sans le surexprimer, permettraient de mieux cerner les mécanismes impliqués dans la SLA. Notamment, le séquençage d'ARN liant TDP-43 isolé par « Cross-linking Immunoprecipitation » (Clip-seq) sur un tissu neuromusculaire, tel qu'utilisé par Polymenidou et al. (2011) sur le cerveau, permettrait d'élaborer une liste de cibles pertinentes à la JNM. Par la suite, l'impact d'un gain ou d'une perte de fonction de TDP-43 pourrait être évalué en manipulant préalablement ses niveaux via des ARN interférant (« short-harpin RNA ») ou via l'insertion d'une variante mutée via des vecteurs viraux. Cette approche permettrait également d'évaluer les cibles de TDP-43 au sein des éléments non neuronaux de la JNM. Fait intrigant, TDP-43 lie l'ARNm des mAChRs de type M3 ainsi que celui de plusieurs éléments impliqués dans la signalisation calcique (IP3R, PLC, CaMKIV) au niveau du SNC (Polymenidou et al., 2011). Les niveaux de ces ARNm, ainsi que ceux encodant la Galectine-3 et la GFAP, étaient altérés suite à une déplétion de TDP-43, suggérant que la fonction des CSPs puisse être affectée par TDP-43.

5.4.2.3 TDP-43 régule la régénérescence des fibres musculaires et s'y agrège durant la SLA

D'autre part, une étude récente a permis d'identifier un autre rôle de TDP-43, au niveau des fibres musculaires cette fois (Vogler et al., 2018). En effet, suite à une lésion musculaire TDP-43 se relocalise au niveau du sarcoplasme et y forme des granules régulant l'expression de nombreux ARNm encodant des protéines sarcomériques (la structure protéique responsable de la contraction musculaire) (Vogler et al., 2018). La réduction des niveaux de TDP-43 entrave la régénérescence des fibres musculaires, menant ainsi à une atrophie musculaire suite à une lésion (Vogler et al., 2018).

De manière intéressante, TDP-43 se retrouve au sein de structures sarcoplasmiques dans des muscles de patients atteints de la SLA (Cykowski et al., 2018). Pourtant, la SLA n'est pas associée à une dégénérescence primaire des fibres musculaires, telle qu'observée par exemple lors du vieillissement normal (Li et al., 2011) ou dans la dystrophie musculaire de Duchenne (Haddix et al., 2018). Ainsi, il pourrait être intéressant d'évaluer si TDP-43 se relocalise

également au sein du cytoplasme à la suite d'une dénervation afin d'y jouer un rôle similaire et si cette fonction est altérée dans la SLA liée à TDP-43. En effet, la dénervation d'une fibre musculaire provoque initialement son atrophie rapide (Langer et al., 2018). Une fois réinnervées, les fibres synthétisent de nouveaux sarcomères et récupèrent graduellement leur taille initiale.

5.4.3 Un gain de fonction axonale toxique de FUS dans la SLA

Malgré le fait que TDP-43 et FUS ont des fonctions similaires, régulant la traduction et l'épissage de nombreux ARN, leurs ARNm cibles diffèrent grandement (Lagier-Tourenne et al., 2012). Les mutations de FUS ne sont généralement pas associées à une translocation de TDP-43 vers le cytoplasme des motoneurones (Ling et al., 2013). Ainsi, les mécanismes causant la SLA liés à FUS pourraient grandement différer de ceux associés TDP-43. Pourtant, des études récentes ont identifié que FUS est localisé au niveau des axones et des JNMs tout comme TDP-43 (Lopez-Erauskin et al., 2018; So et al., 2018). De manière intéressante, l'expression de mutations de FUS associées à la SLA favorise son accumulation dans les axones et induit une inhibition globale de la traduction d'ARNm axonaux (Lopez-Erauskin et al., 2018). Cette inhibition de la traduction locale entraîne notamment une diminution de la synthèse de plusieurs protéines et transporteurs impliqués dans la fonction synaptique chez la souris (Lopez-Erauskin et al., 2018). Ainsi, les mécanismes de toxicité liés à FUS et TDP-43 semblent converger vers une diminution de la traduction axonale d'ARNm bien que les mécanismes y menant semblent différer. Cette altération du transcriptome axonale pourrait donc être à l'origine de la dégénérescence axonale dans les cas de SLA liés à TDP-43 ou FUS.

Dans l'ensemble, ces études révèlent plusieurs mécanismes par lesquels une dysfonction de TDP-43 ou de FUS pourrait affecter l'expression de plusieurs ARNm impliqués dans la fonction axonale, synaptique et musculaire. Bien que plusieurs éléments demeurent à évaluer en détail, notamment la liste des ARNm neuromusculaires interagissant avec TDP-43 et ceux réprimés par l'accumulation de FUS, ces études soulèvent la possibilité qu'une perturbation des fonctions de TDP-43 ou FUS puisse déréguler plusieurs fonctions neuromusculaires. Ainsi, bien que ces mécanismes de toxicité diffèrent grandement de ceux proposés pour SOD1 (voir ci-dessus), il n'est pas impensable que tous puissent converger vers une atteinte des terminaisons

axonales et des JNMs. Ceci pourrait notamment expliquer les similitudes observées entre les observations faites aux JNMs de modèles SOD1 et celles de modèles porteurs d'une mutation de TDP-43. En considérant que les cas de SLA liés à une dysfonction de TDP-43 ou à la mutation de SOD1 ou FUS représentent la quasi-totalité des cas de SLA (>99% des cas) (Ling et al., 2013), le fait que les mécanismes de toxicité leur étant associés convergent vers une altération de la stabilité et/ou de fonction axonale et synaptique suggère fortement qu'il s'agisse d'un mécanisme pathogénique clé dans la SLA.

5.5 Implications cliniques

5.5.1 Préserver les JNMs dans la SLA

Le fait que la perte de JNMs soit initialement due à un démantèlement asynchrone de terminaisons axonales plutôt qu'à une dégénérescence axonale globale suggère que la stabilisation des JNMs pourrait être une avenue thérapeutique intéressante afin de traiter la SLA. En effet, suractiver des cascades favorisant la stabilité des JNMs, telle que la voie Agrine-MuSK (Miyoshi et al., 2017; Cantor et al., 2018), après l'apparition des premiers symptômes ralentit la progression de la maladie chez des souris SOD1^{G93A}. Cibler la JNM a pour avantage de permettre l'utilisation de composés ne traversant pas la barrière hématoencéphalique, tels que ceux utilisés pour les thérapies géniques. En effet, l'utilisation de vecteurs viraux ou d'oligonucléotides antisenses (OAS) nécessite d'effectuer des ponctions lombaires et des infusions intrathécales chez l'humain (Miller et al., 2013), devant potentiellement être répétés selon la demi-vie du composé (OAS) ou le type cellulaire visé (mitotique ou non pour les vecteurs viraux). L'accessibilité du tissu neuromusculaire implique également que des analyses biochimiques régulières au cours du traitement (à partir de biopsies) sont aisément envisageables au cours du traitement et pourraient servir de biomarqueurs pharmacodynamiques. Finalement, de nombreuses techniques permettent une évaluation objective et quantitative de la fonction musculaire dans un contexte clinique (dynamomètre, EMG, etc) tel qu'illustré récemment par Patten et al. (2017) et Shefner et al. (2016). Bien qu'une attention plus particulière doive être portée aux potentiels effets secondaires systémiques, le développement de thérapie visant les JNMs comporte de nombreux avantages techniques et logistiques.

De manière intéressante, les mécanismes proposés dans la présente discussion, notamment la stabilisation des microtubules, les enzymes les régulant et le métabolisme énergétique, pourraient s'avérer être des cibles intéressantes. Néanmoins, une attention particulière devrait être portée afin d'éviter d'induire un problème inverse en ciblant ces mécanismes. Par exemple, bien que l'activité des enzymes sectionnant les microtubules puisse induire une déstabilisation des terminaisons axonales (section 5.3.1), leur activité demeure potentiellement nécessaire à la réinnervation suite à une lésion ou lors de la SLA. D'autre part,

nos résultats suggèrent que de favoriser l'adoption d'un phénotype « prorégénérateur » par les CSPs au niveau des JNMs dénervées pourrait améliorer l'efficacité de la réinnervation, notamment par bourgeonnement terminal. Néanmoins, une intervention visant à favoriser l'adoption d'un « phénotype prorégénérateur » aux JNMs dénervées pourrait potentiellement déstabiliser les JNMs encore innervées (Wright et al., 2009). De plus, les expansions excessives semblent avoir un effet néfaste (section 5.2.2.2), soulevant la possibilité que de trop favoriser la réinnervation puisse être contre-productif. Néanmoins, cibler les mécanismes dépendants des CSPs pourrait favoriser la réinnervation autologue, la formation de bourgeons terminaux, étant souvent plus courts que les bourgeons axonaux, et l'élimination de débris axonaux sur la plaque motrice, ayant ainsi un effet bénéfique. Dans l'ensemble une meilleure compréhension de ces mécanismes, notamment du rôle des CSPs au cours de la progression de la SLA, pourrait certainement permettre de mieux cerner si une thérapie les ciblant serait bénéfique durant la SLA ou si elle aurait un contre-effet délétère.

En ce sens, empêcher directement l'altération des fonctions neuronales et gliales par la SOD1 mutée pourrait s'avérer être une avenue plus intéressante pour les cas de SLA liés à SOD1. En effet, plusieurs stratégies permettant d'empêcher l'accumulation de SOD1 mal repliée (Patel et al., 2014) ou de diminuer son expression (McC Campbell et al., 2018) ont été développées récemment. En assumant que la SOD1 mal-repliée au sein de la terminaison axonale, des CSPs et des fibres musculaires soit à l'origine des altérations pathologiques menant à la perte de JNMs, cibler la SOD1 mutée au niveau du tissu neuromusculaire pourrait être bénéfique sans risquer d'entraver le fonctionnement normal de ces éléments synaptiques. Par exemple, bloquer l'association entre la SOD1 mal repliée et les mitochondries pourrait potentiellement restaurer la fonction mitochondriale sans perturber leur fonction normale. Ce type de stratégie pourrait être utilisé seul, ou en combinaison avec les approches actuellement développées afin de cibler la SOD1 mutée au niveau du SNC, afin de traiter la SLA dépendante de mutations de ce gène. Néanmoins, la portée de cette approche se limite à ce sous-groupe de patients, les mécanismes de toxicité liés aux autres gènes associés à la SLA (à l'exception de FUS) n'étant pas exclusivement un gain de fonction toxique. Pour ces autres cas, il demeurerait donc nécessaire, dans un premier temps, de confirmer que la perte de JNMs est asynchrone tel

que décrit dans la présente thèse, et, dans un deuxième temps, de mieux comprendre les mécanismes liant cette perte de JNMs et les autres gènes associés à la SLA (section 5.4).

5.5.2 Le développement des biomarqueurs neuromusculaires

L'accessibilité du tissu neuromusculaire a également comme avantage de faciliter le développement de biomarqueurs. Notamment, des analyses biochimiques ou fonctionnelles régulières peuvent aisément être envisagées afin d'évaluer si un traitement ciblant la JNM atteint sa cible (biomarqueur pharmacodynamique). Néanmoins, le développement d'un biomarqueur reflétant directement l'instabilité des JNMs demeure un enjeu important, ayant le potentiel de grandement faciliter le développement de traitements ciblant la JNM. En effet, nos résultats montrent que les terminaisons axonales des motoneurons sont instables durant plusieurs semaines avant la dégénérescence globale de l'axone moteur. Cependant, cette instabilité ne semble pas aisément perceptible via les techniques EMG disponibles à ce jour (Dengler et al., 1990; Dantes and McComas, 1991; Schmied et al., 1999; Hegedus et al., 2007). Or, détecter cette instabilité permettrait d'identifier les sous-groupes de patients chez qui elle est présente (biomarqueur prédictif) et, potentiellement, de surveiller son évolution au courant de la maladie ou d'un traitement (biomarqueur pharmacodynamique et/ou de progression). De même, évaluer le phénotype « prorégénérateur » des CSPs aux JNMs humaines de patients pourrait permettre d'identifier les patients susceptibles de bénéficier d'un éventuel traitement les ciblant (biomarqueur prédictif).

De manière intéressante, certains des mécanismes moléculaires discutés ci-dessus, s'ils s'avèrent exacts, pourraient donner naissance à des biomarqueurs pertinents. Notamment, l'analyse biochimique et morphologique de biopsies musculaires enrichies en JNMs pourrait permettre de directement évaluer les JNMs de patients SLA. Ce type de biopsie peut notamment être obtenu grâce à une technique, basée sur l'identification d'une région riche en JNM par électro-stimulation, ayant récemment été développée dans notre laboratoire dans le cadre d'une étude sur la JNM humaine (Aubertin-Leheudre et al., (in prep)). Grâce à cette approche, il serait notamment envisageable d'évaluer la synthèse, l'incorporation et les modifications post-translationnelles (Brill et al., 2016) de la tubuline au niveau neuromusculaire par marquage radioactif et spectrométrie de masse, similairement à ce qui a été effectué par Fanara et al. (2007)

chez la souris. Cette analyse permettrait potentiellement d'évaluer le degré de stabilité des microtubules axonaux, lorsque corrigée par une mesure reflétant la quantité de contenu axonal présent dans l'échantillon. Une autre possibilité serait de mesurer directement l'apparition de facteurs déstabilisant les JNMs, tel que proposé pour Nogo-A (Jokic et al., 2005; Bruneteau et al., 2015). Même si ces molécules ne sont pas nécessairement spécifiques à la SLA, leur niveau pourrait refléter le niveau de dénervation ou d'instabilité des JNMs. Finalement, l'utilisation de biopsies préservant partiellement l'intégrité du tissu, permettrait une évaluation morphologique des JNMs dans la SLA. Notamment, l'analyse des niveaux de Galectine-3 et de la présence de prolongements gliaux aux JNMs dénervées de patients SLA, tel qu'effectué chez la souris au chapitre IV, permettrait d'évaluer directement la capacité des CSPs à adopter un phénotype prorégénérateur chez différents sous-groupes de patients.

Dans l'ensemble, ces exemples illustrent comment l'accessibilité du système neuromusculaire permet d'envisager plusieurs approches permettant d'identifier et de surveiller les changements moléculaires sous-tendant l'instabilité des JNMs dans la SLA. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes sous-tendant le démantèlement des JNMs et l'altération des CSPs n'est pas seulement pertinente pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la SLA, mais elle permet également le développement de biomarqueurs reflétant la présence ou la progression d'altérations pathologiques.

5.5.3 L'importance de l'étude de la JNM humaine

Néanmoins, une étape cruciale doit d'abord être franchie dans le développement de ces biomarqueurs potentiels ou de traitements ciblant la JNM dans la SLA. En effet, tel que mentionné ci-dessus, la majorité des études sur les changements ayant lieu à la JNM dans la SLA ont été effectuées à la JNM de souris SOD1. Mais qu'en est-il de la JNM humaine ? Les changements liés aux mutations causant la SLA à la JNM murine sont-ils représentatifs de ceux ayant lieu à la JNM humaine ? La JNM humaine diffère grandement de la JNM murine, autant d'un point vu morphologique que fonctionnel, suggérant que leur composition moléculaire puisse également différer. En effet, les JNMs humaines sont nettement plus petites que les JNMs murines, formant de nombreux petits « boutons » plutôt qu'une plaque motrice continue ayant une allure de « pretzel » tel que chez la souris (Figure 5.4) (Jones et al., 2017; Slater, 2017). La

petite taille de l'élément présynaptique implique également une plus faible quantité de vésicules synaptiques et de zones actives (Slater, 2017). Cette différence structurelle se traduit par un contenu quantique largement plus faible à la JNM humaine comparativement à la JNM de souris (~20-30 vs ~50 vésicules/potentiel d'action respectivement) (Slater et al., 1992; Slater, 2017). Cette diminution de la quantité de neurotransmetteurs libérés semble néanmoins être compensée par une augmentation de la profondeur des crêtes postsynaptiques, amplifiant présumément les potentiels postsynaptiques (Slater, 2017). Cette différence dans l'organisation fonctionnelle de la JNM a néanmoins comme conséquence de réduire le facteur de sécurité des JNMs humaines, d'environ 4 chez la souris à environ 2 chez l'humain (Wood and Slater, 2001). D'autre part, les motoneurones humains ont une arborisation axonale largement plus grande que ceux murins, possédant entre 300 et 2000 JNMs (Karpati et al., 2010), comparativement à 20 – 50 chez la souris (Valdez et al., 2012). Cette différence suggère que le métabolisme énergétique basal des motoneurones humains pourrait être largement plus élevé, et que ceux-ci seraient plus vulnérables aux mécanismes menant au démantèlement des JNMs que nous avons observés. Finalement, une étude récente sur la JNM humaine dans le contexte du vieillissement normal rapporte que de nombreux changements morphologiques perceptibles aux JNMs de souris lors du vieillissement (fragmentation postsynaptique, dénervation partielle, etc.) semblent absents des JNMs humaines (Jones et al., 2017). Ces données semblent donc suggérer que les JNMs sont plus stables que les JNMs de souris, lors du vieillissement normal à tout le moins. De surcroît, cette étude rapporte également de nombreuses différences dans la composition moléculaire des JNMs grâce à une analyse protéomique (Jones et al., 2017). Ces différences pourraient tout simplement représenter une différence dans l'abondance relative des éléments constituant la JNM humaine plutôt qu'une différence dans l'identité des éléments en place. Néanmoins, ces données, dans leur ensemble, suggèrent que les JNMs de souris diffèrent des JNMs humaines dans leur composition moléculaire et dans leur fonctionnement.

Ainsi, il demeure essentiel de valider que les changements observés et que les mécanismes proposés à la JNM de souris sont représentatifs de ceux ayant lieu à la JNM humaine dans la SLA. Bien que l'ensemble des concepts mis de l'avant dans la présente thèse et dans les nombreuses études chez les souris SOD1 ne puissent être réalistement retestés chez l'humain, l'identité des acteurs moléculaires impliqués peut tout de même être validée. À titre

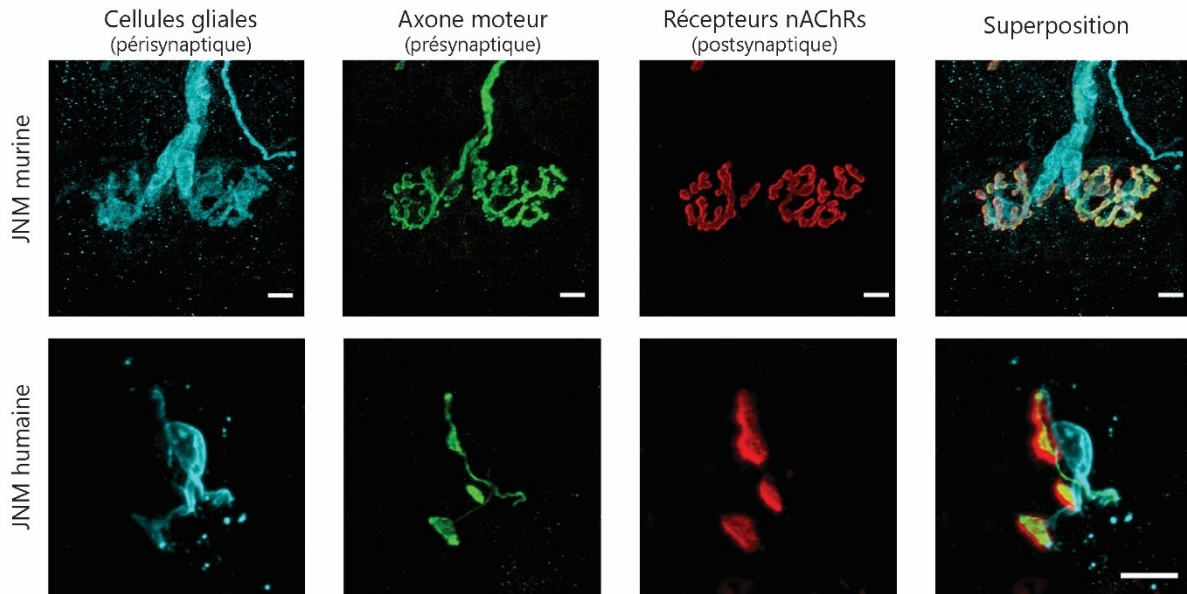


Figure 5.4. Différences morphologiques entre les JNMs humaines et les JNMs murines. Exemples de JNMs murines et humaines typiques. Les JNMs humaines sont nettement plus petites que les JNMs de souris et ne sont généralement recouvertes que d'une seule CSP. La JNM murine provient d'un muscle contenant des unités motrices rapides (Sternomastoidien) d'une souris mâle adulte. La JNM humaine a été obtenue d'un sujet de sexe masculin, âgé de 65 ou plus, dans le cadre d'un projet visant à élaborer une nouvelle méthode permettant d'obtenir des biopsies musculaires enrichies en JNMs. (Aubertin-Leheudre et al., (in prep)). La biopsie fut effectuée sur un muscle contenant principalement des unités motrices rapide (Vastus lateralis), suite à l'identification d'une région riche en JNMs par électrostimulation. La préparation de l'échantillon et la prise d'image ont été effectuées par Joanne Vallée et Sandrine Marchand (Laboratoire de Richard Robitaille, Université de Montréal), qui ont gracieusement acceptées de céder les droits liés à cette image à des fins de publication dans cette thèse. Échelles : 10 μ m.

illustratif, l'expression de Nogo-A au niveau des fibres musculaires dénervées, initialement identifiée à la JNM de souris SOD1^{G93A}, a également été observée par immunohistochimie (Jokic et al., 2005) et par analyse biochimique (Bruneteau et al., 2015) sur des biopsies musculaires de patients SLA. De manière intéressante, les niveaux de Nogo-A corrélaient avec les niveaux de dénervation observés par immunohistochimie sur ces mêmes biopsies (Bruneteau et al., 2015). Ainsi, l'utilisation de biopsies musculaires de patients atteints de la SLA afin d'étudier des cibles moléculaires d'intérêt permet de valider leur présence au niveau des JNMs humaines, de confirmer qu'ils sont affectés similairement à ce qui est observé chez les modèles animaux, et de corréliser ces changements à l'état des JNMs et aux symptômes du patient. Somme toute, l'étude de la JNM humaine dans le contexte de la SLA permettrait non seulement une validation de la pertinence des changements observés aux JNMs de souris, mais elle permettrait également d'identifier ce qui la distingue de la JNM de souris. Une meilleure appréciation de

ces différences pourrait permettre à l'inverse d'identifier des facteurs de vulnérabilité propres aux motoneurones et aux JNMs humaines, expliquant potentiellement pourquoi si peu de modèles animaux récapitulent la pathologie humaine.

5.6 Conclusion

Dans l'ensemble, nous avons montré que des changements structurels dynamiques au niveau des terminaisons axonales des motoneurons inférieurs précède la dégénérescence globale de leurs axones chez des souris SOD1^{G37R}. Une panoplie de mécanismes locaux autonomes et non autonomes semblent pouvoir contribuer à cette instabilité, dont notamment une instabilité du cytosquelette axonale, une altération du métabolisme énergétique, une diminution de l'activité synaptique, la présence de signaux déstabilisateurs musculaires et une dysfonction des CSPs. Notamment, nous avons montré que les propriétés des CSPs semblent refléter le gradient de vulnérabilité des JNMs et que leur capacité à adopter un phénotype prorégénérateur est diminuée avant les premiers signes de dénervation. Cette incapacité des CSPs à réagir adéquatement à la dénervation des JNMs pourrait ainsi prévenir une réinnervation adéquate, un phénomène que nous avons observé *in vivo*, et contribuer à la vulnérabilité des différents types de JNMs.

Bien que nos observations, et les potentiels mécanismes en découlant, peuvent seulement être appliqués à la SLA-dépendante de mutations de SOD1, plusieurs éléments nous portent à croire qu'une dysfonction axonale et synaptique puisse être à l'origine de toutes les formes de SLA. Néanmoins, la limite principale de nos études repose sur la différence frappante entre les JNMs humaines et les JNMs murines. Ainsi, l'investigation parallèle des mécanismes pouvant mener à une déstabilisation des terminaisons axonales chez la souris et l'humain pourrait s'avérer l'approche la plus sûre afin de comprendre ce phénomène, et d'un jour développer des stratégies thérapeutiques et des biomarqueurs pertinents pour le traitement de la SLA.

6. Bibliographie

- ALS Society of Canada (2017) *What is ALS?* <https://www.als.ca/about-als/what-is-als/>. Visité le 2019-05-28.
- Abe K, Itoyama Y, Sobue G, Tsuji S, Aoki M, Doyu M, Hamada C, Kondo K, Yoneoka T, Akimoto M, Yoshino H, Edaravone ALSSG (2014) Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 15:610-617.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10:1538-1543.
- Akaaboune M, Allinquant B, Farza H, Roy K, Magoul R, Fiszman M, Festoff BW, Hantai D (2000) Developmental regulation of amyloid precursor protein at the neuromuscular junction in mouse skeletal muscle. *Mol Cell Neurosci* 15:355-367.
- Al-Chalabi A, Hardiman O (2013) The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* 9:617-628.
- Al-Sarraj S, King A, Troakes C, Smith B, Maekawa S, Bodi I, Rogelj B, Al-Chalabi A, Hortobagyi T, Shaw CE (2011) p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTL and MND/ALS. *Acta Neuropathol* 122:691-702.
- Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, Han SSW, 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.
- Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH (2001) Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57:1282-1289.
- Alto LT, Terman JR (2017) Semaphorins and their Signaling Mechanisms. *Methods Mol Biol* 1493:1-25.
- Appel SH (1981) A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism, and Alzheimer disease. *Annals of neurology* 10:499-505.
- Appel SH, Smith RG, Engelhardt JI, Stefani E (1993) Evidence for autoimmunity in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 118:169-174.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728-739.
- Arbour D, Vande Velde C, Robitaille R (2017) New perspectives on amyotrophic lateral sclerosis: the role of glial cells at the neuromuscular junction. *J Physiol* 595:647-661.
- 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.
- Arnold ES, Ling SC, Huelga SC, Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Ditsworth D, Kordasiewicz HB, McAlonis-Downes M, Platoshyn O, Parone PA, Da Cruz S, Clutario KM, Swing D, Tessarollo L, Marsala M, Shaw CE, Yeo GW, Cleveland DW (2013) ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E736-745.
- Arthur KC, Calvo A, Price TR, Geiger JT, Chio A, Traynor BJ (2016) Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nature communications* 7:12408.
- 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. *Neuromuscular disorders : NMD* 15:377-388.
- Aubertin-Leheudre M, Bélanger M, Pion C, Vallée J, Marchand S, Morais J, Robitaille R ((in prep)) Improved human muscle biopsies to study neuromuscular junction structure and functions in aging.
- Baker DJ, Blackburn DJ, Keatinge M, Sokhi D, Viskaitis P, Heath PR, Ferraiuolo L, Kirby J, Shaw PJ (2015) Lysosomal and phagocytic activity is increased in astrocytes during disease progression in the SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:410.
- Bakkar N, Boehringer A, Bowser R (2015) Use of biomarkers in ALS drug development and clinical trials. *Brain Res* 1607:94-107.
- Balice-Gordon RJ, Lichtman JW (1990) In vivo visualization of the growth of pre- and postsynaptic elements of neuromuscular junctions in the mouse. *J Neurosci* 10:894-908.
- Balice-Gordon RJ, Lichtman JW (1993) In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J Neurosci* 13:834-855.
- Balice-Gordon RJ, Lichtman JW (1994) Long-term synapse loss induced by focal blockade of postsynaptic receptors. *Nature* 372:519-524.
- Baloh RH (2011) TDP-43: the relationship between protein aggregation and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *FEBS J* 278:3539-3549.
- Barbeito AG, Mesci P, Boillee S (2010) Motor neuron-immune interactions: the vicious circle of ALS. *J Neural Transm (Vienna)* 117:981-1000.
- Barres BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60:430-440.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH (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 DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Huang A, Wen S, Liao B, Appel SH (2011) Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134:1293-1314.
- Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH (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 DR, Zhao W, Wang J, Zhang X, Wen S, Neal D, Thonhoff JR, Alsuliman AS, Shpall EJ, Rezvani K, Appel SH (2017) ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight* 2:e89530.
- Belair EL, Vallee J, Robitaille R (2010) In vivo long-term synaptic plasticity of glial cells. *J Physiol* 588:1039-1056.
- Bellouze S, Baillat G, Buttigieg D, de la Grange P, Rabouille C, Haase G (2016) Stathmin 1/2-triggered microtubule loss mediates Golgi fragmentation in mutant SOD1 motor neurons. *Mol Neurodegener* 11:43.
- Benatar M, Boylan K, Jeromin A, Rutkove SB, Berry J, Atassi N, Bruijn L (2016) ALS biomarkers for therapy development: State of the field and future directions. *Muscle Nerve* 53:169-182.
- Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG, Barres BA (2016) New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E1738-1746.
- Bennett MR, Pettigrew AG (1974) The formation of synapses in striated muscle during development. *J Physiol* 241:515-545.
- Bilsland LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L, Schiavo G (2010) Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20523-20528.
- Biomarkers Definitions Working G (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69:89-95.
- Birks R, Katz B, Miledi R (1960) Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration. *J Physiol* 150:145-168.
- Boillee S, Peschanski M, Junier MP (2003) The wobbler mouse: a neurodegeneration jigsaw puzzle. *Mol Neurobiol* 28:65-106.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006a) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52:39-59.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW (2006b) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312:1389-1392.
- Bosco DA, Morfini G, Karabacak NM, Song Y, Gros-Louis F, Pasinelli P, Goolsby H, Fontaine BA, Lemay N, McKenna-Yasek D, Frosch MP, Agar JN, Julien JP, Brady ST, Brown RH, Jr. (2010) Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci* 13:1396-1403.
- Bourque MJ, Robitaille R (1998) Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 512 (Pt 1):197-209.
- Bradley WG, Mash DC (2009) Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 10 Suppl 2:7-20.
- Brichta AM, Callister RJ, Peterson EH (1987) Quantitative analysis of cervical musculature in rats: histochemical composition and motor pool organization. I. Muscles of the spinal accessory complex. *J Comp Neurol* 255:351-368.
- Brill MS, Lichtman JW, Thompson W, Zuo Y, Misgeld T (2011) Spatial constraints dictate glial territories at murine neuromuscular junctions. *J Cell Biol* 195:293-305.

