

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

U1118 Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence

THÈSE présentée par :

Alexandra BOUSCARY

soutenue le : **10 septembre 2020**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**MODULATION DES SPHINGOLIPIDES COMME PISTE
THERAPEUTIQUE DANS LA SCLEROSE LATERALE
AMYOTROPHIQUE**

THÈSE dirigée par :

M. LOEFFLER Jean-Philippe

M. HENRIQUES Alexandre

Directeur de recherches, Université de Strasbourg

Directeur de la pharmacologie, Neuro-Sys

RAPPORTEURS :

Mme. BUTLER-BROWNE Gillian

M. CHARBONNIER Frédéric

Eméritat INSERM, Sorbonne Université

Pr des Universités, Université Paris Descartes

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme. PEREIRA DE VASCONCELOS Anne

Mme. CALLIZOT Noëlle

M. PRADAT Pierre-François

Chargé de recherches, Université de Strasbourg

Directrice scientifique, Neuro-Sys

Praticien Hospitalier, CHU Pitié-Salpêtrière (APHP)

REMERCIEMENTS

Après ce long périple de 4 ans portant le nom de « Doctorat », il est nécessaire que je remercie un certain nombre de personnes sans qui ce travail n'en serait pas venu à bout.

Je remercie tout d'abord mes directeurs de thèse : **Jean-Philippe Loeffler** et **Alexandre Henriques**. Je ne sais comment vous remercier de m'avoir donné la chance de faire cette thèse. Faire une thèse a été mon objectif pendant des années et vous m'avez donné cette possibilité. Merci pour cette thèse enrichissante et épanouissante, merci pour tout l'investissement que vous y avez mis. Merci de toujours m'avoir écoutée, d'avoir toujours pris mes suggestions scientifiques au sérieux. De m'avoir fait grandir dans le monde de la recherche et d'avoir toujours poussé ma réflexion au maximum. Merci d'avoir toujours pu discuter de tout avec vous et merci d'avoir cru en moi. **JP**, tu as toujours été disponible et encore plus quand Alex est parti. Toujours réactif à mes questions et mes demandes, je mesure la chance d'avoir pu bénéficier de ton expérience de la recherche. Elle m'aura considérablement appris pendant ces 4 ans de thèse. Encore « merci pour m'avoir donné la chance de partir deux fois en Australie ». **Alex**, même à l'autre bout de la France, tu répondais à mes mails et à mes appels quasiment dans les heures qui suivaient. Au-delà du fait que tu m'as appris à prendre du recul sur les résultats de mes expériences, tu m'as aussi scientifiquement redonné confiance en moi. Grâce à toi, lorsque j'ai un doute sur mon travail, je pense au fait que la Daube est bon repas.

Je souhaiterai aussi particulièrement remercier **Frédérique René**. Fred, je te remercie beaucoup pour ton investissement sur le papier CHMP2B. Mais surtout, merci pour l'énorme implication que tu as eue, toi aussi, dans ma thèse. Merci d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions, merci pour ton temps sur les différents manuscrits ou sur les saisines. Un grand merci pour ton aide scientifique mais aussi personnelle. Voyager jusqu'en Australie à tes cotés a été formidable. Grâce à toi, je connais presque le centre de Melbourne par cœur. Être partie aussi loin, dans une aussi grande ville, avec notre petite carte déchirée, a été une expérience que je n'oublierai pas. Merci pour cette formidable aventure à tes cotés à l'autre bout du monde.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse **Gillian Butler-Browne**, **Noëlle Callizot**, **Anne Pereira de Vasconcelos**, **Frédéric Charbonnier** et **Pierre-François Pradat** pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse mais aussi d'avoir pu décaler ma soutenance (initialement prévue en juin) en raison du Covid19.

Un grand merci à **Luc Dupuis**, pour m'avoir permis de terminer ma dernière année de thèse. Merci également pour tous les conseils scientifiques apportés lors des réunions de laboratoire. Je remercie aussi **Jose-Luiz Gonzalez De Aguilar**, **Caroline Rouaux** et **Marc de Tapia** pour les échanges scientifiques qui m'ont aidé au cours de ma thèse.

Merci à **Michael Spedding** pour sa participation et son implication sur le projet AMB. Merci pour son expérience du domaine et toutes les découvertes scientifiques que j'ai pu faire en lien avec mon projet grâce à lui.

Je tiens aussi à remercier **Sylvie Dirrig-Grosch** : sans ton aide, la partie CHMP2B n'aurait pas aussi bien avancé ces derniers mois. Merci pour ton savoir et ton expérience sur les différentes techniques du laboratoire. Merci également à **Althéa Mosbach** avec qui j'ai débuté mes travaux sur l'ambroxol pour son aide technique au début de ma thèse.

J'adresse également mes remerciements à **Brigitte Kuenemann**, **Marie-Jo Ruivo** et **Annie Picchinenna**. Merci **Brigitte** pour toutes les démarches administratives que tu as effectué pour ma thèse et merci

pour tous ces échanges autres que scientifiques qui m'ont été d'un grand bien ! **Marie-Jo**, merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme constant. Je prendrai bien soin du beau zamio culcas zamiifolia que tu m'as offert. **Annie**, un grand merci pour le temps que tu as investi à générer mes petites SOD1 tout au long de ma thèse.

Merci également à **Jelena**, **Salim** et **Matei**, les post-docs du labo, pour leurs conseils techniques et scientifiques. **Jelena**, merci pour tous les précieux conseils que tu as pu me donner au cours de ma thèse. **Salim**, merci pour les conseils statistiques que tu nous apportes lors des réunions. **Matei**, je pourrai faire une remarque sur tes chaussettes colorées ou ta moustache, mais je te remercierai plutôt d'avoir partagé ton café avec moi.

Merci à **Alizée** et **Haoyi** pour leur bonne humeur et leur gentillesse. **Alizée**, même si on ne se voit pas souvent, tes tips internet sont toujours tops ! **Haoyi**, merci de nous avoir fait goûter à toutes ces bonnes choses (parfois étranges) venant de Chine !

J'adresse également mes remerciements aux derniers venus (enfin presque !) **Margaux**, **Jessica**, **Marguerite**, **Marie**, **Félicie**, **Getrude** et **Johan** qui perpétuent la bonne humeur de ce laboratoire ! Merci également à **Marion** qui a participé à cette joyeuse ambiance !

Merci à **Stéphane**, **Florian**, **Claudia**, **Geoffrey**, et **Jérôme** pour leurs expertises techniques. **Stéphane**, Ô grand maître de la qPCR. Merci d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions techniques et de m'avoir formée avec patience et pédagogie sur mes différentes manip. Grâce à toi, j'ai aussi trouvé un compagnon pour faire la chouette. Ouh-Ouuuh. **Florian**, ton départ au labo nous a fait un grand vide. Merci pour tous ces bons moments et ces fous rires. Et merci pour cette magnifique séance photos. **Claudia**, merci pour ton expérience sur la partie animale mais aussi pour ta bonne humeur, ton franc-parler et ta positivité constante. **Geoffrey**, merci pour ces agréables et passionnantes conversations philosophiques qui m'ont fait oublier ces longues heures de vibratome. **Jérôme**, merci pour avoir tenté de réparer mon ordi perso qui a décidé de crasher en pleine rédaction de thèse. Merci pour m'avoir informatiquement donné un coup de main toutes les fois où la technologie m'a mise K.O.

Je tiens à remercier **Raph**, **Robin**, **Marco**. Vous avez été les meilleurs voisins de bureau que je n'ai jamais eu. **Raph**, ma toute dernière voisine de bureau. J'ai beaucoup apprécié tous ces moments à pouvoir discuter avec toi, de tout, de rien et sans tabou. Toujours à l'écoute, tu as aussi été un réel soutien pour moi depuis ton arrivée au labo. Merci. **Robin**, ou plutôt Vaguheurte, mon ancien collègue de bureau mais aussi de paillasse. Merci pour avoir eu la patience de répondre à mes innombrables questions sur les CHMP2B. Merci pour tous ces fous rires et la bonne ambiance que tu as toujours su apporter au labo. Juste une chose : ton talent pour la sculpture en pâte à sel n'égalera jamais la danse « Robot-billets ». Mouaha. **Marco**, grâce à toi et au beau vélo que tu m'as donné, j'ai pu parcourir Strasbourg dès mon arrivée en thèse. Alors même si tes éternuements s'entendent à l'autre bout du bâtiment (ah ah), merci !

Je souhaiterai aussi remercier **Thibaut** et **Aurore** pour tous ces supers moments passés avec vous mais également toutes nos discussions scientifiques et personnelles. **Awawawa**, râler seule c'est nul, mais râler à deux c'est mieux ! Merci pour toutes les discussions « cosmétiques » mais aussi merci pour ces soirées films qui m'ont permis de revoir TOUS les Harry Potter. Et pardon pour les spoils. **TB**, j'ai gardé un super souvenir de cette visite d'Oxford. Grâce à toi, j'ai pu découvrir les différents musées de la ville. C'était vraiment top, alors merci ! (Même si je crois que j'ai surtout pris des photos de nos repas...).

Un énorme merci aussi à **Imma** et **Gina**, mes collègues, mes amies avec qui j'ai pu passer la majorité de mes fous rires. Il m'a été difficile d'écrire vos remerciements tant j'ai de choses à vous dire. **Patata**

Imma, hemos empezado esta aventura juntos. También hemos compartido y afrontado las dificultades de la tesis juntos en el laboratorio y en la "lonely-room". Te agradezco mucho el enorme apoyo aportado y los buenos consejos que me has dado, especialmente en mis momentos más difíciles. Espero poder venir a Barcelona muy pronto para verte y tomar un Ginto contigo. GRACIAS PATATOUILLE. <3 **Gineuh**, ces 4 années de thèse à tes côtés ont aussi été pleines de rebondissements. Avec toi, la plus simple des journées se transforme en véritable aventure. Je ne compte même plus les heures durant lesquelles nous avons pu parler continuellement sans s'arrêter. Surtout sur le parking du labo. Même durant le confinement, nous avons trouvé le moyen de passer des heures à papoter. Merci pour tous ces bons moments de rigolades et merci à toi aussi pour tes précieux conseils.

Au-delà du cercle scientifique, je souhaiterai également remercier d'autres personnes, amis et famille, qui m'ont aussi aidé et soutenu durant cette thèse.

Merci à **Céline L.**, ma binôme de master avec qui j'ai passé de supers congrès SLA. Merci également à **Céline D.**, qui m'a toujours encouragée à faire une thèse et accompagnée jusque-là. Merci à **Anthony** qui m'a toujours soutenue lors de mes études supérieures et qui a toujours cru en moi. Merci aussi à **Aurore ma patate**, ma meilleure amie que je connais depuis mon plus jeune âge et qui a toujours été à mes côtés quels que soient mes choix. Merci à ma **belle-famille** qui durant toute cette période de rédaction m'a envoyé plein de beaux messages de soutien. Également merci à mes chats, **Myrtille** et **Ragnar**, qui ont passé la majorité de ma rédaction de thèse à monter et descendre de mes genoux. Rien n'a été plus plaisant que leurs agréables ronrons pour écrire.

Je souhaiterai également remercier mon conjoint **Cyril**, mon plus grand pilier, et particulièrement pendant cette dure période de rédaction (et de confinement). Merci d'avoir cru en moi, d'avoir toujours été là. Merci pour m'avoir encouragée lorsque je perdais patience, d'avoir supporté mes mauvaises humeurs lorsque j'étais fatiguée. C'est aussi en partie grâce à toi si j'ai pu terminer ce manuscrit. Mais surtout, merci d'avoir su effacer mes nombreux doutes, non pas seulement lors de ma rédaction ou de ma thèse passée à tes côtés, mais aussi dans ma vie de tous les jours tout simplement. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi et tout ce que tu continues de m'apporter. #caillouprécieux

Enfin, un énorme merci aux personnes sans qui je n'aurai jamais atteint la thèse sans leur soutien et leur appui : **mes parents**. Merci de m'avoir donné la force, les moyens et la possibilité d'en arriver jusque-là. Sans vous, ce rêve de Doctorat que j'ai depuis très jeune n'aurait jamais pu exister. Merci également à mon reuf **Hugo**, ma reusse **Loanette** qui est aussi « mon petit **Babynou** », mon oncle **Mario**, ma **mamie** et ma belle-sœur **Elodie**, car la famille est l'un des soutiens le plus important. Merci à vous tous d'avoir toujours été là.

Pour terminer, je souhaiterai adresser un **chaleureux merci** à toutes les personnes ayant relu et corrigé ce manuscrit. Merci pour vos nombreux conseils et vos remarques qui m'ont permis d'en venir à bout.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	7
ABREVIATIONS	8
AVANT-PROPOS	10
INTRODUCTION.....	13
PARTIE 1 : La Sclérose Latérale Amyotrophique et le continuum SLA-DFT.....	13
A. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)	13
1. De la génétique aux facteurs environnementaux.....	13
2. Les caractéristiques cliniques.....	16
3. Le diagnostic clinique	21
4. Les traitements thérapeutiques et symptomatiques	24
B. La Démence Fronto-Temporale (DFT).....	27
1. Epidémiologie.....	27
2. Les caractéristiques cliniques.....	29
3. Les diagnostics cliniques	34
4. Les traitements thérapeutiques et symptomatiques	38
C. Le continuum SLA-DFT	39
1. Les principales mutations génétiques.....	39
2. Les mécanismes physiopathologiques de la SLA et du syndrome SLA-DFT	45
3. Les modèles murins de SLA et de DFT	54
PARTIE 2 : L'implication des sphingolipides dans la SLA et dans le syndrome SLA-DFT	59
A. Les sphingolipides, des composants majeurs du système nerveux central et périphérique	59
1. Structure générale des sphingolipides et distribution tissulaire	59
2. Biosynthèse, transport et catabolisme	62
3. Les sphingolipides dans les fonctions cellulaires du système nerveux.....	65
B. Les sphingolipides dans les maladies du système nerveux.....	72
1. Les changements du métabolisme des sphingolipides dans la SLA.....	73
2. Les sphingolipides : une voie lipidique potentiellement impliquée dans le syndrome SLA-DFT.....	75
3. Les sphingolipides dans les maladies neurodégénératives et à surcharge lysosomale.....	76
C. L'ambroxol et le métabolisme des glycosphingolipides	80
1. Qu'est-ce que l'ambroxol ?	80
2. Propriétés de l'ambroxol.....	81
3. L'ambroxol : une molécule chaperonne et inhibitrice.....	85
4. L'ambroxol dans la maladie de Gaucher et la maladie de Parkinson : des souris aux essais cliniques	87
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE THESE	94
RESULTATS	98
A. PUBLICATION 1: Sphingolipid Metabolism Is Dysregulated at Transcriptomic and Metabolic Levels in the Spinal Cord of an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis	98

B. PUBLICATION 2: Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Functions and Extends Survival in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis	114
1. Données complémentaires de la publication 2	125
C. L'ambroxol hydrochloride ralentit la progression de la physiopathologie du modèle SLA-DFT <i>CHMP2B^{intron5}</i> (En préparation)	127
1. Matériel et méthodes	129
2. Résultats	133
3. Discussion	138
4. Conclusion	147
5. Références	147
6. Figures et légendes	152
DISCUSSION	166
A. L'AMB, un potentialisateur des facteurs neurotrophiques ?	166
1. L'AMB préserve l'intégrité de l'axe moteur dans deux modèles de SLA	166
2. Les effets potentiels de l'AMB sur les facteurs neurotrophiques	167
B. Les sphingolipides et l'AMB dans les processus lysosomal et autophagique	168
1. Les sphingolipides et le processus autophagique	169
2. Les effets de l'AMB sur les voies lysosomale et autophagique	171
C. Envisager l'AMB pour traiter la SLA et le syndrome SLA-DFT	180
1. L'AMB contre la neuroinflammation	180
2. L'AMB contre les agrégats cytoplasmiques	182
3. Envisager l'AMB pour les patients SLA et SLA-DFT	182
CONCLUSION	186
ANNEXES	188
A. Données supplémentaires de la publication 1	188
B. Données supplémentaires de la publication 2	192
BIBLIOGRAPHIE	197

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution génétique de la SLA.	15
Figure 2 : Populations neuronales affectées dans la SLA.	17
Figure 3 : Les différents sites d'apparition de la SLA.	19
Figure 4 : Comparaison clinique entre le début d'apparition de la SLA, les mutations familiales et le risque de développer une DFT.	20
Figure 5 : Lien entre les mutations et les inclusions protéiques retrouvées dans la DFT.	32
Figure 6 : Changements métaboliques du continuum SLA-DFT.	34
Figure 7 : Atrophie de la substance grise selon le sous-type de DFT.	36
Figure 8 : Spectre génétique de la SLA et de la DFT.	40
Figure 9 : Conséquence de la mutation <i>M178V/L</i> sur les transcrits <i>CHMP2B</i>	44
Figure 10 : Profil moléculaire de la glie dans la SLA.	48
Figure 11 : Processus autophagique.	54
Figure 12 : Classification simplifiée des sphingolipides.	60
Figure 13 : Vue générale de la synthèse des sphingolipides.	61
Figure 14 : Métabolisme des sphingolipides.	64
Figure 15 : Stabilisation de la gaine de myéline par les sphingolipides.	67
Figure 16 : Expression des gangliosides dans le système nerveux au cours du développement.	69
Figure 17 : Implication des glycosphingolipides dans la différenciation neuronale et la croissance axonale.	70
Figure 18 : Effets de l'interaction des gangliosides GM1 avec les récepteurs Trk.	72
Figure 19 : Structures chimiques de la vasicine et de ses dérivés synthétiques.	80
Figure 20 : Effets connus et supposés de l'AMB.	84
Figure 21 : Principe de la « Pharmacological Chaperone Therapy ».	86
Figure 22 : Propriétés chaperonnes et inhibitrices supposées de l'AMB.	87
Figure 23 : L'inhibition de GBA2 par l'inhibiteur spécifique OM2 améliore <i>in vivo</i> la récupération motrice après lésion du nerf sciatique sur des souris non-transgéniques.	126
Figure 24 : Effets de l'AMB sur les voies dépendantes et indépendantes du mannose-6-phosphate.	175
Figure 25 : Balance mTORC1/AMPK en fonction du statut nutritionnel de la cellule.	178

ABREVIATIONS

AG	Acide gras
AMB	Ambroxol hydrochloride
APP	Aphasies primaires progressives
ARCA	Ataxie cérébelleuse autosomique récessive
ARNm	ARN messenger
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
C9ORF72	Chromosome 9 open reading frame 72
C1P	Céramide-1-phosphate
CBE	Conduritol B époxyde
CDase	Ceramidase
CERS	Ceramide synthase
ChAT	Choline acétyl transférase
CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2b
CMV	Corps multivésiculaires / endosomes tardifs
DFT	Démence fronto-temporale
DLFT	Démence lobaire fronto-temporale
EMG	Electromyographie
ERT	Thérapie de remplacement enzymatique
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
FALS	SLA familiale
FUS	Fused in sarcoma
GALC	Galactosylcéramidase
GalCer	Galactosylcéramide
GBA	β -Glucocérébrosidases
GCase	Glucocérébrosidases
GD1	Maladie de Gaucher de type 1
GDNF	Glial cell-line-derived neurotrophic factor
GlcCer	Glucosylcéramide
GSLs	Glycosphingolipides
HexA/HexB	Hexosaminidase A / B
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JNM	Jonctions neuromusculaires
LacCer	Lactosylcéramide
LCR	Liquide céphalorachidien
LDL/HDL	Low density protein/high density protein
MAPT	Microtubule associated protein TAU
MG	Maladie de Gaucher

MN	Motoneurone(s)
MND	Maladie du motoneurone
MP	Maladie de Parkinson
NGF	Nerve growth factor
MSL	Maladie(s) de surcharge lysosomale
NMC	Neurones moteurs corticaux
NMDA	N-Methyl-d-aspartic acid
nGD	Maladie de Gaucher neuropathique
nTg	Non-transgénique
PGRN	Progranuline
PSH	Paraplégie spastique héréditaire
PSP	Paralysie supranucléaire progressive
RCPGs	Récepteurs couplés aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Radicaux libres / reactive oxygen species
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SALS	SLA sporadique
SCB	Syndrome corticobasal
SK	Sphingosine kinase
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SM	Sphingomyéline
SMase	Sphingomyélinase
SMS	Sphingomyéline synthase
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOD1	Superoxyde dismutase [Cu/Zn] 1
SPP	S1P phosphatase déphosphorylante
SRT	Thérapie de réduction de substrat
TARDBP	Transcriptase response DNA binding protein TDP-43
TEP	Tomographie par émission de positons
TNF- α	Tumor necrosis factors α
Trk	Tropomyosine récepteur kinase
UBQLN2	Ubiquiline 2
UGCG	Glucosylcéramide synthase
UGT8	Céramide galactosyltransférase
vcDFT	Variante comportementale de la DFT
VCP	Valosine-containing protein

AVANT-PROPOS

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale caractérisée par la mort sélective des neurones moteurs corticaux et des motoneurons spinaux. Maladie du motoneurone la plus fréquente chez l'adulte, elle engendre une paralysie progressive et le décès du patient 2 à 5 ans après l'établissement du diagnostic. Malgré l'identification de nombreux gènes à l'origine de la maladie, l'étiologie de la SLA reste encore inconnue. La Démence Fronto-Temporale (DFT) est une démence conduisant à une atrophie progressive des lobes frontaux et temporaux du cortex cérébral. Considérée comme la démence la plus répandue après la maladie d'Alzheimer et la démence à corps de Lewy, les patients présentent un changement de la personnalité associé à des troubles sociaux, émotionnels, linguistiques et alimentaires. La SLA et la DFT ont longtemps été considérées comme deux maladies indépendantes. Les données cliniques, génétiques et histopathologiques ont pu cependant permettre d'établir le lien entre ces deux pathologies, dont le continuum est aujourd'hui clairement reconnu. En dépit des efforts menés par la communauté scientifique pour décrypter les mécanismes de la SLA et de la DFT, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour ces deux maladies et les traitements symptomatiques ont une efficacité limitée.

Il est établi depuis quelques années que la SLA est également une maladie pouvant présenter des perturbations du métabolisme énergétique. En effet, les patients SLA ont une incidence accrue pour une dyslipidémie et un hypermétabolisme, qui corrént négativement avec le pronostic vital. Bien que l'hyperlipidémie ne semble pas avoir d'impact sur le développement de la DFT, on retrouve dans cette maladie une perturbation de la fonction lysosomale, processus notamment impliqué dans la dégradation des lipides dans les neurones. Les données de la littérature et nos précédentes études ont permis de mettre en évidence que les glycosphingolipides, une classe de lipides complexes, sont fortement dérégulés chez les patients SLA ainsi que dans le modèle murin SLA *Sod1^{G86R}*. La voie du glucosylcéramide, l'un de ces glycosphingolipides, est particulièrement impactée. La dégradation du glucosylcéramide s'effectue par deux enzymes, les enzymes GBA1 et GBA2. Les niveaux de GBA2 sont particulièrement augmentés dans la moelle épinière des souris *Sod1^{G86R}*. Plus récemment, le métabolisme des glycosphingolipides a également été retrouvé dérégulé dans le modèle murin SLA-DFT *CHMP2B^{intron5}*. Ces données suggèrent que les glycosphingolipides jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie de la SLA.

L'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer l'impact d'une modulation des glycosphingolipides, grâce à une approche pharmacologique, sur le développement de la maladie d'un modèle murin de SLA mais aussi de SLA-DFT. Pour cela, j'ai utilisé l'ambroxol hydrochloride, une

molécule chaperonne de GBA1, mais aussi inhibitrice de GBA2. J'ai pu ainsi montrer que l'ambroxol a des effets bénéfiques sur la composante motrice des modèles murins *Sod1^{G86R}* et *CHMP2B^{intron5}* ainsi que sur la survie des souris *Sod1^{G86R}*. L'ambroxol limite également les changements comportementaux retrouvés dans le modèle *CHMP2B^{intron5}* tout en modulant l'expression de certains gènes de la voie lysosomale ainsi que celle de marqueurs microgliaux associés à la neuroinflammation. Ces études nous ont conforté dans l'idée que cibler la voie des glycosphingolipides dans la SLA pourrait être une approche thérapeutique efficace. C'est pourquoi, j'ai commencé à évaluer les effets d'une inhibition spécifique de GBA2 en utilisant un inhibiteur pharmacologique plus précis. Nos résultats préliminaires montrent que l'inhibition spécifique de GBA2 améliore la récupération motrice après compression du nerf sciatique. Il se pourrait donc que les effets bénéfiques de l'ambroxol soient liés à l'inhibition de GBA2.

L'ensemble de mes travaux permet d'envisager un potentiel repositionnement médicamenteux de l'ambroxol hydrochloride comme un potentiel traitement thérapeutique de la SLA.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

PARTIE 1 : La Sclérose Latérale Amyotrophique et le continuum SLA-DFT

A. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), aussi appelée Maladie de Charcot, a été décrite pour la première fois en 1869 par le médecin neurologue Jean-Martin Charcot. Cette maladie neurodégénérative létale est caractérisée par la dégénérescence progressive des neurones du système moteur volontaire. Elle atteint plus précisément la fonction et la viabilité des neurones moteurs corticaux et des MN spinaux et bulbaires. Elle est associée aussi à une atrophie musculaire et une paralysie progressive générale. La SLA affecte les patients généralement entre 50 et 60 ans et entraîne leur décès 3 à 5 ans après leur diagnostic (van Es et al., 2017).

1. De la génétique aux facteurs environnementaux

La SLA est considérée comme la maladie du motoneurone (MN) la plus fréquente chez l'adulte. Son incidence dans la population européenne et d'Amérique du Nord est d'environ 1,5 à 3 personnes sur 100 000 habitants par an et sa prévalence concerne approximativement 6 personnes pour 100 000 habitants (Chiò et al., 2013; Couratier et al., 2016; van Es et al., 2017; Logroscino et al., 2010; Mitchell and Borasio, 2007). En France, les données collectées ont montré une prévalence de 6000 personnes atteintes de SLA ainsi qu'une incidence de 3 à 4 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants (Couratier et al., 2016). La SLA est pourtant considérée comme une maladie rare. Cela s'explique par la faible espérance de vie des patients atteints. Certaines études tendent à suggérer que la SLA affecte un peu plus les hommes que les femmes avec un ratio de 1,3 pour les hommes et de 1 pour les femmes (Logroscino et al., 2010; Worms, 2001). Même si les patients décèdent généralement d'une paralysie des muscles respiratoires 3 à 5 ans après l'apparition des premiers signes cliniques, la survie des patients peut être très variable (van Es et al., 2017; Huisman et al., 2011; Logroscino et al., 2010). A ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible et les traitements symptomatiques ont une efficacité limitée. En Europe, seul le riluzole (Rilutek®), est actuellement indiqué pour le traitement de la SLA mais il ne permet d'augmenter l'espérance de vie que de quelques mois (Bensimon et al., 2002; Miller et al., 1996, 2012; Turner et al., 2001). Depuis 2015, une autre molécule, l'edaravone, est autorisée aux USA et au Japon pour le traitement de la SLA. Son efficacité reste tout de même actuellement controversée (Abe et al., 2017a; Al-Chalabi et al., 2017; Dorst et al., 2018).

La SLA peut être d'origine sporadique (90% des cas) ou familiale (10%). Dans le cas de SLA sporadique (SALS), l'étiologie de la maladie est inconnue et touche des individus auxquels aucun historique familial n'a été associé. A l'inverse, dans les cas de forme familiale (FALS), l'origine génétique de la maladie est clairement établie. Hormis certaines mutations provoquant des SLA atypiques, le tableau clinique de la maladie reste généralement le même dans les deux cas (Couratier et al., 2016).

1.1. Les origines génétiques de la SLA

De nombreux gènes ont été découverts comme étant directement liés à la SLA, aussi bien dans les formes familiales (10%) que sporadiques (90%) ([figure 1](#)) (Renton et al., 2014). Dans les cas de FALS, le modèle de transmission dépend fortement de la mutation. Elle se fait généralement de manière autosomique dominante (avec une forte pénétrance), et plus rarement de manière autosomique récessive (Couratier et al., 2016; Millecamps et al., 2010). Les expansions hexanucléotidiques dans une région codante du gène *C9ORF72* (chromosome 9 open reading frame 72) sont la cause majeure des FALS et des SALS. Elles concernent 46% des FALS et 8% des SALS (Millecamps et al., 2012; Renton et al., 2011). Parmi les autres causes génétiques principales, on retrouve des mutations dans le gène *SOD1* (codant la Superoxyde Dismutase 1) dans environ 12% des cas FALS et environ 3% des SALS ; mais aussi dans deux gènes codant pour des protéines du métabolisme de l'ARN : le gène *FUS* (codant la protéine nucléaire « fused in sarcoma »), impliqué dans 5% des FALS et 1% des SALS (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009), et le gène *TARDBP* (codant la « Transcriptase Response DNA Binding Protein TDP-43 »), impliqué dans 5% des FALS et 1% des SALS (Couratier et al., 2016; Millecamps et al., 2010; Renton et al., 2014). Certains de ces gènes, pouvant être impliqués à la fois dans la SLA et dans la DFT, seront détaillés plus précisément dans le chapitre C (PARTIE 1), qui présente le continuum SLA-DFT.

On retrouve chez les patients porteurs de mutations, des agrégats de protéines malconformées en lien avec le gène muté, qui peuvent être concomitants avec des inclusions positives pour d'autres protéines non mutées (TDP-43, FUS, etc.). La protéine TDP-43 est le principal composant des inclusions cytoplasmiques retrouvées dans les MN des patients SLA (Neumann et al., 2006; Renton et al., 2014). Seuls les patients porteurs d'une mutation dans le gène *SOD1* ne possèdent pas d'inclusions TDP-43 (Couratier et al., 2016; Millecamps et al., 2010).

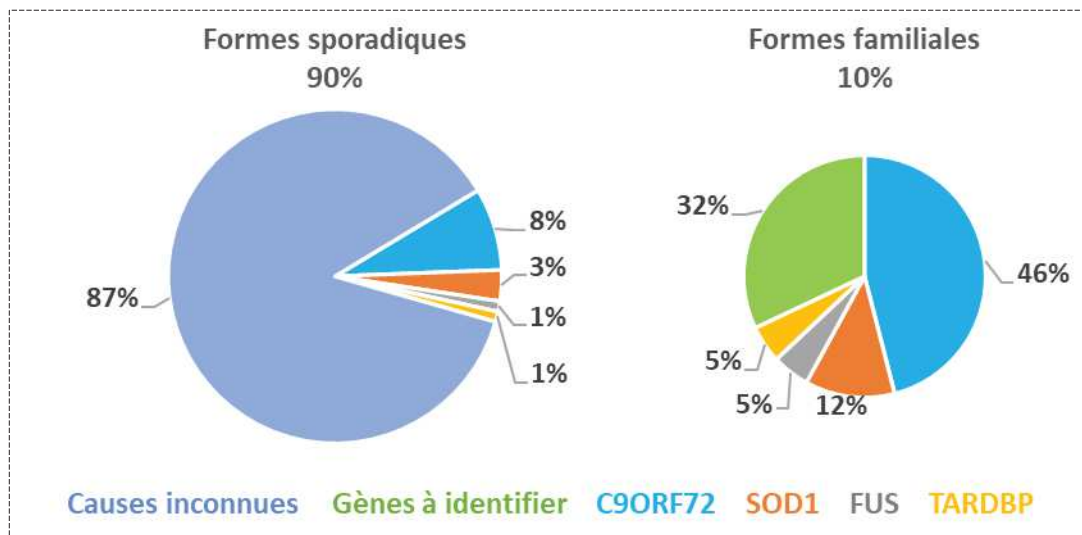


Figure 1 : Distribution génétique de la SLA.

Seuls les gènes les plus fréquemment mutés dans la pathologie sont représentés dans cette figure (figure inspirée de Couratier et al., 2016; Millecamps et al., 2010; Renton et al., 2014).

1.2. L'implication de l'environnement et les facteurs de risques

Les causes de déclenchement de la SLA restent à éclaircir. La communauté scientifique tente donc d'établir un lien entre les cas sporadiques de SLA et les facteurs environnementaux. En effet, dans certaines régions du monde, la fréquence de la maladie est plus élevée. C'est notamment le cas de l'île de Guam, située dans le Pacifique. Dans les années 1940, la population autochtone Chamorro a particulièrement été affectée par une forme de SLA atypique associée à un syndrome parkinsonien et une démence (Arnold et al., 1953; Figlewicz et al., 1994; Garruto et al., 1981; Koerner, 1952; Kurland, 1988). Certaines études privilégient le facteur environnemental dans ces cas de SLA, où l'hypothèse d'un potentiel lien entre la maladie et la présence de L-β-Methylaminoalanine (L-β-MAA, un acide aminé neurotoxique) dans les sols, l'eau et l'alimentation, est fortement suspectée (Cox and Sacks, 2002; Cox et al., 2005; Kurland, 1988; Murch et al., 2004; Spencer et al., 1987).

Outre les facteurs liés à l'environnement naturel, il existe d'autres facteurs de risques de la maladie. Ils sont très divers et peuvent aussi bien être liés à l'environnement professionnel d'une personne qu'à un mode de vie ou encore à des conditions physiologiques et médicales. En effet, la SLA semble affecter davantage les personnes exposées à certains facteurs exogènes comme l'exposition aux pesticides, aux métaux lourds, aux solvants ou encore aux virus (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Douville et al., 2011; Gresham et al., 1986; Ingre et al., 2015; Malek et al., 2012; Vinceti et al., 2010). La pratique d'une activité physique intense, le type de nutrition ou le tabagisme sont aussi considérés comme des facteurs de risques liés au mode de vie dans la SLA (Armon, 2009; Chio, 2005; Nelson et al., 2000; Pupillo et al., 2014a). Enfin, les facteurs physiologiques comme la faible masse corporelle ou les

conditions médicales comme l'hypermétabolisme ou le diabète ont également été associés à l'augmentation du risque de développer la maladie (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Couratier et al., 2016; Ingre et al., 2015; Mariosa et al., 2015; Turner et al., 2013). Toutefois, il est important de noter que tous ces facteurs ne sont que des corrélations et non des causalités. Ils restent donc très controversés.

2. Les caractéristiques cliniques

2.1. L'âge d'apparition de la maladie et son évolution

L'âge de survenue des premiers symptômes de la SLA est en moyenne de 60 ans. L'évolution est toujours fatale. De manière générale, le diagnostic est établi un an après les premiers symptômes et les patients décèdent entre 3 et 5 ans après le diagnostic de la maladie. Toutefois, l'apparition et l'évolution de la pathologie sont variables et dépendent de plusieurs facteurs, notamment des mutations retrouvées chez les patients (Pupillo et al., 2014b).

L'âge d'apparition des premiers symptômes peut également influencer sur l'évolution de la pathologie (Wolf et al., 2014). Plus l'âge est avancé, plus l'évolution semble rapide. De plus, l'âge d'apparition des premiers symptômes corrèle souvent avec le type de mutations retrouvées chez les patients (Millecamps et al., 2010). En effet, les patients porteurs de mutations *C9ORF72* déclarent la maladie à un âge plus avancé que les patients portant une mutation dans les gènes *SOD1/TARDBP/FUS*. A l'inverse, les patients atteints de mutations *FUS* déclarent généralement la maladie plus jeune que les patients porteurs de mutations *SOD1*, *TARDBP* et *C9ORF72* (en moyenne à 43 ans pour les patients *FUS* contre, respectivement, 51/52/58 ans pour les patients *SOD1/TARDBP/C9ORF72*). Enfin, les patients porteurs de mutation *FUS* et *C9ORF72* montrent également un phénotype SLA très sévère et la maladie évolue très rapidement : le décès se fait généralement moins de 3 ans après l'apparition des premiers symptômes (Millecamps et al., 2012).

Plus rarement, l'évolution de la maladie peut être lente et dépasser 15 ans. Cela concerne environ 16% des patients SLA (Gubbay et al., 1985). C'est notamment le cas du célèbre physicien Stephen Hawking, décédé en mars 2018 après avoir vécu plus de 50 ans avec la maladie (Dobson, 2002; Westeneng et al., 2018). Toutefois, les formes de SLA à progression lente sont atypiques. Ces formes concernent les patients portant une mutation ponctuelle dans le gène *DCTN1* (codant pour la dynactine) (Laird et al., 2008). Il existe également des SLA dites « juvéniles ». Les SLA juvéniles apparaissent avant l'âge de 25 ans et sont liées à des mutations spécifiques dans les gènes *ALS2* (codant la protéine alsine), *SETX* (codant la protéine sénataxine) et *FUS* (Cai, 2005; Chance et al., 1998; Chen et al., 2004; Gros-Louis et al., 2008). Hormis les mutations *FUS*, l'évolution des SLA juvéniles est généralement lente.

2.2. Les sites d'apparition de la maladie et les signes cliniques

Il existe 3 formes principales de SLA : spinale, bulbaire et respiratoire. Elles ont été définies en fonction du site d'apparition initial des symptômes moteurs. Ces symptômes moteurs surviennent à la suite d'une dégénérescence des neurones moteurs corticaux (ou MN supérieurs), des MN bulbaires et des MN spinaux (ou MN inférieurs) (**figure 2**). Les neurones moteurs corticaux (NMC) sont situés dans le cortex moteur et projettent sur les MN du bulbe rachidien (MN bulbaires) et la corne ventrale de la moelle épinière (MN spinaux). La connexion des NMC aux MN (bulbaires et spinaux) forme ce qu'on appelle le faisceau pyramidal. Grâce à ce faisceau, les MN commandent aux muscles qu'ils innervent, une action envoyée par les NMC. Parmi les MN existants, ce sont les MN α du système nerveux volontaire qui dégèrent dans la SLA (Roselli and Caroni, 2014).