- Brill MS, Kleele T, Ruschkies L, Wang M, Marahori NA, Reuter MS, Hausrat TJ, Weigand E, Fisher M, Ahles A, Engelhardt S, Bishop DL, Kneussel M, Misgeld T (2016) Branch-Specific Microtubule Destabilization Mediates Axon Branch Loss during Neuromuscular Synapse Elimination. *Neuron* 92:845-856.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL, World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron D (2000) El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1:293-299.
- Brosius Lutz A, Chung WS, Sloan SA, Carson GA, Zhou L, Lovelett E, Posada S, Zuchero JB, Barres BA (2017) Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E8072-E8080.
- Brotherton TE, Li Y, Cooper D, Gearing M, Julien JP, Rothstein JD, Boylan K, Glass JD (2012) Localization of a toxic form of superoxide dismutase 1 protein to pathologically affected tissues in familial ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:5505-5510.
- Brown MC, Holland RL, Ironton R (1980) Nodal and terminal sprouting from motor nerves in fast and slow muscles of the mouse. *J Physiol* 306:493-510.
- Brown MC, Holland RL, Hopkins WG (1981) Motor nerve sprouting. *Annu Rev Neurosci* 4:17-42.
- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281:1851-1854.
- Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327-338.
- Bruneteau G et al. (2015) Endplate denervation correlates with Nogo-A muscle expression in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Clin Transl Neurol* 2:362-372.
- Bryson JB, Hobbs C, Parsons MJ, Bosch KD, Pandraud A, Walsh FS, Doherty P, Greensmith L (2012) Amyloid precursor protein (APP) contributes to pathology in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 21:3871-3882.
- Buchthal F, Erminio F, Rosenfalck P (1959) Motor unit territory in different human muscles. *Acta Physiol Scand* 45:72-87.
- Buffelli M, Busetto G, Cangiano L, Cangiano A (2002) Perinatal switch from synchronous to asynchronous activity of motoneurons: link with synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13200-13205.
- Buffelli M, Burgess RW, Feng G, Lobe CG, Lichtman JW, Sanes JR (2003) Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature* 424:430-434.
- Burden SJ, Sargent PB, McMahan UJ (1979) Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at original synaptic sites in the absence of the nerve. *J Cell Biol* 82:412-425.
- Burke RE, Levine DN, Zajac FE, 3rd (1971) Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* 174:709-712.
- Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE, 3rd (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234:723-748.

- Busetto G, Buffelli M, Tognana E, Bellico F, Cangiano A (2000) Hebbian mechanisms revealed by electrical stimulation at developing rat neuromuscular junctions. *J Neurosci* 20:685-695.
- Cantor S, Zhang W, Delestree N, Remedio L, Mentis GZ, Burden SJ (2018) Preserving neuromuscular synapses in ALS by stimulating MuSK with a therapeutic agonist antibody. *eLife* 7.
- Carrasco DI, Seburn KL, Pinter MJ (2016a) Altered terminal Schwann cell morphology precedes denervation in SOD1 mice. *Exp Neurol* 275 Pt 1:172-181.
- 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, Bahr BA, Seburn KL, Pinter MJ (2016b) Abnormal response of distal Schwann cells to denervation in a mouse model of motor neuron disease. *Exp Neurol* 278:116-126.
- Carroll SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS, Corbett JA (1997) Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 17:1642-1659.
- Chand KK, Lee KM, Lee JD, Qiu H, Willis EF, Lavidis NA, Hilliard MA, Noakes PG (2018) Defects in synaptic transmission at the neuromuscular junction precedes motor deficits in a TDP-43(Q331K) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.* 32(5), 2676-2689.
- Chapple CR (2004) Darifenacin: a novel M3 muscarinic selective receptor antagonist for the treatment of overactive bladder. *Expert Opin Investig Drugs* 13:1493-1500.
- Charcot J-M, Joffroy A (1869) Deux cas d'atrophie musculaire progressive : avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. Paris: Masson.
- Charcot JM, Bourneville (1872) Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la salpêtrière. Paris: A. Delahaye.
- Cheah BC, Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC (2010) Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Current medicinal chemistry* 17:1942-1199.
- Chen J, Mizushige T, Nishimune H (2012) Active zone density is conserved during synaptic growth but impaired in aged mice. *J Comp Neurol* 520:434-452.
- Chevalier-Larsen E, Holzbaur EL (2006) Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochimica et biophysica acta* 1762:1094-1108.
- Chia R, Chio A, Traynor BJ (2018) Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *The Lancet Neurology* 17:94-102.
- Chio A (1999) ISIS Survey: an international study on the diagnostic process and its implications in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology* 246 Suppl 3:III1-5.
- Chio A, Traynor BJ (2015) Motor neuron disease in 2014. Biomarkers for ALS--in search of the Promised Land. *Nat Rev Neurol* 11:72-74.
- Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G (2005) Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 128:472-476.
- Chio A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, White LA (2013) Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology* 41:118-130.
- Chio A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, Traynor BG, Eurals C (2009) Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotrophic lateral sclerosis* :

- official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases 10:310-323.
- Chitiprolu M, Jagow C, Tremblay V, Bondy-Chorney E, Paris G, Savard A, Palidwor G, Barry FA, Zinman L, Keith J, Rogaeva E, Robertson J, Lavalley-Adam M, Woulfe J, Couture JF, Cote J, Gibbings D (2018) A complex of C9ORF72 and p62 uses arginine methylation to eliminate stress granules by autophagy. *Nature communications* 9:2794.
- Chiu IM, Chen A, Zheng Y, Kosaras B, Tsiftoglou SA, Vartanian TK, Brown RH, Jr., Carroll MC (2008) T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17913-17918.
- Chiu IM, Phatnani H, Kuligowski M, Tapia JC, Carrasco MA, Zhang M, Maniatis T, Carroll MC (2009) Activation of innate and humoral immunity in the peripheral nervous system of ALS transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20960-20965.
- Choi HY, Liu Y, Tennert C, Sugiura Y, Karakatsani A, Kroger S, Johnson EB, Hammer RE, Lin W, Herz J (2013) APP interacts with LRP4 and agrin to coordinate the development of the neuromuscular junction in mice. *eLife* 2:e00220.
- Cirulli ET et al. (2015) Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* 347:1436-1441.
- Clark JA, Yeaman EJ, Blizzard CA, Chuckowree JA, Dickson TC (2016) A Case for Microtubule Vulnerability in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Altered Dynamics During Disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 10:204.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee 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.
- Colman H, Nabekura J, Lichtman JW (1997) Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science* 275:356-361.
- Correia-de-Sa P, Timoteo MA, Ribeiro JA (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.
- Cox LE, Ferraiuolo L, Goodall EF, Heath PR, Higginbottom A, Mortiboys H, Hollinger HC, Hartley JA, Brockington A, Burness CE, Morrison KE, Wharton SB, Grierson AJ, Ince PG, Kirby J, Shaw PJ (2010) Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One* 5:e9872.
- Cox PA, Davis DA, Mash DC, Metcalf JS, Banack SA (2016) Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc Biol Sci* 283.
- Coyne AN, Lorenzini I, Chou CC, Torvund M, Rogers RS, Starr A, Zaepfel BL, Levy J, Johannesmeyer J, Schwartz JC, Nishimune H, Zinsmaier K, Rossoll W, Sattler R, Zarnescu DC (2017) Post-transcriptional Inhibition of Hsc70-4/HSPA8 Expression Leads to Synaptic Vesicle Cycling Defects in Multiple Models of ALS. *Cell reports* 21:110-125.
- Crawley MJ (2007) *The R book*. Chichester, England ; Hoboken, N.J.: Wiley.
- Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ (2007) Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* 68:1002-1007.
- Cykowski MD, Powell SZ, Appel JW, Arumanayagam AS, Rivera AL, Appel SH (2018) Phosphorylated TDP-43 (pTDP-43) aggregates in the axial skeletal muscle of patients

- with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica communications* 6:28.
- Da Cruz S, Bui A, Saberi S, Lee SK, Stauffer J, McAlonis-Downes M, Schulte D, Pizzo DP, Parone PA, Cleveland DW, Ravits J (2017) Misfolded SOD1 is not a primary component of sporadic ALS. *Acta Neuropathol* 134:97-111.
- Da Cruz S, Parone PA, Lopes VS, Lillo C, McAlonis-Downes M, Lee SK, Vetto AP, Petrosyan S, Marsala M, Murphy AN, Williams DS, Spiegelman BM, Cleveland DW (2012) Elevated PGC-1alpha activity sustains mitochondrial biogenesis and muscle function without extending survival in a mouse model of inherited ALS. *Cell Metab* 15:778-786.
- Dantes M, McComas A (1991) The extent and time course of motoneuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 14:416-421.
- Darabid H, Arbour D, Robitaille R (2013a) Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 33:1297-1313.
- Darabid H, Arbour D, Robitaille R (2013b) 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.
- Darabid H, St-Pierre-See A, Robitaille R (2018) Purinergic-Dependent Glial Regulation of Synaptic Plasticity of Competing Terminals and Synapse Elimination at the Neuromuscular Junction. *Cell reports* 25:2070-2082 e2076.
- de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H, Shefner J, Swash M (2008) Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 119:497-503.
- De Winter 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.
- DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85:501-512.
- DeJesus-Hernandez M et al. (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72:245-256.
- Deng HX et al. (2011) Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477:211-215.
- Dengler R, Konstanzer A, Kuther G, Hesse S, Wolf W, Struppler A (1990) Amyotrophic lateral sclerosis: macro-EMG and twitch forces of single motor units. *Muscle Nerve* 13:545-550.
- Ditsworth D, Maldonado M, McAlonis-Downes M, Sun S, Seelman A, Drenner K, Arnold E, Ling SC, Pizzo D, Ravits J, Cleveland DW, Da Cruz S (2017) Mutant TDP-43 within motor neurons drives disease onset but not progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133:907-922.
- Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S, Belia S, Wannenes F, Nicoletti C, Del Prete Z, Rosenthal N, Molinaro M, Protasi F, Fano G,

- Sandri M, Musaro A (2008) Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab* 8:425-436.
- Dumic J, Dabelic S, Flogel M (2006) Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et biophysica acta* 1760:616-635.
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Eschbach J, Rene F, Oudart H, Halter B, Huze C, Schaeffer L, Bouillaud F, Loeffler JP (2009) Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One* 4:e5390.
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, di Scala F, Rene F, de Tapia M, Pradat PF, Lacomblez L, Seihlan D, Prinjha R, Walsh FS, Meininger V, Loeffler JP (2002) Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 10:358-365.
- 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 U S A* 112:E497-505.
- Eisen A, Kuwabara S (2012) The split hand syndrome in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:399-403.
- Eisen A, Kim S, Pant B (1992) Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve* 15:219-224.
- Eisen A, Kiernan M, Mitsumoto H, Swash M (2014) Amyotrophic lateral sclerosis: a long preclinical period? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:1232-1238.
- Eisen A, Braak H, Del Tredici K, Lemon R, Ludolph AC, Kiernan MC (2017) Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88:917-924.
- Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH (1993) Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 50:30-36.
- Fallini C, Bassell GJ, Rossoll W (2012) The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth. *Hum Mol Genet* 21:3703-3718.
- Fanara P, Banerjee J, Hueck RV, Harper MR, Awada M, Turner H, Husted KH, Brandt R, Hellerstein MK (2007) Stabilization of hyperdynamic microtubules is neuroprotective in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 282:23465-23472.
- Favero M, Busetto G, 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.
- Fecto F, Yan J, Vemula SP, Liu E, Yang Y, Chen W, Zheng JG, Shi Y, Siddique N, Arrat H, Donkervoort S, Ajroud-Driss S, Sufit RL, Heller SL, Deng HX, Siddique T (2011) SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 68:1440-1446.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41-51.
- Ferns M, Carbonetto S (2001) Challenging the neurocentric view of neuromuscular synapse formation. *Neuron* 30:311-314.
- Ferraiuolo L, Heath PR, Holden H, Kasher P, Kirby J, Shaw PJ (2007) Microarray analysis of the cellular pathways involved in the adaptation to and progression of motor neuron injury in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J Neurosci* 27:9201-9219.

- 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.
- Foran E, Bogush A, Goffredo M, Roncaglia P, Gustincich S, Pasinelli P, Trotti D (2011) Motor neuron impairment mediated by a sumoylated fragment of the glial glutamate transporter EAAT2. *Glia* 59:1719-1731.
- Forsberg K, Jonsson PA, Andersen PM, Bergemalm D, Graffmo KS, Hultdin M, Jacobsson J, Rosquist R, Marklund SL, Brannstrom T (2010) Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. *PLoS One* 5:e11552.
- Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, Ladner KJ, Bevan AK, Foust KD, Godbout JP, Popovich PG, Guttridge DC, Kaspar BK (2014) Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 81:1009-1023.
- Freischmidt A et al. (2015) Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and frontotemporal dementia. *Nat Neurosci* 18:631-636.
- 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.
- Gendron TF et al. (2017) Poly(GP) proteins are a useful pharmacodynamic marker for C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med* 9(383).
- 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.
- Gonzalez de Aguilar JL, Niederhauser-Wiederkehr C, Halter B, De Tapia M, Di Scala F, Demougin P, Dupuis L, Primig M, Meininger V, Loeffler JP (2008) Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiological genomics* 32:207-218.
- Gordon PH, Meininger V (2011) How can we improve clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis? *Nat Rev Neurol* 7:650-654.
- 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.
- Graber DJ, Hickey WF, Harris BT (2010) Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroinflammation* 7:8.
- Grad LI, Guest WC, Yanai A, Pokrishevsky E, O'Neill MA, Gibbs E, Semenchenko V, Yousefi M, Wishart DS, Plotkin SS, Cashman NR (2011) Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16398-16403.
- Gravel M, Beland LC, Soucy G, Abdelhamid E, Rahimian R, Gravel C, 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.
- Gros-Louis F, Soucy G, Lariviere R, Julien JP (2010) Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *J Neurochem* 113:1188-1199.

- Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin CL (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 ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775.
- Haddix SG, Lee YI, Kornegay JN, Thompson WJ (2018) Cycles of myofiber degeneration and regeneration lead to remodeling of the neuromuscular junction in two mammalian models of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 13:e0205926.
- Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK (2011) Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature biotechnology* 29:824-828.
- Hammond TR, Robinton D, Stevens B (2018) Microglia and the Brain: Complementary Partners in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 34:523-544.
- Hardiman O, van den Berg LH (2017) Edaravone: a new treatment for ALS on the horizon? *The Lancet Neurology* 16:490-491.
- Hardiman O, van den Berg LH, Kiernan MC (2011) Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 7:639-649.
- Hawrylycz MJ et al. (2012) An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 489:391-399.
- 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.
- Hedegaard A, Lehnhoff J, Moldovan M, Grondahl L, Petersen NC, Meehan CF (2015) Postactivation depression of the Ia EPSP in motoneurons is reduced in both the G127X SOD1 model of amyotrophic lateral sclerosis and in aged mice. *J Neurophysiol* 114:1196-1210.
- 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.
- 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.
- Henkel JS, Beers DR, Wen S, Rivera AL, Toennis KM, Appel JE, Zhao W, Moore DH, Powell SZ, Appel SH (2013) Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med* 5:64-79.
- Hennig R, Lomo T (1985) Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 314:164-166.
- Henriques A, Pitzer C, Dittgen T, Klugmann M, Dupuis L, Schneider A (2011) CNS-targeted viral delivery of G-CSF in an animal model for ALS: improved efficacy and preservation of the neuromuscular unit. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19:284-292.
- Herdewyn S, Cirillo C, Van Den Bosch L, Robberecht W, Vanden Berghe P, Van Damme P (2014) Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43 (A315T) mice. *Mol Neurodegener* 9:24.

- Heredia DJ, Feng CY, Hennig GW, Renden RB, Gould TW (2018) Activity-induced Ca(2+) signaling in perisynaptic Schwann cells of the early postnatal mouse is mediated by P2Y1 receptors and regulates muscle fatigue. *eLife* 7.
- Higgins CM, Jung C, 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, Donnerfeld H, Sasaki S, Nakano I (1984) Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:461-470.
- Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH (2015) Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* 12:364-375.
- Huisman MH, Seelen M, de Jong SW, Dorresteyn KR, van Doormaal PT, van der Kooij AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, van den Berg LH, Veldink JH (2013) Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:976-981.
- Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187:761-772.
- Ilieva HS, Yamanaka K, Malkmus S, Kakinohana O, Yaksh T, Marsala M, Cleveland DW (2008) Mutant dynein (Loa) triggers proprioceptive axon loss that extends survival only in the SOD1 ALS model with highest motor neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12599-12604.
- Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, Cleveland DW (2010) Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron* 67:575-587.
- Jablonski M, Miller DS, Pasinelli P, Trotti D (2015) ABC transporter-driven pharmacoresistance in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Res* 1607:1-14.
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP (1992) Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069-1077.
- Jara JH, Villa SR, Khan NA, Bohn MC, Ozdinler PH (2012) AAV2 mediated retrograde transduction of corticospinal motor neurons reveals initial and selective apical dendrite degeneration in ALS. *Neurobiol Dis* 47:174-183.
- Jiang J et al. (2016) Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron* 90:535-550.
- Johnson JO et al. (2010) Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68:857-864.
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Dimou L, Lin S, Fergani A, Ruegg MA, Schwab ME, Dupuis L, Loeffler JP (2006) The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* 7:1162-1167.
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Pradat PF, Dupuis L, Echaniz-Laguna A, Muller A, Dubourg O, Seilhean D, Hauw JJ, Loeffler JP, Meininger V (2005) Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* 57:553-556.
- Jones RA, Harrison C, Eaton SL, Llaverro Hurtado M, Graham LC, Alkhamash L, Oladiran OA, Gale A, Lamont DJ, Simpson H, Simmen MW, Soeller C, Wishart TM, Gillingwater TH (2017) Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction. *Cell Rep* 21:2348-2356.

- Jonsson PA, Ernhill K, Andersen PM, Bergemalm D, Brannstrom T, Gredal O, Nilsson P, Marklund SL (2004) Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 127:73-88.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA (2008) TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40:572-574.
- 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, Thompson W (2003) Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *Journal of neurocytology* 32:975-985.
- 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.
- Kang H, Tian L, Son YJ, Zuo Y, Procaccino D, Love F, Hayworth C, Trachtenberg J, Mikesch M, Sutton L, Ponomareva O, Mignone J, Enikolopov G, Rimer M, Thompson W (2007) Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity. *J Neurosci* 27:5948-5957.
- Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE (2010) NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 68:668-681.
- Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothstein JD, Bergles DE (2013) Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 16:571-579.
- Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE (2010) Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 33:409-440.
- Karpati G (2010) Disorders of voluntary muscle, 8th Edition. Cambridge ; New York: Cambridge University Press.
- Karpati G, Hilton-Jones D, Bushby K, Griggs RC, Cambridge Books O (2010) Disorders of Voluntary Muscle. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140:691-707.
- Keller-Peck CR, Walsh MK, Gan WB, Feng G, Sanes JR, Lichtman JW (2001) Asynchronous synapse elimination in neonatal motor units: studies using GFP transgenic mice. *Neuron* 31:381-394.
- Ketterer C, Zeiger U, Budak MT, Rubinstein NA, Khurana TS (2010) Identification of the neuromuscular junction transcriptome of extraocular muscle by laser capture microdissection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4589-4599.
- Kia A, McAvoy K, Krishnamurthy K, Trotti D, Pasinelli P (2018) Astrocytes expressing ALS-linked mutant FUS induce motor neuron death through release of tumor necrosis factor- α . *Glia* 66:1016-1033.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC (2011) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377:942-955.
- Kim HJ et al. (2013) Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495:467-473.

- Kleele T, Marinkovic P, Williams PR, Stern S, Weigand EE, Engerer P, Naumann R, Hartmann J, Karl RM, Bradke F, Bishop D, Herms J, Konnerth A, Kerschensteiner M, Godinho L, Misgeld T (2014) An assay to image neuronal microtubule dynamics in mice. *Nature communications* 5:4827.
- Ko CP, Robitaille R (2015) Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7:a020503.
- Koistinen H, Prinjha R, Soden P, Harper A, Banner SJ, Pradat PF, Loeffler JP, Dingwall C (2006) Elevated levels of amyloid precursor protein in muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis and a mouse model of the disease. *Muscle Nerve* 34:444-450.
- Kong J, Xu Z (1998) Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 18:3241-3250.
- Kopp DM, Perkel DJ, Balice-Gordon RJ (2000) Disparity in neurotransmitter release probability among competing inputs during neuromuscular synapse elimination. *J Neurosci* 20:8771-8779.
- Krakora D, Macrander C, Suzuki M (2012) Neuromuscular junction protection for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int* 2012:379657.
- Krichevsky AM, Kosik KS (2001) Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32:683-696.
- Kurland LT, Mulder DW (1954) Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution, with special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations. *Neurology* 4:355-378.
- Kwiatkowski TJ, Jr. et al. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323:1205-1208.
- La Spada AR, Taylor JP (2010) Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet* 11:247-258.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V (1996) Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 347:1425-1431.
- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW (2010) TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19:R46-64.
- Lagier-Tourenne C et al. (2012) Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat Neurosci* 15:1488-1497.
- Lalancette-Hebert M, Sharma A, Lyashchenko AK, Shneider NA (2016) Gamma motor neurons survive and exacerbate alpha motor neuron degeneration in ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E8316-E8325.
- Lalancette-Hebert M, Swarup V, Beaulieu JM, Bohacek I, Abdelhamid E, Weng YC, Sato S, Kriz J (2012) Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *J Neurosci* 32:10383-10395.
- LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, Tokito M, Van Winkle T, Howland DS, Holzbaur EL (2002) Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 34:715-727.

- Langer HT, Senden JMG, Gijzen AP, Kempa S, van Loon LJC, Spuler S (2018) Muscle Atrophy Due to Nerve Damage Is Accompanied by Elevated Myofibrillar Protein Synthesis Rates. *Front Physiol* 9:1220.
- Le Masson G, Przedborski S, Abbott LF (2014) A computational model of motor neuron degeneration. *Neuron* 83:975-988.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD (2012) Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487:443-448.
- Leigh PN, Anderton BH, Dodson A, Gallo JM, Swash M, Power DM (1988) Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neuroscience letters* 93:197-203.
- Lerman BJ, Hoffman EP, Sutherland ML, Bouri K, Hsu DK, Liu FT, Rothstein JD, Knoblach SM (2012) Deletion of galectin-3 exacerbates microglial activation and accelerates disease progression and demise in a SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain and behavior* 2:563-575.
- Letinsky MS, Fischbeck KH, McMahan UJ (1976) Precision of reinnervation of original postsynaptic sites in frog muscle after a nerve crush. *Journal of neurocytology* 5:691-718.
- Li Y, Lee Y, Thompson WJ (2011) Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse. *J Neurosci* 31:14910-14919.
- Li Y, Du XF, Liu CS, Wen ZL, Du JL (2012) Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev Cell* 23:1189-1202.
- Lichtman JW, Colman H (2000) Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25:269-278.
- Liddelow SA et al. (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481-487.
- Lindholm D, Wootz H, Korhonen L (2006) ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 13:385-392.
- Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79:416-438.
- Lino MM, Schneider C, Caroni P (2002) Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 22:4825-4832.
- Liu HN, Sanelli T, Horne P, Pioro EP, Strong MJ, Rogaeva E, Bilbao J, Zinman L, Robertson J (2009) Lack of evidence of monomer/misfolded superoxide dismutase-1 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 66:75-80.
- 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.
- Liu Y, Pattamatta A, Zu T, Reid T, Bardhi O, Borchelt DR, Yachnis AT, Ranum LP (2016) C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron* 90:521-534.
- Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, Cleveland DW (2009) Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4465-4470.

- Loeffler JP, Picchiarelli G, Dupuis L, Gonzalez De Aguilar JL (2016) The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathol* 26:227-236.
- Lopez-Erauskin J et al. (2018) ALS/FTD-Linked Mutation in FUS Suppresses Intra-axonal Protein Synthesis and Drives Disease Without Nuclear Loss-of-Function of FUS. *Neuron* 100:816-830 e817.
- Lopez-Gonzalez R, Lu Y, Gendron TF, Karydas A, Tran H, Yang D, Petrucelli L, Miller BL, Almeida S, Gao FB (2016) Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron* 92:383-391.
- Love FM, Thompson WJ (1998) Schwann cells proliferate at rat neuromuscular junctions during development and regeneration. *J Neurosci* 18:9376-9385.
- Love FM, Thompson WJ (1999) Glial cells promote muscle reinnervation by responding to activity-dependent postsynaptic signals. *J Neurosci* 19:10390-10396.
- 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. *Journal of neurobiology* 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.
- Mackenzie IR, Frick P, Neumann M (2014) The neuropathology associated with repeat expansions in the C9ORF72 gene. *Acta Neuropathol* 127:347-357.
- Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretzschmar HA, Monoranu CM, Highley JR, Kirby J, Siddique T, Shaw PJ, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of neurology* 61:427-434.
- Magill CK, Tong A, Kawamura D, Hayashi A, Hunter DA, Parsadanian A, Mackinnon SE, Myckatyn TM (2007) Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: a confocal microscopic study in transgenic mice. *Exp Neurol* 207:64-74.
- Maimon R, Ionescu A, Bonnie A, Sweetat S, Wald-Altman S, Inbar S, Gradus T, Trotti D, Weil M, Behar O, Perlson E (2018) miR126-5p Downregulation Facilitates Axon Degeneration and NMJ Disruption via a Non-Cell-Autonomous Mechanism in ALS. *J Neurosci* 38:5478-5494.
- Mannen T, Iwata M, Toyokura Y, Nagashima K (1982) The Onuf's nucleus and the external anal sphincter muscles in amyotrophic lateral sclerosis and Shy-Drager syndrome. *Acta Neuropathol* 58:255-260.
- Mantovani S, Garbelli S, Pasini A, Alimonti D, Perotti C, Melazzini M, Bendotti C, Mora G (2009) Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process. *Journal of neuroimmunology* 210:73-79.
- Manuel M, Zytnicki D (2011) Alpha, beta and gamma motoneurons: functional diversity in the motor system's final pathway. *J Integr Neurosci* 10:243-276.
- Marin B, Boumediene F, Logroscino G, Couratier P, Babron MC, Leutenegger AL, Copetti M, Preux PM, Beghi E (2017) Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol* 46:57-74.

- Marinkovic P, Reuter MS, Brill MS, Godinho L, Kerschensteiner M, 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.
- Marshall LM, Sanes JR, McMahan UJ (1977) Reinnervation of original synaptic sites on muscle fiber basement membrane after disruption of the muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3073-3077.
- Martineau E, Di Polo A, Vande Velde C, Robitaille R (2018) Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS. *eLife* 7.
- Martinez-Silva ML, Imhoff-Manuel RD, Sharma A, Heckman CJ, Shneider NA, Roselli F, Zytnicki D, Manuel M (2018) Hypoexcitability precedes denervation in the large fast-contracting motor units in two unrelated mouse models of ALS. *eLife* 7.
- Maruyama H et al. (2010) Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465:223-226.
- Maselli RA, Wollman RL, Leung C, Distad B, Palombi S, Richman DP, Salazar-Gruoso EF, Roos RP (1993) Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 16:1193-1203.
- McC Campbell A et al. (2018) Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. *The Journal of clinical investigation* 128:3558-3567.
- McComas AJ, Sica RE, Campbell MJ, Upton AR (1971) Functional compensation in partially denervated muscles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 34:453-460.
- McCombe PA, Henderson RD (2010) Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gen Med* 7:557-570.
- McMahan UJ, Sanes JR, Marshall LM (1978) Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. *Nature* 271:172-174.
- Meininger V et al. (2017) Safety and efficacy of ozanezumab in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 16:208-216.
- Menon P, Kiernan MC, Vucic S (2015) Cortical hyperexcitability precedes lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 126:803-809.
- Mesci P, Zaidi S, Lobsiger CS, Millecamps S, Escartin C, Seilhean D, Sato H, Mallat M, Boillee S (2015) System xC⁻ is a mediator of microglial function and its deletion slows symptoms in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Brain* 138:53-68.
- Mesnard NA, Haulcomb MM, Tanzer L, Sanders VM, Jones KJ (2013) Delayed functional recovery in presymptomatic mSOD1 mice following facial nerve crush axotomy. *Journal of neurodegeneration & regeneration* 4:21-25.
- Meyer K, Ferraiuolo L, Miranda CJ, Likhite S, McElroy S, Rensch S, Ditsworth D, Lagier-Tourenne C, Smith RA, Ravits J, Burghes AH, Shaw PJ, Cleveland DW, Kolb SJ, Kaspar BK (2014) Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:829-832.
- Meyer T, Schwan A, Dullinger JS, Brocke J, Hoffmann KT, Nolte CH, Hopt A, Kopp U, Andersen P, Epplen JT, Linke P (2005) Early-onset ALS with long-term survival associated with spastin gene mutation. *Neurology* 65:141-143.
- Miledi R, Slater CR (1968) Electrophysiology and electron-microscopy of rat neuromuscular junctions after nerve degeneration. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 169:289-306.