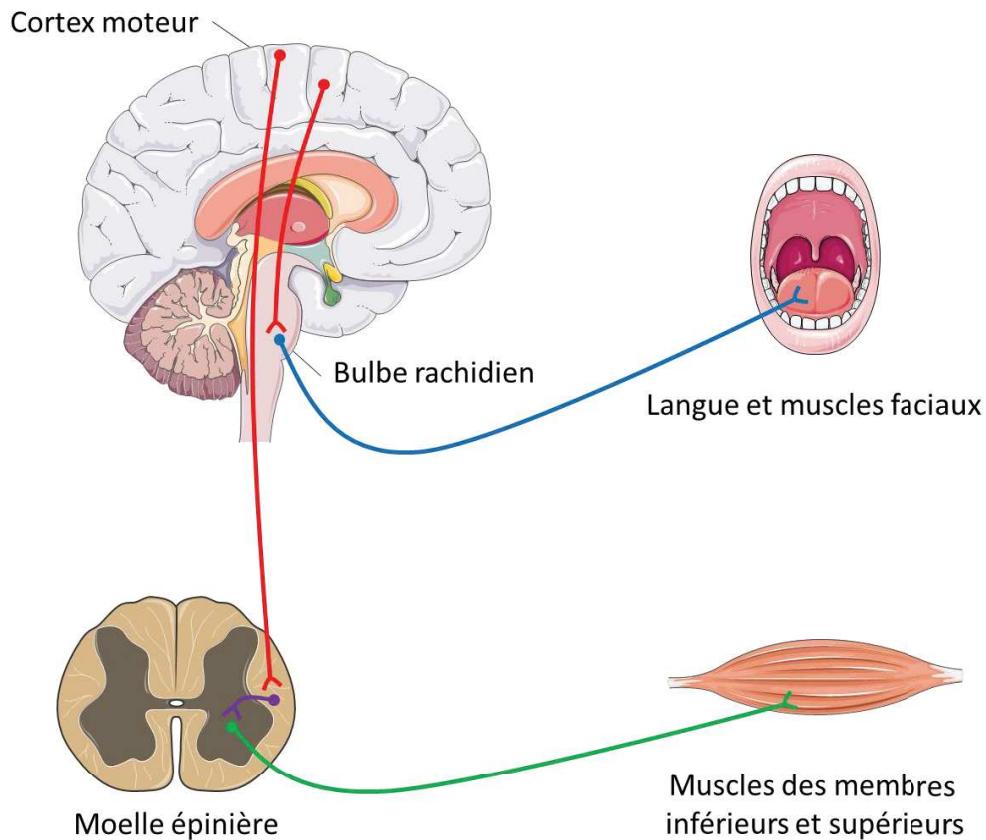


Figure 2 : Populations neuronales affectées dans la SLA.

Les NMC projettent vers les MN bulbaires et spinaux. Les MN bulbaires et spinaux commandent les muscles du visage ou les membres supérieurs et/ou inférieurs. La SLA est caractérisée par la dégénérescence de ces populations de neurones (NMC ; MN bulbaires ; MN spinaux) (Inspirée de Taylor et al., 2016).

En règle générale, la dégénérescence des NMC chez les patients entraîne une spasticité et une hyperréflexie ostéotendineuse (exagération des réflexes) avec inversion du signe de Babinski. La spasticité consiste en une exagération pathologique du réflexe myotatique à l'origine de spasmes et de contractions musculaires exagérées. Les travaux du laboratoire suggèrent que la spasticité

retrouvée chez les patients SLA serait en partie liée à la dégénérescence des neurones sérotoninergiques du noyau raphé dans le tronc cérébral (Dentel et al., 2013; El Oussini et al., 2017). La dégénérescence des MN entraîne le plus souvent une paralysie progressive, des fasciculations (contractions involontaires des fibres musculaires), des crampes et une hypotonie (tonicité musculaire insuffisante) des muscles atteints. La dégénérescence des MN bulbaires peut donner lieu à des phénomènes de dysarthrie (trouble de l'élocution) et de dysphagie (troubles de la déglutition) (Rowland and Shneider, 2001).

La SLA est caractérisée par l'atteinte de la fonction et de la viabilité des deux populations de neurones moteurs (NMC et MN). Le niveau d'atteinte de ces neurones est spécifique à chaque patient et entraîne une diversité de symptômes et des formes différentes de la maladie ([figure 3](#)).

La forme spinale concerne 75% des cas. La progression de la maladie est moins sévère que les autres formes. Elle se caractérise par l'atteinte asymétrique des membres inférieurs ou supérieurs, le plus souvent de manière distale (Rowland and Shneider, 2001; Wijesekera and Leigh, 2009). Les principaux symptômes cliniques de la forme spinale sont : une faiblesse et une atrophie musculaire, des fasciculations (contraction involontaire des fibres musculaires) et des crampes des membres atteints, une hyperréflexie, une spasticité avec généralement une absence du signe de Babinski (Rowland and Shneider, 2001; Swinnen and Robberecht, 2014). La forme bulbaire concerne 20% des patients SLA. Elle est associée à un mauvais pronostic vital. Cette forme est prédominante chez les femmes. Les patients atteints par la forme bulbaire présentent le plus souvent une faiblesse et une atrophie progressive des muscles bulbaires (c'est-à-dire les muscles du visage, du pharynx, du larynx et de la langue), entraînant généralement une dysarthrie, une dysphagie et des fasciculations de la langue. La propagation de la maladie peut se caractériser par une hyperréflexie des membres (Chio et al., 2011; Swinnen and Robberecht, 2014). Enfin, la forme respiratoire de la SLA est la forme clinique la plus rare mais aussi la plus agressive. Elle concerne 5% des patients et touche plus souvent les hommes. Cette forme entraîne généralement des orthopnées (difficulté respiratoire en position couchée) et des dyspnées (difficulté de la respiration) (Chio et al., 2011).

Quelle que soit la forme de la SLA, cette maladie évolue toujours fatalement vers une paralysie générale des muscles volontaires et finalement, une paralysie des muscles respiratoires entraînant la mort des patients.

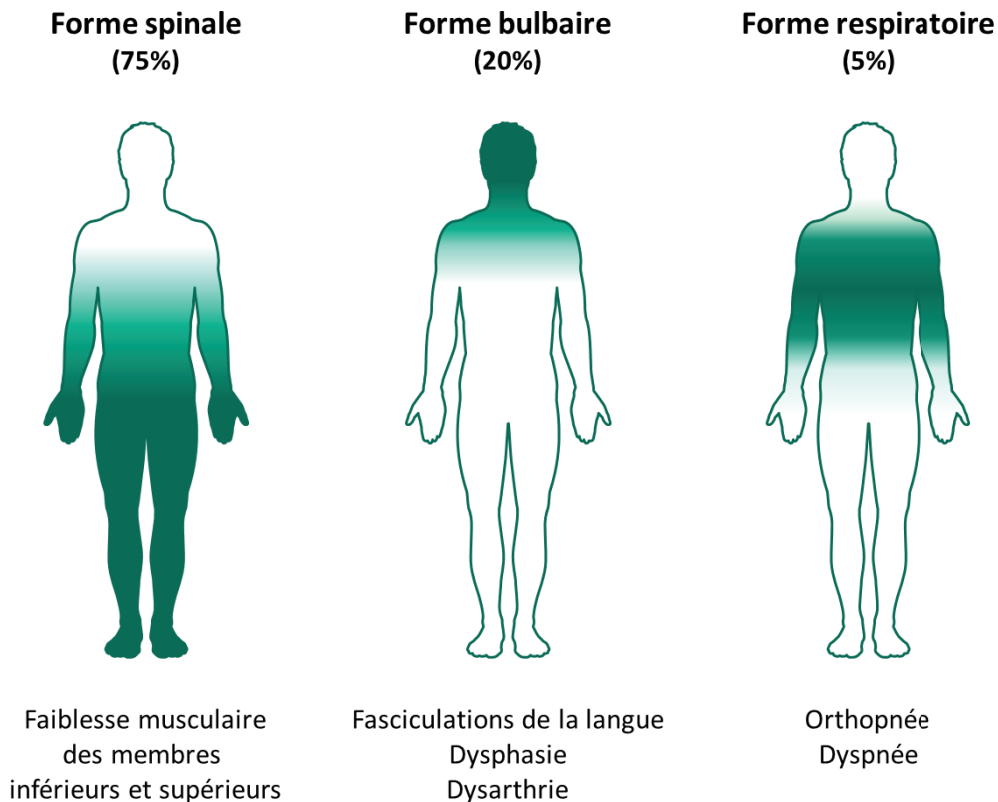


Figure 3 : Les différents sites d'apparition de la SLA.

On parle de forme spinale quand la SLA se déclenche dans les membres supérieurs et inférieurs. C'est la forme de SLA la plus courante. La forme bulbaire, moins fréquente, se caractérise par une apparition de la maladie au niveau des muscles faciaux, du pharynx, du larynx et de la langue. Plus sévère et plus rare, la forme respiratoire impacte les muscles thoraciques/respiratoires.

Il est important de noter que le site d'apparition des premiers symptômes peut également être dépendant de la mutation retrouvée chez les patients ([figure 4](#)) (Millecamps et al., 2012). En effet, une étude française menée sur des patients FALS montre que les mutations *SOD1* engendrent plus souvent des atteintes des membres inférieurs, tandis que les mutations *TARDBP* débutent plus généralement par une atteinte des membres supérieurs. Les mutations *FUS* sont également plus souvent associées à des formes spinales, tandis que les mutations *C9ORF72* plutôt à des formes de SLA bulbaires.

Enfin, en plus de ces formes de SLA, certains patients développent des troubles comportementaux. En effet, 15 à 20% des patients atteints de SLA développent une démence fronto-temporale (DFT), et à l'inverse, 15% des patients atteints de DFT développent une SLA (Ling et al., 2013; Nguyen et al., 2018). Le développement d'une DFT chez les patients SLA peut être associé à la mutation retrouvée ([figure 4](#)). Alors qu'aucune mutation *SOD1* n'a été jusqu'ici reportée chez les patients SLA-DFT, certains

patients porteurs de mutations *C9ORF72*, *FUS* ou *TARDBP* par exemple, sont plus sujets à développer des DFT (Ji et al., 2017; Millecamps et al., 2012; Nguyen et al., 2018; Turner et al., 2017).

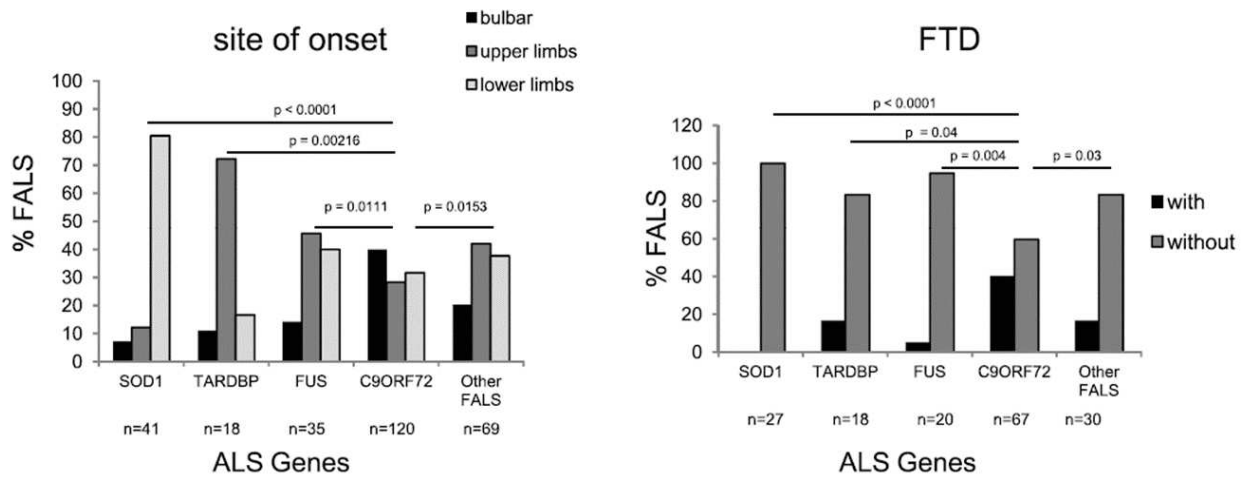


Figure 4 : Comparaison clinique entre le début d'apparition de la SLA, les mutations familiales et le risque de développer une DFT.

Les patients atteints de mutations *SOD1* développent généralement la maladie au niveau des membres inférieurs, tandis que l'on retrouve plus de formes bulbaires de la maladie chez les patients porteurs de mutation *C9ORF72*. Enfin, le risque de développer une démence fronto-temporale (DFT) est plus accru chez les patients porteurs de mutations *C9ORF72*, *TARDBP* et *FUS*. Cette étude a été menée sur une population de patients français (figure adaptée de Millecamps et al., 2012).

2.3. La composante métabolique

Les 20 dernières années ont permis de montrer que la SLA n'est pas seulement une maladie du MN. Les patients SLA présentent aussi des défauts dans la balance énergétique (Dupuis et al., 2011; Pradat et al., 2010). En effet, en 2001, Desport et collaborateurs ont mis en évidence que les patients présentent un hypermétabolisme, c'est-à-dire une dépense énergétique accrue au repos (Desport et al., 2001). Les études ont révélé que cet hypermétabolisme concerne quasiment 2 patients sur 3, et qu'il est négativement corrélé à la survie (Jésus et al., 2018; Steyn et al., 2018). De plus, ce phénomène est précoce et perdure tout au long de la maladie (Bouteloup et al., 2009; Funalot et al., 2009; Peter et al., 2017). Les patients SLA sont également plus facilement sujet à développer des troubles du comportement en lien avec l'alimentation (ou des formes de démences) (Ahmed et al., 2016a, 2016b). Cet hypermétabolisme est associé à un syndrome de malnutrition qui est à l'origine de la perte de poids progressive observée chez les patients et à l'aggravation de la pathologie (Desport et al., 1999; Marin et al., 2011). L'indice de masse corporelle (IMC) est donc un indice de pronostic de la maladie. En effet, un faible IMC associé à une malnutrition corrèle négativement avec la survie (Desport et al., 1999; O'Reilly et al., 2013; Paganoni et al., 2011). Le suivi du statut nutritionnel des patients est donc fondamental et peut être sujet à des stratégies d'amélioration de l'espérance de vie.

Néanmoins, l'hypermétabolisme n'est pas la seule altération métabolique retrouvée chez les patients. On note que 50% des patients présentent une hyperlipidémie qui corrèle avec l'augmentation de l'espérance de vie. En effet, des études ont montré que les patients avec des ratios « low density protein/high density protein » (LDL/HDL) et une concentration en triglycérides circulants élevés vivent plus longtemps (Dorst et al., 2011; Dupuis et al., 2008). D'autres données montrent que le métabolisme lipidique des patients est privilégié au profit du métabolisme glucidique. En effet, un grand nombre de patients SLA présentent une altération de l'assimilation du glucose circulant, c'est-à-dire qu'ils possèdent un taux de glucose élevé (mais suffisamment inférieur aux critères retenus pour le diabète) dû à un trouble de régulation de la glycémie. Ces patients sont donc insulino-résistants, et l'intolérance au glucose s'accompagne généralement de niveaux d'acides gras libres élevés (Pradat et al., 2010). Ainsi, l'induction du métabolisme lipidique, pourrait expliquer la survie plus importante des patients hyperlipidémiques.

3. Le diagnostic clinique

L'établissement du diagnostic de la SLA est généralement difficile à poser en raison de la vitesse de progression de la maladie, de l'hétérogénéité clinique des patients, mais aussi à cause du nombre important de maladies du motoneurone (« MND » pour « motor neuron disease ») possédant des caractéristiques similaires (notamment les amyotrophies spinales et bulbaires de l'adulte ou encore la sclérose latérale primitive). Le diagnostic différentiel peut demander du temps, généralement plus d'un an, car il est basé sur l'évolution clinique de la pathologie. Outre le facteur génétique qui aide au diagnostic de la maladie, seul un nombre limité de techniques permet d'orienter le diagnostic de la SLA. On trouve parmi ces méthodes : l'électrophysiologie, la neuroimagerie (IRM, TEP), les biopsies musculaires et l'étude des biomarqueurs (Dorst et al., 2018; van Es et al., 2017; Mitchell and Borasio, 2007).

3.1. Les critères de diagnostic

Le diagnostic formel de la SLA nécessite que les patients présentent des symptômes de faiblesses musculaires progressives impliquant simultanément les NMC et les MN dans plusieurs régions du corps (bulbaire, cervicale, thoracique, lombaire). Le diagnostic différentiel de la SLA (par rapport aux autres MND) est réalisé selon les critères de diagnostic d'« El Escorial ». Ces critères ont été établis par Brooks et collaborateurs en 1994, et déterminent les atteintes motrices des patients et l'avancée de la pathologie (Brooks, 1994). Même si les critères d'El Escorial ont récemment été révisés (Ludolph et al., 2015), ils consistent toujours en l'identification d'une SLA selon 4 catégories de certitude de diagnostic : SLA possible, SLA probable avec confirmation en laboratoire, SLA probable ou SLA établie

(van Es et al., 2017). Lorsqu'une seule région présente des signes d'atteinte des NMC et des MN, ou si deux régions montrent des atteintes des NMC, la SLA est « possible ». Une SLA est dite « probable avec confirmation en laboratoire » si le patient présente des signes d'atteinte des NMC avec une électromyographie qui montre une atteinte des MN dans deux régions corporelles différentes. On parle de SLA « probable » quand les deux populations de neurones moteurs sont affectées dans deux régions différentes. Enfin, lorsque trois régions présentent des atteintes des NMC et MN, la SLA est « établie » (van Es et al., 2017).

3.2. Les méthodes d'évaluation

De nos jours, plus de 40 mutations ont été associées à la SLA. C'est pourquoi les patients peuvent être soumis à des tests génétiques afin de vérifier les potentielles mutations dans les gènes impliqués dans la SLA. Dans le cas des FALS, l'étude du génome est fondamentale dans le diagnostic de la maladie. Cette méthode de diagnostic reste néanmoins controversée en raison de la pénétrance de la maladie qui n'est pas toujours complète (van Es et al., 2017).

a. L'électromyographie et la biopsie musculaire

En dehors de la génétique, d'autres méthodes aident au diagnostic de la SLA. Les méthodes d'étude de l'innervation musculaire peuvent notamment informer sur les dysfonctionnements des MNs. Parmi ces méthodes, il y a l'électromyographie (EMG) qui est une méthode de routine permettant de mettre en évidence les dénervations musculaires. Les résultats EMG peuvent ainsi mettre en évidence une altération de la conduction nerveuse ainsi que des fibrillations (contractions spontanées et anarchiques des fibres musculaires) et des fasciculations, qui sont la conséquence d'une dénervation musculaire (Joyce and Carter, 2013; Krarup, 2011; Vucic and Rutkove, 2018). La technique de l'EMG permet également d'estimer le nombre d'unités motrices fonctionnelles (van Es et al., 2017) bien qu'elle ne permette pas à elle seule de poser un diagnostic de SLA. D'autres méthodes d'étude de la dénervation musculaire, comme la biopsie musculaire, peuvent être réalisées en complément de l'EMG pour orienter le diagnostic de la SLA. La biopsie musculaire est généralement réalisée au niveau du muscle deltoïde des patients. Cette méthode permet de révéler, par histologie, les atrophies des fibres musculaires et les signes de dénervation (Jokela et al., 2016). Toutefois, cette technique n'est pas toujours réalisée car elle demeure invasive et douloureuse.

b. Les biomarqueurs

La biopsie musculaire peut aussi mettre en évidence de potentiels biomarqueurs de la SLA. L'augmentation de l'expression du facteur NOGO-A (neurite out growth inhibitor) dans les muscles des patients, une protéine membranaire impliquée dans l'inhibition de la régénérescence axonale, semble

pouvoir corrélérer avec la sévérité de la maladie (Dupuis et al., 2002; Pradat et al., 2007, 2012). D'autres marqueurs peuvent aussi être mesurés dans les prélèvements sanguins et le liquide céphalorachidien (LCR) des patients. Dans le LCR des patients, le biomarqueur le plus étudié pour orienter le diagnostic de SLA est le neurofilament, une protéine structurale des neurones relarguée dans le LCR lors d'une lésion axonale. Des niveaux élevés de neurofilaments peuvent ainsi être un outil d'évaluation de la progression de la maladie (van Es et al., 2017; Tortelli et al., 2012). D'autres marqueurs, comme la présence de protéines TDP-43 ou de GDNF, peuvent être également mesurés (Grundström et al., 2000; Neumann et al., 2006). Dans le sang des patients, des changements de niveau de certains marqueurs de l'inflammation (facteur de nécrose tumorale α « TNF- α », Interleukine 6 « IL-6 », etc.) et de stress oxydatif peuvent également être mis en évidence (Robelin and Gonzalez De Aguilar, 2014). Enfin, plus récemment, des études métabolomiques dont une étude lipidomique, ont montré que le LCR des patients SLA présente une signature métabolique spécifique qui pourrait permettre le diagnostic de la maladie et de prédire son évolution (Blasco et al., 2013, 2017). Il est toutefois important de noter que les études des biomarqueurs possèdent leurs limites. De nos jours, elles ne permettent pas à elles seules de diagnostiquer la SLA car d'autres maladies neurodégénératives sont associées à ces mêmes biomarqueurs. Toutefois, les biomarqueurs restent importants à mesurer puisqu'ils peuvent contribuer au diagnostic et au pronostic de la SLA.

c. La neuroimagerie

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) cérébrale ou médullaire, constitue également un outil d'aide au diagnostic de la SLA et à l'évaluation de la progression de la maladie. Cette technique non invasive permet d'étudier entre autres, les structures cérébrales comme l'épaisseur du cortex moteur, qui est diminué chez les patients SLA. A noter que dans les cas des SLA-DFT, des atrophies des lobes frontaux et temporaux peuvent être mises en évidence (voir « 2 » du chapitre B, PARTIE 1). L'utilisation occasionnelle de la Tomographie par Emission de Positons (TEP) peut également permettre d'estimer les niveaux d'atteinte métabolique des patients. Toutefois, couteuse et radioactive, cette technique ne peut être régulièrement pratiquée. Ainsi les techniques d'IRM et de TEP peuvent permettre d'aiguiller, en plus des autres méthodes, sur le diagnostic différentiel de la SLA (Agosta et al., 2010; Lloyd et al., 2000; da Rocha et al., 2004; Senda et al., 2011; Verstraete et al., 2012).

3.3. Evaluation de la progression de la maladie

Lorsque le diagnostic SLA est établi, il est fondamental d'évaluer l'avancée des symptômes et la vitesse d'évolution de la pathologie. L'état fonctionnel du patient doit donc régulièrement être évalué. L'échelle principale d'évaluation de la progression de la maladie est celle de l'ALSFRS (Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale). Cette échelle d'évaluation apprécie l'atteinte bulbaire (la

parole, la déglutition, la salivation...), l'atteinte fonctionnelle des membres (notamment la marche) ainsi que l'atteinte des fonctions ventilatoires. Elle permet d'analyser la capacité des patients à réaliser des tâches de la vie quotidienne (Cedarbaum et al., 1999). Ainsi, l'autonomie des patients peut être évaluée et permet d'adapter leur prise en charge au cours de la progression de la maladie. Cependant, cette échelle ne permet pas de mesurer l'état psychologique du patient, bien que les conditions psychosociales aient été considérées comme des acteurs dans la progression de la maladie (Johnston et al., 1999). C'est pourquoi la mise en place d'un suivi médical spécifique est également essentiel au cours de la maladie.

4. Les traitements thérapeutiques et symptomatiques

Malgré les nombreuses molécules envisagées pour traiter la SLA, aucun traitement curatif n'est actuellement disponible. Toutefois, en plus des traitements symptomatiques non médicamenteux, deux agents thérapeutiques sont disponibles. Ces molécules, qui semblent ralentir la progression de la maladie, n'ont cependant montré que des effets limités.

4.1. Les stratégies thérapeutiques actuelles

a. *Le riluzole*

Développé dans les années 90, le premier médicament proposé pour les patients SLA est le riluzole (Rilutek®). A raison de 100 mg/jour, il est le seul médicament prolongeant de quelques mois la survie des patients (Bensimon et al., 2002; Miller et al., 1996, 2012; Turner et al., 2001). Les réponses au traitement riluzole sont néanmoins très hétérogènes et ses effets sur la survie des patients restent faibles. En moyenne il augmente l'espérance de vie de 2 à 3 mois et semble avoir des effets plus marqués chez les patients atteints de formes bulbaires que ceux atteints de formes spinales (Bensimon et al., 1994; van Es et al., 2017; Miller et al., 1996, 2012; Zoccollella et al., 2007). Il semblerait que l'un des mécanismes d'action du riluzole consiste à inhiber la libération du glutamate au niveau présynaptique et à augmenter la recapture extracellulaire du glutamate. Antagoniste des récepteurs Acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA), il limiterait également la transmission glutamatergique, stabiliserait l'état inactivé des canaux sodiques voltages-dépendants (Distad et al., 2008; Dorst et al., 2018) et réduirait l'hyperexcitabilité neuronale. Toutefois, des études laissent à penser que les effets du riluzole passent par d'autres propriétés pharmacologiques puisque les traitements anti-glutamatergiques qui ont été testés chez les patients sont inefficaces. Bien qu'on suppose que le riluzole réduise l'excitotoxicité glutamatergique, le mécanisme neuroprotecteur exact de la molécule reste méconnu. Le riluzole demeure néanmoins un médicament dont le profil est sûr. En effet, seuls quelques effets secondaires mineurs tels que des maux de tête, une asthénie, de l'anxiété ou une

somnolence ont été constatés (Bensimon et al., 1994; Groeneveld et al., 2003). A ce jour en Europe, il reste le seul médicament approuvé pour le traitement de la SLA.

b. L'Edaravone

Approuvé au Japon en 2015 et aux Etats-Unis en 2017 dans le cadre du traitement de la SLA, l'Edaravone est un agent anti-oxydant dont les mécanismes d'action demeurent inconnus. Initialement l'Edaravone (Radicava®) est un médicament utilisé pour le traitement des ischémies cérébrales. Un essai clinique dans la SLA a montré que l'Edaravone limite le déclin fonctionnel (Abe et al., 2017b; Rothstein, 2017). Cependant, cette étude a été menée uniquement sur une sous-population japonaise qui présentait des caractéristiques SLA moindre. En effet, les patients présentaient une atteinte légère de la fonction motrice et de la déglutition, ainsi que des fonctions respiratoires normales. Aucune étude ne traite de ses effets sur des patients avec de plus fortes atteintes (Al-Chalabi et al., 2017). De plus, l'efficacité de l'Edaravone a récemment été remise en question à la suite d'un essai clinique où les patients ont répondu négativement au traitement (Turnbull, 2018). Il n'est actuellement pas autorisé en Europe en raison des lourds inconvénients liés à son administration qui consiste en des perfusions intraveineuses presque quotidiennes réparties sur 24 semaines (60mg par injection intraveineuse) (Abe et al., 2017b; Dorst et al., 2018).

c. La thérapie antisens

Depuis quelques années, bien qu'invasive et pas encore approuvée, une autre forme de thérapie est envisagée. Cette thérapie est basée sur l'injection d'oligonucléotides antisens (ASO) aux patients dotés de mutations SOD1. Les ASO injectés peuvent ainsi lier directement les ARN messagers (ARNm) du mutant SOD1 dans le noyau et/ou le cytoplasme pour les inactiver ou les modifier, et engendrer une diminution de l'expression de la protéine mutée (Bennett et al., 2019; DeVos and Miller, 2013; Dorst et al., 2018). A ce jour, une seule étude clinique d'injection intrathécale d'ASO a été menée sur des patients atteints de SLA familiale SOD1 (Miller et al., 2013). Les premières données de l'étude montrent que les ASO sont plutôt bien tolérés et suggèrent qu'une injection d'ASO dans le système nerveux central (SNC) pourrait être une stratégie thérapeutique envisageable et prometteuse pour les maladies neurodégénératives.

4.2. Les traitements non médicamenteux

Pour pallier les déficits moteurs des patients, de nombreuses stratégies peuvent être mises en place. Ces stratégies ont pour but de préserver et de renforcer la fonction motrice afin de limiter la perte musculaire, améliorer les conditions de vie des patients voire allonger leur espérance de vie. Des

traitements symptomatiques (contre les crampes musculaires, l'anxiété, les douleurs...) sont également mis en place pour essayer d'améliorer le confort de vie des patients.

a. Les traitements nutritionnels

Comme précédemment indiqué, les patients SLA présentent un déficit métabolique qui peut entraîner une perte de poids avant même l'apparition des premiers symptômes moteurs (Peter et al., 2017). Cette perte de poids est un facteur de pronostic délétère, et des études cliniques ont montré qu'un IMC plus faible retrouvé chez les patients SLA est négativement corrélé à la survie (Desport et al., 1999; Dupuis et al., 2008; O'Reilly et al., 2013; Paganoni et al., 2011). A l'inverse, d'autres recherches cliniques ont montré que les patients possédant des ratios élevés en LDL/HDL, en triglycérides et cholestérols, présentent un avantage de survie plus élevée (Dorst et al., 2011; Dupuis et al., 2008). Ces données montrent l'importance du statut nutritionnel du patient. Ainsi des stratégies thérapeutiques basées sur des régimes alimentaires spécifiques ont été adoptées. En effet, des études ont essayé de pallier les défauts métaboliques des patients grâce à un régime alimentaire hyperlipidique ou hyperglucidique (Dorst et al., 2013; Wills et al., 2014). Très récemment, une étude a évalué l'efficacité d'un régime gras riche en calories sur des patients SLA. Bien que cette étude ne semble pas montrer d'effets sur la survie de l'ensemble de la cohorte de patients, elle semble montrer que le régime a des effets bénéfiques sur la survie d'un sous-groupe de patients dont l'évolution de la maladie est rapide (Ludolph et al., 2020).

Enfin, il est essentiel de noter que la perte progressive de la force musculaire et la difficulté à déglutir sont des facteurs favorisant la malnutrition et la sous-nutrition. Les patients ne sont alors plus capables d'avaler ni de mastiquer et des procédures de gastrostomie (telle que la nutrition entérale) doivent être mises en place (Desport et al., 1999; Greenwood, 2013). La nutrition entérale est un mode d'administration direct des aliments par l'intermédiaire d'une sonde. Cette approche nutritionnelle couplée à un régime hypercalorique enrichi en glucides semble efficace pour ralentir la progression de la maladie (Wills et al., 2014). Enfin, une étude menée sur 1 million de participants a montré qu'une consommation élevée de lipides enrichis en acides gras oméga-3 diminue le risque de développer une SLA (Fitzgerald et al., 2014).

b. La prise en charge médicale et l'exercice

Tout au long de la maladie, les patients sont pris en charge grâce à des stratégies médicales qui ont pour but de les aider à accepter la maladie et à améliorer leur condition physique. Les stratégies médicales, non basées sur les dimensions motrices, ont pour but d'améliorer la qualité de vie des patients en les encourageant à communiquer et en les aidant à participer à la vie de tous les jours.

Cette prise en charge passe donc par l'implication de psychothérapeutes, de physiothérapeutes et de kinésithérapeutes (Dorst et al., 2018). Dans la mesure du possible, il est également recommandé aux patients de pratiquer une activité physique modérée afin de soulager les douleurs et crampes musculaires. Des études menées sur le modèle murin SLA *SOD1^{G93A}* ont montré que certains types d'exercice (notamment la natation) pouvaient avoir des effets bénéfiques sur l'apparition des premiers symptômes, sur l'intégrité des fibres musculaires, sur le maintien du nombre de MN, mais aussi sur la survie des animaux (Deforges et al., 2009; Desseille et al., 2017). Même si l'exercice améliore la qualité de vie des patients, il est maintenant connu qu'une activité musculaire trop intense aurait des effets néfastes sur les MN qui, trop stimulés par l'exercice dégénéraient, provoquant une progression plus rapide de la maladie (Dorst et al., 2018; Mahoney et al., 2004).

c. Les supports respiratoires

Au cours de la maladie, les patients développent des insuffisances respiratoires dues à une défaillance progressive du diaphragme et des muscles respiratoires. Il est alors indispensable de recourir à la ventilation assistée dès l'apparition des premiers symptômes de difficultés respiratoires. La ventilation assistée est non-invasive et permet un soutien respiratoire des voies supérieures grâce à un masque nasal ou intégral (Dorst et al., 2018). Des études cliniques montrent que ce type de ventilation peut améliorer la qualité de vie des patients et ainsi allonger leur survie de plusieurs mois (Berlowitz et al., 2016; Bourke et al., 2006). A un stade très avancé de la maladie, les patients présentent une paralysie quasiment complète et il est possible qu'ils nécessitent d'une ventilation plus invasive. Cette ventilation consiste en une trachéotomie capable de soutenir les voies respiratoires inférieures. Cette méthode peut également améliorer de quelques mois la survie des patients (Spataro et al., 2012).

B. La Démence Fronto-Temporale (DFT)

La Démence Fronto-Temporale (DFT) est une maladie neurodégénérative provoquant une atrophie progressive, souvent asymétrique, des lobes frontaux et temporaux du cortex cérébral. Troisième cause de démence après la maladie d'Alzheimer et la démence à corps de Lewy, elle se manifeste généralement entre 50 et 60 ans et provoque des troubles du comportement, du langage et des mouvements (Finger, 2016). Comme la SLA, il n'existe aucun traitement curatif de la DFT et les traitements symptomatiques, capitaux pour les patients et leurs proches, sont limités.

1. Épidémiologie

La Démence fronto-temporale (DFT) se traduit par la dégénérescence progressive des lobes frontaux et temporaux du cortex cérébral causant une démence chez l'adulte. C'est une maladie dite « pré-

sénile » étant donné qu'elle se déclare généralement chez les individus de moins de 65 ans. La prévalence de la DFT est assez hétérogène selon les zones géographiques et peu d'études répertorient la répartition géographique de la maladie. Toutefois, elle est estimée entre 15 et 22 personnes pour 100 000 habitants, avec 10% des patients qui développent la maladie avant 35 ans et 30 % après 65 ans. Elle semble également toucher de manière égale les hommes et les femmes et on dénombre chaque année 2 à 4 nouveaux cas pour 100 000 individus. En raison du faible nombre d'étude, ces estimations restent très discutées (Coyle-Gilchrist et al., 2016; Hogan et al., 2016; Mercy et al., 2008; Onyike and Diehl-Schmid, 2013; Ratnavalli et al., 2002) (Finger, 2016).

1.1. Les facteurs de risque

Les facteurs de risque de la DFT connus à ce jour sont essentiellement liés à la génétique car peu d'études ont été menées sur l'implication des facteurs exogènes (environnement, tabac, traumatismes, etc.), et ces études ne semblent pas toutes d'accord avec les hypothèses suggérées (Golimstok et al., 2014; Kalkonde et al., 2012; Onyike and Diehl-Schmid, 2013; Rosso, 2003). Néanmoins, la composante héréditaire de la DFT a été démontrée comme plus importante que celle de la SLA : 30% des DFT sont d'origine familiale contre 70% d'origine sporadique (Ling et al., 2013; Turner et al., 2017). La majorité des mutations sont retrouvées au niveau des gènes *C9ORF72*, *Progranuline (PGRN)* et du gène codant la protéine TAU (*MAPT*). Mais d'autres gènes ont été associés à la DFT tels que les gènes *CHMP2B (Charged Multivesicular Body protein 2B)*, *UBQLN2 (Ubiquiline 2)* ou encore *VCP (Valosine-containing protein)* (Ling et al., 2013; Taylor et al., 2016). Ensemble, les mutations des gènes *C9ORF72*, *PGRN* et *MAPT* représentent plus de 80% des DFT, tandis que les mutations dans les gènes *CHMP2B* et *VCP* sont beaucoup plus rares et représentent moins de 1% des DFT (Ling et al., 2013; Onyike and Diehl-Schmid, 2013). Les cas de DFT liés aux mutations *TARDBP* sont encore plus rares (Ling et al., 2013). Elles sont le plus souvent liées à une SLA (Benajiba et al., 2009). Seules 2 familles atteintes de DFT sans symptômes moteurs et portant une mutation dans le gène *TARDBP* ont été répertoriées (Borroni et al., 2009; Kovacs et al., 2009). L'implication des mutations *FUS* dans la DFT reste toujours à éclaircir (Lagier-Tourenne et al., 2010; Mackenzie et al., 2010). En effet, comme pour les patients *TARDBP*, les études reportant les cas de DFT liées à *FUS* sont initialement des patients SLA porteurs de mutation *FUS* qui ont développé des caractéristiques liés à la DFT (Blair et al., 2010; Ticozzi et al., 2011). Jusqu'à aujourd'hui, seul un patient a développé une DFT liée à une mutation *FUS* (M254V) sans antécédant de SLA (Van Langenhove et al., 2010). Toutefois, aucune donnée d'autopsie n'a confirmé le diagnostic et des données supplémentaires sont nécessaires pour confirmer que cette mutation est une véritable cause de DFT (Cairns and Ghoshal, 2010; Mackenzie et al., 2010).

Les principaux gènes associés aux deux pathologies (SLA et DFT) seront présentés plus précisément dans le chapitre suivant qui décrit le continuum SLA-DFT (chapitre C, PARTIE 1).

2. Les caractéristiques cliniques

2.1. Les différentes variantes de DFT et leurs signes cliniques

La DFT provoque progressivement chez les patients, des changements de la personnalité associés à des troubles sociaux, émotionnels, linguistiques et alimentaires. La mémoire et la perception sont globalement conservées dans les premiers stades de la pathologie (Rascovsky et al., 2011). Les premiers signes de la maladie sont parfois difficiles à détecter et sont facilement associés à d'autres troubles psychiatriques (Pose et al., 2013). Ils débutent généralement par des changements du comportement alimentaire ou des faux-pas sociaux (maladresses sociales) qui sont, tout d'abord, interprétés comme des comportements anodins. L'accumulation de nombreux indices (liés à des changements du langage, du comportement en société et de l'alimentation) permet de définir les signes annonciateurs d'une DFT (Pose et al., 2013; Rascovsky et al., 2011). Il existe 2 formes majeures de DFT qui sont catégorisées selon les symptômes cliniques présentés par le patient (Harciarek and Cosentino, 2013; Pose et al., 2013; Rascovsky et al., 2011; Tsai and Boxer, 2016) :

- La variante comportementale de la DFT (vcDFT) qui est la forme la plus répandue,
- L'aphasie primaire progressive (APP) qui est subdivisée en 3 groupes : l'APP avec variante grammaticale, l'APP avec variante sémantique et l'APP avec variante phonologique (ou aussi appelée démence sémantique).