- Miller RG, Mitchell JD, Moore DH (2012) Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*:CD001447.
- Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umapathi 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 U S A* 103:19546-19551.
- Miller TM, Pestronk A, David W, Rothstein J, Simpson E, Appel SH, Andres PL, Mahoney K, Allred P, Alexander K, Ostrow LW, Schoenfeld D, Macklin EA, Norris DA, Manousakis G, Crisp M, Smith R, Bennett CF, Bishop KM, Cudkowicz ME (2013) An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *The Lancet Neurology* 12:435-442.
- Minic J, Molgo J, Karlsson E, Krejci E (2002) Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci* 15:439-448.
- Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V (2014) Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *The Lancet Neurology* 13:1127-1138.
- Miyoshi S, Tezuka T, Arimura S, Tomono T, Okada T, Yamanashi Y (2017) DOK7 gene therapy enhances motor activity and life span in ALS model mice. *EMBO Mol Med* 9:880-889.
- Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K (2006) Immunoreactivities of p62, an ubiquitin-binding protein, in the spinal anterior horn cells of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 249:13-18.
- 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.
- Moriya H, Takagi Y, Nakanishi T, Hayashi M, Tani T, Hirotsu I (1999) Affinity profiles of various muscarinic antagonists for cloned human muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) subtypes and mAChRs in rat heart and submandibular gland. *Life Sci* 64:2351-2358.
- Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y, Nabekura J, Sato K, Okajima F, Takebayashi H, Okano H, Koizumi S (2017) Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nature communications* 8:28.
- Munch C, Rolfs A, Meyer T (2008) Heterozygous S44L missense change of the spastin gene in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 9:251-253.
- 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.
- Nardone R, Holler Y, Taylor AC, Lochner P, Tezzon F, Golaszewski S, Brigo F, Trinka E (2016) Canine degenerative myelopathy: a model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology (Jena)* 119:64-73.

- Nazarian J, Bouri K, Hoffman EP (2005) Intracellular expression profiling by laser capture microdissection: three novel components of the neuromuscular junction. *Physiological genomics* 21:70-80.
- Negro S, Bergamin E, Rodella U, Duregotti E, Scorzeto M, Jalink K, Montecucco C, Rigoni M (2016) ATP Released by Injured Neurons Activates Schwann Cells. *Frontiers in cellular neuroscience* 10:134.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130-133.
- Nguyen JV, Soto I, Kim KY, Bushong EA, Oglesby E, Valiente-Soriano FJ, Yang Z, Davis CH, Bedont JL, Son JL, Wei JO, Buchman VL, Zack DJ, Vidal-Sanz M, Ellisman MH, Marsh-Armstrong N (2011a) Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:1176-1181.
- Nguyen KT, Garcia-Chacon LE, Barrett JN, Barrett EF, David G (2009) The Psi(m) depolarization that accompanies mitochondrial Ca²⁺ uptake is greater in mutant SOD1 than in wild-type mouse motor terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2007-2011.
- Nguyen KT, Barrett JN, Garcia-Chacon L, David G, Barrett EF (2011b) Repetitive nerve stimulation transiently opens the mitochondrial permeability transition pore in motor nerve terminals of symptomatic mutant SOD1 mice. *Neurobiol Dis* 42:381-390.
- Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman JW (2002) Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci* 5:861-867.
- Nijssen J, Comley LH, Hedlund E (2017) Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133:863-885.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457:981-989.
- Nikolsky EE, Vyskocil F, Bukharaeva EA, Samigullin D, Magazanik LG (2004) Cholinergic regulation of the evoked quantal release at frog neuromuscular junction. *J Physiol* 560:77-88.
- 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.
- Nishimune H (2012) Active zones of mammalian neuromuscular junctions: formation, density, and aging. *Ann N Y Acad Sci* 1274:24-32.
- O'Malley JP, Waran MT, Balice-Gordon RJ (1999) In vivo observations of terminal Schwann cells at normal, denervated, and reinnervated mouse neuromuscular junctions. *Journal of neurobiology* 38:270-286.
- O'Rourke JG et al. (2015) C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD. *Neuron* 88:892-901.
- Okada M, Yamashita S, Ueyama H, Ishizaki M, Maeda Y, Ando Y (2018) Long-term effects of edaravone on survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *eNeurologicalSci* 11:11-14.
- Ozdinler PH, Benn S, Yamamoto TH, Guzel M, Brown RH, Jr., Macklis JD (2011) Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early

- and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *J Neurosci* 31:4166-4177.
- Pacelli C, Giguere N, Bourque MJ, Levesque M, Slack RS, Trudeau LE (2015) Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Curr Biol* 25:2349-2360.
- Painter MW, Brosius Lutz A, Cheng YC, Latremoliere A, Duong K, Miller CM, Posada S, Cobos EJ, Zhang AX, Wagers AJ, Havton LA, Barres B, Omura T, Woolf CJ (2014) Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. *Neuron* 83:331-343.
- Park KH, Franciosi S, Leavitt BR (2013) Postnatal muscle modification by myogenic factors modulates neuropathology and survival in an ALS mouse model. *Nat Commun* 4:2906.
- Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, Morrison KE, Pall HS, Hardiman O, Collinge J, Shaw PJ, Fisher EM, Study MRCPIA, Consortium FR (2006) ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 67:1074-1077.
- Parone PA, Da Cruz S, Han JS, McAlonis-Downes M, Vetto AP, Lee SK, Tseng E, Cleveland DW (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, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, Brown RH, Jr. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 43:19-30.
- Patel P, Kriz J, Gravel M, Soucy G, Bareil C, Gravel C, Julien JP (2014) Adeno-associated virus-mediated delivery of a recombinant single-chain antibody against misfolded superoxide dismutase for treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 22:498-510.
- Patten SA, Aggad D, Martinez J, Tremblay E, Petrillo J, Armstrong GA, La Fontaine A, Maios C, Liao M, Ciura S, Wen XY, Rafuse V, Ichida J, Zinman L, Julien JP, Kabashi E, Robitaille R, Korngut L, Parker JA, Drapeau P (2017) Neuroleptics as therapeutic compounds stabilizing neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *JCI Insight* 2(22).
- Pedrini S, Sau D, Guareschi S, Bogush M, Brown RH, Jr., Nanche N, Kia A, Trotti D, Pasinelli P (2010) ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Hum Mol Genet* 19:2974-2986.
- Perez-Garcia MJ, Burden SJ (2012) Increasing MuSK activity delays denervation and improves motor function in ALS mice. *Cell reports* 2:497-502.
- Perez-Gonzalez AP, Rouse I, Darabid H, Lamoureux B, Arbour D, Robitaille R ((soumis)) Glial Cells at the Mammalian Neuromuscular Junction Acquire Immature Excitability Phenotype Following Injury and During Reinnervation. *Glia*.
- Perlson E, Jeong GB, Ross JL, Dixit R, Wallace KE, Kalb RG, Holzbaur EL (2009) A switch in retrograde signaling from survival to stress in rapid-onset neurodegeneration. *J Neurosci* 29:9903-9917.
- Pernet V, Schwab ME (2012) The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell Tissue Res* 349:97-104.
- Personius KE, Balice-Gordon RJ (2001) Loss of correlated motor neuron activity during synaptic competition at developing neuromuscular synapses. *Neuron* 31:395-408.

- Personius KE, Karnes JL, Parker SD (2008) NMDA receptor blockade maintains correlated motor neuron firing and delays synapse competition at developing neuromuscular junctions. *J Neurosci* 28:8983-8992.
- Personius KE, Chang Q, Mentis GZ, O'Donovan MJ, Balice-Gordon RJ (2007) Reduced gap junctional coupling leads to uncorrelated motor neuron firing and precocious neuromuscular synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11808-11813.
- Peters OM 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.
- Petrov KA, Girard E, Nikitashina AD, Colasante C, Bernard V, Nurullin L, Leroy J, Samigullin D, Colak O, Nikolsky E, Plaud B, Krejci E (2014) Schwann cells sense and control acetylcholine spillover at the neuromuscular junction by alpha7 nicotinic receptors and butyrylcholinesterase. *J Neurosci* 34:11870-11883.
- Pfeiffer T, Avignone E, Nagerl UV (2016) Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. *Sci Rep* 6:32422.
- Phukan J, Elamin M, Bede P, Jordan N, Gallagher L, Byrne S, Lynch C, Pender N, Hardiman O (2012) The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:102-108.
- Picher-Martel V, Valdmanis PN, Gould PV, Julien JP, Dupre N (2016) From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta neuropathologica communications* 4:70.
- Pickles S, Vande Velde C (2012) Misfolded SOD1 and ALS: zeroing in on mitochondria. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 13:333-340.
- Pickles S, Destroismaisons L, Peyrard SL, Cadot S, Rouleau GA, Brown RH, Jr., Julien JP, Arbour N, Vande Velde C (2013) Mitochondrial damage revealed by immunoselection for ALS-linked misfolded SOD1. *Hum Mol Genet* 22:3947-3959.
- Pickles S, Semmler S, Broom HR, Destroismaisons L, Legroux L, Arbour N, Meiering E, Cashman NR, Vande Velde C (2016) ALS-linked misfolded SOD1 species have divergent impacts on mitochondria. *Acta neuropathologica communications* 4:43.
- Plachta N, Annaheim C, Bissiere S, Lin S, Ruegg M, Hoving S, Muller D, Poirier F, Bibel M, Barde YA (2007) Identification of a lectin causing the degeneration of neuronal processes using engineered embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 10:712-719.
- Pokrishevsky E, Grad LI, Yousefi M, Wang J, Mackenzie IR, Cashman NR (2012) Aberrant localization of FUS and TDP43 is associated with misfolding of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7:e35050.
- Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, Ling SC, Sun E, Wancewicz E, Mazur C, Kordasiewicz H, Sedaghat Y, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Yeo GW, Cleveland DW (2011) Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci* 14:459-468.
- Powers S, Kwok S, Lovejoy E, Lavin T, Sher RB (2017) Editor's Highlight: Embryonic Exposure to the Environmental Neurotoxin BMAA Negatively Impacts Early Neuronal Development and Progression of Neurodegeneration in the Sod1-G93R Zebrafish Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Toxicol Sci* 157:129-140.

- Prakash YS, Miller SM, Huang M, Sieck GC (1996) Morphology of diaphragm neuromuscular junctions on different fibre types. *Journal of neurocytology* 25:88-100.
- Pramatarova A, Laganieri J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21:3369-3374.
- 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.
- Purves D, Lichtman JW (1980) Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science* 210:153-157.
- Qosa H, Lichter J, Sarlo M, Markandaiah SS, McAvoy K, Richard JP, Jablonski MR, Maragakis NJ, Pasinelli P, Trotti D (2016) Astrocytes drive upregulation of the multidrug resistance transporter ABCB1 (P-Glycoprotein) in endothelial cells of the blood-brain barrier in mutant superoxide dismutase 1-linked amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 64:1298-1313.
- Rakhit R, Robertson J, Vande Velde C, Horne P, Ruth DM, Griffin J, Cleveland DW, Cashman NR, Chakrabarty A (2007) An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nat Med* 13:754-759.
- Rao HM, Prevosto V (2013) Proprioceptive eye position signals are still missing a sensory receptor. *J Neurosci* 33:10585-10587.
- Ravits JM, La Spada AR (2009) ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology* 73:805-811.
- Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, Papadimitriou D, Nagy P, Mitsumoto H, Kariya S, Wichterle H, Henderson CE, Przedborski S (2014) Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron* 81:1001-1008.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD (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.
- Rechtman L, Jordan H, Wagner L, Horton DK, Kaye W (2015) Racial and ethnic differences among amyotrophic lateral sclerosis cases in the United States. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 16:65-71.
- 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.
- Reichert F, Saada A, 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.
- 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.
- Renton AE, Chio A, Traynor BJ (2014) State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 17:17-23.
- Renton AE et al. (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72:257-268.
- Reynolds ML, Woolf CJ (1992) Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *Journal of neurocytology* 21:50-66.

- Ribeiro JA, Sebastiao AM (1987) On the role, inactivation and origin of endogenous adenosine at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 384:571-585.
- Rich MM, Lichtman JW (1989) In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. *J Neurosci* 9:1781-1805.
- 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.
- 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, Rousse I, Robitaille R (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21:3819-3829.
- Rogers RS, Tungtur S, Tanaka T, Nadeau LL, Badawi Y, Wang H, Ni HM, Ding WX, Nishimune H (2017) Impaired Mitophagy Plays a Role in Denervation of Neuromuscular Junctions in ALS Mice. *Front Neurosci* 11:473.
- Rosen DR (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364:362.
- Rosenbaum C, Karyala S, Marchionni MA, Kim HA, Krasnoselsky AL, Happel B, Isaacs I, Brackenbury R, Ratner N (1997) Schwann cells express NDF and SMDF/n-ARIA mRNAs, secrete neuregulin, and show constitutive activation of erbB3 receptors: evidence for a neuregulin autocrine loop. *Exp Neurol* 148:604-615.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *The New England journal of medicine* 326:1464-1468.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 38:73-84.
- Rotshenker S (2009) The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. *Journal of molecular neuroscience* : MN 39:99-103.
- Rotshenker S (2011) Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *Journal of neuroinflammation* 8:109.
- Rotshenker S, Reichert F, Gitik M, Haklai R, Elad-Sfadia G, Kloog Y (2008) Galectin-3/MAC-2, Ras and PI3K activate complement receptor-3 and scavenger receptor-AI/II mediated myelin phagocytosis in microglia. *Glia* 56:1607-1613.
- 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.
- Saberi S, Stauffer JE, Jiang J, Garcia SD, Taylor AE, Schulte D, Ohkubo T, Schloffman CL, Maldonado M, Baughn M, Rodriguez MJ, Pizzo D, Cleveland D, Ravits J (2018) Sense-encoded poly-GR dipeptide repeat proteins correlate to neurodegeneration and uniquely co-localize with TDP-43 in dendrites of repeat-expanded C9orf72 amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 135:459-474.
- Salter MW, Stevens B (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23:1018-1027.

- Sanes JR, Lichtman JW (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2:791-805.
- Sasaki S, Iwata M (2007) Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:10-16.
- Sasaki S, Warita H, Murakami T, Abe K, Iwata M (2004) Ultrastructural study of mitochondria in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol* 107:461-474.
- 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.
- Scekic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, Wagner M, Sun Y, Allmeroth K, Dieterle S, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, Rene F, Dormann D, Haass C, Ludolph AC, Lagier-Tourenne C, Storkebaum E, Dupuis L (2017) Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133:887-906.
- 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.
- Schaeffer L, de Kerchove d'Exaerde A, Changeux JP (2001) Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron* 31:15-22.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691-705.
- Schmied A, Pouget J, Vedel JP (1999) Electromechanical coupling and synchronous firing of single wrist extensor motor units in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 110:960-974.
- Sephton CF, Tang AA, Kulkarni A, West J, Brooks M, Stubblefield JJ, Liu Y, Zhang MQ, Green CB, Huber KM, Huang EJ, Herz J, Yu G (2014) Activity-dependent FUS dysregulation disrupts synaptic homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E4769-4778.
- 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.
- Sharma A, Lyashchenko AK, Lu L, Nasrabady SE, Elmaleh M, Mendelsohn M, Nemes A, Tapia JC, Mentis GZ, Shneider NA (2016) ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nature communications* 7:10465.
- Sharp DJ, Ross JL (2012) Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci* 125:2561-2569.
- Sharp PS, Dick JR, Greensmith L (2005) The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 130:897-910.
- Shefner JM, Wolff AA, Meng L, Bian A, Lee J, Barragan D, Andrews JA, On Behalf Of The Benefit-Als Study G (2016) A randomized, placebo-controlled, double-blind phase IIb trial evaluating the safety and efficacy of tirasemtiv in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 17:426-435.
- Shi Y et al. (2018) Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nat Med* 24:313-325.

- Si Y, Kim S, Cui X, Zheng L, Oh SJ, Anderson T, AlSharabati M, Kazamel M, Volpicelli-Daley L, Bamman MM, Yu S, King PH (2015) Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta) Is a Muscle Biomarker of Disease Progression in ALS and Correlates with Smad Expression. *PLoS One* 10:e0138425.
- Silinsky EM (2004) Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 558:389-401.
- Silinsky EM, Hirsh JK, Searl TJ, Redman RS, Watanabe M (1999) Quantal ATP release from motor nerve endings and its role in neurally mediated depression. *Prog Brain Res* 120:145-158.
- Slater CR (2017) The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *Int J Mol Sci* 18.
- Slater CR, Lyons PR, Walls TJ, Fawcett PR, Young C (1992) Structure and function of neuromuscular junctions in the vastus lateralis of man. A motor point biopsy study of two groups of patients. *Brain* 115 (Pt 2):451-478.
- Slutsky I, Silman I, Parnas I, Parnas H (2001) Presynaptic M(2) muscarinic receptors are involved in controlling the kinetics of ACh release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 536:717-725.
- Smith BN et al. (2014) Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS. *Neuron* 84:324-331.
- Smith IW, Mikesh M, Lee Y, Thompson WJ (2013) Terminal Schwann cells participate in the competition underlying neuromuscular synapse elimination. *J Neurosci* 33:17724-17736.
- So E, Mitchell JC, Memmi C, Chennell G, Vizcay-Barrena G, Allison L, Shaw CE, Vance C (2018) Mitochondrial abnormalities and disruption of the neuromuscular junction precede the clinical phenotype and motor neuron loss in hFUSWT transgenic mice. *Hum Mol Genet* 27:463-474.
- Solowska JM, Baas PW (2015) Hereditary spastic paraplegia SPG4: what is known and not known about the disease. *Brain* 138:2471-2484.
- Somjen GG (1988) Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* 1:2-9.
- Son YJ, Thompson WJ (1995a) Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 14:125-132.
- Son YJ, Thompson WJ (1995b) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14:133-141.
- Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ (1996) Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci* 19:280-285.
- Spaulding EL, Sleigh JN, Morelli KH, Pinter MJ, Burgess RW, Seburn KL (2016) Synaptic Deficits at Neuromuscular Junctions in Two Mouse Models of Charcot-Marie-Tooth Type 2d. *J Neurosci* 36:3254-3267.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319:1668-1672.
- Stanga S, Zanou N, Audouard E, Tasiaux B, Contino S, Vandermeulen G, Rene F, Loeffler JP, Clotman F, Gailly P, Dewachter I, Octave JN, Kienlen-Campard P (2016) APP-dependent glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression drives neuromuscular junction formation. *FASEB J* 30:1696-1711.

- Steele JC, McGeer PL (2008) The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis. *Neurology* 70:1984-1990.
- Stephan AH, Barres BA, Stevens B (2012) The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci* 35:369-389.
- Sutton MA, Schuman EM (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127:49-58.
- 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.
- Swarup V, Audet JN, Phaneuf D, Kriz J, Julien JP (2012) Abnormal regenerative responses and impaired axonal outgrowth after nerve crush in TDP-43 transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 32:18186-18195.
- Swarup V, Phaneuf D, Dupre N, Petri S, Strong M, Kriz J, Julien JP (2011a) Deregulation of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis triggers nuclear factor kappaB-mediated pathogenic pathways. *J Exp Med* 208:2429-2447.
- Swarup V, Phaneuf D, Bareil C, Robertson J, Rouleau GA, Kriz J, Julien JP (2011b) Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain* 134:2610-2626.
- Swinnen B, Robberecht W (2014) The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10:661-670.
- Taetzsch T, Tenga MJ, Valdez G (2017) Muscle Fibers Secrete FGFBP1 to Slow Degeneration of Neuromuscular Synapses during Aging and Progression of ALS. *J Neurosci* 37:70-82.
- Tallon C, Russell KA, Sakhalkar S, Andrapallayal N, Farah MH (2016) Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice. *Neuroscience* 312:179-189.
- Tam SL, Gordon T (2003) Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *Journal of neurobiology* 57:221-234.
- Taylor JP, Brown RH, Jr., Cleveland DW (2016) Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 539:197-206.
- Teyssou E, Takeda T, Lebon V, Boillee S, Doukoure B, Bataillon G, Sazdovitch V, Cazeneuve C, Meininger V, LeGuern E, Salachas F, Seilhean D, Millecamps S (2013) Mutations in SQSTM1 encoding p62 in amyotrophic lateral sclerosis: genetics and neuropathology. *Acta Neuropathol* 125:511-522.
- Thompson W, Jansen JK (1977) The extent of sprouting of remaining motor units in partly denervated immature and adult rat soleus muscle. *Neuroscience* 2:523-535.
- 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, Robitaille R (2006) Purinergic modulation of synaptic signalling at the neuromuscular junction. *Pflugers Arch* 452:608-614.
- Todd KJ, Auld DS, Robitaille R (2007) Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci* 25:1287-1296.

- Todd KJ, Darabid H, Robitaille R (2010) Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 30:11870-11882.
- Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, Konig J, Hortobagyi T, Nishimura AL, Zupunski V, Patani R, Chandran S, Rot G, Zupan B, Shaw CE, Ule J (2011) Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci* 14:452-458.
- Towne C, Raoul C, Schneider BL, Aebischer P (2008) Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16:1018-1025.
- Trachtenberg JT, Thompson WJ (1997) Nerve terminal withdrawal from rat neuromuscular junctions induced by neuregulin and Schwann cells. *J Neurosci* 17:6243-6255.
- Tremblay E, Martineau E, Robitaille R (2017) Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model: When Motor Units Matter. *J Neurosci* 37:8901-8918.
- Tremblay E, Arbour D, Favron-Godbout C, Robitaille R ((in prep)) Chronic systemic treatment with a selective muscarinic antagonist does not improve NMJ repair and neuromuscular function in an ALS mouse model.
- Trias E, Ibarburu S, Barreto-Nunez R, Varela V, Moura IC, Dubreuil P, Hermine O, Beckman JS, Barbeito L (2017) Evidence for mast cells contributing to neuromuscular pathology in an inherited model of ALS. *JCI Insight* 2(20).
- Trias E, King PH, Si Y, Kwon Y, Varela V, Ibarburu S, Kovacs M, Moura IC, Beckman JS, Hermine O, Barbeito L (2018) Mast cells and neutrophils mediate peripheral motor pathway degeneration in ALS. *JCI Insight* 3(19).
- 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.
- Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA (1999) SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 2:848.
- Tsujimoto Y, Shimizu S (2007) Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 12:835-840.
- 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.
- Turner MR, Swash M (2015) The expanding syndrome of amyotrophic lateral sclerosis: a clinical and molecular odyssey. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86:667-673.
- Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K (2009) Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology* 8:94-109.
- Turner MR, Hardiman O, Benatar M, Brooks BR, Chio A, de Carvalho M, Ince PG, Lin C, Miller RG, Mitsumoto H, Nicholson G, Ravits J, Shaw PJ, Swash M, Talbot K, Traynor BJ, Van den Berg LH, Veldink JH, Vucic S, Kiernan MC (2013) Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology* 12:310-322.

- Turney SG, Lichtman JW (2012) Reversing the outcome of synapse elimination at developing neuromuscular junctions in vivo: evidence for synaptic competition and its mechanism. *PLoS Biol* 10:e1001352.
- Turney SG, Walsh MK, Lichtman JW (2012) In vivo imaging of the developing neuromuscular junction in neonatal mice. *Cold Spring Harb Protoc* 2012:1166-1176.
- 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.
- van Blitterswijk M, van Es MA, Hennekam EA, Dooijes D, van Rheenen W, Medic J, Bourque PR, Schelhaas HJ, van der Kooij AJ, de Visser M, de Bakker PI, Veldink JH, van den Berg LH (2012) Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 21:3776-3784.
- Van Damme P, Van Den Bosch L, Van Houtte E, Callewaert G, Robberecht W (2002) GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity. *J Neurophysiol* 88:1279-1287.
- Van Dyke JM, Smit-Oistad IM, Macrander C, Krakora D, Meyer MG, 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.
- Vance C 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 TM, Cashman NR, Cleveland DW (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.
- 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 medicine* 5:193-203.
- Vande Velde C, McDonald KK, Boukhedimi Y, McAlonis-Downes M, Lobsiger CS, Bel Hadj S, Zandona A, Julien JP, Shah SB, Cleveland DW (2011) Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. *PLoS One* 6:e22031.
- Vandoorne T, De Bock K, Van Den Bosch L (2018) Energy metabolism in ALS: an underappreciated opportunity? *Acta Neuropathol* 135:489-509.
- Vaughan SK, Kemp Z, Hatzipetros T, Vieira F, Valdez G (2015) Degeneration of proprioceptive sensory nerve endings in mice harboring amyotrophic lateral sclerosis-causing mutations. *J Comp Neurol* 523:2477-2494.
- Venkova K, Christov A, Kamaluddin Z, Kobalka P, Siddiqui S, Hensley K (2014) Semaphorin 3A signaling through neuropilin-1 is an early trigger for distal axonopathy in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 73:702-713.
- Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del Gaizo Moore V, Yoshikawa M, Hampton TG, Prevette D, Caress J, Oppenheim RW, Milligan C (2013) Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain and behavior* 3:431-457.
- Vogler TO, Wheeler JR, Nguyen ED, Hughes MP, Britson KA, Lester E, Rao B, Betta ND, Whitney ON, Ewachiw TE, Gomes E, Shorter J, Lloyd TE, Eisenberg DS, Taylor JP, Johnson AM, Olwin BB, Parker R (2018) TDP-43 and RNA form amyloid-like myo-granules in regenerating muscle. *Nature* 563:508-513.

- von Lewinski F, Keller BU (2005) Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci* 28:494-500.
- Vrbova G, Mehra N, Shanmuganathan H, Tyreman N, Schachner M, Gordon T (2009) Chemical communication between regenerating motor axons and Schwann cells in the growth pathway. *Eur J Neurosci* 30:366-375.
- Vucic S, Nicholson GA, Kiernan MC (2008) Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131:1540-1550.
- Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC (2014) Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci* 37:433-442.
- Vucic S, Cheah BC, Yiannikas C, Kiernan MC (2011) Cortical excitability distinguishes ALS from mimic disorders. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 122:1860-1866.
- Vucic S, Lin CS, Cheah BC, Murray J, Menon P, Krishnan AV, Kiernan MC (2013) Riluzole exerts central and peripheral modulating effects in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 136:1361-1370.
- Waller A (1850) Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 140:423-429.
- Walsh MK, Lichtman JW (2003) In vivo time-lapse imaging of synaptic takeover associated with naturally occurring synapse elimination. *Neuron* 37:67-73.
- Wang HA, Lee JD, Lee KM, Woodruff TM, Noakes PG (2017) Complement C5a-C5aR1 signalling drives skeletal muscle macrophage recruitment in the hSOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Skelet Muscle* 7:10.
- 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.
- Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH (2009) TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18809-18814.
- Wen X, Tan W, Westergard T, Krishnamurthy K, Markandaiah SS, Shi Y, Lin S, Shneider NA, Monaghan J, Pandey UB, Pasinelli P, Ichida JK, Trotti D (2014) Antisense proline-arginine RAN dipeptides linked to C9ORF72-ALS/FTD form toxic nuclear aggregates that initiate in vitro and in vivo neuronal death. *Neuron* 84:1213-1225.
- Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, Elliott JL, Bassel-Duby R, Sanes JR, Olson EN (2009) MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* 326:1549-1554.
- Williams TL, Day NC, Ince PG, Kamboj RK, Shaw PJ (1997) Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 42:200-207.
- Williamson TL, Cleveland DW (1999) Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2:50-56.
- Winbanks CE, Wang B, Beyer C, Koh P, White L, Kantharidis P, Gregorevic P (2011) TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4. *J Biol Chem* 286:13805-13814.

- Wojcik S, Engel WK, Askanas V (2006) Increased expression of Noga-A in ALS muscle biopsies is not unique for this disease. *Acta Myol* 25:116-118.
- Wong M, Martin LJ (2010) Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 19:2284-2302.
- 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.
- Wood SJ, Slater CR (2001) Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol* 64:393-429.
- Woolley SC, Strong MJ (2015) Frontotemporal Dysfunction and Dementia in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin* 33:787-805.
- 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.
- Writing G, Edaravone ALSSG (2017) Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* 16:505-512.
- Writing Group On Behalf Of The Edaravone Als 19 Study G (2017) Open-label 24-week extension study of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 18:55-63.
- Wu DC, Re DB, Nagai M, Ischiropoulos H, Przedborski S (2006) The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12132-12137.
- Wyatt RM, Balice-Gordon RJ (2008) Heterogeneity in synaptic vesicle release at neuromuscular synapses of mice expressing synaptophluorin. *J Neurosci* 28:325-335.
- Xu YF, Zhang YJ, Lin WL, Cao X, Stetler C, Dickson DW, Lewis J, Petrucelli L (2011) Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Mol Neurodegener* 6:73.
- Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LS (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 SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008b) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11:251-253.
- Yang JS, Sladky JT, Kallen RG, Barchi RL (1991) TTX-sensitive and TTX-insensitive sodium channel mRNA transcripts are independently regulated in adult skeletal muscle after denervation. *Neuron* 7:421-427.
- Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT (2008) Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine* 10:e17.
- Yu W, Qiang L, Solowska JM, Karabay A, Korulu S, Baas PW (2008) The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Mol Biol Cell* 19:1485-1498.

- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 32:6391-6410.
- Zeisel A, Hochgerner H, Lonnerberg P, Johnsson A, Memic F, van der Zwan J, Haring M, Braun E, Borm LE, La Manno G, Codeluppi S, Furlan A, Lee K, Skene N, Harris KD, Hjerling-Leffler J, Arenas E, Ernfors P, Marklund U, Linnarsson S (2018) Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 174:999-1014 e1022.
- Zhou H, Huang C, Chen H, Wang D, Landel CP, Xia PY, Bowser R, Liu YJ, Xia XG (2010a) Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS Genet* 6:e1000887.
- Zhou JY, Afjehi-Sadat L, Asress S, Duong DM, Cudkowicz M, Glass JD, Peng J (2010b) Galectin-3 is a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: discovery by a proteomics approach. *Journal of proteome research* 9:5133-5141.
- Zuo Y, Bishop D (2008) Glial imaging during synapse remodeling at the neuromuscular junction. *Neuron Glia Biol* 4:319-326.
- Zwiegers P, Lee G, Shaw CA (2014) Reduction in hSOD1 copy number significantly impacts ALS phenotype presentation in G37R (line 29) mice: implications for the assessment of putative therapeutic agents. *Journal of negative results in biomedicine* 13:14.

Annexe 1 :

**Opposite Synaptic Alterations At The Neuromuscular
Junction In An Als Mouse Model: When Motor Unit
Matters**

Authors : Tremblay Elsa^{1,2}, Martineau Éric^{1,2}, Robitaille Richard^{1,2*}

Running title: Opposite Synaptic Alterations at the NMJ in ALS

¹ : Département de neurosciences, Université de Montréal

² : Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal, PO box 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Acknowledgements: We would like to thank Dr Christine Vande Velde and Dr Danielle Arbour for their constant support and for exciting and stimulating discussions. We also thank them and Dr Heather Durham for reading the manuscript. We also would like to thank Joanne Vallée and Julie Pépin for technical support. This work was supported by grants to RR from the Canadian Institutes for Health research (MOP-14137 and MOP-111070) and The Robert Packard research center for ALS, and an infrastructure grant from Fonds Recherche Québec-Santé (FRQ-S) to the Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central. E.T. holds a Canada Vanier doctoral award and É.M. holds an ALS Canada doctoral research award. The authors declare no competing financial interests.

Significance statement: The inadequate excitability of motor neurons and their output, the neuromuscular junctions (NMJs), has been considered a key factor in the detrimental outcome of the motor function in ALS. However, a conundrum persists at the NMJ whereby persistent but incoherent opposite neurotransmission changes have been reported to take place. This paper untangles this conundrum by systematically analyzing changes of synaptic properties over the course of the disease progression as a function of the motor unit type. This temporal analysis reveals that early synaptic alterations evolve with disease progression but precedes NMJ neurodegeneration. These data provide a novel framework of analysis and comparison of synaptic transmission alterations in neurodegenerative disorders.

Abstract

Denervation of the neuromuscular junction (NMJ) precedes the loss of motor neurons (MNs) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). ALS is characterized by a motor unit (MU) dependent vulnerability where MNs with fast-fatigable (FF) characteristics are lost first, followed by fast-fatigue resistant (FR) and slow (S) ones. However, changes of NMJ properties as a function of MU types remain debated. We hypothesized that NMJ synaptic functions would be altered precociously in a MU specific manner, prior to structural alterations of the NMJ. Synaptic transmission and morphological changes of NMJs have been explored in two nerve-muscle preparations of SOD1^{G37R} mice and their wild-type (WT) littermates: the *Soleus* (SOL; S and FR MU) and the *Extensor Digitorum Longus* (EDL; FF MU). S, FR and FF NMJs of WT mice showed distinct synaptic properties from which we build a MU synaptic profile (MUSP) that reports MU-dependent NMJ synaptic properties. At P180, FF and S NMJs of SOD1 already showed respectively lower and higher quantal content compared to WT, prior to signs of MN death and before NMJ morphological alterations. Changes persisted in both muscles until pre-onset (P380) while denervation was frequent in the mutant mouse. MN death was evident at this stage. Additional changes occurred at clinical disease onset (P450) for S and FR MU. As a whole, our results reveal a reversed MUSP in SOD1 mutants and highlight MU specific synaptic changes occurring in a precise temporal sequence. Importantly, changes in synaptic properties appear to be good predictors of vulnerability to neurodegeneration.

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal late-onset neurodegenerative disease characterised by the progressive loss of upper and lower MNs. NMJ degeneration is an early event in disease pathogenesis and NMJs morphological and physiological alterations have been reported in several genetic mouse models (Fischer et al., 2004, Narai et al., 2009, Moloney et al., 2014, Arbour et al., 2015). Denervation and loss of synaptic proteins (e.g. SV2) were observed in SOD1^{G93A} mice while early stalling of synaptic vesicles in the nerve terminal has been preferentially observed in fast-twitch fibers (Pun et al., 2006). These changes occur prior to symptoms onset and the loss of ventral root axons in the spinal cord (Frey et al., 2000, Fischer et al., 2004, Narai et al., 2009). This loss affects primarily fast-fatigable (FF) motor units (MU), as they show the greatest vulnerability, followed by fast-fatigue resistant (FR) and slow (S) MU, the latter being the most resistant that persist until end stage (Frey et al., 2000, Pun et al., 2006, Hegedus et al., 2007, Hegedus et al., 2008). Large MU in fast-twitch muscle are then partially replaced by compensatory reinnervation by axons from small (S and FR) MU (Schaefer et al., 2005, Hegedus et al., 2008).

Hence, the development of this MN disease appears to be characterised by profound synaptic alterations at the NMJ. However, this led to a number of discrepancies, generating a conundrum in the literature. For instance, Souayah et al. (2012) reported a reduced probability of release at NMJs of the diaphragm muscle in the presymptomatic SOD1^{G93A} mice while, using the same neuromuscular preparation at the same stage, Rocha et al. (2013) reported that a distinct group of mutant NMJs presented a higher quantal content. After disease onset however, a decreased quantal content was subsequently observed in some NMJs. In addition, a diminished synaptic fidelity as well as decreased spontaneous activity was reported in spinal MNs of the

mutant TDP-43 *zebrafish larvae* (Armstrong and Drapeau, 2013a). Also, either a gain or a loss of FUS function impaired neurotransmission by reducing quantal content and synaptic current amplitude in *drosophila* (Shahidullah et al., 2013; Machamer et al., 2014) or *zebrafish* (Armstrong and Drapeau, 2013b). The difficulty to reconcile these observations could be due in part to the developmental stage, the animal model itself or even to the specific mutation. However, an important aspect that was not considered in these studies is the type of MU to which the NMJs belong.

Consistent with the selective vulnerability of specific groups of MU and the temporal pattern of denervation observed in various models of ALS, we postulate that synaptic activity is altered differentially depending on the MU type and also evolves differently during the disease process. We used SOD1^{G37R} mice, a late-onset, slow and progressive model of ALS (Wong et al., 1995), to record neurotransmission from three different MU types of two different muscles: the fast-twitch EDL (FF MU) and the slow-twitch SOL (S and FR MU). We show that MU at WT NMJs are characterised by a distinctive synaptic profile that we define as a Motor Unit Synaptic Profile (MUSP). We further show that opposite synaptic changes are seen in FF and S MU of SOD1^{G37R} mice before motor neuron degeneration in the spinal cord. NMJs of mutant FF MU present a persistent reduced synaptic strength while those of S MU first show a substantial increase in synaptic evoked release that disappears after clinical onset of the disease. FR MU show a reduced quantal content only after disease onset. These characteristics generated a distinctive MUSP that reflected the various stages of disease progression. These synaptic alterations preceded NMJ structural changes, underlying the preferential vulnerability of NMJs from FF MU. This work highlights the importance of considering MU types in the study of NMJ

functions in ALS, given their differential susceptibility to the disease and the specific intrinsic properties that confer their unique response to disease progression.

Material and methods

Animals

Mice overexpressing the human mutated SOD1^{G37R} transgene were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA,) and bred at our animal facilities on a C57BL/6 background. These mice, referred to as line 29, expressed 2 to 5 fold the level of mutant proteins in the brain, spinal cord and brainstem and developed a slow motor neuron syndrome that resembles the human pathology characterised by a progressive weakness and a late onset of hind limb paralysis originally occurring around 12-13 months of age (Wong, 1995). However, this mouse strain currently exhibits an extended lifetime up to more than 500 days of age, confirmed by Jackson Laboratory (see Fig. 1A for the time course of the disease of the SOD1^{G37R} mouse in our facilities). Three specific time periods were investigated in the present experiment in the SOD1^{G37R} mice and their WT littermates: the asymptomatic stage, P170-190 (P180), the presymptomatic stage, P370-400 (P380) and the symptomatic stage, P420-460 (P450).

Mice genotyping was performed at the time of the weaning by PCR amplification of the human SOD1 transgene using a small tail sample. All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and the Comité de déontologie animale of Université de Montréal.

Nerve-muscle preparations

Nerve-muscle preparations of the *Soleus* (SOL) and *Extensor Digitorum Longus* (EDL) were dissected in oxygenated Ringer's solution (in mM): 110 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 11 Glucose, 0.3 Glutamic Acid, 0.4 Glutamine, 5 BES, 0.036 Choline Chloride and 4.34×10^{-7} Cocarboxylase. After dissection, nerve muscle preparations were

pinned in a Sylgard-coated recording chamber constantly perfused with oxygenated Ringer's solution (95% O₂, 5% CO₂). The pH (7.4) and temperature (28 ± 2 °C) were continuously regulated.

Electrophysiological recordings of synaptic transmission

Suprathreshold stimulation (2-5X) of the tibial nerve (SOL) or the deep peroneal nerve (EDL) was performed using a suction electrode filled with Ringer's solution. Muscle contractions were prevented by continuous perfusion of the preparations with a modified Ringer's solution prepared with low Ca²⁺ (1mM) and high Mg²⁺ concentrations (6.4mM), or by incubating the preparations with μ -conotoxin GIIIB (3-4 μ M, Peptides International) in normal Ringer's physiological solution in closed-bath for 20 min prior to the experiments. Recordings were considered successful when the initial membrane potential (E_m) of a muscle fiber was between - 65mV to - 80mV, an important indicator of muscle quality. In addition, a recording was considered valid and included for further analysis only if E_m variation was less than 5 mV during the experiment.

Importantly, soon after disease onset (defined by the start of weight loss), nerve-muscle preparations of the EDL were too fragile to sustain the experimental procedures and spontaneous contractions would inevitably occur. This further confirmed the vulnerability of these muscles in the disease process. In addition, extensive denervation in the EDL greatly reduced the availability of surface NMJs, further reducing the success rate and preventing us from obtaining successful recordings after disease onset. Nerve-muscle preparation quality of the SOL could

be maintained for a longer time window, allowing us to perform recordings at the beginning of the symptomatic period.

Intracellular recordings of spontaneous and nerve-evoked synaptic responses were performed using a sharp glass microelectrode (WPI, 1.0mm) filled with 3mM KCl (35-70 M Ω) as previously described (Darabid et al., 2013b, Arbour et al., 2015). Briefly, spontaneous activity was monitored first, where miniature endplate potentials (mEPP) were recorded for a period of five to ten minutes without any motor nerve stimulation. mEPP frequency was obtained by dividing the number of mEPPs occurring in a period of at least five minutes (min 100 mEPPs). Endplate potentials (EPP) were then evoked by paired (10 – 15 ms interval) motor nerve stimulations at 0.2 Hz for a period of at least 10 minutes (120 repetitions). Paired-Pulse Facilitation (PPF) was calculated as the mean amplitude of the second EPP divided by the mean amplitude of the first EPP (10 minutes period). Quantal content was calculated according to Castillo and Katz (1954): $m = \text{mean amplitude of the first EPPs (including failures)} / \text{mean amplitude of the mEPPs}$. At least 100 mEPP were included in the calculation of m . Quantal content and paired-pulse facilitation (PPF) are presynaptic markers of the synaptic strength of the recorded NMJs.

Fiber type identification and classification were performed on previously recorded NMJs in the SOL muscle. Preparations were incubated right after the physiological experiment for 10 minutes with α -Bungarotoxin (Alexa fluor 594 conjugate, 1.3-2.0 $\mu\text{g/ml}$, ThermoFisher Scientific), an irreversible marker of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) at the NMJ. This labeling revealed the unique pretzel-like pattern of each NMJ, allowing us to retrieve each recorded NMJs. Additionally, after the completion of the experiment and to further ensure an accurate *post hoc* NMJ identification, surrounding fibers were gently impaled with a sharp

microelectrode in a characteristic way to make the NMJ even more salient and eventually use it as a map. Number of fibers separating the recorded NMJ from the main nerve entry was also counted which served as a supplemental reference. Images on live muscles were then acquired on an Olympus BX-51W1 upright microscope with a BrightLine Pinkel filter set (Single band exciter FF01-560/25).

Immunohistochemistry and fiber type identification

Fiber type identification

The SOL contains mainly two fiber types in mice: S fibers expressing the myosin heavy chain I (MHCI) and FR fiber expressing the myosin heavy chain IIa (MHCIIa). Triple staining was performed on SOL muscle after each physiological experiment to identify the two MHCs and the nAChRs (see Fig. 5B). Muscles were fixed with 4% formaldehyde (Mecalab Ltée) diluted in PBS solution (in mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄ and 2 KH₂PO₄) during 10 minutes and rinsed 3 times with PBS. Membrane permeabilization was then performed in cold Methanol for 6 minutes (-20°C). The following steps of the immunostaining were performed at room temperature. After a rinsing period (3 times with PBS), muscles were incubated in a PBS-Triton X (0.01%) solution containing 10% Normal Donkey Serum (NDS) (Jackson Immunoresearch Labs) for 20 minutes to limit non-specific antibody labeling. Muscles were then incubated for 2 hours with a mouse anti-MHC type I IgG2B and a mouse anti-MHCIIa IgG1 (BAD5c, 1:100 and SC-71c, 1:200, Developmental Studies Hybridoma Bank). Between each immunolabeling steps, muscles were subsequently washed three times (5 min each) in PBS-Triton 0.01%. SOL preparations were incubated for 1 hour at room temperature consecutively in an Alexa647-goat α -mouse IgG2b (1:500, Jackson Immunoresearch Labs) and,

then with the Alexa488-goat α -mouse IgG1 (1:500, Jackson ImmunoResearch Labs). Finally, a 30 minute staining with an Alexa594-conjugated- α -BTX (1.33-2.0 μ g/ml, ThermoFisher Scientific) was performed to label postsynaptic receptors. Muscles were then mounted on a glass slide in Prolong Gold antifade (ThermoFisher Scientific). Images were subsequently acquired using a Zeiss LSM 510 confocal microscope.

Immunolabeling on cross-sections of the EDL was performed as previously described (Gouspillou et al., 2014). Briefly, EDL muscles were mounted in cold optimal cutting medium compound (OCT; TissueTek) and frozen in isopentane cooled to -80°C in liquid nitrogen. Transverse sections (10 μ m) were made and incubated in blocking solution (10% NDS in PBS). Sections were incubated with either mouse IgG1 anti-MHC type IIa (SC-71, 1:200), mouse IgG2b anti-MHC type I (BA-D5, 1:100) and mouse IgM anti-MHC type IIb (BF-F3, 1:200) or mouse IgM anti-MHC type IIx (6H1; 1:10) and mouse IgG1 anti-MHC all but IIx (BF-35, 1:200) for 1h at room temperature (all from Developmental Studies Hybridoma bank). Sections were then rinsed in PBS three times, and incubated with secondary antibodies: goat anti-mouse IgG1 Alexa488, goat anti-mouse IgM Alexa405 and goat anti-mouse IgG2b Alexa647 (all 1:500, Jackson ImmunoResearch). Sections were then mounted in Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen).

MU identification was not performed after each experiment in the EDL muscle since we found that the specific zone on the muscle surface where NMJs were recorded was composed only of MHC IIb fibers (see example at preonset stage in Fig. 8H). In contrast, immunolabeling was necessary after each physiological experiment to identify the FR (MHCIIa) and the S NMJs (MHC I) of the SOL muscle (see Fig. 5B), as they are intermingled and present in similar proportion in WT and SOD1^{G37R} mice at the surface of the SOL muscle (Arbour et al., 2015).

Immunohistochemistry of NMJs and lumbar spinal cord sections

Tissue preparation

Mice were anesthetized with a lethal dose of Ketamine (375 - 450 mg/kg) and Xylazine (25 -30 mg/kg), and then perfused through the heart with cold PBS 1X for 5 minutes, followed by 4% formaldehyde diluted in PBS 1X (4% PFA) for about 15 minutes. SOL and EDL muscles were then dissected and post-fixed for 10 minutes in 4% PFA at room temperature. The whole mice was then further fixed overnight in 4% PFA at 4°C and lumbar spinal cords were dissected, post-fixed in 4% PFA for 2 hours at room temperature and cryoprotected in a 30% sucrose PBS 1X solution for 72 hours at 4°C. Lumbar spinal cords were then embedded in OCT and snap frozen in cooled isopentane (-40 to -50°C).

Spinal cord cross sections and motor neuron counting

Lumbar spinal cord sections were prepared as previously described (Parone et al., 2013, Pickles et al., 2013). Floating 30µm-thick spinal cord cryosections were washed twice (5 min each) in PBS 1X, then incubated in a blocking solution (10% NDS, 0.3% Triton X-100 in PBS) for 1 hour at room temperature. Sections were incubated overnight with primary antibodies against Choline Acetyl-Transferase (ChAT; 1:100; Goat; Millipore; AB144P) and Neuronal Nuclei (NeuN; 1:300; Mouse IgG1; Millipore; MAB377) in blocking solution at room temperature. Slices were then rinsed three times with PBS 1X (5 min each) and incubated with the secondary antibody Alexa594-donkey anti-goat (1:500; Jackson Immunoresearch Labs) in blocking solution for 1 hour at room temperature. Slices were then rinsed three times with PBS 1X and incubated with Alexa488-goat anti-mouse IgG1 secondary antibody for 1 hour. Finally, sections were rinsed three times with PBS 1X (5 min each) and mounted on Superfrost Plus

Gold slides (Thermo Fisher Scientific) with Prolong Gold antifade reagent (Thermo Fisher Scientific).

Image acquisition was performed on an Olympus FV1000 confocal microscope with a 20X water immersion objective (N.A. 0.95). Motor neurons in both ventral horns were counted from 15 to 20 sections per animal, at least 90 μm apart. ChAT- and NeuN-positive cells in the ventral horn were counted as α -motor neurons while ChAT-positive and NeuN-negative cells were counted as γ -motor neurons as previously described (Lalancette-Hebert et al., 2016). Results are expressed as the average number of cells counted per ventral horn in each animal.

NMJ identification and labeling

NMJ immunolabeling to label the three synaptic compartments of the NMJ was performed as previously described (Valdez et al., 2012, Darabid et al., 2013a, b, Arbour et al., 2015). EDL and SOL muscles were permeabilized in 100% cold methanol at -20°C for 6 min. To prevent nonspecific labeling, preparations were incubated for 1 hour at room temperature in a blocking solution composed of 10% normal donkey serum (NDS) and 1% of Triton-X100 diluted in PBS 1X.

For SOL muscles, type I muscle fibers were first labelled by incubating muscles with an antibody against MHC type I (BA-D5c; mouse IgG2b; 1:100; Developmental Studies Hybridoma bank) diluted in blocking solution for 24h at 4°C . SOL and EDL muscles were incubated with a rabbit anti-S100 β antibody (1:250, Agilant-Dako) in blocking solution for 24h at 4°C to label Schwann cells. Next, axons (chicken anti-neurofilament M, NF-M, 1:2000, Rockland Immunochemicals Inc) and nerve terminals (mouse IgG1 anti-synaptic vesicular protein 2, SV2, 1:2000, Developmental Studies Hybridoma Bank) were labeled in blocking

solution for 24h. SOL muscles were then incubated with the secondary antibody Alexa488-goat anti-mouse IgG2b (1:500; Jackson ImmunoResearch Labs) in blocking solution for 2 hours at room temperature. SOL and EDL muscles were then incubated simultaneously with Alexa594-conjugated- α -BTX (1.33-2.0 μ g/ml, Thermo Fisher Scientific) and three secondary antibodies diluted in blocking solution for 2 hour at room temperature: goat anti-mouse IgG1 Alexa405 (SOL) or Alexa488 (EDL), donkey anti-chicken or Alexa 405 (SOL) or Alexa488 (EDL) and Alexa647-donkey anti-rabbit (all 1:500; Jackson ImmunoResearch). Finally, whole muscle preparations were mounted in Prolong Gold antifade reagent (Thermo Fisher Scientific). Muscles were washed six times (10 min each) in PBS-Triton 0.01% following each antibody incubation. Some EDL muscles were dissected from un-fixed mice in normal Ringer's solution and fixed in 4% PFA at room temperature for 10 mins. Immunolabeling of the three synaptic components was performed as previously described for these muscles (Darabid et al., 2013a, Arbour et al., 2015). Observations and image acquisition were performed on a Zeiss LSM 510 or a Zeiss LSM 880 confocal microscope. No image manipulations were performed after acquisition, except for linear contrast adjustments for figure presentation.

Statistical analysis

Results are represented as mean \pm SEM where the number of animals is identified as N and the number of NMJs is represented by n . Unpaired t tests were used in most cases where two different groups were compared. In addition, *two-way ANOVA* with *post hoc* Bonferroni multiple Comparison Test was used to compare the values obtained for the three MU of SOD1 and WT mice. The confidence level used was 95% ($\alpha = 0.05$).

Data from the NMJ morphological analysis (number of events over a number of observations, expressed as a % of events) follow a logistic distribution rather than a Gaussian distribution. This implies that variance is not constant and will vary depending on the value of the mean, i.e. variance is smaller towards the extreme values of 0% and 100% (Crawley, 2007). Classical statistical tests (such as *t-test* or *two-way ANOVAs*) assume that variance is constant and therefore are not appropriate for this analysis. Thus, *Generalized linear models (GLM)* using a *logistic distribution* (binomial error structure, logit link function) were created to test the effect of the MU type and the genotype of animals on the measured morphological criteria (Figure 5). The MU type was defined as paired within each subject (“within subject factor”). All pairwise comparisons were performed post-hoc using *Sidak’s* test. Only post-hoc *p-values* are reported in the text. All analyses were made with the SPSS 24.0.0.0 software (IBM). The number of animals used (N; number of replicates) and the number of NMJs (n; number of observations) are indicated in the text.

Results

Considering the progressive differential susceptibility of fast MU in ALS (Frey et al., 2000, Atkin et al., 2005, Pun et al., 2006, Hegedus et al., 2007, Hegedus et al., 2008), we postulated that previous inconsistencies seen in synaptic transmission at the NMJ in various ALS models may be explained by the differential effect of the mutation on the different MU. In addition, we hypothesized that synaptic alterations presented by the various NMJ types (S-FR-FF) might be transient and evolve differently as disease progress. Hence, using the SOD1^{G37R} mouse model, we tested if spontaneous and nerve-evoked activity were altered in the slow-twitch SOL and the fast-twitch EDL, in a MU specific manner and at different time points during the course of the disease. We investigated three defined time periods to dissect the temporal effect of SOD1 mutation on neuromuscular transmission and NMJ structure: the asymptomatic stage (P180), the presymptomatic (preonset) stage (P380) and disease onset (P450) (see Fig. 1 for details).

α -motor neurons numbers are preserved at P180 but not at P380 in the SOD1^{G37R} mouse

We first characterised the time of onset of motor neuron loss in our slow and progressive SOD1^{G37R} model with respect to disease progression (Fig. 1A). We used the general neuronal nuclei marker NeuN and the cholinergic neuron marker ChAT to specifically identify MNs in lumbar spinal cords cross-sections of the mutant and control mice. Neurons in the ventral horn of the spinal cord positive for both markers were counted as α -MN while those weakly or unlabeled for NeuN were considered γ -MNs. As expected, analysis revealed no change in α -MN or γ -MN number at P180, 9 months prior to disease onset (Fig. 1B-D; WT α -MN: 9.19 ± 0.26 , N=3, SOD1 α -MN: 11.14 ± 2.23 , N=3, WT γ -MN: 5.05 ± 0.32 , N=3, SOD1 γ -MN: 6.02

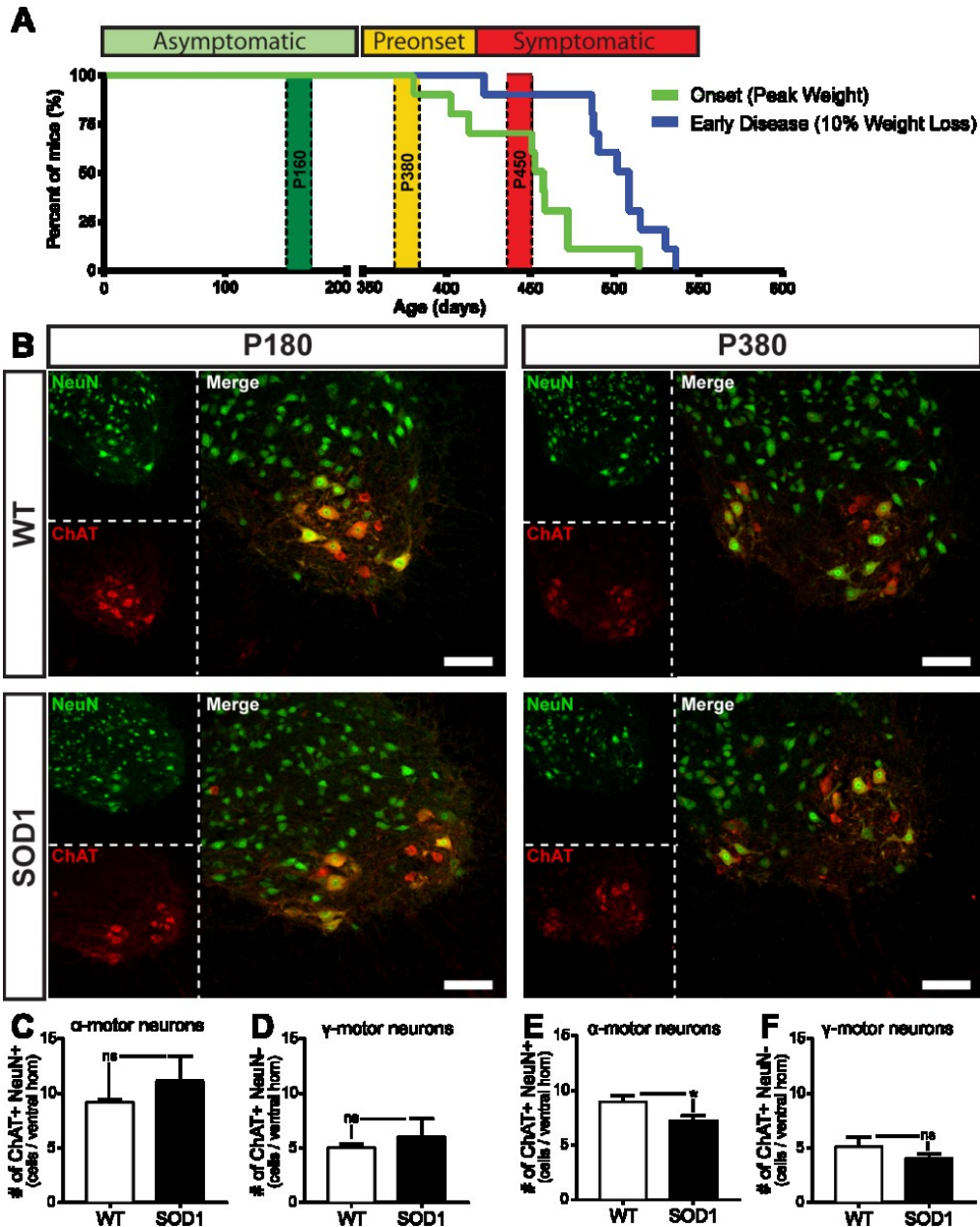


Figure 1 Disease progression and motor neuron death in the SOD1G37R mouse model. A) Percentage of mice reaching disease onset (pale green line) and early disease (blue line). Based on symptoms and clinical nomenclature, the asymptomatic period (green zone) was defined from birth until P350, the presymptomatic (preonset) stage (yellow zone) from P350 until P400 approximately and the symptomatic stage (red zone) started at around P400 until the endstage, at P525-600. We investigated three time periods corresponding to the three stages represented in the figure: P180, P380 and P450. WT, N = 10; SOD1, N = 9. B) Confocal images of immunohistological labeling of motor neurons in the ventral horn of a lumbar spinal cord section: neurons nuclei (NeuN, green) and choline acetyltransferase (ChAT, red) were immunolabelled on spinal cord cross-sections of WT (upper panels) and SOD1 mice (lower panels) at P 180 (left) and P380 (right). Neurons in the ventral horn were identified as α -MNs when brightly labeled for both NeuN and ChAT and identified as γ -MNs when labeled with ChAT but weakly or not labeled for NeuN. C - F) Histograms showing the mean \pm SEM of the number of α -MNs (C) and γ -MNs at P180 (D), and α -MNs (E) and γ -MNs at P380 (F). Note the selective reduction of α -MNs in the mutant mouse at P380, without any γ -MNs loss. Scale bars, 100 μ m.

± 1.65 , N=3). At P380 however, 1 or 2 months prior to the symptomatic stage, a significant loss of α -MN was found in the ventral horn of SOD1 spinal cord while no change in γ -MN number was observed (Fig. 1B, E and F; WT α -MN: 8.98 ± 0.56 , N=4, SOD1 α -MN: 7.26 ± 0.43 , N=5, WT γ -MN: 5.16 ± 0.90 , N=4, SOD1 γ -MN: 4.04 ± 0.42 , N=5). This indicates that α -MN degeneration was already ongoing at this stage.