Le terme « Démence Lobaire Fronto-Temporale (DLFT) » est utilisé pour les patients diagnostiqués DFT, et qui ont été confirmés comme étant atteints de DFT par l'identification d'une mutation génétique ou par des démarches histopathologiques (biopsie ou analyse post-mortem) (Finger, 2016; Mackenzie et al., 2009). Les critères de diagnostic de la DFT seront développés dans la sous-partie « 3 » de ce chapitre.

a. La variante comportementale de la DFT (vcDFT)

La vcDFT concerne 60% des patients et se caractérise par une détérioration progressive du comportement (Onyike and Diehl-Schmid, 2013). Les patients développent progressivement des troubles du comportement social, des troubles de l'alimentation mais également des changements émotionnels. Ainsi les symptômes associés à la vcDFT ont été définis par le développement progressif d'une désinhibition, d'une perte d'empathie, d'agressivité et de stéréotypies comportementales (ou verbales), mais aussi de troubles du comportement alimentaire comme l'ingestion d'objets non comestibles, une hyperphagie ou surconsommation d'alcool et/ou de tabac (Rascovsky et al., 2011).

b. Les aphasies primaires progressives (APP)

Les patients qui développent des APP présentent également la plupart de ces symptômes mais comme le nom l'indique, un trouble du langage est aussi associé. Cette aphasie peut aller de la difficulté à trouver ses mots à l'incapacité totale de s'exprimer ou même de comprendre des mots et des phrases. Les patients développant la variante grammaticale de l'APP par exemple, présentent des discours saccadés, lents et éprouvent des difficultés à construire leurs phrases et des difficultés d'élocution liées à l'incapacité d'exécuter certains mouvements des muscles permettant le langage. Les patients atteints par l'APP avec variante sémantique confondent le sens de certains mots ou même les oublis et perdent en vocabulaire. Ils présentent également des troubles de la reconnaissance des objets et des lieux. Enfin, les patients avec une APP phonologique présentent une incapacité à répéter des séries de mots/lettres ou à répéter des phrases/expressions (Erkkinen et al., 2018; Gorno-Tempini et al., 2008, 2011). Cette forme de DFT est souvent associée à un variant de la maladie d'Alzheimer (Meeter et al., 2017).

c. Les DFT associées aux maladies du motoneurone (MND)

Les patients DFT sont sujets à développer plus facilement d'autres pathologies comme un syndrome extrapyramidal, engendrant une DFT associée à des symptômes parkinsoniens ou à une MND. Les DFT associées à des atteintes des MN sont caractérisées de DFT-MND. Ainsi, les patients DFT peuvent développer, à un stade précoce ou tardif de la maladie, des phénotypes cliniques qui vont du parkinsonisme à la SLA, en passant par la Paralyse Supranucléaire Progressive (PSP), le Syndrome Corticobasal (SCB) et d'autres MND. Par exemple, les patients atteints d'APP sémantique développent plus facilement une SLA ou une MND, tandis que les patients atteints d'APP grammatical développent plus facilement une PSP ou un SCB (Meeter et al., 2017).

2.2. Les altérations cérébrales

a. Les atteintes morphologiques

La DFT se caractérise par une atrophie progressive des lobes frontaux et/ou temporaux. Toutefois cette atteinte peut s'étendre à d'autres zones cérébrales selon le type de DFT ([figure 7](#)) (Schroeter et al., 2007). En effet, dans le cas de la vcDFT, l'atteinte peut être frontale et temporale mais aussi prédominante au niveau frontal sans atteinte temporale (et *vice-versa*). En plus de l'atteinte des lobes frontaux-temporaux, le cortex cingulaire antérieur, le cortex insulaire antérieur et certaines zones sous-corticales comme le thalamus, l'amygdale et l'hippocampe sont également atrophiés (Ahmed et al., 2016b; Schroeter et al., 2007). Dans le cas de l'APP, l'hémisphère gauche est généralement plus atteint que le droit (Schroeter et al., 2007). On retrouve donc dans l'APP grammaticale une atrophie du lobe frontal gauche ainsi qu'une atrophie du cortex insulaire et du cortex prémoteur (Gorno-

Tempini et al., 2004; Warren et al., 2013). L'APP sémantique est associée à une atrophie asymétrique (plus développée à gauche qu'à droite) des lobes temporaux antérieurs, de l'amygdale et l'hippocampe antérieur (Gorno-Tempini et al., 2004, 2011; Thompson et al., 2003). Enfin, l'APP phonologique touche la jonction des lobes frontaux-pariétaux et de l'hippocampe antérieur (Erkkinen et al., 2018; Gorno-Tempini et al., 2004).

De plus, les patients atteints de vcDFT et d'APP sémantique possèdent des difficultés à identifier les saveurs et les odeurs. Cela serait dû à la dégénérescence du cortex entorhinal gauche, de l'hippocampe et du lobe temporal (Ahmed et al., 2016b). De plus, comme les patients atteints de vcDFT ou d'APP sémantique, les patients SLA présentent des changements du comportement alimentaire. Néanmoins, dans la SLA comme dans la vcDFT, on retrouve des atrophies de l'hypothalamus qui ne sont pas retrouvées dans le cas d'APP sémantique (Ahmed et al., 2016b; Vercruyse et al., 2018). Ces données démontrent que les changements du comportement alimentaire ne sont pas liés à la dégénérescence d'une seule et unique région cérébrale. Il est possible que ce soit l'atrophie commune de plusieurs régions cérébrales qui donne naissance à des symptômes communs entre les différentes formes de DFT et autres pathologies comme la SLA.

b. Les inclusions TDP-43/FUS/TAU

L'examen post mortem du cerveau des patients DLFT a permis de regrouper les formes de DFT sous différentes appellations en fonction du type d'inclusions protéiques retrouvées dans les neurones affectés ([figure 5](#)) (Holm et al., 2007; Ling et al., 2013; Mackenzie et al., 2010, 2009; Meeter et al., 2017; Onyike and Diehl-Schmid, 2013; Rascovsky et al., 2011) :

- « DLFT-TDP » : 45% des DLFT présentent des inclusions positives pour TDP-43. Les patients porteurs de mutations *TARDPB*, *PGRN*, *C9ORF72* et *VCP* présentent des inclusions intraneurales TDP-43 positives et TAU négatives.
- « DLFT-TAU » : 45% des DLFT présentent des inclusions positives pour TAU. Les patients ayant une mutation dans le gène *MAPT* présentent des inclusions TAU positives et TDP-43 négatives.
- « DLFT-FUS » : 9% des DLFT présentent des inclusions positives pour FUS. Cette appellation comprend les patients qui présentent des inclusions FUS positives (TAU et TDP-43 négatives) sans pour autant être porteurs de mutation dans le gène *FUS*.
- « DLFT-UPS ou DLFT-Unfolded protein system » : plus rare, 1% des DLFT présentent des inclusions positives pour l'ubiquitine sans immunoréactivité pour TDP-43, FUS ou TAU. C'est le cas des DLFT induites par la mutation *CHMP2B^{intron5}*.

Dans toutes ces catégories de DFT, on retrouve des inclusions positives pour l'ubiquitine. Il est aussi intéressant de noter que la protéine CHMP2B est également retrouvée dans les inclusions cytoplasmiques des cerveaux des patients atteints de la maladie de Parkinson et de la Démence à Corps de Lewy (Kurashige et al., 2013).

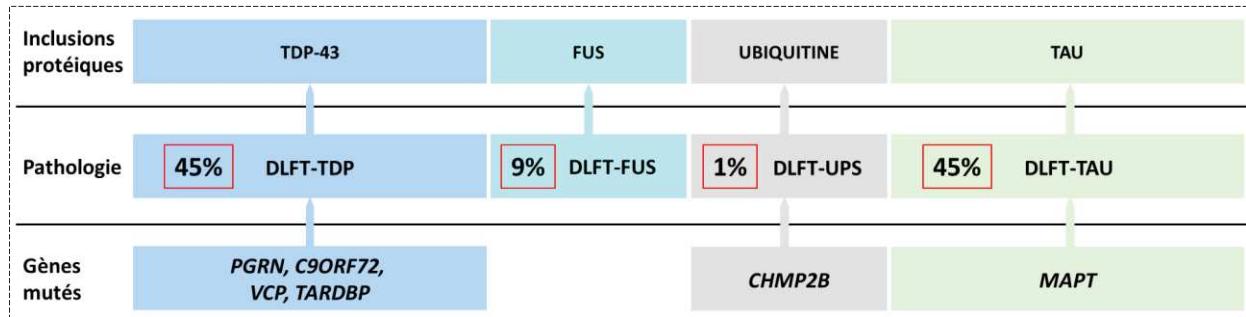


Figure 5 : Lien entre les mutations et les inclusions protéiques retrouvées dans la DFT.

Il est possible d'établir un lien entre les mutations génétiques et les inclusions protéiques dans la DFT. En effet, 45% des DLFT-TDP sont associées à des inclusions TDP-43, 9% des DLFT-FUS à des inclusions FUS, 1% des DLFT-UPS à des inclusions ubiquitines et 45% des DLFT-TAU à des inclusions TAU. Ces inclusions vont dépendre de la mutation retrouvée chez les patients. (inspirée de Ling et al., 2013; Meeter et al., 2017; Onyike and Diehl-Schmid, 2013).

c. Les modifications des neurotransmetteurs

La transmission de certains neurotransmetteurs est altérée dans la DFT et semble contribuer à la physiopathologie de la maladie. En effet, l'imagerie fonctionnelle et la TEP mettent en évidence que les patients DFT présentent une altération des voies dopaminergiques dans le striatum telle qu'une perte de neurones dopaminergiques et une diminution des niveaux de dopamine (Gil-Navarro et al., 2013; Lebert et al., 2004; Pijnenburg et al., 2003). Ces altérations provoqueraient les changements comportementaux observés chez les patients. Des études suggèrent également que les altérations de la transmission dopaminergique pourraient être à l'origine de la tendance des patients DFT à développer un syndrome extrapyramidal, lors de l'utilisation de neuroleptiques qui sont des bloqueurs des récepteurs dopaminergiques (Czarnecki et al., 2008; Pijnenburg et al., 2003). Bien que le système cholinergique soit plutôt préservé (à l'inverse de la maladie d'Alzheimer), les patients DFT présentent aussi une diminution de la quantité de récepteurs à la sérotonine au niveau des lobes frontaux-temporaux et une diminution de la transmission sérotoninergique (Lebert et al., 2004; Procter et al., 1999; Tsai and Boxer, 2016; Warren et al., 2013).

2.3. Les altérations métaboliques

Comme les patients SLA, les patients DFT présentent des changements métaboliques qui influencent le pronostic de la maladie. En 2014, Ahmed et collaborateurs ont mené une étude sur des patients atteints de vcDFT et d'APP sémantique. Ils ont mis en évidence que ce type de DFT implique une

hyperlipidémie et plus précisément une augmentation sérique des triglycérides, du ratio LDL/HDL, du cholestérol et des niveaux d'insuline. L'ensemble de ces données traduit une insulino-résistance des patients DFT (Ahmed et al., 2014, 2016b). De plus, l'hyperoréalité et les changements alimentaires font partie des critères de diagnostic des patients vcDFT et de certaines variantes comme l'APP sémantique. Ces changements du comportement alimentaire poussent les patients à consommer de grandes quantités de nourriture (avec une préférence pour les aliments sucrés), ce qui augmente leur IMC (Ahmed et al., 2016c). Néanmoins, l'IMC des patients ne semble pas avoir d'impact direct sur l'évolution de la DFT. Mais il semblerait plutôt que l'augmentation de l'appétit des patients SLA-DFT soit elle-même favorable au pronostic de survie des patients (Ahmed et al., 2016a). Toutefois, compte tenu de leur alimentation, les patients DFT devraient montrer un IMC plus élevé que celui habituellement retrouvé. En 2007, Wooley et collaborateurs suggèrent que les patients DFT montrent des changements métaboliques compensatoires, qui pourraient être similaires à ceux retrouvés chez les patients SLA (Woolley et al., 2007). Les patients DFT semblent donc, eux aussi, hypermétaboliques.

Néanmoins, les points communs cliniques et pathologiques entre la SLA et la DFT, comme les changements métaboliques, ne sont pas toujours compris. Tandis que les patients SLA perdent du poids, les patients DFT en gagnent. Mais dans les deux maladies, on retrouve un hypermétabolisme, une hyperlipidémie et une résistance à l'insuline. Il est montré que les patients SLA sans déficits cognitifs présentent un IMC beaucoup plus faible que les patients SLA-DFT ou SLA avec atteinte cognitive ([figure 6](#)). De plus, les patients SLA qui présentent une hyperlipidémie ont un meilleur pronostic de survie, les patients développant la SLA avec une DFT ont une progression de la maladie plus rapide (Ahmed et al., 2016b).

Les données internes du laboratoire ont également permis d'établir un lien étroit entre le profil transcriptomique musculaire des patients SLA et DFT. En effet, cette étude a montré que l'expression des gènes du métabolisme lipidique et mitochondrial pouvait être un indicateur de l'évolution d'une DFT en SLA. Ainsi, les patients DFT qui ne présentaient pas d'atteintes motrices au moment de la biopsie et qui ont développé plus tard une SLA, présentaient les mêmes dérégulations des gènes que les patients diagnostiqués SLA. Cette étude démontre l'existence d'une signature transcriptionnelle avant l'apparition des symptômes moteurs chez des patients DFT.

SLA	SLA-plus	SLA-DFT	DFT
-Perte de poids -Hypercholestérolémie -Insulino-résistance -Hypermétabolisme -Effets inconnus sur l'apport calorique	-Augmentation de l'IMC -Effets inconnus sur l'apport calorique	-Augmentation de l'IMC -Effets inconnus sur l'apport calorique	-Hyperphagie -Préférence au sucre -Augmentation de l'IMC -Insulino-résistance -Possible hypermétabolisme

Figure 6 : Changements métaboliques du continuum SLA-DFT.

Certaines altérations métaboliques des patients SLA et DFT peuvent être comparables comme l'hypermétabolisme et l'insulino-résistance. Toutefois, les changements du comportement alimentaire des patients DFT engendrent une hyperphagie et un IMC élevé, tandis que les patients SLA présentent un syndrome de malnutrition qui leurs font perdre du poids. Lors du continuum SLA-DFT, ces paramètres peuvent évoluer. Les patients « SLA-plus » sont considérés comme les patients SLA qui montrent des troubles cognitifs et du comportement, mais qui ne présentent pas suffisamment de symptômes pour être diagnostiqués DFT (inspirée de Ahmed et al., 2016b).

2.4. Pronostic

Le pronostic de la DFT est assez variable et va dépendre des formes de DFT. En effet, la médiane de survie est estimée à 10,5 ans pour les patients vcDFT et est de l'ordre de 12,6 ans pour les patients APP (Onyike, 2011). Les patients DFT portant des inclusions TAU dans leurs neurones semblent également survivre plus longtemps (environ 9 ans) que les patients DFT TAU-négatifs (Onyike and Diehl-Schmid, 2013). Toutefois, la médiane de survie générale des patients DLFT est comprise entre 7 et 13 ans à condition qu'ils ne développent pas de MND (comme la SLA), qui raccourci la durée de survie entre 3 et 5 ans après l'apparition des premiers symptômes moteurs (Coon et al., 2011; Onyike, 2011; Onyike and Diehl-Schmid, 2013).

3. Les diagnostics cliniques

En raison du nombre important de démences existantes, le diagnostic de la DFT peut parfois s'avérer long. Notamment au début de la pathologie où les symptômes peuvent être facilement semblables à ceux retrouvés dans la maladie d'Alzheimer ou dans d'autres troubles psychiatriques comme la schizophrénie ou la démence à corps de Lewy (Pose et al., 2013; Warren et al., 2013). Le diagnostic de la DFT passe par la réalisation d'imagerie médicale mais aussi par la détection de certains biomarqueurs.

3.1. Les critères de diagnostics

Comme la SLA, le diagnostic de la DFT est basé sur un tableau clinique spécifique : « DFT possible », « DFT probable » ou « DFT établie ». En 2011, deux équipes scientifiques ont établi des critères capables de discerner les vcDFT et les différentes APP (Gorno-Tempini et al., 2011; Rascovsky et al., 2011).

Ainsi, les vcDFT peuvent être définies comme « possibles » lorsque les patients présentent au moins 3 symptômes comportementaux ou cognitifs suivants : une désinhibition (comme des comportements sociaux inappropriés), une perte d'empathie, des comportements stéréotypés ou compulsifs (répétition de certains gestes ou développement de rituels verbaux), des changements du comportement alimentaire (suralimentation ou ingestion d'objets non comestibles), une apathie ou/et un déclin cognitif précoce telle que la perte des compétences exécutives et spatio-temporelles (troubles de la mémoire ou difficultés à réaliser certaines tâches) (Rascovsky et al., 2011). Dans le cas des APP « possibles », 3 symptômes précédents doivent être présents et au moins 3 critères suivants doivent être retenus (Gorno-Tempini et al., 2011) :

- APP grammaticale : fort agrammatisme (trouble de l'agencement syntaxique des mots), discours saccadés et lents, difficultés à s'exprimer même à l'effort, difficultés d'élocution, difficultés de compréhension des phrases complexes, faible vocabulaire,
- APP sémantique : compréhension altérée des mots, nomination altérée des objets, perte de vocabulaire, dyslexie ou dysgraphie,
- APP phonologique : incapacité de répéter des séries de mots/lettres ou de répéter des phrases/expressions, bonne articulation mais discours lents avec léger agrammatisme.

Une DFT dite « probable » (vcDFT et APP confondues) se caractérise par des patients qui répondent aux critères cités précédemment dans le diagnostic « possible », associés à un déclin cognitif très important et des altérations cérébrales diagnostiquées par imagerie (atrophies des cortex frontaux et/ou temporaux). Enfin, le diagnostic d'une DFT est établi (on parle alors de DLFT) lorsque les patients répondent aux critères associés à une DFT « possible », accompagnées de preuves génétiques et/ou histopathologiques.

Les critères cliniques d'une DFT doivent impérativement être associés à des analyses de neuroimagerie, des analyses génétiques mais aussi des analyses de biomarqueurs. C'est ce qui permet ainsi de faire le diagnostic différentiel de la DFT avec d'autres démences.

3.2. Les méthodes de diagnostics

a. La neuroimagerie

Le diagnostic de la DFT doit être confirmé par des techniques d'imagerie comme l'IRM et la TEP. L'IRM permet d'analyser les substances cérébrales grises et blanches des patients.

- L'analyse de la substance grise

Le volume de la substance grise globale ou des différentes structures peut être mesuré afin de déterminer l'avancement des atrophies cérébrales ([figure 7](#)) (Meeter et al., 2017; Warren et al., 2013). Avec l'analyse du profil du LCR des patients, l'IRM cérébrale peut permettre de différencier la DFT de la maladie d'Alzheimer. Comme le montre la figure 7, certaines mutations génétiques ont été liées à des altérations spécifiques : les patients mutés pour le gène *C9ORF72* présentent des atrophies cérébrales symétriques généralisées, tandis que les patients portant des mutations *PGRN* exposent des atrophies fronto-temporo-pariétales asymétriques. Les patients mutés pour le gène *MAPT* montrent une atrophie symétrique des lobes temporaux ([figure 7](#)).