At preonset stage: NMJ morphology is altered in the EDL and SOL muscles

At P180, several months before the start of overt motor symptoms, there was no evidence of morphological alterations of the presynaptic, postsynaptic and the glial components in the WT and SOD1^{G37R} NMJs (see Fig. 2 for details on the seven criteria analysed), neither in the SOL nor in the EDL (data not shown).

However, since several morphological alterations have been reported in the SOD1^{G93A} mouse before symptom onset, especially in FF MU (Frey et al., 2000, Pun et al., 2006, Valdez et al., 2012), we expected substantial denervation and postsynaptic changes in the fast-twitch EDL that could impair synaptic transmission during the preonset stage. The three components of the NMJ were then labeled at P380 on EDL and SOL whole mounted muscle preparations and each NMJ was analysed according to the seven criteria previously described (Fig. 2 and Arbour et al., 2015).

Denervation and partial innervation were already noticeable and frequent in the SOD1^{G37R} in all fiber types compared to WT (Fig. 3A-C; SOD1 S, 18.89 ± 5.95 %, n=81, N=4; SOD1 FR, 12.67 ± 4.52 %, n=109, N=4; SOD1 FF, 38.27 ± 6.26 %, n=153, N=6; WT S, 0.74 ± 0.74 %, n=94, N=4; WT FR, 2.18 ± 2.18 %, n=69, N=4; WT FF, 6.68 ± 1.50 %, n=125, N=6, *Generalized Linear Model (GLM)*, respectively $p = 0.007$, $p = 0.025$ and $p < 0.001$). In

	Criteria	Definition	Examples
Presynaptic	Denervation	Partial: when the presynaptic nerve terminal vacates parts (>10%) of the end-plate area (BTX staining). Complete: when the end-plate is completely devoided of a presynaptic nerve terminal.	
	Nerve sprouting	Terminal: when the nerve terminal extends beyond the end-plate (>10 μm) or contacts another NMJ.* Axonal: when a sprout extends from the axonal branch rather than the end-plate.	
	Polyinnervation	When at least two distinct sources of innervation (myelinated axons or thin sprouts!) contact an end-plate.* The intensity and tickness of the S100β staining is used to distinguish myelinated axons from sprouts.	
Postsynaptic	Faint clustered nAChR	When the postsynaptic nAChRs are not (1) uniformly distributed, (2) lack the classical "pretzel"-like organization and (3) do not have a well-defined outline. These end-plates are reminiscent of immature NMJs (Darabid et al. 2013).	
	Ectopic nAChR	When two nAChR clusters belonging to the same NMJ are at least 5 μm apart. Small spherical BTX-positive puncta were considered as non-specific labeling. Clusters of nAChRs on the same muscle fiber are considered as belonging to the same NMJ.	
Glia	Glial coverage	Insufficient coverage: When PSCs do not fully cover the endplate area (BTX staining). Over-coverage: When the soma of PSCs extends beyond the endplate area without forming a long and thin process (see below).	
	PSC process extension	Terminal: When a PSC extends a thin process beyond the end-plate (>10 μm) without being associated with a presynaptic sprout contacting this NMJ. ** Axonal: when a glial process extends from axonal SCs rather than PSCs.	

* As it is difficult to distinguish between NMJs emitting or receiving sprouts (terminal sprouting or polyinnervation), a thin presynaptic process contacting a partially denervated NMJ was counted as a source of innervation rather than as a sprout originating from this endplate, unless clear evidence suggests otherwise.

** Glial processes associated with a presynaptic sprout contacting an endplate were classified as a terminal sprout or a source of innervation (see comment above).

Figure 2 Definition and examples of the criteria used for NMJ morphological analysis. The state of the three components (left column) of the NMJ, presynaptic (green), postsynaptic (red) and glia (blue) was analysed using seven criteria. Immunohistochemical analysis of the three components was performed based on the criteria defined in Fig. 2 (Arbour et al., 2015). Three criteria were defined to analyse the presynaptic component: denervation, nerve sprouting and polyinnervation. Postsynaptic receptors organisation was assessed using two criteria: faint clustered nAChRs or ectopic receptors. Finally, PSCs structure and integrity were evaluated using two criteria: incomplete glial coverage and glial sprouting. Confocal false color images of the three components of the NMJ obtained from the mutant mouse illustrating each criterion (right column): presynaptic terminal (synaptic vesicles and the neurofilament, SV2 + NF-M, in green), endplate acetylcholine receptors (postsynaptic, α -BTX, in red) and perisynaptic Schwann cells (Glia, S100 β , in blue). Scale bars, 10 μ m.

comparison, only one NMJ was found completely denervated in WT muscles at this age and only a few were partially denervated (Fig. 3A-C). Denervation was however clearly higher in the EDL than the SOL muscle, with FF MU presenting significantly more partially or completely denervated endplates than FR MU (Fig. 3A-C; *GLM*, $p = 0.0307$). In all mutant MU types, postsynaptic endplate areas showed more ectopic receptors, a diffuse α -BTX labeling (see Fig. 2 for examples) and a clustered appearance in SOD1 mice in comparison to WT (Fig. 3D; WT S, 28.66 ± 8.69 %; WT FR, 36.90 ± 5.39 %; WT FF, 18.28 ± 2.25 %; SOD1 S, 77.00 ± 3.20 %; SOD1 FR, 67.48 ± 8.75 %; SOD1 FF, 38.88 ± 3.71 %, *GLM*, respectively $p = 0.007$, $p = 0.025$ and $p < 0.001$). However, positive NMJ repair signs, including nerve sprouting, polyinnervation and PSC process extensions were observed more frequently in both mutant S and FR synapses compared to FF synapses (Fig. 3E; SOD1 S, 40.32 ± 7.42 %; SOD1 FR, 35.79 ± 8.02 %; SOD1 FF, 12.67 ± 3.56 %, *GLM*, respectively $p < 0.001$ and $p = 0.006$), suggesting that some regenerative processes are likely to happen in the SOD1 SOL muscle at this stage. This is consistent with the high plasticity capacity of these synapses compared to FF synapses (Frey et al., 2000). Interestingly, in the WT as well, FR MU presented greater signs of NMJ reinnervation than FF MU (Fig. 3D; WT S, 19.82 ± 7.29 %; WT FR, 33.79 ± 6.66 %; WT FF, 5.09 ± 2.47 , *GLM*, $p < 0.001$), furthermore confirming the increased adaptive capacity of the SOL in healthy and pathological conditions.

At disease onset: Selective morphological vulnerability of NMJs from FF MU

We next analysed morphological NMJ properties at disease onset (P450) and performed similar immunostainings as described above (Fig. 3). Consistent with their well-known relative vulnerability in the SOD1^{G93A} model (Frey et al., 2000, Pun et al., 2006, Hegedus et al., 2007,

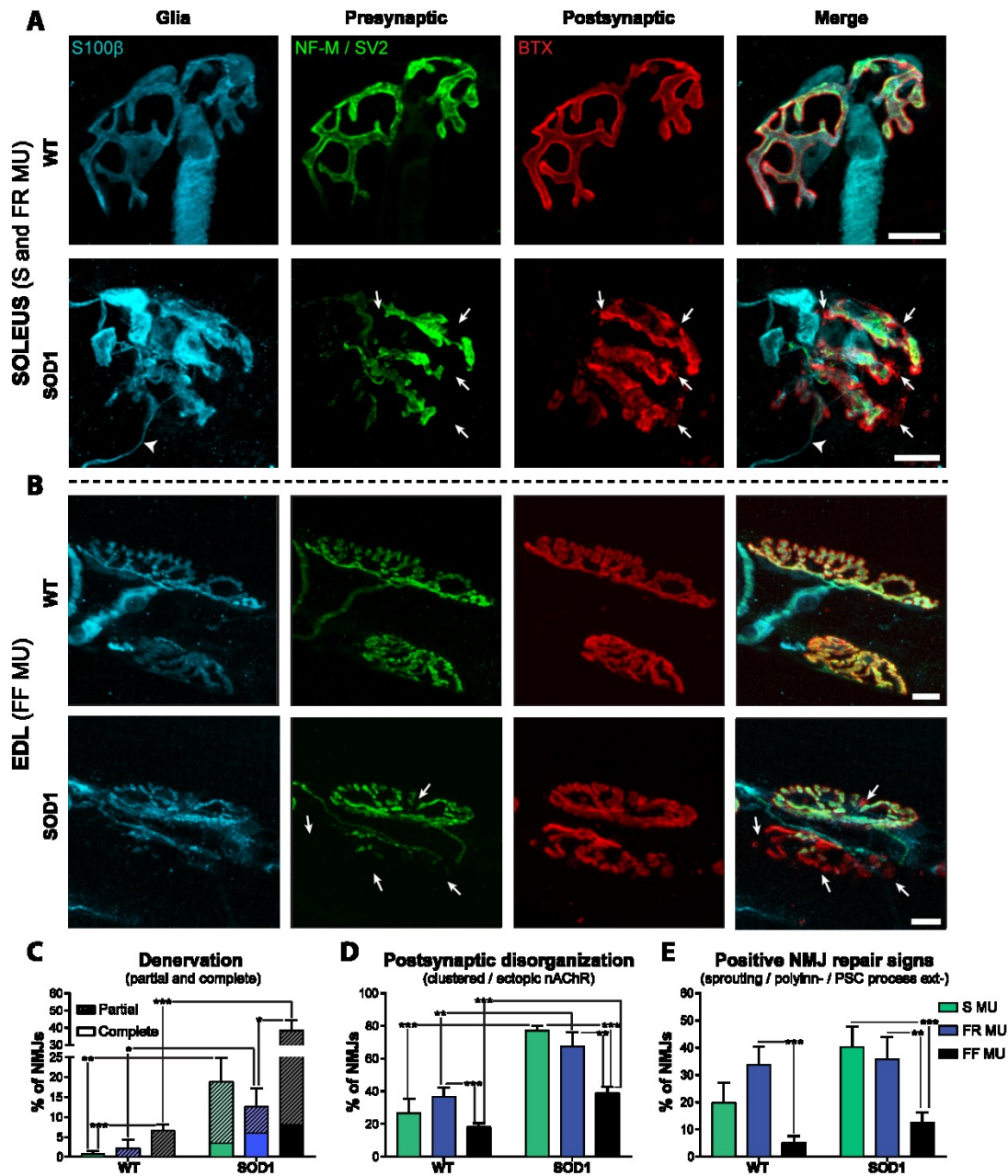


Figure 3 Morphological alterations at P380 of FF, FR and S NMJs in EDL and SOL muscles. **A-B** Confocal images of immunohistochemical labeling of the three components of the NMJ: the perisynaptic Schwann cells (Glia, S100 β , in blue), the presynaptic terminal (SV2 + NF-M, in green) and AChRs (postsynaptic, α -BTX, in red) in the SOL (**A**) and the EDL (**B**) of WT (upper panel) and SOD1^{G37R} mice (bottom panel). Note the presence of partially innervated NMJs in the SOL (**A**, lower panel) and EDL (**B**, lower panel) of SOD1 mice (arrows) and a glial process extension in the SOD1 SOL (**A**, arrowheads). **C – E** Histograms showing mean \pm SEM of the percentage of NMJs with denervation, including partially innervated and completely denervated NMJs (**C**), postsynaptic endplate disorganisation, including faint, clustered or ectopic nAChRs (**D**) and positive NMJ repair signs, namely nerve sprouting, polyinnervation and PSC bridges (**E**). Note that all MU types already present significant denervation and postsynaptic disorganisation at the presymptomatic stage in the mutant mouse compared to the control. *GLM*, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Scale bars, 10 μ m.

Hegedus et al., 2008, Krysciak et al., 2014), denervation and partial innervation were frequently observed at FF NMJs, significantly higher than in FR and S NMJs. Indeed, only 12.94 ± 5.61 % of S NMJs and 12.62 ± 5.20 % of FR NMJs were denervated and partially innervated as opposed to 49.24 ± 3.62 % of FF NMJs (Fig. 4B; SOD1 S, n=64, N=4; SOD1 FR, n=97, N=4; SOD1 FF, n=153, N=4, *GLM*, $p < 0.001$ and $p < 0.001$). By comparison, denervation was observed on 5.73 ± 1.73 % of S WT NMJs, 3.65 ± 1.40 % of FR NMJs and 3.62 ± 1.58 % of FF NMJs, only the latter being significantly different from the mutant (Fig. 8B; WT S, n=107, N=5; WT FR, n=174, N=5; WT FF, n=249, N=5, *GLM*, $p > 0.05$, $p > 0.05$ and $p < 0.01$).

While postsynaptic endplates of NMJs from S MU in WT were more disorganised than FR and FF synapses (Fig. 4C; WT S, 47.63 ± 7.16 %; WT FR, 22.58 ± 7.66 %; WT FF, 20.55 ± 1.39 *GLM*, $p = 0.013$ and $p < 0.001$), only mutant FR and FF MU showed more disorganised postsynaptic endplates (increased ectopic receptors, diffuse α -BTX labeling and clustered nAChRs) than WT mice (Fig. 4C; SOD1 FR, 51.71 ± 10.74 %; SOD1 FF, 63.45 ± 6.38 %, *GLM*, respectively $p = 0,005$ and $p < 0.001$).

In addition, mutant NMJs from S MU had significantly more frequent positive signs of reinnervation, including nerve sprouting, polyinnervation and PSCs process extensions, than the FF NMJs (Fig. 4D; SOD1 S, 44.98 ± 1.99 %; SOD1 FR 42.52 ± 11.57 %; SOD1 FF, 9.38 ± 3.08 %, *GLM*, $p < 0.001$ and p). Consistent with the positive influence of these parameters on the reinnervation of NMJs (Son et al., 1996), we observed numerous NMJs that were relatively spared in SOL of SOD1 mice, showing a well-preserved presynaptic component and a complete PSC coverage. This result is consistent with the relative resistance of this muscle to denervation in ALS (Valdez et al., 2012). Furthermore, our data confirm that the specific vulnerability of FF MU reported in other SOD1 models of the disease is also present in the SOD1^{G37R} model.

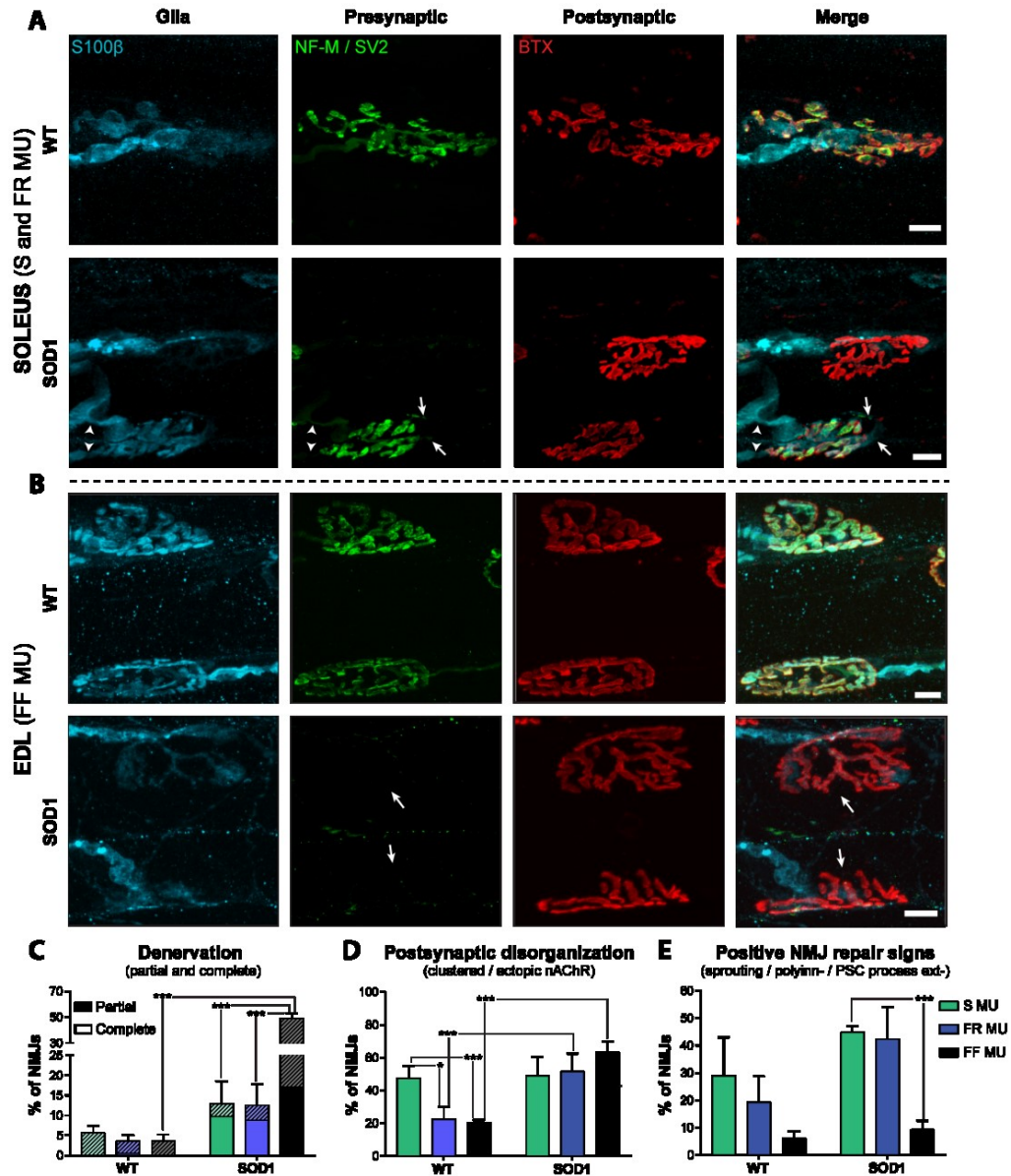


Figure 4 Differential NMJs morphological alterations at clinical disease onset (P450). A-B Confocal false color images of the three synaptic compartments of the NMJ: glia (S100 β , blue), presynaptic nerve terminal (NF-M and SV2, green) and postsynaptic endplate (nAChRs) (α -bungarotoxin, red) for WT and SOD1 NMJs. Note the presence of denervated NMJs in the SOL and the EDL (A, lower panel) and EDL (B, lower panel) of SOD1 mice (white arrows), as well as polyinnervation and nerve terminal sprouting in the SOD1 SOL (A, arrowheads and asterisks respectively). Immunohistochemical analysis was performed as in Fig 3. C- E) Histograms showing the mean \pm SEM of the percentage of NMJs with partial or complete denervation (C), with faint, clustered or ectopic nAChRs (D) or with nerve sprouting, polyinnervation or PSC process extensions (E). Note the major deterioration of NMJs of the EDL in comparison to the ones of the SOL. *GLM*, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

At asymptomatic stage: Spontaneous activity is unaltered in all MU types

Following the characterization of the state of innervation, we examined the NMJ properties and synaptic changes throughout disease progression as a function of the MU type.

Frequency and amplitude of spontaneous synaptic events were first analysed at P180 in the SOL and EDL muscle of WT and SOD1^{G37R} mice. Figure 5 shows that the properties of spontaneous activity are MU-dependent ($F(2,73) = 86.86$, $p < 0.0001$, *two-way ANOVA*). In WT mice, NMJs of slow MU showed the lowest mEPP frequency with 0.50 ± 0.03 Hz (Fig. 5B; WT S, $n=9$, $N=6$), followed by the FR NMJs at 1.16 ± 0.22 Hz (Fig. 5B; WT FR, $n=11$, $N=6$) and finally the FF NMJs at 5.51 ± 0.56 Hz (Fig. 2B; WT FF, $n=15$, $N=7$). Importantly, the same pattern was observed in the SOD1 mice, without any difference compared to control NMJs (Fig. 5B; SOD1 S: 0.57 ± 0.06 Hz, $n=13$, $N=7$; SOD1 FR: 1.46 ± 0.23 Hz, $n=14$, $N=6$; SOD1 FF: 4.66 ± 0.46 Hz, $n=17$, $N=6$, *Bonferroni post-hoc test*, $p > 0.05$). This is consistent with a previous report of unaltered spontaneous transmitter release at a presymptomatic stage in the SOD1^{G93A} mouse diaphragm (Rocha et al., 2013).

We next investigated the amplitude of the spontaneous events, knowing that this variable is usually inversely correlated with the fiber diameter (Sieck and Prakash, 1997). Accordingly, we predicted that mEPP amplitude should be the smallest in FF MU and the largest in S MU in WT mice. Alteration of this criterion could highlight postsynaptic defects in the mutant mice. Our results show that mEPP amplitude varied as a function of the MU type ($F(2,69) = 58.72$, $p < 0.0001$, *two-way ANOVA*). In the WT, FF MU had the smallest mEPP amplitude while FR MU and S MU had the greatest mEPP amplitude (Fig. 5C; WT S, 0.35 ± 0.02 mV, $n=10$, $N=6$; WT FR, 0.31 ± 0.01 mV, $n=12$, $N=7$; WT FF, 0.24 ± 0.01 mV, $n=15$, $N=7$, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.001$). Mutant NMJs followed approximately the same pattern, but in contrast

mEPP amplitude of mutant FR NMJs was significantly higher than the control mice (Fig. 5D; SOD1 S, 0.37 ± 0.02 mV, n=13, N=7; SOD1 FR, 0.36 ± 0.02 mV, n=12, N=6; SOD1 FF, 0.24 ± 0.01 mV, n=14, N=6, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.01$). Unlike previously reported for the

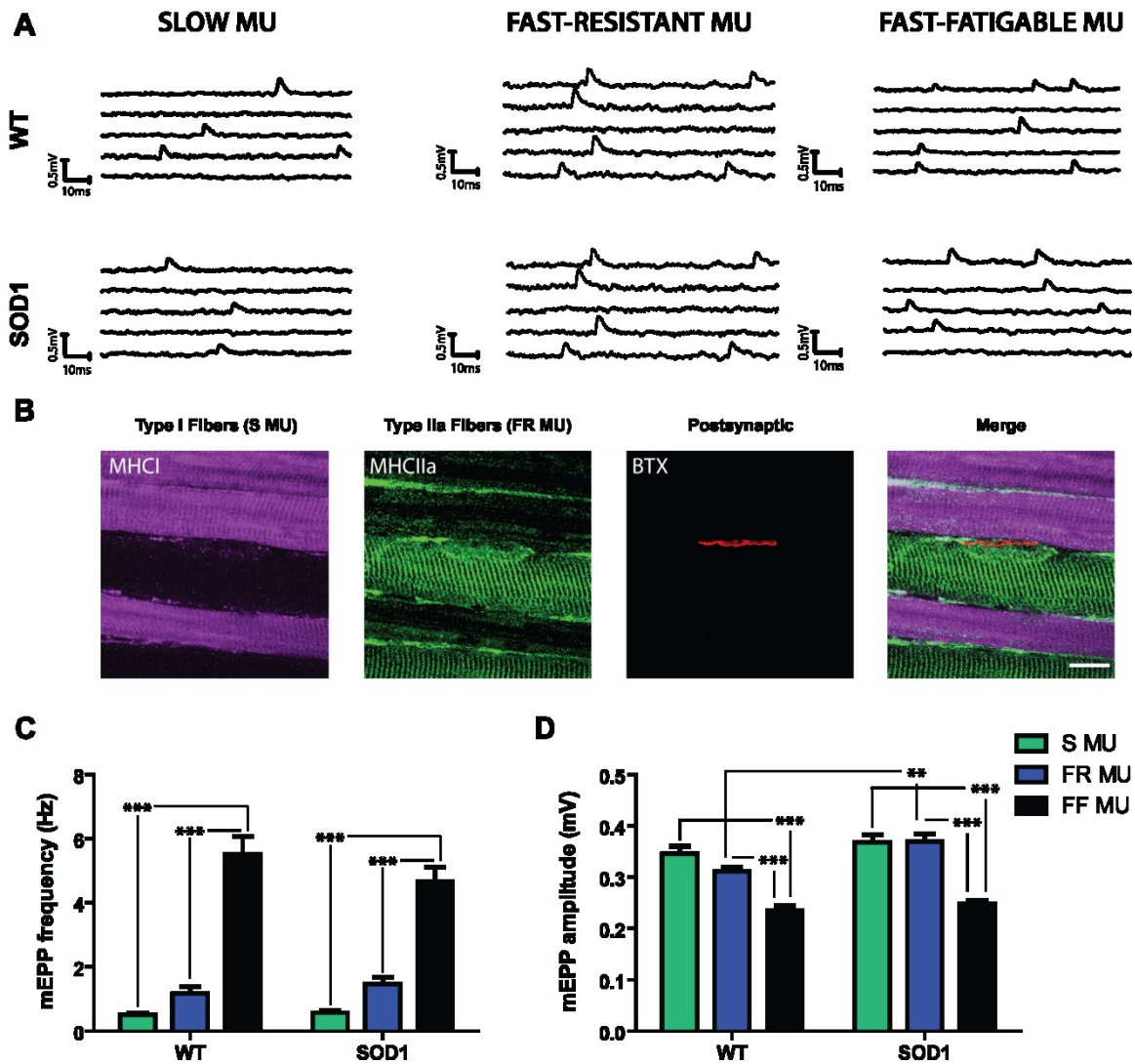


Figure 5 Unaltered spontaneous activity at P180 in S, FR and FF NMJs. **A**) Typical traces of mEPP for S (left), FR (center) and FF (right) NMJs of WT and SOD1^{G37R} mice. **B**) Confocal false color images showing fiber type identification and labeling of the SOL muscle: S MHC (MHC 1, purple), FR MHC (MHC IIa, green) and postsynaptic nAChRs (α -BuTX, red). Note the alternance of the two MU types at the surface of the SOL muscle. C-D) Histograms showing the mean \pm SEM of mEPP frequency (C) and mEPP amplitude (D) for S (in green), FR (in blue) and FF NMJs (in black). Note the gradual increase in mEPP frequency as a function of the MU type, which is similar for WT and SOD1^{G37R} NMJs. However, the relative mEPP amplitude of SOD1 NMJs did not follow the pattern observed in WT littermates as the mEPP amplitude of FR MU was larger in SOD1 than WT. Scale Bar in **B**, 10 μ m.

SOD1^{G93A} diaphragm (Rocha et al., 2013), giant mEPPs (> 1 mV) were not predominant in any MU (less than 1 event per 5 min recording period) in both WT and SOD1 mice.

At asymptomatic stage: Evoked activity is high in S MU and low in FF MU

We next tested nerve evoked synaptic transmission in a MU specific manner at P180 in the SOD1^{G37R} mouse model. We performed intracellular electrophysiological recordings using a paired-pulse stimulation (PPF) protocol (two stimuli, 0.1 ms duration at 10 ms interval) elicited at 0.2 Hz, in a low Ca²⁺-high Mg²⁺ Ringer's solution. These properties were then studied in normal Ca²⁺ concentration.