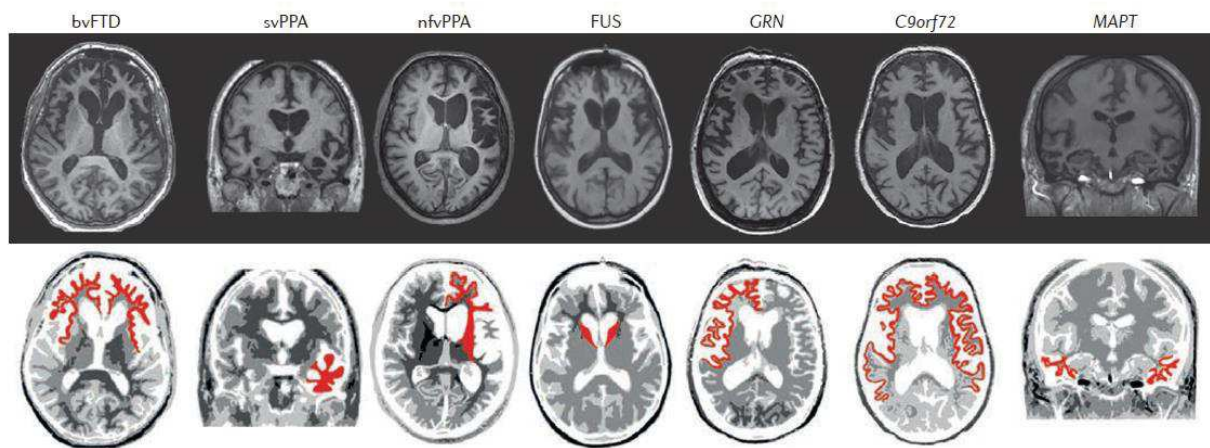


Figure 7 : Atrophie de la substance grise selon le sous-type de DFT.

Les patients atteints de DFT peuvent présenter des profils différents d'atrophies de la substance grise (en rouge). Les patients de vcDFT (ou bvFTD) présentent essentiellement des atrophies au niveau frontal et temporal. Dans le cas de l'APP sémantique (svPPA), on retrouve une atrophie des lobes temporaux plus accentuée dans l'hémisphère gauche. Les patients atteints d'APP grammaticale (nfvPPA) développent des atrophies du lobe frontal gauche et de l'insula. Les patients DLFT-FUS (muté ou non pour le gène mais présentant des inclusions FUS) ont généralement des atrophies du cortex caudé très prononcées, les patients porteurs de mutations *PGRN* (GRN) montrent des atrophies asymétriques fronto-temporo-pariétales, et les patients porteurs de mutation *C9ORF72* présentent une atrophie généralisée. Enfin, les patients mutés pour le gène *MAPT* montrent des atrophies des lobes temporaux. Souvent considérés comme une variante de la maladie d'Alzheimer, les patients APP phonologique ne sont ici pas représentés (issue de Meeter et al., 2017).

- L'analyse de la substance blanche

L'étude de la substance blanche se fait grâce à la technique d'IRM « DTI » (imagerie en tenseur de diffusion). Cette technique permet de mettre en évidence, de manière non-invasive, la distribution des molécules d'eau et ainsi d'observer l'intégrité des faisceaux de matière blanche du cerveau, et donc plus précisément la dégénérescence axonale. La technique de DTI permet de différencier les différents sous-types de DFT comme la vcDFT ou les APP en fonction des zones altérées (Meeter et al., 2017).

Pour étudier la connectivité fonctionnelle entre les différentes régions cérébrales, l'IRM fonctionnelle peut également être utilisée, bien que moins précise et variable.

- Quantification du débit sanguin tissulaire (ARL)

La technique d'IRM de quantification du débit sanguin tissulaire ARL (arterial spin labeling) permet également, sans injection de produit de contraste, de mesurer la perfusion cérébrale. Les patients DFT présentent également une hypoperfusion des régions cérébrales affectées. Cette technique est souvent corrélée à des mesures de l'activité métabolique par la technique de TEP et peut permettre un diagnostic précoce de la maladie.

- Analyse des atteintes métaboliques

La technique de TEP permet d'estimer les atteintes métaboliques cérébrales et prédire l'évolution de la maladie. Couplée à la technique d'ARL, elle permet de distinguer les sous-types de DFT et de les différencier des autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Lors de la TEP, les régions cérébrales atteintes montrent une activité métabolique réduite soit un hypométabolisme localisé, qui est une caractéristique retrouvée chez les patients DFT. Chez les patients DFT, l'hypométabolisme cérébral intervient avant l'atrophie de la substance grise. Cet hypométabolisme peut être asymétrique chez les patients APP (Meeter et al., 2017). Cette technique peut aussi être utile pour détecter un hypométabolisme dans les régions cérébrales atteintes lorsque l'IRM semble normale (Warren et al., 2013). Enfin, des traceurs amyloïdes et TAU peuvent être utilisés dans la technique de TEP pour différencier les différentes DFT à inclusions TAU, FUS ou TDP-43 (Tsai and Boxer, 2016).

b. L'analyse de potentiels biomarqueurs

Dans le cadre du diagnostic de la DFT, le LCR peut être analysé pour identifier les éventuels changements de biomarqueurs. Cette analyse est un examen complémentaire de la neuroimagerie dans le diagnostic de la DFT (Meeter et al., 2017). Comme dans la SLA, des niveaux augmentés de chaînes de neurofilaments reflètent une dégénérescence axonale. Les patients DFT présentent donc des niveaux de neurofilaments élevés mais c'est également le cas d'autres maladies neurodégénératives bien que dans des quantités moindres (Maladie d'Alzheimer, PSP, SCB, etc.). Néanmoins, même si le neurofilament n'est pas un biomarqueur précoce de la maladie et qu'il ne permet pas de différencier les différents sous-types de DFT, il permet d'estimer le stade de la maladie et de surveiller son avancement.

Dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, trois biomarqueurs différents sont dosés dans le LCR : TAU phosphorylé (TAU-P), TAU total (TAU-T) et le Bêta-amyloïde1-42 ($A\beta$ 1-42). Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, les niveaux protéiques de TAU-P, TAU-T sont plus élevés que chez les patients DFT, tout comme les niveaux de $A\beta$ 1-42 qui sont inférieurs à ceux des patients DFT. Ainsi les ratios TAU-P/ $A\beta$ 1-42 ou TAU-T/ $A\beta$ 1-42 permettent de différencier la DFT de la maladie d'Alzheimer (Meeter et al., 2017). Toutefois, tous les patients DFT ne présentent pas d'augmentation/diminution des niveaux protéiques de TAU et de $A\beta$ 1-42, tandis que d'autres patients ont des profils semblables à ceux de la maladie d'Alzheimer (les patients atteints d'APP phonologique par exemple).

c. La génétique

Comme dans la SLA, les analyses génétiques peuvent être fondamentales dans l'établissement d'un diagnostic de DFT. Mais le LCR et le sang des patients peuvent également informer sur les mutations génétiques, tout comme ces mutations vont influencer le type de protéines retrouvées dans ces fluides. Dans le cas de mutation dans le gène *PGRN*, les quantités de protéines PGRN dans le sang et le LCR sont réduites jusqu'à 40% par rapport à un individu sain. A l'inverse, la mutation *C9ORF72* entraîne une augmentation des niveaux de protéines proline-glycine (Poly(GP)) dans le sérum et dans le LCR. Néanmoins, même si ces biomarqueurs sont cruciaux pour l'analyse d'une DFT, leur quantification n'indique toutefois pas sur la progression de la maladie (Meeter et al., 2017).

4. Les traitements thérapeutiques et symptomatiques

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de la DFT ou permettant de ralentir la progression de la pathologie. Toutefois, des traitements médicamenteux limitent les symptômes en lien avec les troubles du comportement. Ces traitements s'avèrent parfois cruciaux quand le caractère impulsif des patients peut mettre leur sécurité en jeu ou celle de leurs entourages. C'est pourquoi une prise en charge spécialisée et adaptée doit absolument être mise en place.

4.1. Les traitements médicamenteux

Les traitements de la DFT agissent essentiellement sur la transmission des neurotransmetteurs. Encore aujourd'hui, l'utilisation d'inhibiteurs de l'acétylcholine estérase ou de la mémantine (un antagoniste des récepteurs NMDA utilisé dans la maladie d'Alzheimer), est controversée étant donné que leurs effets ne sont pas vraiment démontrés (Boxer et al., 2013; Lebert et al., 2004; Tsai and Boxer, 2016; Warren et al., 2013). Les neuroleptiques peuvent aussi être utilisés pour agir sur l'impulsivité des patients. Mais bien qu'ils semblent efficaces, ils génèrent parfois des effets indésirables comme l'aggravation des symptômes comportementaux, l'accélération de la maladie ou le développement d'un syndrome extrapyramidal et de symptômes parkinsoniens tels que l'antécolis (courbure excessive

de la nuque vers l'avant) (Czarnecki et al., 2008; Pijnenburg et al., 2003; Warren et al., 2013). L'utilisation d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (5-HT) (comme la trazodone, la sertraline et le citalopram) semble être la méthode la plus efficace. Elle aurait montré des effets bénéfiques sur les troubles comportementaux et psychoaffectifs des patients DFT, qui présentent une diminution de la quantité de récepteurs à la 5-HT au niveau des lobes frontaux-temporaux (Lebert et al., 2004; Procter et al., 1999; Tsai and Boxer, 2016; Warren et al., 2013). Les essais cliniques avec ces molécules semblent montrer une réduction de la désinhibition, de l'impulsivité, des troubles alimentaires, de l'anxiété et de la dépression (Herrmann et al., 2012; Lebert et al., 2004; Prodan et al., 2009). Ces traitements sont à l'origine utilisés dans le traitement des troubles psychiatriques comme la dépression.

4.2. Les traitements non médicamenteux

La DFT est une maladie qui n'affecte pas seulement le patient. Les troubles du comportement ont généralement un impact direct sur le patient et sur sa famille. Une prise en charge spécialisée des patients est alors fondamentale pour assurer un environnement calme et sécuritaire. Elle va de l'ordre de la thérapie physique (pour atténuer les troubles de la marche et l'équilibre) à l'aide à la communication (particulièrement pour les patients dont la parole est affectée). La prise en charge est donc généralement adaptée aux déficits spécifiques de chaque patient (fonctionnels, psychologiques, etc.) et passe par l'intervention de nombreux spécialistes : orthophonistes, diététiciens, physiothérapeutes, ergothérapeutes, psychologues, etc. La famille des patients peut aussi bénéficier d'un support psychologique et d'une aide à domicile (Kortte and Rogalski, 2013; Tsai and Boxer, 2016; Warren et al., 2013).

C. Le continuum SLA-DFT

De nos jours, de nombreuses données cliniques mettent en évidence que la SLA et la DFT présentent des altérations communes, notamment génétiques et histopathologiques, qui permettent d'établir un lien entre ces deux pathologies. Ainsi, il a été montré que 15-20% des patients SLA développent une DFT, tandis que 15% des patients DFT développent une SLA (Ling et al., 2013; Nguyen et al., 2018). Et même s'il n'est toujours pas entièrement compris, le continuum SLA-DFT est aujourd'hui clairement établi.

1. Les principales mutations génétiques

Les avancées technologiques actuelles ont permis d'identifier de nombreuses mutations associées à la SLA, à la DFT ou aux deux. L'identification de ces gènes impliqués dans les deux pathologies a permis

de renforcer l'idée de l'existence d'un continuum SLA-DFT ([figure 8](#)). Ces gènes aux fonctions physiologiques variées assurent le bon fonctionnement des différentes voies moléculaires dans lesquelles ils sont impliqués, leurs fonctions allant de l'homéostasie protéique à la régulation du métabolisme des ARN. Je ne présenterai ici que les gènes les plus représentés dans la SLA, la DFT et le continuum SLA-DFT.

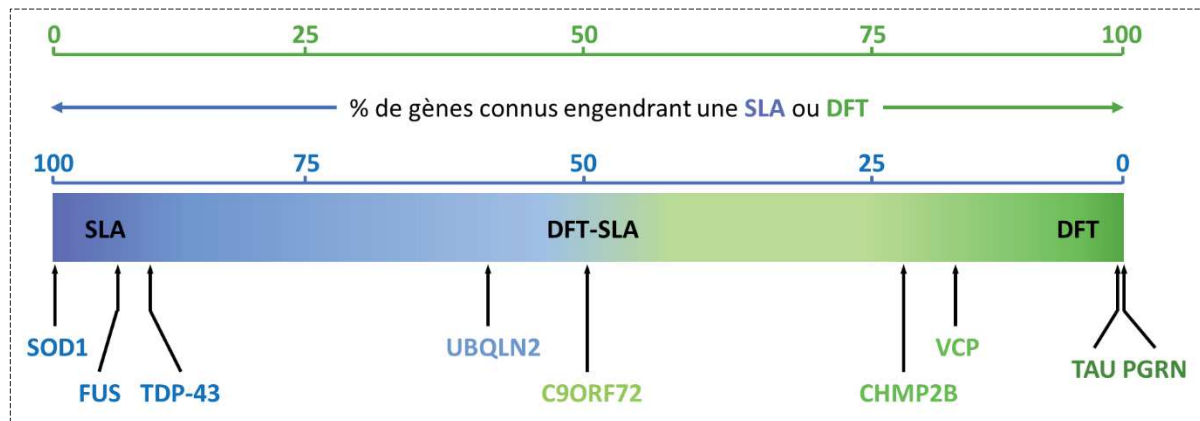


Figure 8 : Spectre génétique de la SLA et de la DFT.

Mutations génétiques les plus représentées dans la SLA (en bleu) et la DFT (en vert). La SLA et la DFT sont des maladies neurodégénératives qui partagent un même spectre génétique et clinique (inspirée de Ling et al., 2013).

1.1. *C9ORF72*, un gène majeur dans la SLA et la DFT

C9ORF72 pour « chromosome 9 open reading frame 72 » est le gène le plus répandu avec une causalité de 46% chez les FALS, 8% chez les SALS, 25% des DFT familiales et 6% des DFT sporadiques (Lattante et al., 2015; Millecamps et al., 2012). Découvert en 2011 par deux équipes américaines, il a ensuite été mis en évidence dans une grande population de patients atteints de FALS/SALS et/ou de DFT (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). La fonction exacte de ce gène, situé sur le chromosome 9, n'est pas encore complètement élucidée. Quelques études suggèrent cependant que la protéine du gène *C9ORF72* aurait un rôle dans le trafic endosomal et de l'autophagie (Farg et al., 2014; Sellier et al., 2016; Webster et al., 2016).

Chez certains patients SLA, l'expansion hexanucléotidique GGGGCC peut atteindre jusqu'à 1600 répétitions contre 1-23 chez l'individu sain (Millecamps et al., 2012). L'identification difficile de ce gène est dû au fait que les répétitions riches en GC dans les régions non codantes du génome sont difficiles à analyser avec des méthodes classiques. Les patients SLA mutés pour le gène *C9ORF72* présentent plus fréquemment des atteintes bulbaires et des troubles cognitifs (Millecamps et al., 2010, 2012). Ces patients développent aussi la maladie plus tardivement et ont une durée de survie plus courte. Fait intéressant, une étude montre que les générations futures de patients porteurs d'une expansion dans

le gène *C9ORF72* développent une SLA plus rapidement que leurs parents en raison d'une augmentation du nombre de répétitions au cours de la méiose (Chio et al., 2012).

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant la pathogénicité des mutations dans le gène *C9ORF72* (Ling et al., 2013). L'une d'elle est l'haploinsuffisance du gène *C9ORF72*. Cette théorie va dans le sens d'une perte de fonction, où la diminution de l'expression du gène *C9ORF72* est responsable de l'apparition des symptômes moteurs et de la dégénérescence des MN. Une quantité réduite des transcrits *C9ORF72* a été détectée dans les lymphoblastes et le cortex frontal des patients porteurs de l'expansion hexanucléotidique (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Gijssels et al., 2012). Une seconde théorie concerne la toxicité des ARN contenant les séquences répétées et qui séquestrent les ribosomes et/ou les facteurs de transcription. Ces ARN ont été retrouvés agrégés dans les noyaux des cellules de la moelle épinière et du cortex frontal des patients (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Une autre hypothèse est que ces ARN avec expansions favorisent la formation de dipeptides toxiques qui s'accumulent dans les cellules du cerveau et de la moelle épinière des patients (Mori et al., 2013). Enfin, il est aussi possible d'envisager que les mutations dans le gène *C9ORF72* entraînent une altération des voies autophagiques (Farg et al., 2014; Sellier et al., 2016; Webster et al., 2016).

1.2. *SOD1*, un gène spécifique de la SLA

Le gène *Superoxyde Dismutase [Cu/Zn] 1 (SOD1)* est localisé sur le chromosome 21. Il code pour l'enzyme SOD1 impliquée dans la protection de la cellule contre le stress oxydatif et les radicaux superoxydes qu'elle transforme en peroxyde d'hydrogène. C'est une protéine ubiquitaire qui se trouve principalement dans le cytosol, mais elle est aussi présente dans le noyau, les peroxysomes et l'espace intermembranaire mitochondrial des cellules humaines (Valentine et al., 2005). En 1993, l'identification de 11 mutations ponctuelles à l'état hétérozygote dans des FALS ont permis la découverte d'une des causes génétiques les plus répandues de la SLA (Rosen et al., 1993). Après *C9ORF72*, les mutations dans le gène *SOD1* constituent actuellement la deuxième cause génétique de SLA avec 3% de cas sporadiques et 12% de cas familiaux (Couratier et al., 2016; Millecamps et al., 2010; Renton et al., 2014; Rotunno and Bosco, 2013). A ce jour, *SOD1* est l'un des gènes le mieux caractérisés dans la SLA et plus de 180 mutations différentes ont été identifiées chez des patients diagnostiqués SLA (Saccon et al., 2013; ALSOD consortium : <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>). La transmission se fait généralement de manière autosomique dominante, et le type de mutation semblerait également corrélé avec la survie des patients, notamment les mutations *G37R* et *A4V* par exemple, qui semblent prédire une survie plus longue (Andersen, 2006; Cudkowicz et al., 1997). Les patients porteurs de mutations sur le gène *SOD1* présentent des inclusions protéiques SOD1 dans les neurones et les astrocytes mais ces inclusions ne sont jamais concomitantes avec les inclusions protéiques FUS et TDP-

43. La pathogénicité des mutations *SOD1* serait directement liée à l'agrégation de la protéine mal conformée et/ou à des dysfonctionnements cellulaires. En effet, de nombreuses études ont ainsi mis en évidence que les altérations de la fonction physiologique de la protéine *SOD1* provoquent des altérations mitochondriales, des altérations du transport axonal ou encore une excitotoxicité au glutamate (Bruijn et al., 2004; Rotunno and Bosco, 2013; Zhang et al., 2007). Enfin, des études *in vitro* et *in vivo* montrent que les protéines mutées *SOD1* forment des agrégats protéiques entre elles. Ces protéines *SOD1* agrégées seraient capables de se propager de cellule en cellule tout en accentuant la pathologie mais elles seraient également capables de recruter les autres protéines *SOD1* sauvages. Ces études supposent donc un comportement de type prion de la protéine mutée (Ayers et al., 2014; Chattopadhyay et al., 2008; Münch et al., 2011).

Pour conclure, les données actuelles tendent à supposer un gain de fonction toxique de la protéine *SOD1* qui n'est aujourd'hui pas encore totalement compris (Andersen, 2006).

1.3. Les gènes *FUS* et *TARDBP*, des gènes du métabolisme de l'ARN

a. *FUS* (*Fused in sarcoma*)

Les mutations dans le gène *FUS* ont été retrouvées pour la première fois en 2009 (Vance et al., 2009 ; Kwiatkowski et al., 2009). Elles sont généralement situées au niveau des résidus glycine et arginine du dernier exon du gène : l'exon 15 qui code pour le domaine de signalisation nucléaire de *FUS* (Millecamps et al., 2010). Les mutations *FUS* concernent 5% des FALS et 1% des SALS. Chez les patients SLA, les mutations dans le gène *FUS* se transmettent généralement sur le mode autosomique dominant avec parfois une pénétrance incomplète. Ces formes de SLA provoquent généralement des phénotypes précoces et sévères de la maladie avec évolution rapide (Millecamps et al., 2010). Les patients porteurs de mutations *FUS* déclarent généralement la maladie entre 15 et 40 ans. L'évolution de la maladie est rapide et le décès des patients a généralement lieu 6 mois à 2 ans après l'apparition des premiers symptômes (Baumer et al., 2010; Waibel et al., 2004).

La protéine *FUS* est particulièrement impliquée dans le métabolisme de l'ARN, en particulier dans l'initiation de la transcription et l'épissage (Millecamps et al., 2010). Chez les patients SLA porteurs de mutation *FUS*, la protéine mutée *FUS* s'accumule dans le cytoplasme des neurones. Ces inclusions cytoplasmiques sont généralement TDP-43 négatives et ne sont pas retrouvées chez les patients porteurs de mutations *SOD1*.

b. *TARDBP (Transcriptase response DNA binding protein TDP-43)*

Le gène *TARDBP* se trouve sur le chromosome 1 et est à l'origine de la protéine TDP-43. Tout comme la protéine FUS, TDP-43 est une protéine se liant à l'ARN. En effet, TDP-43 est une protéine nucléaire impliquée dans le métabolisme de l'ARN : transcription, épissage, transport et traduction. Par exemple, il est connu que TDP-43 est impliqué dans le processus d'inclusion et d'exclusion de l'exon 7 du gène *SMN2*, impliqué dans les amyotrophies spinales (Bose et al., 2008). De même, TDP-43 est impliqué dans le transport des granules à ARN contenant les ARNm codants pour les protéines du cytosquelette (Neurofilaments et β -actine) (Strong et al., 2007).

La découverte en 2008 de mutations dans le gène *TARDBP* a marqué le domaine de la génétique de la SLA. La majorité des mutations dans le gène *TARDBP* est située dans le domaine C-Terminal de la protéine, qui est un domaine riche en glycine connu pour se lier à l'ARN (Pesiridis et al., 2009). Rarement impliqué dans les cas de SLA-DFT, il représente 5% des FALS et 1% des SALS. Les mutations *TARDBP* chez les patients DFT est rare. Pourtant, gène *TARDBP* muté ou non, des inclusions cytoplasmiques TDP-43 sont retrouvées chez les patients SLA et DFT (Sreedharan et al., 2008). En effet, 45% des DLFT montrent des inclusions TDP-43 positives. Dans les cas de SLA et de DFT, la protéine TDP-43 s'accumule, sous forme hyperphosphorylée et ubiquitinée, dans le cytoplasme et les noyaux des MN mais aussi des cellules gliales (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006), à l'exception des patients porteurs d'une mutation dans le gène *SOD1* (Mackenzie et al., 2007; Tan et al., 2007). Des expériences d'inactivation et de surexpression de *TARDBP* muté, menées sur le poisson-zèbre, ont montré l'induction de phénotypes moteurs chez ces animaux. Ces recherches supposent que les mutations dans le gène *TARDBP* sont associées à la perte de certaines fonctions de la protéine (Kabashi et al., 2010).

1.4. *CHMP2B* dans la SLA-DFT

Le gène *Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B)* est localisé sur le chromosome 3 humain. La protéine CHMP2B possède 6 exons et est connue pour son interaction avec le complexe *Endosomal sorting complex required for transport III (ESCRT-III)* (Urwin et al., 2009). Le complexe ESCRT est primordial pour le processus de scission membranaire et d'endocytose (Henne et al., 2011). ESCRT-III est également impliqué dans la formation et la stabilisation des épines dendritiques via son interaction avec la protéine CHMP2B (Belly et al., 2010; Chassefeyre et al., 2015). CHMP2B est une protéine ubiquitaire qui agit essentiellement au niveau neuronal. Les mutations dans le gène *CHMP2B* représentent 1% des cas de SLA et de DFT (Ling et al., 2013; Onyike and Diehl-Schmid, 2013). A ce jour, 12 mutations dans ce gène ont été répertoriées mais elles ne semblent pas toutes causer à la fois une SLA et une DFT. Certaines d'entre elles sont plutôt connues pour causer des DFT (les mutations

CHMP2B^{Q165X} et *CHMP2B*^{S194L} par exemple) (Ghanim et al., 2010; van der Zee et al., 2008) alors que d'autres ont été associées à des SLA (mutation *CHMP2B*^{Q206H}) (Cox et al., 2010; Parkinson et al., 2006). En 2006, la mutation *CHMP2B*^{I29V} a également été retrouvée chez un patient atteint à la fois de SLA et de DFT (Parkinson et al., 2006). La première mutation dans le gène *CHMP2B* a été découverte en 2005, dans une famille danoise exprimant des troubles cliniques de vcDFT (Skibinski et al., 2005). Cette famille exprime une mutation dans l'exon 6 du gène : la mutation *M178V/L*. Cette mutation affecte l'épissage de l'ARN pré-messager et modifie la séquence peptidique en aval du site de mutation. Deux transcrits alternatifs sont alors possibles :

1. Un transcrit présentant la rétention d'une partie de l'intron 5 et qui provoque un arrêt de la traduction (l'exon 6 n'est alors plus traduit) : appelé *CHMP2B*^{intron5}
2. Un transcrit avec un épissage total de l'intron 5 mais un exon 6 tronqué : appelé *CHMP2B*^{Δ10}.

Chez ces patients, l'expression du mutant *CHMP2B*^{intron5} n'est exprimé qu'à 35% par rapport au transcrit sauvage tandis que l'expression du mutant *CHMP2B*^{Δ10} ne représente que 10% du transcrit sauvage ([figure 9](#)) (Urwin et al., 2010).

Du fait de l'implication génétique de *CHMP2B* dans les maladies neurodégénératives (comme la SLA, la DFT ou encore dans le SCB), l'idée que les mutations *CHMP2B* jouent un rôle fondamental dans la physiopathologie de ces maladies est depuis quelques années fortement envisagée.

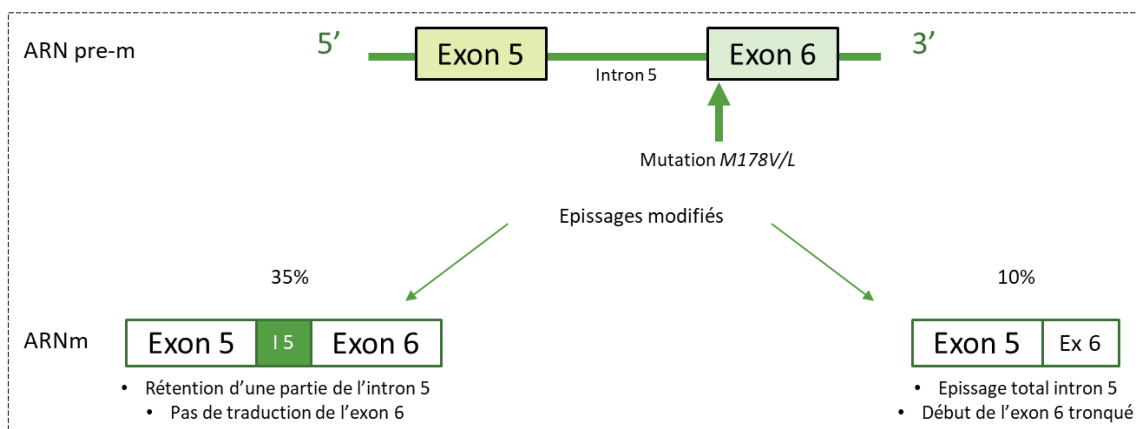


Figure 9 : Conséquence de la mutation *M178V/L* sur les transcrits *CHMP2B*.

La mutation *M178V/L*, retrouvée dans une famille danoise exprimant cliniquement une vcDFT, conduit à la formation de 2 transcrits. L'un des transcrits montre une rétention de l'intron 5 et provoque la non-traduction de l'exon 6. Le deuxième transcrit est ne présente pas de rétention de l'intron 5 mais une troncation du début de l'exon 6.

1.5. Autres gènes

Parmi les principaux gènes impliqués dans la DFT on retrouve également le gène *MAPT* (*Microtubule Associated Protein TAU*) et le gène *PGRN* (*Progranuline*). Avec *C9ORF72*, ils représentent 80% des DFT.

Le gène *MAPT* code pour la protéine TAU qui est une protéine associée aux microtubules et qui permet leur stabilité dans la cellule. Les patients porteurs de mutations dans le gène *MAPT* développent généralement une DFT associée à un syndrome parkinsonien. Ces patients portent généralement des inclusions intraneurales TAU et TDP-43 positives. A l'inverse, des patients porteurs de mutation dans le gène *PGRN* montrent des inclusions intraneurales TDP-43 et ubiquitine positives et TAU négatives. C'est l'haploinsuffisance du gène *PGRN* qui cause une DFT chez les patients mutés de manière hétérozygote. La fonction de *PGRN* est encore mal connue mais il est suggéré que la protéine joue un rôle dans le processus lysosomal (Ling et al., 2013; Meeter et al., 2017; Olszewska et al., 2016).

Ensemble, les mutations dans le gène *VCP* (Valosin-Containing Protein) et *UBQLN2* (Ubiquiline 2) représentent moins de 3% des SLA et des DFT. La protéine VCP est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires (cycle cellulaire, fonctionnement mitochondrial, le protéasome, l'autophagie, etc.). Notamment, VCP est une protéine chaperonne qui agit sur les protéines ubiquitinées et qui permet leur adressage vers le protéasome ou le processus autophagique. Les mutations dans le gène *VCP* représentent environ 1% des SLA et 1% des DFT et provoquent des inclusions TDP-43 positives. La protéine UBQLN2 permet l'adressage des protéines ubiquitinées vers le protéasome tout en régulant l'activité autophagique. Rare cas de causalité de SLA et de DFT, les mutations dans ce gène induisent des inclusions ubiquitinées positives pour l'UBQLN2, TDP-43 et FUS. Toutefois, des inclusions UBQLN2 ont également été retrouvées chez des patients SLA ne présentant pas de mutations dans le gène (Ling et al., 2013; Olszewska et al., 2016).

2. Les mécanismes physiopathologiques de la SLA et du syndrome SLA-DFT

La SLA et la DFT partagent un spectre clinique d'un point de vue anatomopathologique. En effet, on retrouve dans ces deux pathologies une astrocytose et une microgliose qui sont associées à la mort neuronale. Les MN des patients SLA et les cerveaux des patients DFT contiennent des agrégats intracytoplasmiques de protéines ubiquitinées. L'un des composants majeurs de ces inclusions est la protéine TDP-43 qui s'accumule de manière pathologique dans le cytoplasme des neurones et des cellules gliales. Avec ou sans TDP-43, d'autres protéines peuvent s'accumuler sous formes ubiquitinées dans le cytoplasme de ces cellules, comme la protéine FUS ou la protéine TAU. Associés aux agrégats neurotoxiques, d'autres mécanismes participent à la dégénérescence des neurones et des cellules gliales, notamment le dysfonctionnement des mitochondries, l'excitotoxicité au glutamate ou encore l'altération des protéines du cytosquelette et les perturbations du transport axonal. Il semblerait que plusieurs facteurs, plutôt qu'un mécanisme unique, contribuent au développement et la progression de la SLA et de la DFT (Taylor et al., 2016).

2.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif correspond à une agression des cellules par les radicaux libres « ROS » (« reactive oxygen species »), qui sont des substances toxiques pour les cellules. Tous les organismes vivants en aérobie produisent des ROS. Les ROS sont produits en permanence au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie à partir d'oxygène dans la cellule. La production de ROS n'engendre pas forcément un stress oxydatif. Toutefois, un processus de stress oxydatif se met en place lors d'un déséquilibre de la balance entre les ROS, qui sont pro-oxydants, et les molécules détoxifiantes antioxydantes. En effet, le déséquilibre dans la production des ROS et leur élimination, induit des dommages cellulaires comme l'altération de l'ADN, des protéines ou des lipides. L'intégrité cellulaire est alors mise en jeu, et de nombreuses molécules interviennent pour rétablir cet équilibre et neutraliser les ROS, notamment certaines enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), ou encore les vitamines comme la vitamine E et la vitamine C (Li and Trush, 2016).

L'identification de mutations dans le gène *SOD1* a permis à la communauté scientifique d'émettre des hypothèses sur les mécanismes pathologiques de la SLA. L'idée d'une perte de fonction enzymatique (aujourd'hui reconsidérée) a dans un premier temps été suggérée, après la découverte d'une baisse de l'activité enzymatique dans les érythrocytes des patients SLA (Deng et al., 1993). Toutefois, la perte totale de l'enzyme *SOD1* n'engendre pas de phénotypes moteurs et l'idée d'un gain de fonction toxique est aujourd'hui beaucoup plus envisagée (Reaume et al., 1996). Chez les souris *SOD1^{G93A}* et *SOD1^{G37R}*, l'accumulation de protéines *SOD1* mutées et mal repliées dans les mitochondries conduit à une réduction de l'activité de la chaîne respiratoire (Jung et al., 2002) mais aussi à des altérations morphologiques, telles que des mitochondries vacuolées et dilatées dans les MN de la moelle épinière et dans les cellules des muscles squelettiques. Ces mitochondriopathies n'ont cependant pas été retrouvées dans les MN des patients mais plutôt dans leurs hépatocytes (Higgins et al., 2003; Wong et al., 1995). En 2003, Dupuis et collaborateurs ont mis en évidence une altération de la chaîne respiratoire dans le muscle des souris *Sod1^{G86R}* (Dupuis et al., 2003). Mais la présence de cette protéine mutée engendre d'autres phénomènes, notamment une perturbation du transport axonal des mitochondries le long des microtubules, la libération de ROS mais aussi des perturbations de l'homéostasie protéique, du métabolisme énergétique et une dérégulation du processus apoptotique (Magrané and Manfredi, 2009; Morotz et al., 2012; Pasinelli et al., 2000, 2004; Sasaki and Iwata, 2007).

Les hypothèses concernant le stress cellulaire sont nombreuses, notamment celles autour de la mitochondrie et du stress du réticulum endoplasmique (RE). En effet, le RE joue un rôle fondamental dans l'homéostasie protéique puisqu'il intervient dans la synthèse, le repliement, les modifications post-traductionnelles et l'adressage des protéines. Le système d'élimination des protéines mutées

(UPR pour Unfolded Protein Response) et l'autophagie jouent un rôle central dans la dégradation des protéines mal repliées pour empêcher leur agrégation (Bravo et al., 2013; Chakrabarti et al., 2011; Hetz et al., 2015). Les agrégats protéiques dans la SLA et la DFT font aujourd'hui entièrement partie de la physiopathologie de ces maladies. En effet, d'un point de vue histopathologique, la SLA et la DFT partagent également un même spectre : la présence d'inclusions cytoplasmiques neuronales ubiquitinées positives pour TDP-43 est retrouvée dans les deux maladies (à l'exception des patients SLA mutés pour le gène *SOD1*). Les protéines mutantes comme *SOD1*, TDP-43, *FUS* et *TAU* s'agrègent dans le cytoplasme, le noyau ou la matrice extracellulaire, entraînant des dommages cellulaires et un dysfonctionnement neuronal (van Es et al., 2017). Lors de l'examen post-mortem, ces inclusions sont retrouvées dans la moelle épinière des patients SLA et dans le cerveau des patients DFT. Caractéristiques de ces pathologies, elles permettent de confirmer le diagnostic des patients. P62 et l'ubiquitine sont aussi deux protéines retrouvées dans les inclusions des patients SLA et DFT. Ces protéines sont recrutées dans la voie de dégradation du protéasome et dans l'autophagie, ce qui suggère leur implication dans les mécanismes de la neurodégénérescence de ces maladies.

En effet, la formation des inclusions intracellulaires dans la SLA et la DFT laissent penser à une éventuelle altération des voies UPR et autophagiques (Cipolat Mis et al., 2016). L'agrégation des protéines mutées provoqueraient un stress cellulaire, le processus UPR ne serait plus efficace engendrant l'activation du processus apoptotique. L'analyse du LCR et des tissus des patients SLA et des souris *SOD1^{G93A}*, a mis en évidence la présence de marqueurs liés à l'apoptose et à la réponse UPR (Atkin et al., 2008; Ito et al., 2009). D'autres études allant dans ce sens ont montré que l'altération de l'autophagie entraîne l'accumulation des protéines mutées dans les MN et leur dégénérescence (Li et al., 2008). Fait intéressant, stimuler l'autophagie semble améliorer la clairance des agrégats TDP-43 et augmenter la survie des neurones *in vitro* (Barmada et al., 2014), tout comme limiter le stress du RE retarde l'apparition des symptômes moteurs et augmente la survie des animaux *SOD1^{G93A}* (Saxena et al., 2009). Des résultats similaires ont été mis en évidence dans le cerveau de souris DFT mutées pour le gène *MAPT*, où une augmentation de marqueurs UPR a été soulignée. Cibler l'un de marqueurs UPR : le marqueur PERK (PKR-like ER protein kinase), permet de limiter la neurodégénérescence (Radford et al., 2015).

2.2. Implication de la neuroinflammation dans la mort des motoneurones

De plus en plus d'études suggèrent que la neuroinflammation joue un rôle crucial dans la pathogénèse de la SLA et de la DFT. Dans le SNC et plus particulièrement dans le cerveau et la moelle épinière, la neuroinflammation se caractérise par l'activation des cellules gliales résidentes (microglie et

astrocytes). Ces cellules sont activées en réponses à des signaux comme une lésion cérébrale/spinale, une infection ou encore une dégénérescence.

La microglie est la première ligne de défense immunitaire du SNC mais aussi l'une des principales médiatrices de la neuroinflammation. Elle permet la surveillance d'un environnement stable et répond aux signaux de « danger » envoyés par les MN et les astrocytes (Liu and Wang, 2017). Lorsque les cellules neuronales sont endommagées, la microglie s'active et de nombreux médiateurs cytotoxiques et inflammatoires (cytokines, ROS, *etc.*) sont libérés. Ces facteurs affectent alors d'autres neurones et astrocytes environnants (Boillee et al., 2006; Souza et al., 2016). De nos jours, malgré de nombreux travaux sur le domaine, nous ne connaissons toujours pas le mécanisme exact de déclenchement de cette neuroinflammation (figure 10).