Amplitude of EPPs evoked by stimulation of the tibial nerve (SOL) and the deep peroneal nerve (EDL) was first measured using the first EPP evoked by the PPF protocol. Overall, we found a significant interaction effect ($F(2,73) = 8.836$, $p = 0.0004$, *two-way ANOVA*). For instance, EPP amplitude in the WT SOL was not significantly different neither in S, FR nor in FF MU (Fig. 6A and B; WT S, 0.74 ± 0.08 mV, $n=10$, $N=6$; WT FR, 0.97 ± 0.07 mV, $n=13$, $N=7$; WT FF, 0.95 ± 0.08 mV, $n=16$, $N=6$, *Bonferroni post-hoc test*, $p > 0.05$). In contrast, mutant mice showed a completely reversed pattern, with EPP amplitude significantly larger at S NMJs than at FF NMJs (Fig. 6A and B; SOD1 S, 1.21 ± 0.13 mV, $n=11$, $N=7$; SOD1 FF, 0.98 ± 0.12 mV, $n=16$, $N=6$, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.001$). In addition, significant differences emerged between WT and SOD1 where EPP amplitude was 64% larger in mutant S NMJs than WT S NMJs (Fig. 6A and B; *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.001$) while it was 36% smaller in the FF NMJs of SOD1 mice (Fig. 6A and B; *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.01$). However, no difference in EPP amplitude was detected at FR NMJs from SOD1 mice compared

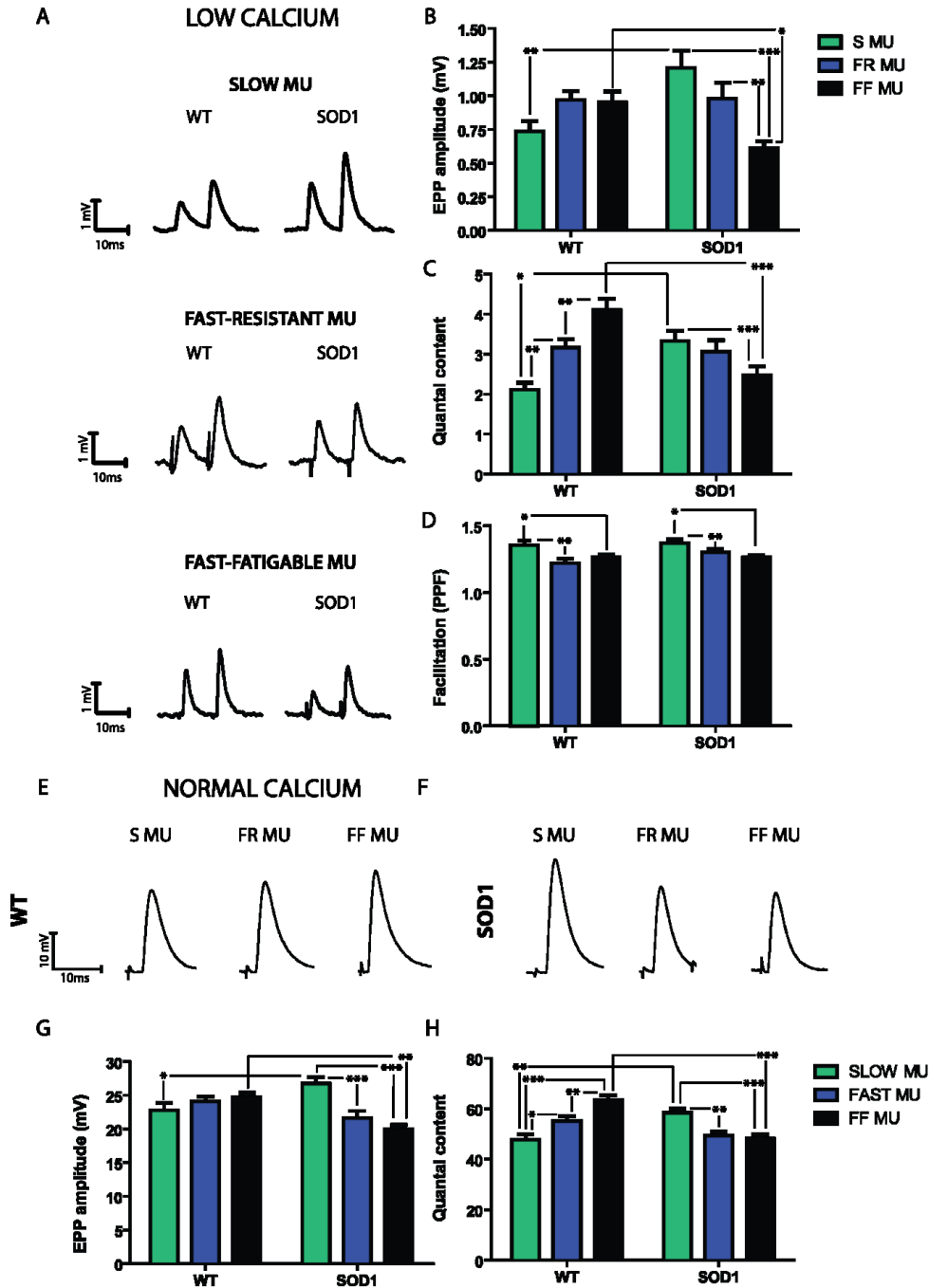


Figure 6 EPP amplitude and quantal content are increased at P180 in S NMJs but decreased in FF NMJs. **A)** Typical traces of EPPs evoked by a paired-pulse protocol (0.2 Hz, 10 ms interval) in a low Ca^{2+} /High Mg^{2+} solution for S (top), FR (middle) and FF NMJs (bottom) of WT and SOD1^{G37R} mice. **B – D)** Histograms of the mean \pm SEM of EPP amplitude (**B**), quantal content (**C**) and paired-pulsed facilitation ratio (**D**) of the S (green), FR (blue) and FF NMJs (black) from WT and SOD1^{G37R} mice. Note that SOD1 NMJs showed a reverse MU pattern. **E-F)** Example traces of EPPs in physiological Ca^{2+} concentration with μ -conotoxin GIIIB to block muscle contractions, for WT (**E**) and SOD1 (**F**) mice. **G – H)** Histograms of the mean \pm SEM of EPP amplitude (**G**) and quantal content (**H**) performed in normal extracellular Ca^{2+} concentration. Note the similarities between data obtained in low vs normal Ca^{2+} confirming the striking synaptic differences observed in the mutant mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

to WT (Fig. 6A and B; SOD1 FR, 0.61 ± 0.05 mV, $n=14$, $N=7$, *Bonferroni post-hoc test*, $p > 0.05$).

We next determined the quantal content as a function of the MU type in WT and SOD1 animals. Based on the well-known differences in MU functions and synaptic properties (Reid et al., 1999, Kanning et al., 2010), we predicted a gradient of quantal content in WT mice, from S to FF NMJs. Indeed, S NMJs had the smallest quantal content with 2.11 ± 0.17 (Fig. 6C; *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.01$) while FF NMJs presented the largest one with 4.10 ± 0.29 (Fig. 6C, WT S, $n=10$, $N=6$, WT FF, $n=16$, $N=7$, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.001$). Furthermore, FR NMJs showed an intermediate value that was significantly different from the others (Fig. 6C; WT FR, 3.15 ± 0.23 , $n=14$, $N=7$, *Bonferroni post-hoc test*, respectively $p < 0.05$ and $p < 0.001$).

Interestingly, this MU-dependency was altered at SOD1 NMJs. Indeed, well before onset of motor symptoms, opposite synaptic changes were already prominent in the S fibers of the SOL and the FF fibers of the EDL, reversing the normal physiological properties observed at WT NMJs. Interestingly the presence of the mutation influenced the MU types differently, as shown by a significant interaction effect ($F(2,68) = 15.01$, $p < 0.0001$, *two-way ANOVA*). Indeed, S MU of the SOD1^{G37R} SOL presented a 57% increase in the mean quantal content compared to WT (Fig. 6C; SOD1 S, 3.33 ± 0.26 , $n=13$, $N=6$, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.01$) while it was reduced by 66% in the FF NMJs of the mutant mice (Fig.6C; SOD1 FF, 2.46 ± 0.23 , $n=16$, $N=7$, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.001$). These results demonstrate the presence of early and striking synaptic alterations in mutant mice, which contradict the established roles and functions of the various MU types (Kanning et al., 2010).

Lastly, we analysed the paired-pulsed facilitation ratio (PPF) as an indicator of presynaptic release probability and synaptic efficacy. Consistent with the idea that the initial probability of release of a NMJ is normally inversely proportional to the PPF (Mallart and Martin, 1968), we expected, based on our quantal analysis results, to observe MU specific variation of this variable in WT mice. Owing to the quantal content in SOD1 mice described above, we further hypothesized that PPF ratio should be reduced at SOD1 S NMJs and increased at FF NMJs in SOD1 compared to WT.

Once again, MU type had the greatest influence on these properties, irrespective of the genotype ($F(2,75) = 8.847$, $p = 0.004$, *two-way ANOVA*). Indeed, PPF ratio was significantly greater in S and FR NMJs than in FF NMJs in WT (Fig. 6D; WT S, 1.35 ± 0.03 , $n=10$, $N=6$, WT FR, 1.22 ± 0.03 , $n=12$, $N=6$, WT FF, 1.26 ± 0.02 , $n=16$, $N=6$, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.05$) and in SOD1 mice (Fig. 6D; SOD1 S, 1.37 ± 0.02 , $n=13$, $N=6$, SOD1 FR, 1.30 ± 0.02 , $n=15$, $N=7$, SOD1 FF, 1.26 ± 0.02 , $n=16$, $N=6$, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.05$). Surprisingly, however, PPF ratio was unchanged in SOD1 compared to WT mice in any MU type (Fig. 6D; *Bonferroni post-hoc test*, $p > 0.05$). This is inconsistent with the typical physiology of the NMJ whereby a large PPF is associated with a low quantal content. However, these results are in accordance with the MU-specific differences in PPF reported in WT mice.

In the last sets of experiments, we tested that the various alterations in the synaptic properties described above are also present in regular Ca^{2+} conditions and occur in normal synaptic physiological conditions (Fig. 6E-H). We performed electrophysiological recordings in normal Ca^{2+} Ringer's solution, using μ -Conotoxin GIIIB (3-4 μ M) to selectively block Na^+ channel in muscle fibres and prevent muscle contractions. Properties of nerve-evoked synaptic activity were again clearly altered as a function of the MU type ($F(2,86) = 4.055$, $p = 0.0207$,

two-way ANOVA) and the interaction with the genotype ($F(2,86) = 12.03$, $p < 0.0001$, *two-way ANOVA*) for EPP amplitude. In addition, there was a clear influence of the genotype ($F(1,75) = 4.543$, $p = 0.0363$, *two-way ANOVA*) and an interaction of the genotype with MU type for the quantal content ($F(2,75) = 21.91$, $p < 0.0001$, *two-way ANOVA*). Indeed, consistent with our previous findings in low Ca^{2+} /high Mg^{2+} , quantal content in the WT was smaller at S NMJs compared to FR and FF NMJs, with FF NMJs showing the largest one (Fig. 6H; WT S, 47.61 ± 2.32 , $n=11$, $N=5$; WT FR; 54.98 ± 2.06 , $n=14$, $N=5$; WT FF, 63.44 ± 1.83 , $n=15$, $N=5$; SOD1 S, 58.24 ± 1.88 , $n=14$, $N=5$; SOD1 FR, 49.20 ± 1.71 , $n=10$, $N=5$; SOD1 FF, 48.04 ± 1.84 , $n=19$, $N=5$, *Bonferroni post-hoc test*, respectively $p < 0.05$, $p < 0.001$ and $p < 0.01$). Importantly, the NMJs of SOD1 mice presented the opposite MU-dependent quantal content distribution whereby the mutant S MU had an elevated mean EPP amplitude and quantal content compared to WT (Fig. 6E-H; EPP amplitude : SOD1 S, 26.71 ± 1.03 , $n=14$, $N=5$; SOD1 FR, 21.61 ± 1.07 , $n=12$, $N=5$; SOD1 FF, 19.86 ± 0.74 , $n=20$, $N=5$; WT S, 22.80 ± 1.06 , $n=11$, $N=5$; WT FR; 24.10 ± 0.72 , $n=16$, $N=5$; WT FF, 24.63 ± 0.77 , $n=15$, $N=5$, *Bonferroni post-hoc test*, respectively $p < 0.05$ and $p < 0.001$). In addition, EPP amplitude and quantal content were significantly smaller in the FF NMJs of the mutant mice compared to the control (Fig. 6E and F; *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.01$ and $p < 0.001$). Also, similar to changes observed in low Ca^{2+} /High Mg^{2+} , mEPP amplitude was altered as a function of the MU type ($F(2,72) = 12.92$, $p < 0.0001$, *two-way ANOVA*), with FF NMJs having a smaller mEPP amplitude compared to S NMJs in both control and mutant mouse and FR NMJs having a median value (data not shown, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.01$ and $p < 0.05$). These experiments further confirm the profound synaptic alterations that are present in physiological conditions in the SOD1^{G37R} mouse. These occur prior to symptoms onset, NMJ denervation and motor neuron loss in the ventral horn of the spinal cord.

Moreover, the large similarity of synaptic signatures in the different Ca^{2+} conditions further highlights the importance of the MU-dependent gradient of synaptic properties.

Building a Motor Unit Synaptic Profile (MUSP)

To better describe and evaluate synaptic variations as a function of MU type and subsequently facilitate comparison with mutant synaptic deficits, we developed a MU Synaptic Profile (MUSP) based on the characteristics of WT spontaneous and evoked neurotransmission at P180 (Fig 7). The comparison of the spontaneous and evoked synaptic properties allowed us to generate a profile for the properties of each MU type based on four variables that represent synaptic strength, namely mEPP frequency and amplitude, quantal content and PPF. This reflects the normal profile that one should expect at adult mouse NMJs based on the MU types. This synaptic profile reveals that the various MU type presents a relative continuum of properties.

This distinct MU synaptic signature then allows one to subsequently identify and classify MU based on measures of their synaptic strength. This represents a tool to study changes of synaptic transmission at the NMJ in ALS, not only as a comparison between SOD1 and WT NMJs but also as a function of the intrinsic gradient of synaptic properties across MU types. Hence, we expended the characterisation of the SOD1 NMJ synaptic properties to further build the MUSP for SOD1 mice over the course of disease progression.

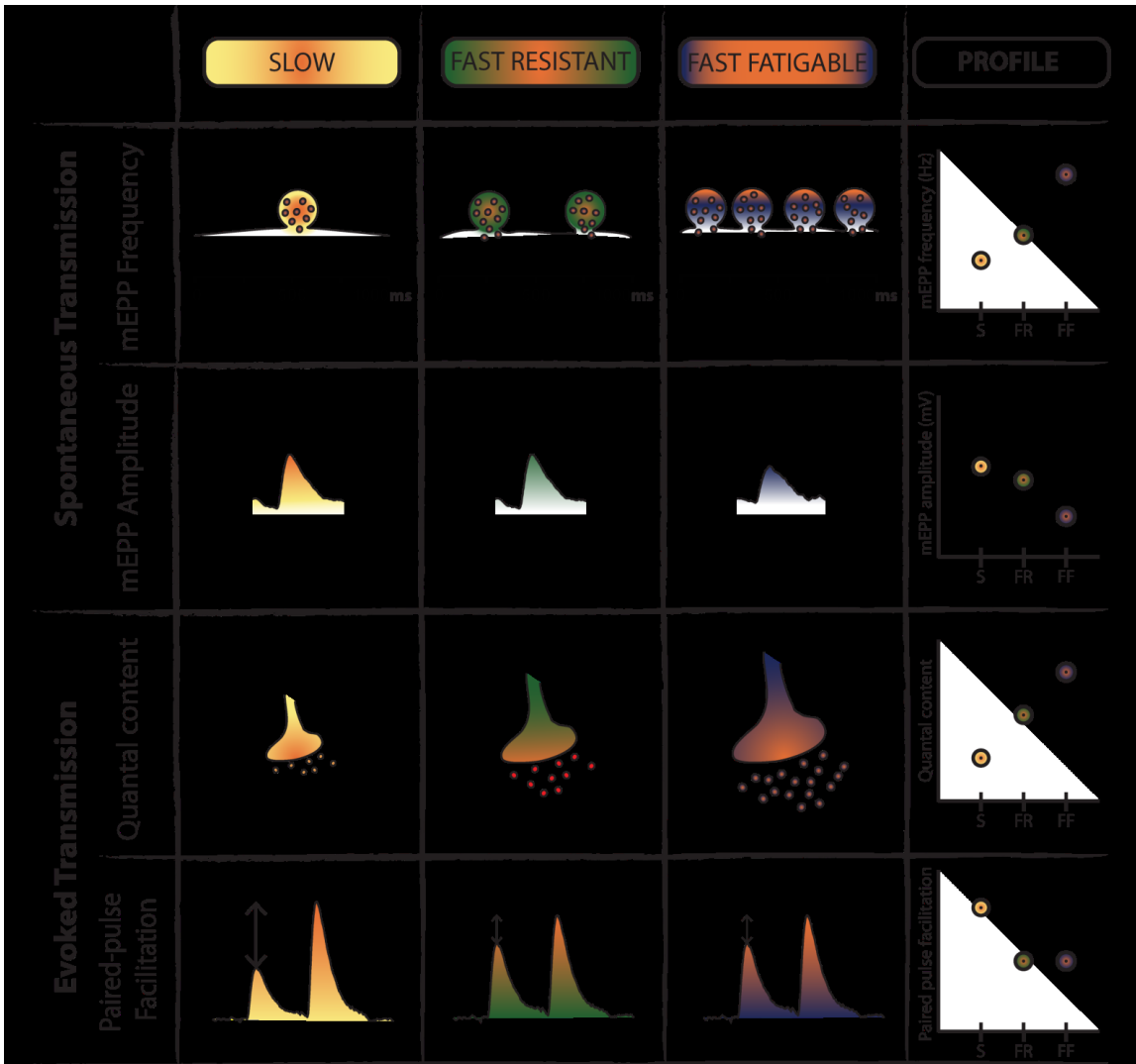


Figure 7 Motor Unit Synaptic Profile (MUSP) based on synaptic transmission of WT mice. Schematic representation of relative variations in synaptic properties as a function of the MU type (S, yellow; FR, green; FF, purple/orange) based on our experimental data obtained in low and normal Ca^{2+} conditions. Four parameters were used to determine the profile: mEPP amplitude and frequency, quantal content and paired-pulse facilitation (PPF). Note the relative gradation of spontaneous and nerve-evoked properties following the MU types which allowed us to generate the MUSP.

At presymptomatic stage: Alterations of Synaptic properties persist in the EDL muscle

We then performed electrophysiological recordings on the presymptomatic EDL (P380) of $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ mice and age-matched controls, to examine whether the properties observed at the asymptomatic stage persisted while denervation and NMJ morphological alterations were

present. As shown in Fig. 8, spontaneous neurotransmission was now significantly changed in the EDL, as opposed to P180. Indeed, mEPP frequency was considerably decreased in SOD1 mice (Fig. 8B; WT, 6.33 ± 0.35 Hz, $n=15$, $N=6$; SOD1, 3.36 ± 0.80 Hz, $n=12$, $N=6$, unpaired *t-test*, $p = 0.0082$) while mEPP amplitude was increased (Fig. 8C; WT, 0.21 ± 0.01 mV, $n=13$, $N=6$; SOD1, 0.25 ± 0.02 mV, $n=12$, $N=5$, respectively, unpaired *t-test*, $p = 0.05$). On the other hand, similar to the data obtained at P180, EPP amplitude at FF NMJs was 31% smaller in SOD1 than in WT mice (Fig. 8D, F; WT, 0.85 ± 0.05 mV, $n=19$, $N=7$; SOD, 0.59 ± 0.05 , $n=14$, $N=6$, unpaired *t-test*, $p = 0.0005$). Additionally, quantal content was still considerably reduced at this age (Fig. 8F; WT, 3.97 ± 0.21 , $n=15$, $N=7$, SOD1, 2.49 ± 0.33 , $n=13$, $N=6$, unpaired *t-test*, $p = 0.0007$) and no significant difference in PPF was observed between WT and SOD1 (Fig. 8; WT, 1.25 ± 0.02 , $n=19$, $N=8$; SOD, 1.31 ± 0.03 , $n=14$, $N=6$, unpaired-*t-test*, $p > 0.05$). To confirm that only NMJs from FF MU were recorded, immunolabeling for the MHC IIB and all but IIX was performed to identify the two fiber types on transverse cross-sections of the EDL muscle. As shown in Fig. 8H, type IIB fibers (FF MU), were still predominantly present at the surface of the EDL muscle, despite the presence of clear muscle atrophy. This atrophy was also accompanied by a reduction in muscle weight (data not shown).

After disease onset: Spontaneous activity in the SOL remains unaltered

We next tested whether the alterations of synaptic transmission in the SOL persisted after disease onset, since vulnerability to neurodegeneration, specifically for FR MU, has been observed in this period in SOD1 mice (Frey et al., 2000, Hegedus et al., 2008). Properties and quality of the SOL preparations still allowed us to perform the recording experiments even after

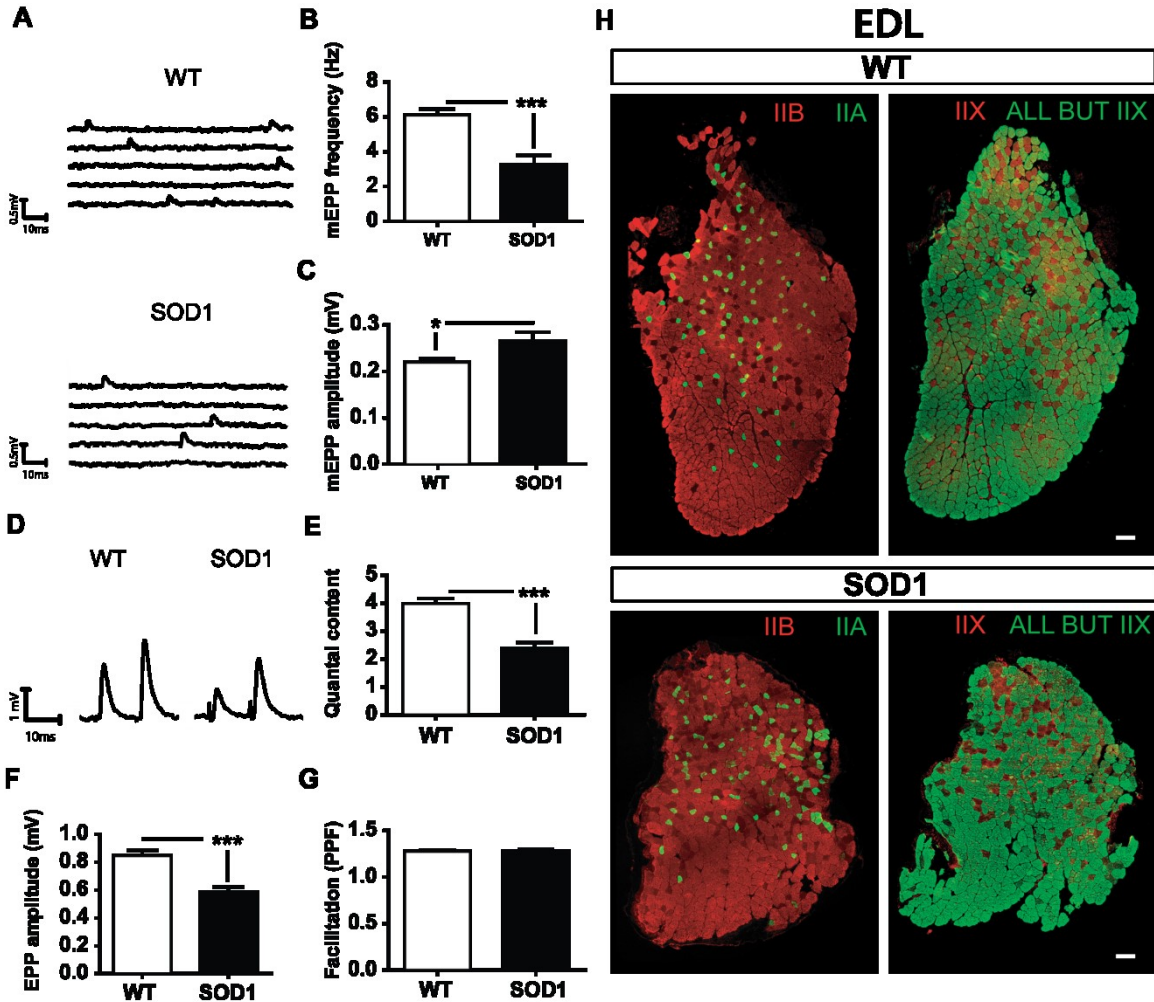


Figure 8 Persistent and additional synaptic changes at P380 in the EDL. **A)** Examples of mEPPs in control (WT) and SOD1^{G37R} mice. **B – C)** Histograms showing the mean \pm SEM of mEPP frequency (**B**) and amplitude (**C**) in FF NMJs. **D)** Traces of EPPs from WT and SOD1 FF NMJs. **E – G)** Histograms showing the mean \pm SEM of EPP amplitude (**E**), quantal content (**F**) and paired-pulse facilitation ratio (**G**). **H)** Transverse cross-sections of an EDL muscle (WT, top; SOD1, bottom) showing fiber type labeling of three MHC. Left panels, MHC Iia (in green) and MHC Iib (in red), right panels: MHC all but Iix (in green) and MHC Iix (by extension, in red). Note that the type of MHC at the surface recorded in our experiments (arrow) did not change during the course of the disease despite the atrophy of the muscle (bottom panels). Scale Bar: **H**, 100 μ m. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

the start of the weight loss owing to its late degeneration in ALS (Hegedus et al., 2007, Valdez et al., 2012).

As expected, significant differences were observed in mEPP frequency in S MU and FR MU, being significantly higher in FR NMJs than S NMJs, for the WT and the SOD1 mice (Fig. 9A-C; WT FR, 1.14 ± 0.12 Hz, $n=14$, $N=8$; SOD1 FR, 1.23 ± 0.22 Hz, $n=8$, $N=5$; WT S, 0.55

± 0.01 Hz, $n=12$, $N=8$; SOD1 S, 0.60 ± 0.04 Hz, $n=11$, $N=6$, *Bonferroni post-hoc test*, respectively $p < 0.05$ and $p < 0.01$). In addition, there was again a clear effect of the MU type on mEPP amplitude ($F(2,69) = 58.72$, $p < 0.0001$, *two-way ANOVA*), where it was larger at S NMJs than at FR NMJs in WT mice (Fig. 9D; WT S, 0.38 ± 0.02 mV, $n=15$, $N=6$; WT FR, 0.33 ± 0.02 mV, $n=14$, $N=6$; *Bonferroni post-hoc test*, $p = 0.001$). However, there was no difference between WT and SOD1 (SOD1 S, 0.39 ± 0.02 mV, $n=11$, $N=6$; SOD1 FR, 0.32 ± 0.01 mV, $n=9$, $N=5$, $p > 0.05$). Consistent with the data obtained at P180, spontaneous activity was unchanged in the mutant, where mEPP frequency the WT NMJs was not different from the SOD1 NMJs (Fig. 9C; *Bonferroni post-hoc test*, $p > 0.05$).

After disease onset: Nerve-evoked activity evolved differently in S and FR MU

Unlike the long-lasting changes found in the FF MU of the EDL, none of the MU dependent nerve-evoked synaptic alterations previously reported in the SOL persisted at P450 in SOD1 mice. Indeed, EPP amplitude was no longer significantly different between WT and SOD1 in S MU (Fig. 9E and G; WT, 0.85 ± 0.05 mV, $n=15$, $N=8$, SOD1, 1.01 ± 0.09 mV, $n=12$, $N=7$, *Bonferroni post-hoc test*, $p > 0.05$). Moreover, EPP amplitude at FR NMJs of SOD1 mice was now lower compared to WT FR NMJs (Fig. 9F-G; WT, 0.85 ± 0.06 mV, $n=17$, $N=9$, SOD1, 0.68 ± 0.06 mV, $n=9$, $N=6$, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.01$).

At this age, WT mice still presented a specific pattern of synaptic properties in accordance with the MUSP developed at P180 (see Fig. 7). However, several prominent synaptic changes were observed in SOD1 mice: quantal content of FR NMJs, which was normal during the presymptomatic stage, was now considerably reduced (by 27%) in SOD1 FR NMJs (Fig. 9H; WT, 2.89 ± 0.19 , $n=14$, $N=8$, SOD1, 2.12 ± 0.19 , $n=12$, $N=7$, *Bonferroni post-hoc*

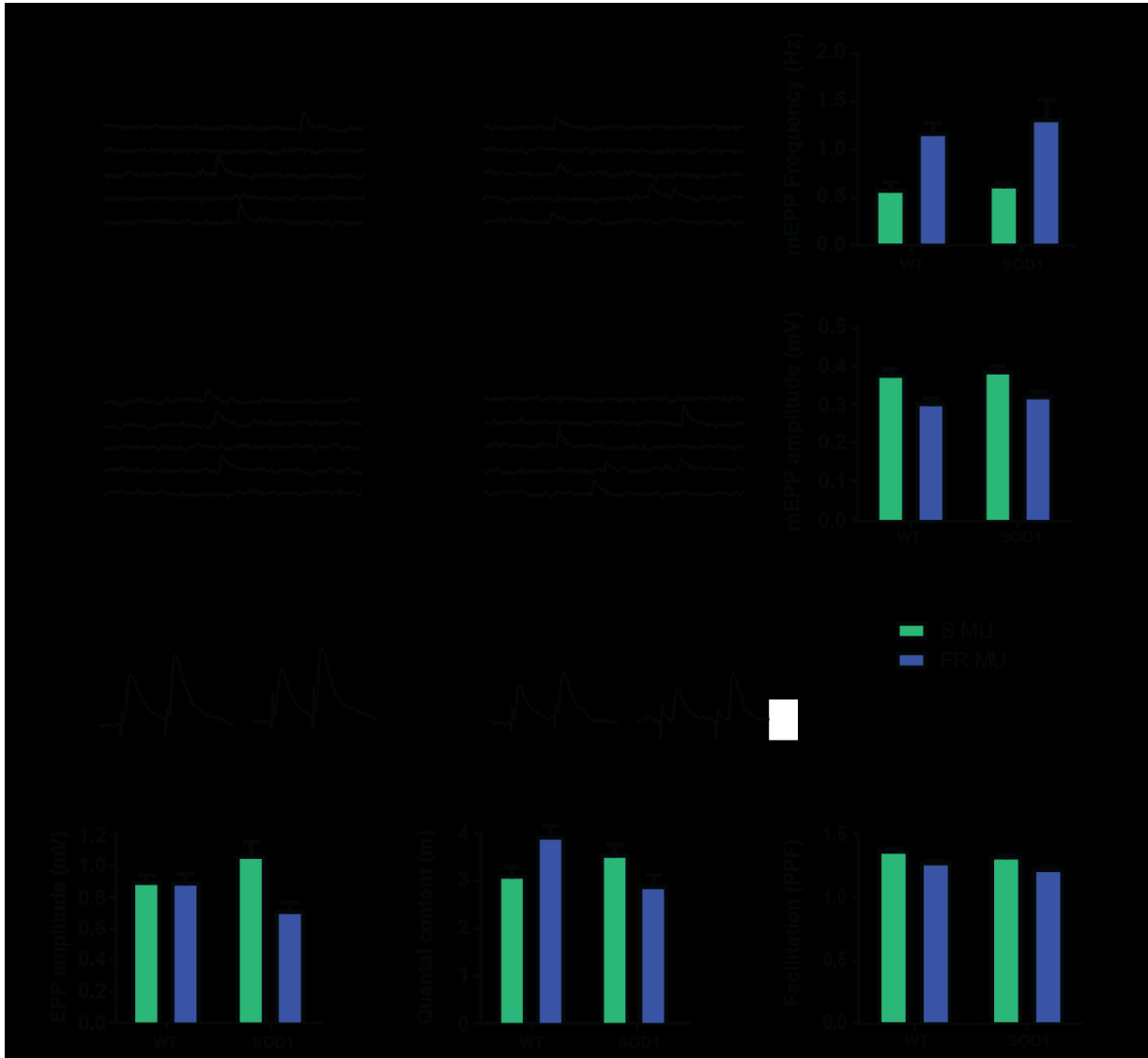


Figure 9 At disease onset, quantal content is no longer enhanced in S MU and is decreased in FR MU. **A –B)** Typical traces of spontaneous events in the S (**A**) and FR (**B**) NMJs from WT (top) and SOD1^{G37R} (bottom) mice. **C – D)** Histograms showing the mean ± SEM of mEPP frequency (**C**) and amplitude (**D**) for S (green) and FR MU (blue). **E – F)** Traces of EPPs in the S (**E**) and FR MU (**F**) in WT (left) and mutant (right) mice. **G – I)** Histograms showing the mean ± SEM of EPP amplitude (**G**), quantal content (**H**) and paired-pulse facilitation (**I**), for S (green), FR (blue). Note that the quantal content of the SOD1 S MU is no longer larger than the WT while it is now significantly smaller in FR MU.

test, $p < 0.05$.), while at the same time the increase in neurotransmission reported earlier in mutant S MU was no longer observed (Fig. 9H; WT, 2.29 ± 0.15 , $n = 15$, $N=8$, SOD, 2.61 ± 0.18 , $n = 9$, $N=6$, *Bonferroni post-hoc test*, $p > 0.05$). Finally, again at this age, paired-pulse facilitation was only significantly influenced by the MU type ($F(1,48) = 12.73$, $p = 0.0008$, *two-*

way ANOVA) while it remained unchanged at SOD1 NMJs as compared to WT NMJs ($F(1,48) = 3.533$, $p = 0.0663$, *two-way ANOVA*). In both cases, S NMJs presented a higher PPF ratio than FR NMJs (Fig. 9I; WT S, 1.39 ± 0.03 , $n = 15$, $N = 8$; SOD1 S, 1.32 ± 0.02 , $n = 12$, $N = 7$; WT FR, 1.27 ± 0.02 , $n = 17$, $N = 8$; SOD1 FR, 1.22 ± 0.03 , $n = 8$, $N = 6$, *Bonferroni post-hoc test*, $p < 0.05$), following the synaptic property identified earlier in the MUSP.

Reversal of the MUSP at SOD1 NMJs

Our comprehensive analysis of MU-dependent deficits in NMJ synaptic transmission and the corresponding timeline alterations of the MUSP in SOD1 mice are summarized in Figure 10. We observed that NMJs of FF MU, that should show the strongest synaptic output according to their intrinsic properties (Kanning et al., 2010), showed a reduced quantal content at P180, when NMJs presented a normal morphology. This reduced quantal content persisted at P380, when denervation became frequent in the EDL. In addition, in complete reverse fashion, the quantal content of the S MU was large at P180 to eventually decrease at disease onset (P450). The reduction of quantal content in FR NMJs at P450, before the appearance of pronounced morphological alterations, indicates that changes in neurotransmission are early indicators of NMJ malfunction. Hence, the decreased evoked transmission precedes the extensive NMJ denervation observed in the pathology, and is predictive of subsequent NMJ denervation and axonal degeneration.

Together, our results reveal a prominent opposite MU-specific synaptic alterations in FF and S NMJs of SOD1 mice, reversing the pattern of synaptic properties normally seen in the MUSP of WT mice (see Fig. 7). These early persistent synaptic changes will subsequently evolve differently after symptoms onset in the SOL muscle. In particular, the quantal content is

the hallmark of the ALS-dependant changes in NMJ synaptic functions with a particular signature at a given stage of the disease.

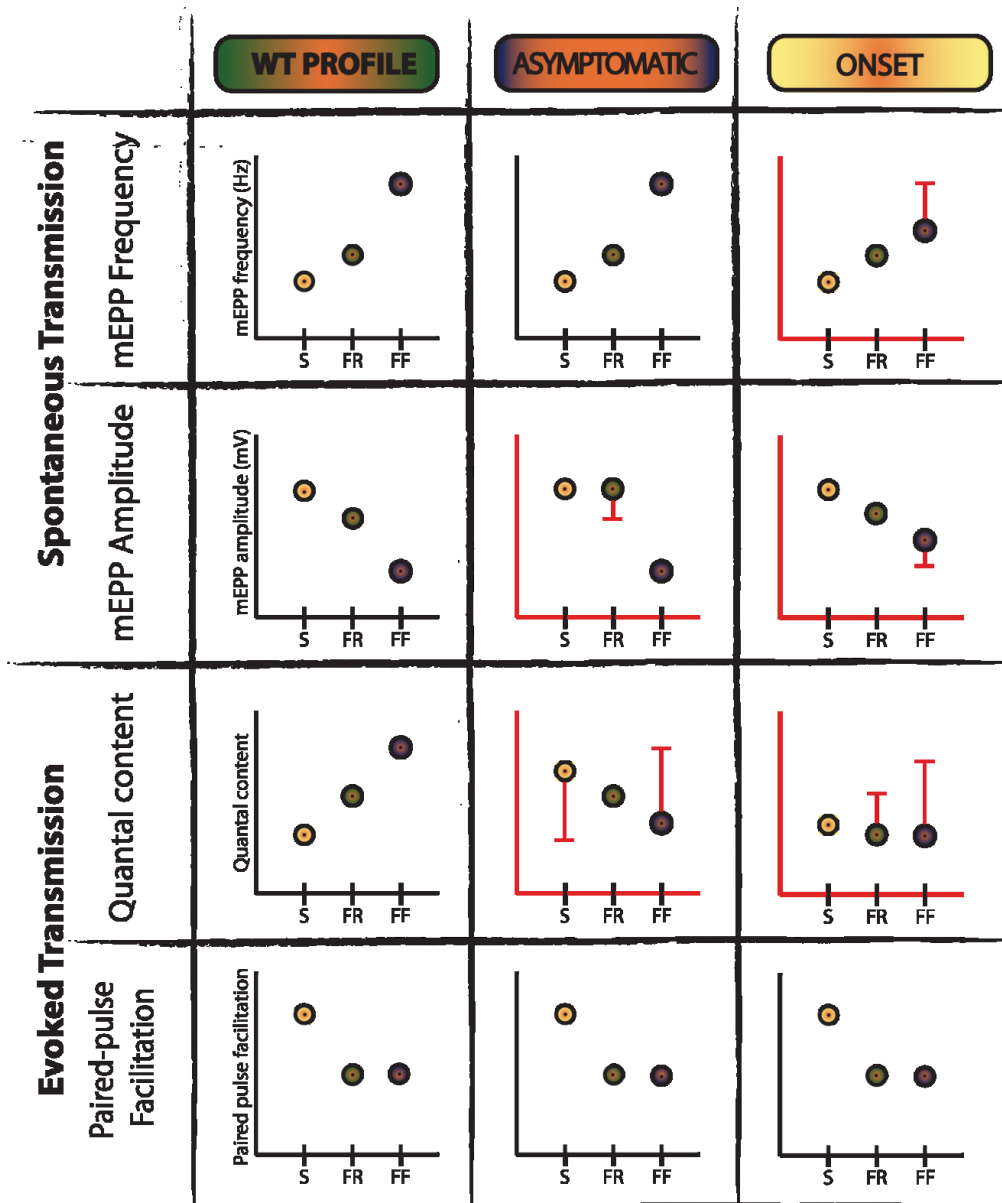


Figure 10- MUSP alterations over the course of the disease in *SOD1* mice. Schematic representation of changes in synaptic properties of NMJs as a function of MU type (S, FR and FF) and disease stage for the mutant mice. WT synaptic profile of the four parameters (mEPP amplitude and frequency, quantal content and PPF) derived from Figure 5 is showed again for ease of comparison (left column). To simplify the figure, data from the EDL (P380) and SOL (P450) are represented in the Onset category (right column), while data at P180 is represented in the asymptomatic category (middle column). Synaptic alterations between WT and *SOD1* NMJs are represented with red bars, highlighting the statistical difference with the value of the WT MUSP. Note the relative evolution of the alterations of quantal content, mEPP frequency and mEPP amplitude throughout the disease at *SOD1* NMJs. Only PPF remained unaltered at all stages.

Discussion

Our study provides a unique characterisation of synaptic transmission recorded in three MU types over time in mutant SOD1^{G37R} mice and their WT littermates. A MU synaptic profile (MUSP) was developed based on WT neurotransmission that showed a distinct signature of S, FR and FF NMJs. This strategy revealed several synaptic alterations in SOD1 mice that provided not only a MUSP signature for the SOD1 mutant, but also a precise and unique MUSP for each stage of the disease. Furthermore, synaptic alterations were observed prior to MN loss, axonal degeneration and NMJ structural changes. Reduction of nerve-evoked transmission appears to be predictive of the NMJ denervation in FF and FR NMJs.

MU-dependant NMJ morphological alterations during disease progression

To our knowledge, this is the first extensive MU-specific analysis of NMJ properties in a model of ALS. Our characterisation of NMJs allowed us to specifically tract the morphological alterations in all MU during disease progression and to confirm key characteristics of the animal model. The fact that denervation was more frequent in the EDL than in the SOL at P380 and P450 supports an early selective vulnerability of the FF MU also observed in other ALS models. However, somewhat surprisingly, partially or completely denervated NMJs were more frequent in all MU types of SOD1 mice compared to the control, but only at P380. Our data are consistent with a recent study in SOD1^{G93A} that showed that innervation of SOL NMJs was initially as affected as other muscles but showed a slower rate of decline (Valdez et al., 2012). In addition, S and FR MU showed more positive signs of nerve repair (increased polyinnervation, nerve sprouting and PSC process extensions). Their presence during disease progression is consistent with the relative resistance of the SOL muscle in ALS. The importance of these processes to

NMJ reinnervation (Son et al., 1996) may contribute to the better preserved NMJ structure in the S and FR MU than in FF MU at the symptomatic stage. Of course, the presence of NMJ repair signs does not warrant NMJ protection since NMJs of the SOL eventually become denervated at end-stage (Valdez et al., 2012).

As a whole, our work supports the findings on the widely used model SOD1^{G93A} (Frey et al., 2000, Atkin et al., 2005, Pun et al., 2006, Hegedus et al., 2007, Hegedus et al., 2008, Krysciak et al., 2014) as it confirms the selective vulnerability of the FF MU and the pattern of spinal MN loss. Interestingly, the comprehensive characterisation provided by our work may facilitate the use of the SOD1^{G37R} mouse model that more closely mimics disease progression in patients.

The Motor Unit Synaptic Strength Profile (MUSP) reflects MU properties

Our work allowed the development of a novel tool to characterise NMJ properties over time and in a MU-dependent manner. The MU specific synaptic properties of the WT NMJs used to build the MUSP are in perfect accordance with known differences between slow and fast NMJs (Reid et al., 1999, Atkin et al., 2005), the MN type (Leroy et al., 2014) and the muscle contractile properties. Indeed, the S NMJs had the smallest evoked and spontaneous activity, consistent with their high resistance to fatigue (Hennig and Lomo, 1985) and the slow contractile properties of type I fibers (Krysciak et al., 2016). In contrast, the FF MU that develop strength rapidly, but only transiently (Hennig and Lomo, 1985), presented the highest mEPP frequency and nerve-evoked synaptic transmission.

However, SOD1 NMJs do not follow this profile, demonstrating striking alterations of quantal content early in the pathogenesis. Importantly, these salient differences in the quantal

content were also observed in normal extracellular Ca^{2+} conditions, suggesting that these properties are expressed during normal synaptic activity in SOD1 mice and that they occur in the course of ALS. This further confirms the differential MU specific synaptic phenotype as a biomarker of the disease process.

Early and progressive reduction of neurotransmission in FF NMJs highlights their relative vulnerability

The reduced neurotransmitter release in FF SOD1 NMJs is in accordance with a reduced quantal transmission reported in fast-twitch-like muscle in mutTARDBP and mutFUS *zebrafish* larvae (Armstrong and Drapeau, 2013b, a) and *drosophila* model of FUS (Shahidullah et al., 2013; Machamer et al., 2014). Similar results were observed at NMJs from ALS patients (Maselli et al., 1993). These observations suggests that reduced neurotransmission at the NMJ is a prominent feature of the various forms of ALS. This is consistent with the reported stalling of synaptic vesicles in the nerve terminal observed in fast NMJs before denervation (Pun et al., 2006) and the impaired axonal transport of acetylcholine transferase in SOD1^{G93A} MNs (Tateno et al., 2009) that could reduce neurotransmitter synthesis at the NMJ. In addition, the selective increase in endoplasmic reticulum stress in a subset of vulnerable MNs observed in the SOD1^{G93A} mouse *in vivo* (Saxena et al., 2009) could be involved in early synaptic alterations. However, our observation of changes in mEPP amplitude is indicative of possible postsynaptic effects, including fragmentation and disorganisation of the endplate and changes in muscle fiber diameter (Sieck and Prakash, 1997). Hence, changes in NMJ properties of FR and FF motor units likely imply changes in both pre- and postsynaptic elements that evolve over the course of the disease process.

The reduction in neurotransmitter release first appeared in the mutant EDL at P180, without NMJ morphological changes and prior to MN degeneration. Moreover, FR MU also showed similar reduction in evoked neurotransmission after disease onset, before the appearance of major NMJ structural changes in the SOL muscles. Hence, functional synaptic alterations are early indicators of NMJ malfunction that precede NMJ denervation.

Increased nerve-evoked transmission observed in S NMJs only

Our study also reveals abnormal elevated synaptic activity in NMJs of S MU observed at P180 that persisted until P380 (Arbour et al., 2015). Increased synaptic transmission has been reported at unidentified NMJs of the diaphragm in presymptomatic SOD1^{G93A} mice (Rocha et al., 2013) and is consistent with early intrinsic MN hyperexcitability that is thought to contribute to neurodegeneration in ALS. However, contradictory results have been reported such that, while hyperexcitability of SOD1^{G93A} MN in culture was reported (Pieri et al., 2003, Kuo et al., 2004, Kuo et al., 2005), others reported either an unchanged excitability (Pambo-Pambo et al., 2009, Quinlan et al., 2011) or even a decreased excitability in mutant SOD1 MN (Bories et al., 2007). Interestingly, a recent elegant *in vivo* study reported that adult MNs are not hyperexcitable (Delestree et al., 2014) and that fast MN have an unchanged or reduced excitability compared to WT while the more resistant S MN show a transient intrinsic hyperexcitability (Leroy et al., 2014). These results strongly suggest that increased excitability does not play a crucial role in neurodegeneration in ALS, but rather appears neuroprotective of the MN during the presymptomatic stage of the disease and perhaps related to the relative resilience of S MU (Saxena et al., 2013).

Synaptic candidates underlying the MU-dependent changes in ALS

A number of synaptic mechanisms may underlie the MU-dependent differential NMJ changes. A first possible mechanism relates to adenosine that decreases (via A₁ receptors) or increases (via A_{2A} receptors) presynaptic ACh release at the NMJ (Sebastiao and Ribeiro, 2009b, a). The facilitating effect of adenosine is enhanced at NMJs of SOD1^{G93A} mice at presymptomatic stage (Nascimento et al., 2014). Although the role of A₁ receptors remains ill-defined at the NMJ in ALS, their involvement could explain the reduction of spontaneous activity at P380 in the EDL.

Another possible mechanism is a toxic gain of function of the SOD1 enzyme, affecting neurotransmission in ALS. Indeed, abnormal persistent Na⁺ current has been observed in cultured mutant SOD1 MNs (Pieri et al., 2003, Kuo et al., 2004, Kuo et al., 2005) and in humans (Vucic and Kiernan, 2006). Ca²⁺-dependent mechanisms may also be involved as indicated by the increase of NMJ neurotransmission by ALS-derived antibodies (Appel et al., 1995, Engelhardt et al., 1995), by Ca²⁺ dysregulation in the MNs (Siklos et al., 1998) and the perturbations of mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in SOD1 mice (Jaiswal and Keller, 2009, Tradewell et al., 2011, Jaiswal, 2014). Any alteration of presynaptic Ca²⁺ handling will alter transmitter release and lead to differential outcomes according to the MN type (Kanning et al., 2010).

Another possibility relates to glial cell functions at the NMJ. A recent study showed an increased Ca²⁺-dependent activity of perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at NMJs of S and FR MU (Arbour et al., 2015). Interestingly, Ca²⁺-dependent mechanisms in PSCs regulate transmitter release and synaptic plasticity (Todd et al., 2010). Hence, alteration of PSCs Ca²⁺-dependent activity could alter neurotransmission and impact NMJ functions. In addition, owing

to their role in NMJ maintenance and repair (Son and Thompson, 1995, Son et al., 1996, Georgiou et al., 1999), alterations in PSCs early in the disease process may contribute to disease pathogenesis and further exacerbate the effect of SOD1 mutation on synaptic transmission (Arbour et al., 2017).

In conclusion, this extensive NMJ morphological and synaptic characterisation, which evolves during disease progression, highlights the importance of the MU type in ALS and appears a strong and early biomarker of the disease. It underlies a specific gradient of synaptic properties (MUSP) that is completely altered in SOD1 mice. Understanding the specific implications of the selective long-term NMJ physiological changes in ALS will help develop novel forms of functional biomarkers and identify novel therapeutic targets in ALS.

REFERENCES

- Appel SH, Smith RG, Alexianu M, Siklos L, Engelhardt J, Colom LV, Stefani E (1995) Increased intracellular calcium triggered by immune mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neuroscience* 3:368-374.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:688-706.
- Arbour D, Vande Velde C, Robitaille R (2017) New perspectives on amyotrophic lateral sclerosis: the role of glial cells at the neuromuscular junction. *The Journal of physiology* 595:647-661.
- Armstrong GA, Drapeau P (2013a) Calcium channel agonists protect against neuromuscular dysfunction in a genetic model of TDP-43 mutation in ALS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:1741-1752.
- Armstrong GA, Drapeau P (2013b) Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS. *Human molecular genetics* 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. *Neuromuscular disorders : NMD* 15:377-388.
- 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. *The European journal of neuroscience* 25:451-459.
- Crawley MJ (2007) *The R book*. Chichester, England ; Hoboken, N.J.: Wiley.
- Darabid H, Arbour D, Robitaille R (2013a) Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 33:1297-1313.
- Darabid H, Arbour D, Robitaille R (2013b) Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:1297-1313.
- Engelhardt JI, Siklos L, Komuves L, Smith RG, Appel SH (1995) Antibodies to calcium channels from ALS patients passively transferred to mice selectively increase intracellular calcium and induce ultrastructural changes in motoneurons. *Synapse* 20:185-199.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental neurology* 185:232-240.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2534-2542.
- Georgiou J, Robitaille R, Charlton MP (1999) Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:3836-3846.
- Gospillou G, Sgarioto N, Norris B, Barbat-Artigas S, Aubertin-Leheudre M, Morais JA, Burelle Y, Taivassalo T, Hepple RT (2014) The relationship between muscle fiber type-

- specific PGC-1 α content and mitochondrial content varies between rodent models and humans. *PLoS One* 9:e103044.
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T (2007) Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease* 28:154-164.
- Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T (2008) Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of physiology* 586:3337-3351.
- Hennig R, Lomo T (1985) Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 314:164-166.
- Jaiswal MK (2014) Selective vulnerability of motoneuron and perturbed mitochondrial calcium homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: implications for motoneurons specific calcium dysregulation. *Molecular and cellular therapies* 2:26.
- Jaiswal MK, Keller BU (2009) Cu/Zn superoxide dismutase typical for familial amyotrophic lateral sclerosis increases the vulnerability of mitochondria and perturbs Ca²⁺ homeostasis in SOD1G93A mice. *Molecular pharmacology* 75:478-489.
- Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE (2010) Motor neuron diversity in development and disease. *Annual review of neuroscience* 33:409-440.
- Krysciak K, Celichowski J, Drzymala-Celichowska H, Gardiner PF, Krutki P (2016) Force regulation and electrical properties of motor units in overloaded muscle. *Muscle & nerve* 53:96-106.
- Krysciak K, Grieb P, Celichowski J (2014) Changes in motor unit properties in SOD1 (G93A) rats. *Muscle & nerve* 50:577-586.
- 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. *Journal of neurophysiology* 91:571-575.
- Kuo JJ, Siddique T, Fu R, Heckman CJ (2005) Increased persistent Na⁽⁺⁾ current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *The Journal of physiology* 563:843-854.
- Lalancette-Hebert M, Sharma A, Lyashchenko AK, Shneider NA (2016) Gamma motor neurons survive and exacerbate alpha motor neuron degeneration in ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E8316-E8325.
- Machamer JB, Collins SE, Lloyd TE (2014) The ALS gene FUS regulates synaptic transmission at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Human molecular genetics* 23:3810-3822.
- Mallart A, Martin AR (1968) The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of physiology* 196:593-604.
- Maselli RA, Wollman RL, Leung C, Distad B, Palombi S, Richman DP, Salazar-Grueso EF, Roos RP (1993) Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve* 16:1193-1203.
- 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. *Frontiers in neuroscience* 8:252.
- Narai H, Manabe Y, Nagai M, Nagano I, Ohta Y, Murakami T, Takehisa Y, Kamiya T, Abe K (2009) Early detachment of neuromuscular junction proteins in ALS mice with SODG93A mutation. *Neurology international* 1:e16.
- Nascimento F, Pousinha PA, Correia AM, Gomes R, Sebastiao AM, Ribeiro JA (2014) Adenosine A2A receptors activation facilitates neuromuscular transmission in the pre-

symptomatic phase of the SOD1(G93A) ALS mice, but not in the symptomatic phase. *PloS one* 9:e104081.

- Pambo-Pambo A, Durand J, Gueritaud JP (2009) Early excitability changes in lumbar motoneurons of transgenic SOD1G85R and SOD1G(93A-Low) mice. *Journal of neurophysiology* 102:3627-3642.
- Parone PA, Da Cruz S, Han JS, McAlonis-Downes M, Vetto AP, Lee SK, Tseng E, Cleveland DW (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.
- Pickles S, Destroismaisons L, Peyrard SL, Cadot S, Rouleau GA, Brown RH, Jr., Julien JP, Arbour N, Vande Velde C (2013) Mitochondrial damage revealed by immunoselection for ALS-linked misfolded SOD1. *Hum Mol Genet* 22:3947-3959.
- 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. *Neuroscience letters* 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. *Nature neuroscience* 9:408-419.
- 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. *The Journal of physiology* 589:2245-2260.
- Reid B, Slater CR, Bewick GS (1999) Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:2511-2521.
- 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.
- Saxena S, Cabuy E, Caroni P (2009) A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature neuroscience* 12:627-636.
- Schaefer AM, Sanes JR, Lichtman JW (2005) A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of comparative neurology* 490:209-219.
- Sebastiao AM, Ribeiro JA (2009a) Adenosine receptors and the central nervous system. *Handbook of experimental pharmacology* 471-534.
- Sebastiao AM, Ribeiro JA (2009b) Tuning and fine-tuning of synapses with adenosine. *Current neuropharmacology* 7:180-194.
- 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.
- Sieck GC, Prakash YS (1997) Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on fiber type. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 22:197-230.
- Siklos L, Engelhardt JI, Alexianu ME, Gurney ME, Siddique T, Appel SH (1998) Intracellular calcium parallels motoneuron degeneration in SOD-1 mutant mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 57:571-587.

- Son YJ, Thompson WJ (1995) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14:133-141.
- Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ (1996) Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends in neurosciences* 19:280-285.
- Souayah N, Coakley KM, Chen R, Ende N, McArdle JJ (2012) Defective neuromuscular transmission in the SOD1 G93A transgenic mouse improves after administration of human umbilical cord blood cells. *Stem cell reviews* 8:224-228.
- Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T (2009) Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Human molecular genetics* 18:942-955.
- Todd KJ, Darabid H, Robitaille R (2010) Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:11870-11882.
- Tradewell ML, Cooper LA, Minotti S, Durham HD (2011) Calcium dysregulation, mitochondrial pathology and protein aggregation in a culture model of amyotrophic lateral sclerosis: mechanistic relationship and differential sensitivity to intervention. *Neurobiology of disease* 42:265-275.
- 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.
- Vucic S, Kiernan MC (2006) Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 117:1458-1466.
- 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.

Annexe 2 :

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

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

Running title: Altered glial properties at NMJs in ALS

¹ : Département de neurosciences, Université de Montréal

² : Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal, PO box 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

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

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

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.

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.

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, XLUMPlanFl; 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 μM, Alexis), large-spectrum P2 antagonists (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid, 20, 60, and 100 μM, and suramin, 100 μM, Sigma) and mAChRs antagonist (atropine, 5–20 μM, 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 μM) 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-S100β 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% ($\alpha = 0.05$).

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

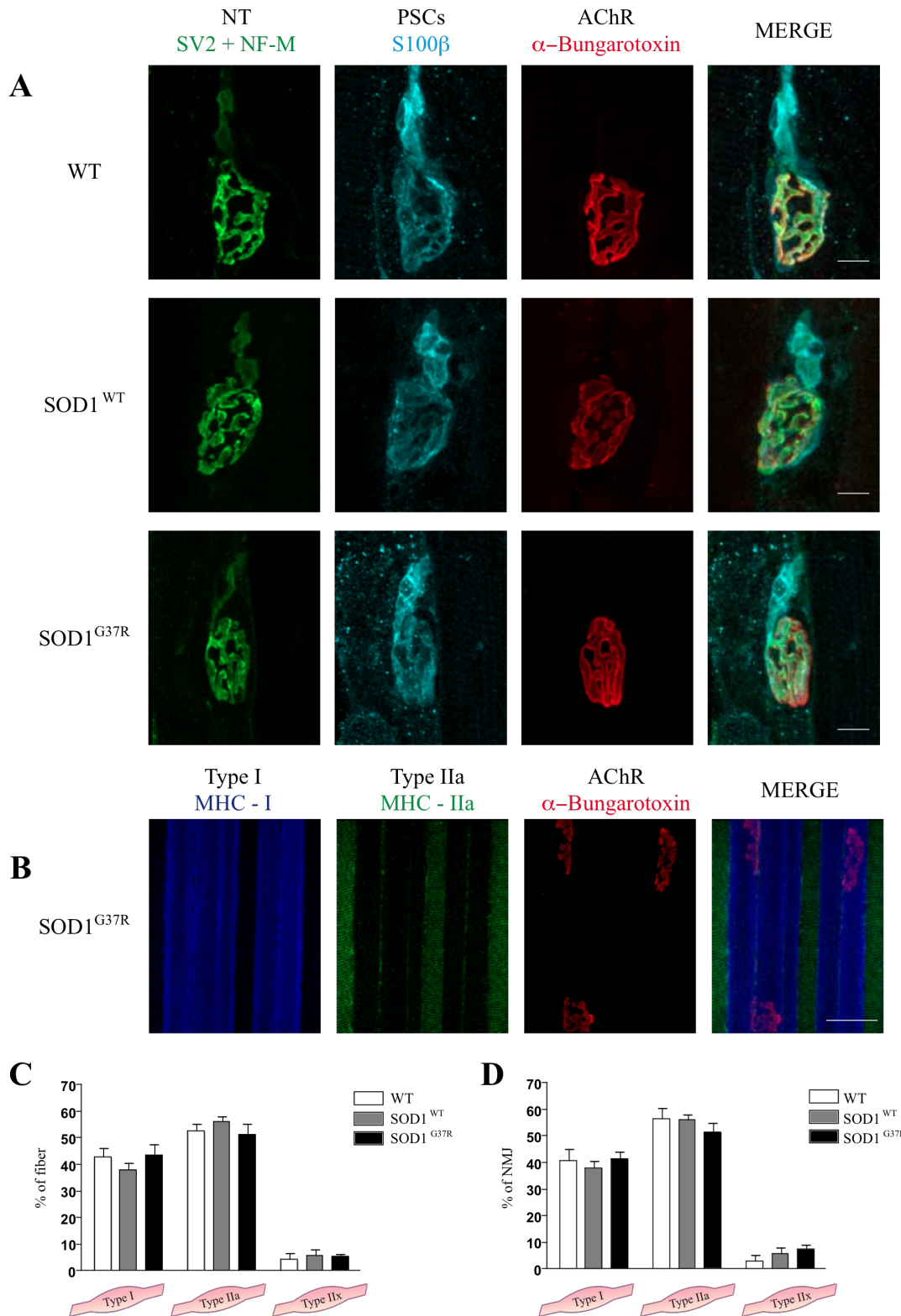
PSCs actively participate in the maintenance and repair of neuromuscular synapses (Reynolds and Woolf, 1992; Son et al., 1996; Georgiou et al., 1999; O'Malley et al., 1999; Reddy et al., 2003; Feng and Ko, 2008). Hence, any sign of PSC morphological disorganization coupled to NMJ morphological alteration 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 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 3 μm 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 S100 β 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 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 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.

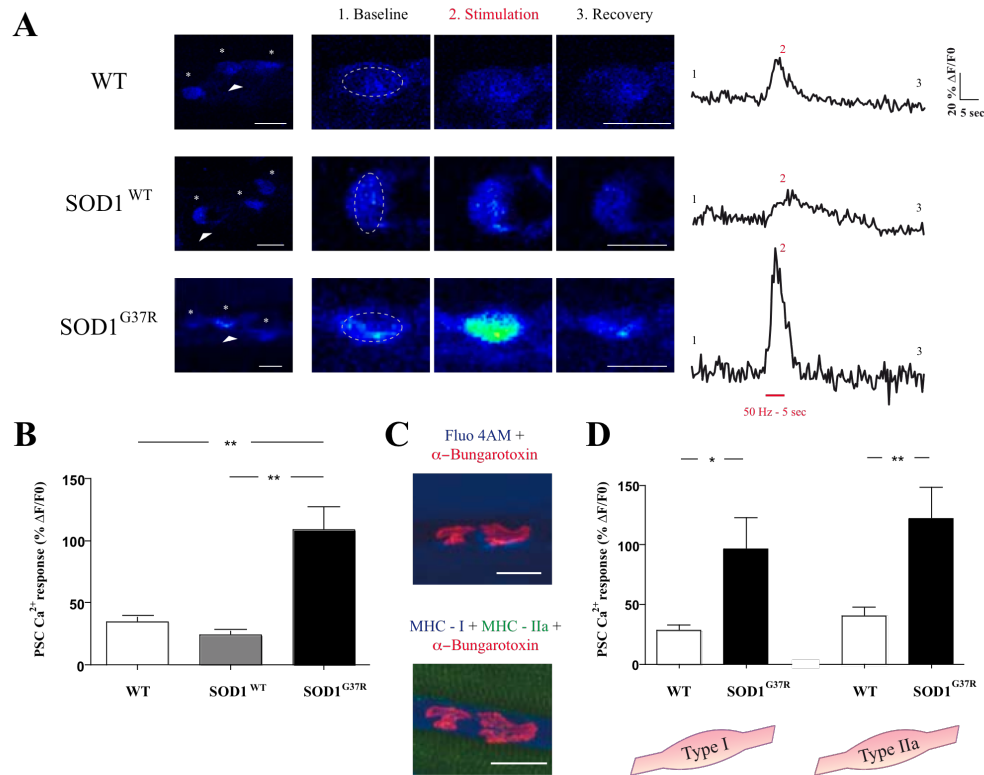
Thus, we examined the ability of PSCs to respond to synaptic activity elicited by motor nerve stimulation. Stimulation was performed at 50 Hz for 5 s, a frequency reported for firing of motor neurons innervating adult SOL muscle (Chipman et al., 2010) and for PSC responsiveness (Todd et al., 2007; Rouse 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; Rouse 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 Ca^{2+} responses was larger in $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ 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 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.

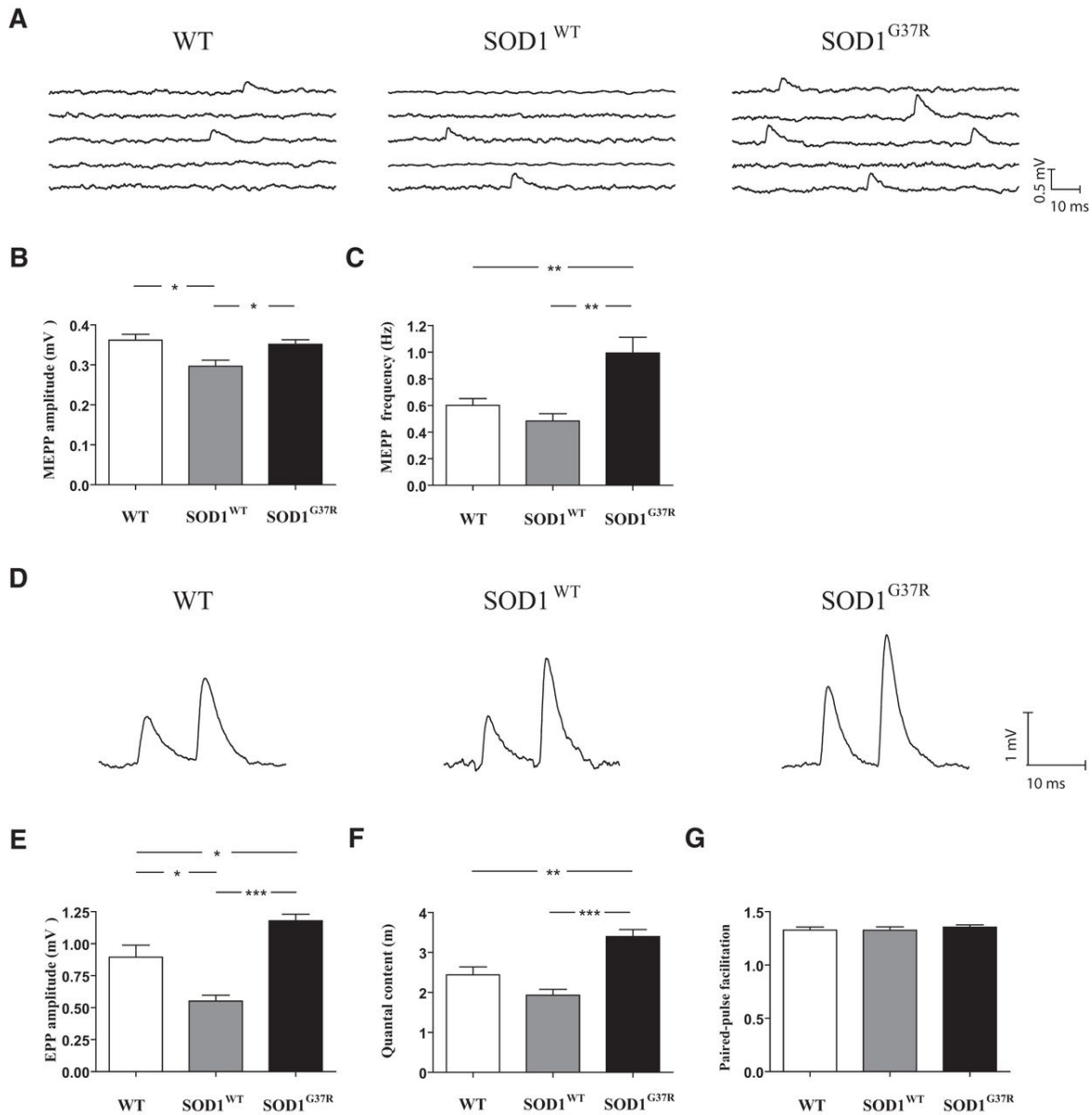
First, we evaluated the spontaneous activity of the NMJs. No difference in MEPP amplitude was observed between WT and SOD1^{G37R} mice (WT, 0.36 ± 0.01 mV, N = 9, n = 15; SOD1^{WT}, 0.30 ± 0.02 mV, N = 6, n = 8; SOD1^{G37R}, 0.35 ± 0.01 mV, N = 9, n = 14; one-way ANOVA, p = 0.0145; Fig. 5.3A,B). Surprisingly, 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 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

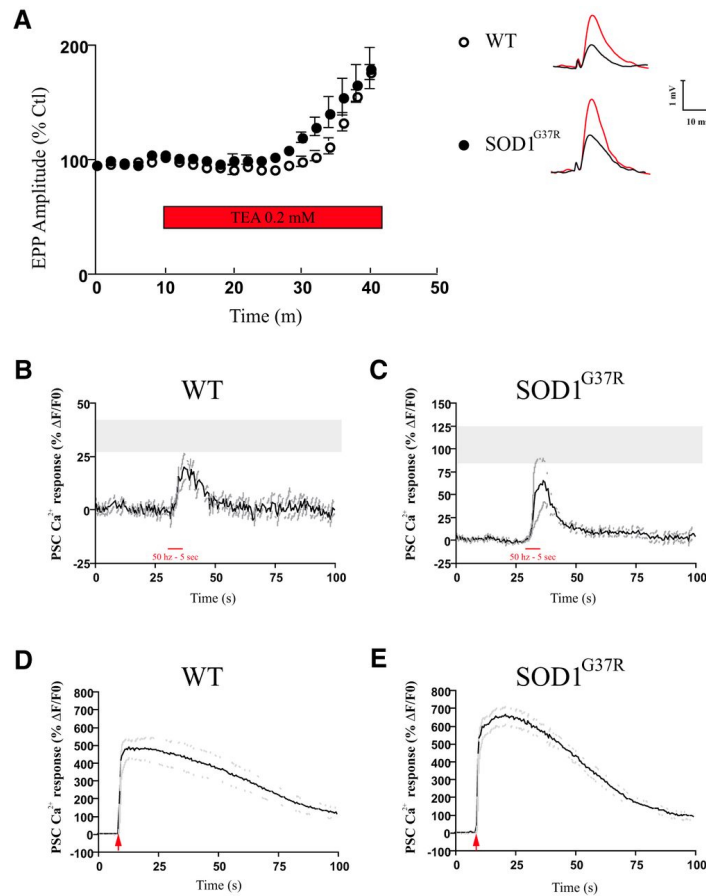
determined as EPP amplitude/mEPP amplitude. NMJs from SOD1^{G37R} mice had higher quantal content. **G**, Calculated PPF obtained from electrophysiological recordings of synaptic transmission and determined as the mean amplitude of the second EPPs divided by the mean amplitude of the first EPPs. *p 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

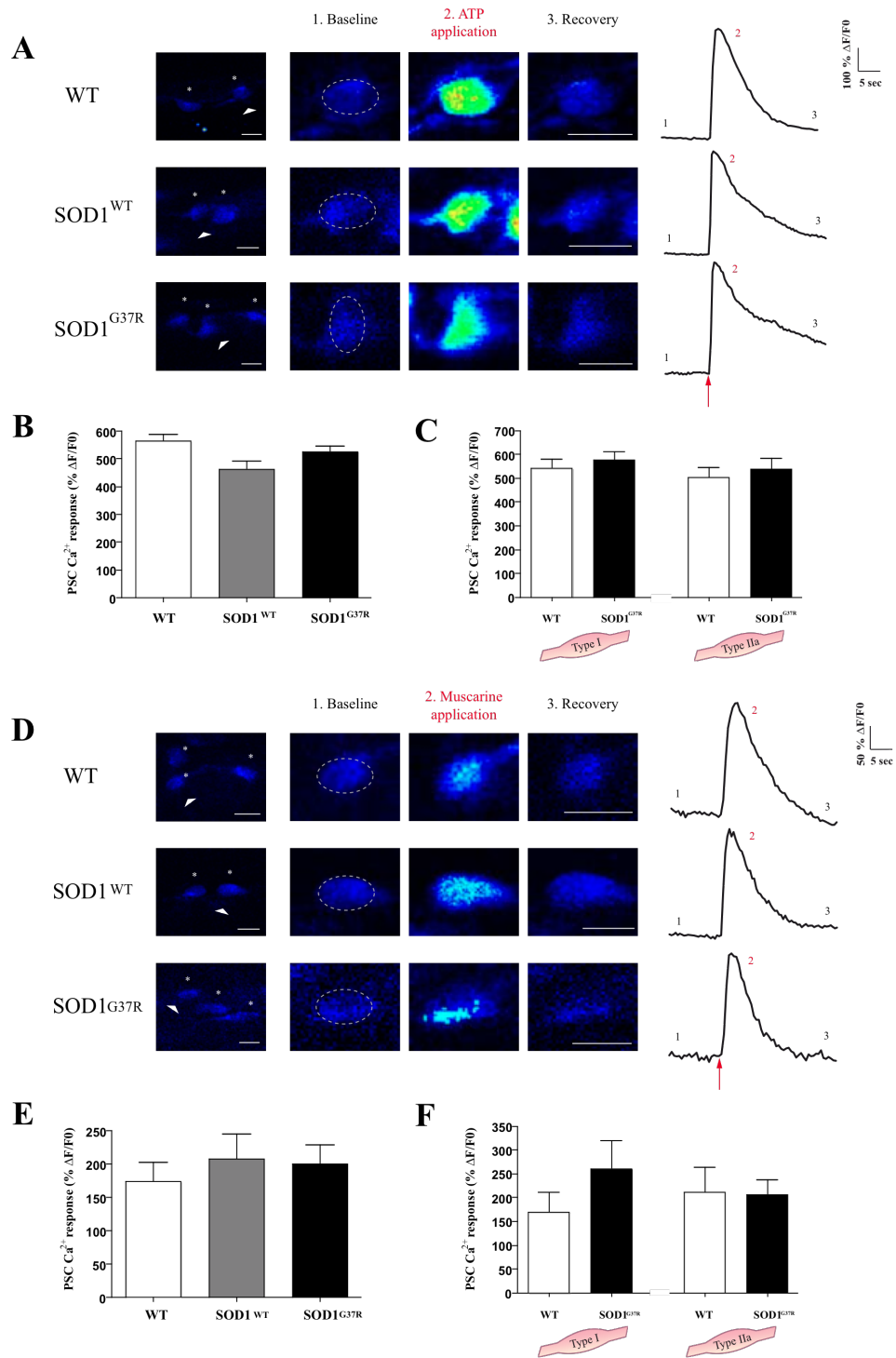
Interestingly, even though transmitter release was doubled, bath application of TEA had no effect on the average amplitude of PSC Ca^{2+} responses on WT synapses induced by nerve stimulation (50 Hz for 5 s) (Fig. 5.4B; $26.2 \pm 5.2\% \Delta\text{F}/\text{F}$, $N = 4$, $n = 6$, unpaired t test, $p = 0.3650$). 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 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.

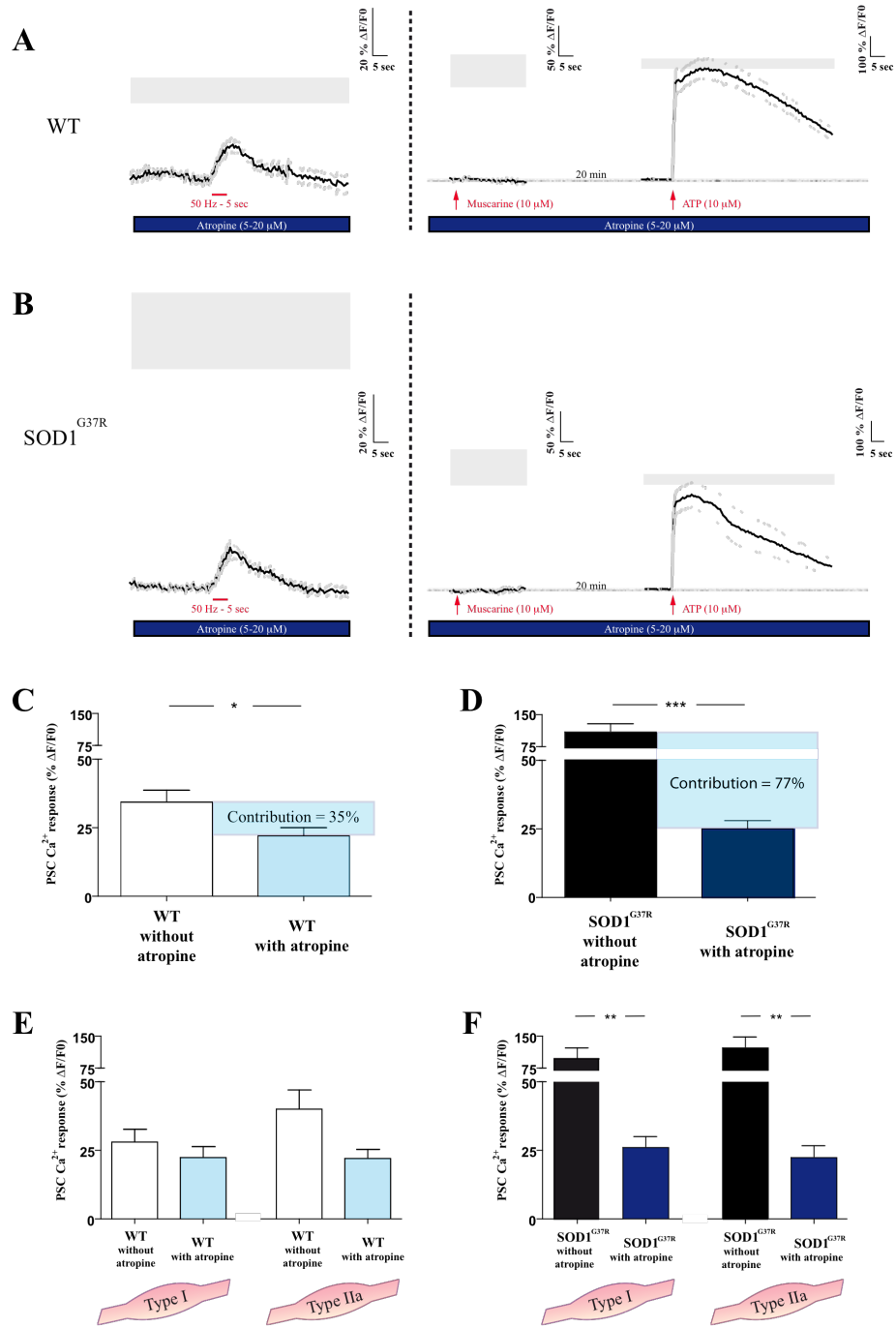
First, we examined the impact of purinergic receptor blockade using broad-spectrum P2 receptor antagonists (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid and suramin) and RB2 as a general P2_Y receptor antagonist. Consistent with our previous observations (Rochon et al., 2001), there were no clear 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 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.

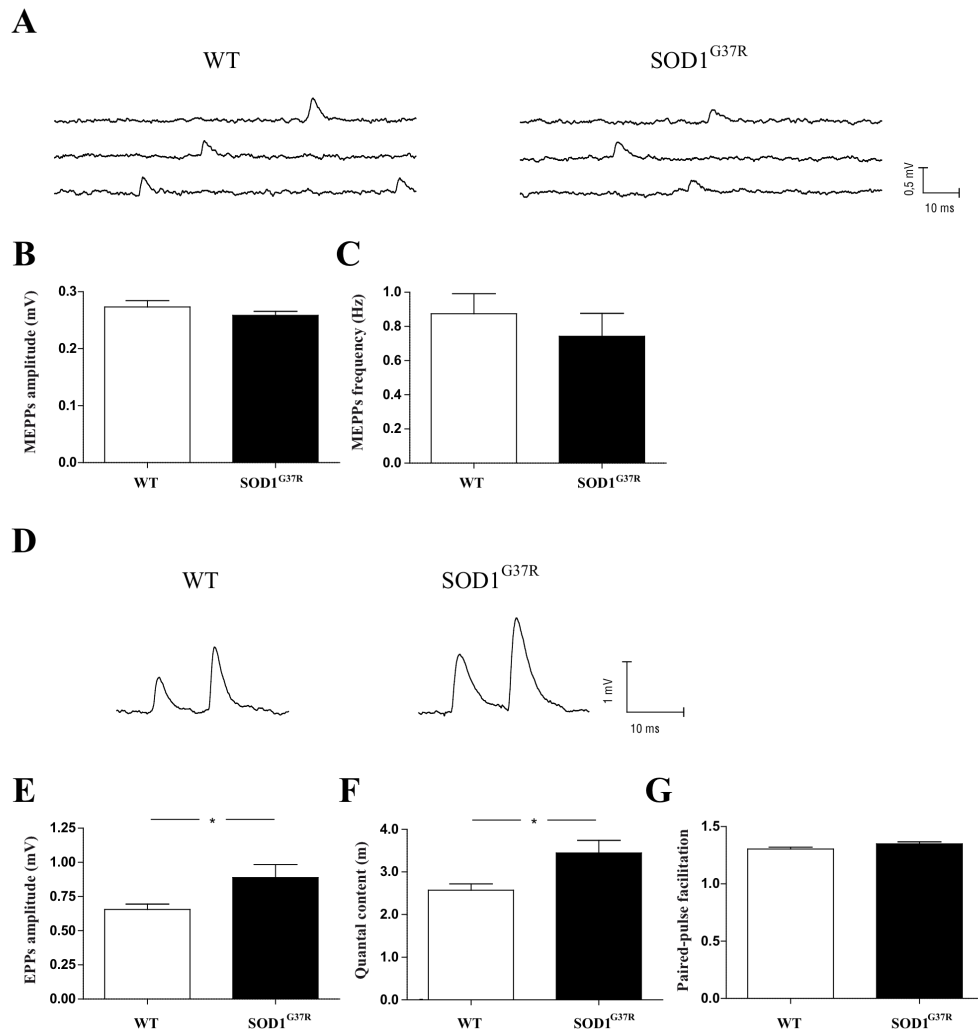
First, we evaluated the synaptic properties of SOD1^{G37R} mice at P380. We observed no difference in MEPP amplitude between WT and SOD1^{G37R} mice (WT, 0.27 ± 0.01 mV, $N = 7$, $n = 21$; SOD1^{G37R}, 0.26 ± 0.01 mV, $N = 8$, $n = 22$; unpaired t test, $p = 0.2672$; Fig. 5.7A,B). Surprisingly, unlike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

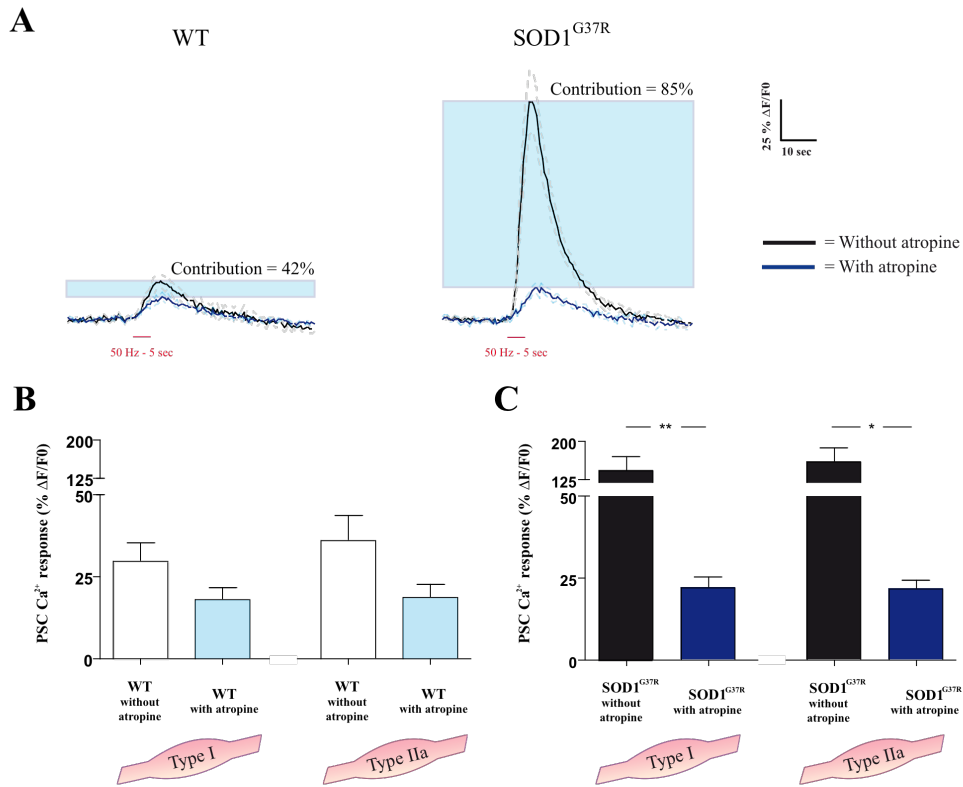
Excitability of PSCs remains altered just before the onset of the disease

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 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.

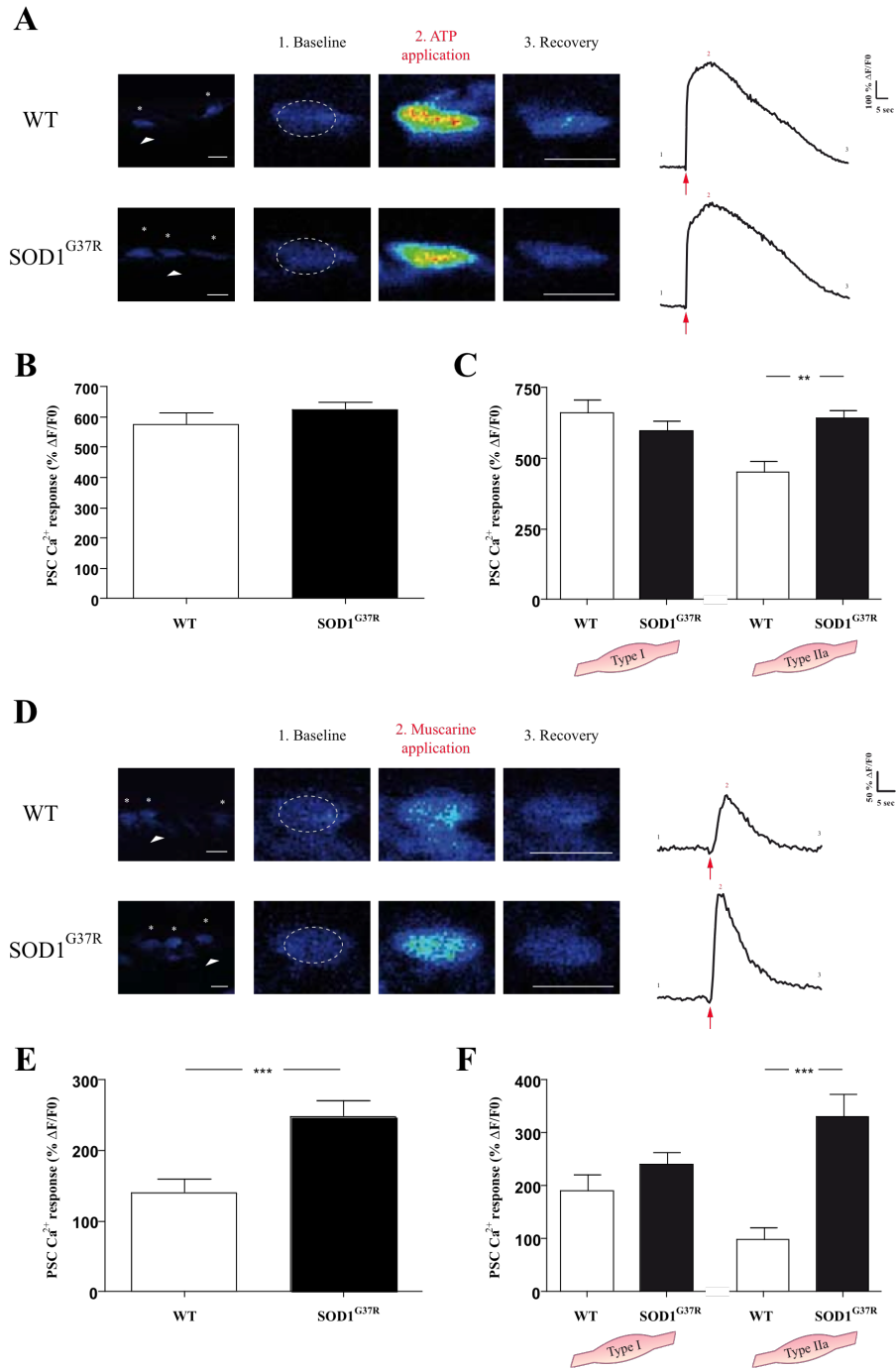
PSC ability to detect muscarinic signals is altered at P380

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 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 . *** $p < 0.001$.

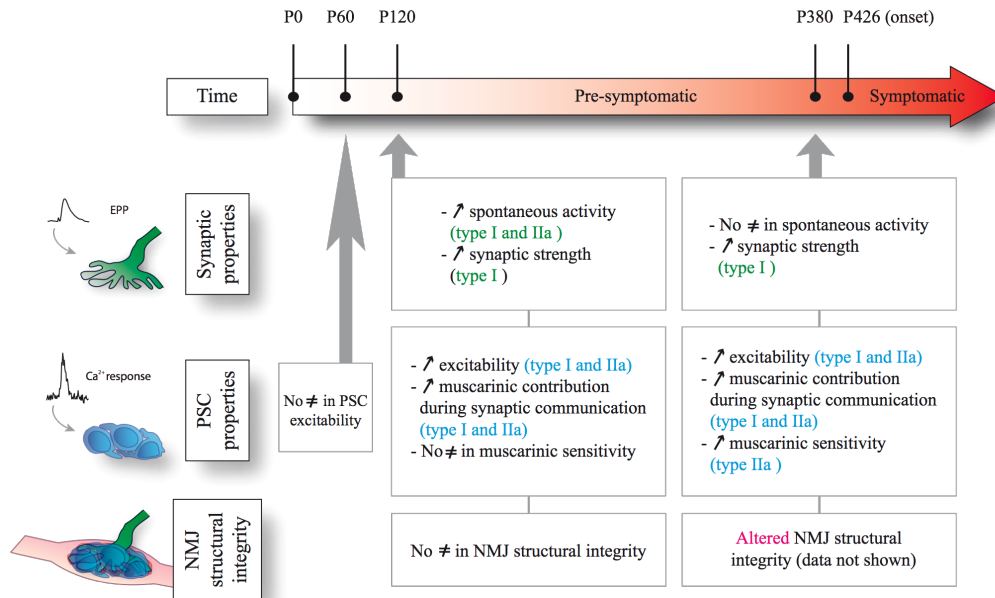
We next investigated the ability of a muscarinic agonist to evoke Ca^{2+} responses (Fig. 5.9D-F). Local application of muscarine (10 μM) induced Ca^{2+} responses in 69.6% of PSCs of WT (32 of 46 PSCs) and 56.5% of PSCs for $\text{SOD1}^{\text{G37R}}$ (52 of 92 PSCs). Average of Ca^{2+} responses was $139.5 \pm 20.0\% \Delta\text{F}/\text{F}$ ($N = 9$, $n = 32$) 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 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. ↑ indicates a significant increase in SOD1 compared with WT, and “No ≠” indicates that there was no statistical difference.

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).

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.

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.

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

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, 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.