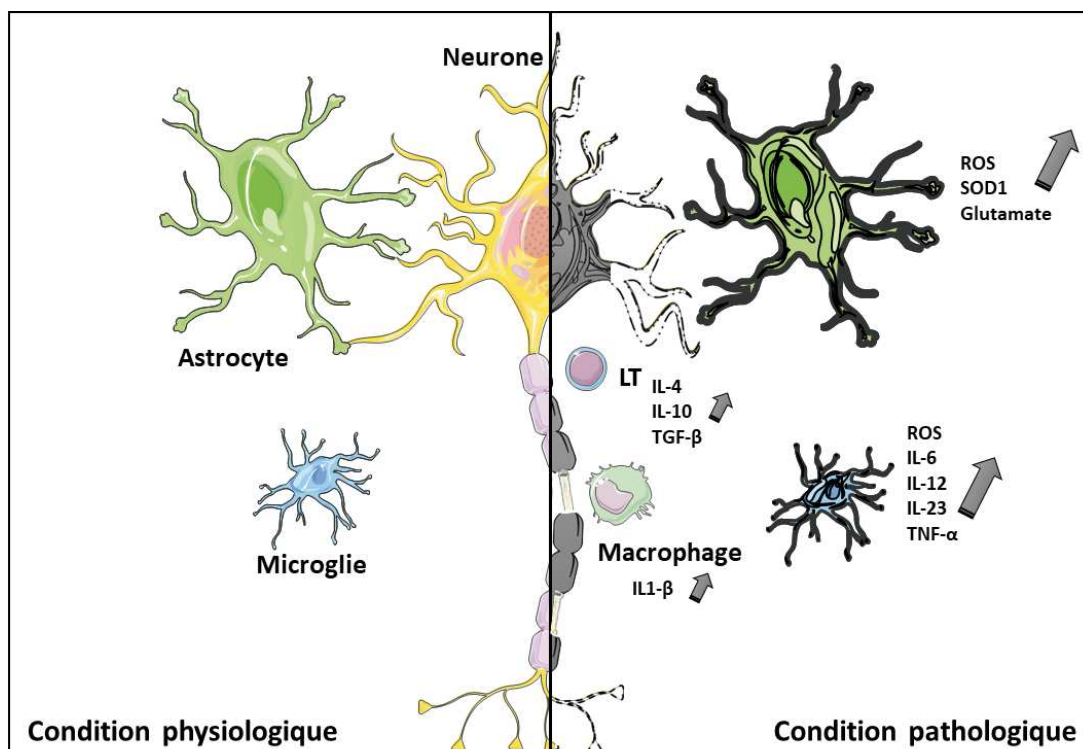


Figure 10 : Profil moléculaire de la glie dans la SLA.

Dans la SLA, les cellules gliales hyperactivées sécrètent de nombreux facteurs de l'inflammation comme des cytokines et des ROS. Dans ces conditions, les cellules de l'immunité systémique, comme les lymphocytes T (LT) et les macrophages, s'infiltrent dans le SNC (inspirée de Souza et al., 2016).

a. La neuroinflammation chez les patients

Les causes exactes déclenchant la neuroinflammation dans la SLA et la DFT ne sont aujourd'hui toujours pas élucidées. Les données actuelles permettent tout de même de savoir qu'à un stade avancé de la maladie, le LCR des patients FTD comme celui des patients SLA, montrent aussi des niveaux accrus de cytokines pro et anti-inflammatoires ainsi que de ROS (Chang et al., 2008; Simpson et al., 2004a;

Sjogren, 2004). Les cytokines peuvent aussi être sécrétées par les cellules immunitaires systémiques qui s'activent et se mobilisent vers les tissus endommagés afin de restaurer l'homéostasie. Les lymphocytes T, par exemple, sont connus pour s'infiltrer dans le SNC et contrôler la réponse microgliale (Liu and Wang, 2017). L'analyse des échantillons de LCR et de moelle épinière post-mortem des patients SLA a révélé une augmentation de l'activation microgliale et une perméabilisation des lymphocytes T. Toutefois, l'analyse des tissus des patients ne permet pas de comprendre tous les phénomènes de la neuroinflammation. En effet, l'examen post-mortem a généralement lieu à un stade final de la maladie, moment où la neuroinflammation est à son comble (Liu and Wang, 2017; McCauley and Baloh, 2019). Il n'est donc pas possible de déterminer à ce stade si la neuroinflammation est une conséquence de la mort des neurones ou au contraire, si elle engendre le processus de dégénérescence de ces cellules.

Des études d'imagerie, comme la TEP, sur des cerveaux de patients SLA vivants montrent la présence d'une activation microgliale généralisée avec une corrélation significative entre l'intensité de l'activation microgliale dans le cortex moteur et la gravité des symptômes cliniques en lien avec les neurones moteurs corticaux. Toutefois, l'activation gliale n'est pas restreinte aux aires motrices (on note l'hyperactivation de l'hypothalamus et du cortex frontal par exemple) et même si elle s'aggrave avec la maladie, elle ne semble pas être un indicateur de l'évolution de la pathologie (Alshikho et al., 2018; Corcia et al., 2012; Turner et al., 2004). Des études similaires montrent qu'il en est de même dans la DFT où l'activation des cellules gliales est observée dans plusieurs régions cérébrales affectées comme les régions corticales frontales et temporales, sous-corticales ainsi qu'au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe (Cagnin et al., 2004). Cette activation gliale corrèle avec le niveau d'atrophie (Kersaitis et al., 2004; Schofield, 2003). Si l'activation gliale est marquée chez les patients DFT, d'autres études montrent également qu'en parallèle, les astrocytes de ces zones cérébrales dégèrent en raison de l'activation de certains facteurs de l'apoptose notamment la caspase-3 (Martin et al., 2001; Su et al., 2000).

Ces données démontrent l'importance de l'activation des cellules gliales dans la physiopathologie de la SLA et la DFT. Toutefois, il est important de noter que chez les patients, l'efficacité des approches thérapeutiques employées pour réduire la neuroinflammation n'a jusqu'à aujourd'hui jamais été démontrée (Liu and Wang, 2017).

b. La neuroinflammation dans les modèles murins SOD1

De manière surprenante, il a été montré chez les patients DFT, que l'activation gliale est retrouvée à un stade précoce de la maladie (Schofield, 2003). Si ce phénomène n'a pas encore été démontré chez

les patients SLA, les études suggèrent que dans un premier temps, la neuroinflammation est une réaction protectrice du SNC, qui à long terme, devient un facteur aggravant de l'évolution de la maladie. Il est montré que pendant le stade précoce de la SLA, la microglie murine présente des marqueurs favorisant la réparation et la régénéscence des tissus (Appel, 2011). Elle jouerait donc au début un rôle neuroprotecteur en atténuant la pathologie. Mais au fur et à mesure que la maladie progresse, les MN qui dégènèrent, libèrent des signaux qui activent les cellules microgliales, qui elles-mêmes libèrent des cytokines pro-inflammatoires et des ROS. Ces facteurs pourraient donc être à l'origine de la dégénéscence des MN aux alentours, car ils créent un environnement toxique pour ces cellules. Des études *in vitro* montrent que la microglie issue de souris *SOD1^{G93A}* pré-symptomatiques protège les MN de souris non-transgéniques (nTg) et les maintient vivants (Liao et al., 2012). A l'inverse, lorsque la microglie provient de souris en stade terminal, elle devient toxique pour les MN non-transgéniques (nTg). Fait intéressant, l'ajout d'astrocytes nTg en présence de microglie issue de souris *SOD1^{G93A}*, n'améliore la survie des MN qu'au stade précoce de la maladie. Chez les souris *SOD1^{G93A}*, une activation microgliale dans la moelle épinière et le cerveau est présente dès un stade précoce de la maladie (Alexianu et al., 2001; Hall et al., 1998; Kriz et al., 2002). Cette activation microgliale engendre la production de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α et des ROS. Cette réaction est protectrice dans un premier temps puis devient toxique au cours de la progression de la maladie (Beers et al., 2011; Gargiulo et al., 2016; Henkel et al., 2009).

La surexpression de la protéine SOD1 mutée spécifiquement dans les MN n'est pas suffisante pour provoquer des symptômes moteurs et une SLA (Lino et al., 2002; Pramatarova et al., 2001). Ces données suggèrent donc que les MN à eux seuls ne sont pas capables d'engendrer le processus de dégénéscence et que les cellules non neuronales, comme la glie, contribuent à la perte des MN. En effet, la surexpression conditionnelle de la protéine SOD1 mutée spécifiquement dans les cellules gliales provoque chez la souris, malgré des MN sains, des phénotypes semblables à ceux de la SLA. En 2006, Boillée et collaborateurs ainsi que Beers et collaborateurs ont montré dans des modèles conditionnels de SLA, l'importance de la microglie dans l'apparition et l'évolution de la maladie. Boillée et collaborateurs, ont montré que les souris *SOD1^{G37R}* qui n'expriment pas la protéine mutante SOD1 dans la microglie et les macrophages, ont une survie plus longue (Boillee et al., 2006). Tandis que Beers et collaborateurs ont mis en évidence que le remplacement d'une microglie issue de souris *SOD1^{G93A}* par une microglie nTg, retarde la dégénéscence des MN et prolonge la survie des animaux (Beers et al., 2006).

Les astrocytes jouent également un rôle fondamental dans la mort des MN. Par des phénomènes encore inconnus, il est montré que les astrocytes exprimant la SOD1 mutée sont toxiques pour les MN.

Par exemple, une étude chez le rat montre que l'implantation d'astrocytes exprimant la protéine mutée SOD1 chez un rat nTg, induit une activation microgliale et une dégénérescence des MN de la moelle épinière (Papadeas et al., 2011). A l'inverse, supprimer l'expression de la protéine mutée SOD1 uniquement dans les astrocytes, permet de retarder l'activation microgliale et de ralentir la progression de la maladie (Wang et al., 2011; Yamanaka et al., 2008). Il en est de même dans le cas d'une transplantation d'astrocytes sains chez les rats *SOD1^{G93A}* (Lepore et al., 2008). Même si les mécanismes contribuant au dysfonctionnement des astrocytes ne sont pas compris, des hypothèses suggèrent que c'est la recapture de l'excès du glutamate par les astrocytes qui est défectueuse et qui provoque la dégénérescence des MN (Liu and Wang, 2017). En effet, à la suite de l'identification d'une augmentation des niveaux de glutamate dans le LCR des patients SLA, des études du déficit de transport du glutamate chez les patients SLA ont été menées. Ainsi, la diminution de la recapture du glutamate due à la sous-expression des transporteurs astrocytaires EEAT2 (transporteurs d'acide aminés excitateurs) a été mise en évidence (Bristol and Rothstein, 1996; Howland et al., 2002). La diminution de ce transporteur induit une augmentation de la concentration synaptique du glutamate et une surstimulation des récepteurs post-synaptiques du glutamate, contribuant à l'excitotoxicité et la dégénérescence neuronale (Lin et al., 1998; Souza et al., 2016; Sunico et al., 2011). Chez la souris *SOD1^{G93A}*, la surexpression de EEAT2 retarde la dégénérescence des MN et la progression de la maladie (Guo, 2003). Ces données mettent en évidence la contribution des astrocytes dans la mort des MN et la physiopathologie de la SLA.

c. La neuroinflammation dans les modèles murins de DFT

Le rôle de la neuroinflammation dans la DFT est également étudié chez les modèles murins et nombreux de ces modèles tels que les modèles de mutation *PRGN*, *MAPT* ou encore *CHMP2B* montrent une neuroinflammation. Par exemple, les souris *Pgrn* KO montrent une astrogliose et une microgliose accrue au niveau de l'hippocampe, du cortex et du thalamus (Ghoshal et al., 2012; Yin et al., 2010). Toutefois, Filiano et collaborateurs ont montré en 2013 que, le développement de la gliose est dépendant du nombre d'allèle *Pgrn*. En effet, les souris *Pgrn^{+/-}* développent une DFT sans gliose contrairement aux souris *Pgrn^{-/-}* pour lesquelles l'astrogliose et la microgliose sont fortement marquées avec une augmentation des facteurs pro-inflammatoires. Ces données suggèrent que l'activation gliale et les facteurs inflammatoires sont indépendants de l'atteinte comportementale (Filiano et al., 2013). Il est cependant intéressant de noter que les patients DFT porteurs de mutation *PRGN* expriment un niveau de cytokines pro-inflammatoires circulantes très élevé (Bossù et al., 2011). En 2005, une étude montre que la surexpression, spécifiquement dans les astrocytes, de la protéine TAU mutée induit une dégénérescence des MN, une destruction de la barrière hématoencéphalique (BHE) et l'accumulation de la protéine TAU hyperphosphorylée-ubiquitinée dans les astrocytes

(Forman, 2005). Cette étude concorde avec une autre expérience menée en 2007 qui montre que les souris exprimant la protéine TAU humaine mutée développent une activation microgliale hippocampique (Yoshiyama et al., 2007). Enfin, le modèle murin *CHMP2B^{intron5}* créée en 2012 par l'équipe d'Adrian Isaac, exprimant la protéine CHMP2B mutée spécifiquement dans les neurones et la glie, montre qu'en plus de l'atteinte comportementale, les souris présentent une activation de la microglie et des astrocytes au niveau cortical et thalamique (Ghazi-Noori et al., 2012).

Toutes ces données démontrent bien que l'activation des cellules gliales joue un rôle crucial dans la progression de la maladie, aussi bien dans la SLA que dans la DFT. Malgré la découverte de l'activation gliale dès les premiers stades de la maladie, il n'est aujourd'hui pas encore connu si cette activation est bénéfique ou délétère. Il se pourrait toutefois que l'activation prolongée de ces cellules soit nocive pour les MN et à l'origine de la mort neuronale.

2.3. L'altération du processus autophagique et endosomal

L'autophagie et l'endocytose sont des processus étroitement liés. L'endocytose est le mécanisme d'internalisation du matériel extracellulaire ou des protéines membranaires. Ce processus permet le recyclage du contenu des endosomes en l'apportant vers la membrane plasmique ou d'autres compartiments intracellulaires (appareil de Golgi, RE, etc.). Il permet également la dégradation de leur contenu via le processus autophagique (et plus précisément la macroautophagie), mécanisme physiologique de dégradation cellulaire. La macroautophagie est le processus d'autophagie le plus courant mais aussi le plus complexe puisqu'il fait intervenir de nombreux acteurs protéiques, notamment le système ESCRT lors du processus de dégradation des protéines membranaires. Cette forme d'autophagie passe par la formation d'autophagosomes, structures circulaires à double membrane également capable d'internaliser le matériel intracellulaire (via la formation de phagophore) pour le dégrader après fusion avec les lysosomes. Les lysosomes sont des organites cellulaires présents dans le cytosol, formés à partir de l'appareil de Golgi ou du RE, contenant des hydrolases acides capables de dégrader le contenu internalisé. Ainsi, l'autophagie joue un rôle fondamental dans la dégradation des agrégats protéiques dans les maladies neurodégénératives (Rusten and Simonsen, 2008).

a. SLA-DFT et autophagie

Chez les patients SLA et DFT, on retrouve de nombreuses inclusions protéiques dans les neurones contenant différentes protéines telles que SOD1, TDP-43, FUS, etc. Des études suggèrent que cette accumulation de protéines est la conséquence d'une altération du processus autophagique. Ces études soulignent également l'impact des anomalies génétiques en lien avec ces deux maladies dont un grand

nombre sont liées à ce processus. Par exemple, il a été montré que les patients et les souris *SOD1*^{G93A} surexprimaient certaines protéines de l'autophagie notamment les protéines Beclin-1 et LC3-II (Li et al., 2008; Nguyen et al., 2019; Wei, 2014). D'autres études montrent que les protéines TDP-43 et FUS mutantes impactent également l'autophagie en réprimant l'expression de protéines nécessaires à son induction (Ling et al., 2013; Soo et al., 2015). Les mutations dans le gène *PGRN* semblent jouer un rôle important dans l'induction des gènes de l'autophagie. Chez les patients porteurs de mutation *PGRN*, une étude lipidomique a montré que la composition cérébrale en lipides est différente de celle des patients sains. La perte de *PGRN* entraîne également une accumulation de triglycérides dans les lysosomes des fibroblastes des patients. L'analyse transcriptomique des cerveaux des souris *Pgrn* KO a révélé des profils d'expression spécifiques dans les gènes en lien avec le métabolisme lysosomal et lipidique. De plus, une délétion en *Pgrn* modifie l'abondance et la morphologie des lysosomes dans les neurones de souris (Evers et al., 2017). Toutes ces données montrent l'implication génétique de *PGRN* dans le dysfonctionnement du processus lysosomal retrouvé chez les patients. Toutefois, ces études ne permettent pas de conclure si l'altération de l'autophagie participe directement à la pathogénicité de la SLA et la DFT, ou si elle est une conséquence des mutations retrouvées dans ces maladies.

D'autre part, certaines maladies neurodégénératives sont également concernées par l'accumulation de lipides dans les lysosomes, notamment la maladie de Gaucher où le glucosylcéramide est retrouvé en très forte quantité dans les lysosomes des cellules des patients (voir « 3 » du chapitre B, PARTIE 2) (Dodge, 2017). Ces maladies sont caractérisées de « maladies à surcharge lysosomale ». La SLA n'est pas une maladie à surcharge lysosomale bien qu'une perturbation de l'homéostasie des sphingolipides soit retrouvée (Dodge, 2017; Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2017, 2018). Il se peut donc que l'altération des processus d'autophagie ou d'endocytose participe à ces phénomènes.

b. L'implication de CHMP2B dans l'autophagie

Le système ESCRT est impliqué dans la dégradation des protéines membranaires via l'autophagie. Lorsque les récepteurs membranaires sont endocytés, les complexes ESCRT agissent en synergie pour permettre l'invagination de la membrane de l'endosome et former ainsi des corps multivésiculaires (CMV ou « endosomes tardifs »). Les CMV fusionnent ensuite avec les autophagosomes, qui eux-mêmes fusionnent avec les lysosomes. Ce processus permet la dégradation du contenu des vésicules ([figure 11](#)) (Rusten and Simonsen, 2008).

Le système ESCRT est composé de 4 complexes : ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III. La protéine CHMP2B appartient au complexe ESCRT-III. Des études *in vitro* ont démontré que la déplétion cellulaire du complexe ESCRT-III ou la surexpression de la protéine mutante CHMP2B^{intron5}, inhibent le processus

autophagique, entraînant la formation et l'accumulation d'agrégats protéiques ubiquitinés et une accumulation d'autophagosomes (Filimonenko et al., 2007; Urwin et al., 2010). D'autres études montrent également que la surexpression de *CHMP2B*^{intron5} entraîne une accumulation d'endosomes tardifs (Skibinski et al., 2005) ainsi qu'un défaut de fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes, ou de fusion de l'autophagosome avec le lysosome, provoquant une dégénérescence (Lee et al., 2007; Urwin et al., 2010). L'accumulation d'endosomes tardifs a également été retrouvée dans les neurones des patients *CHMP2B*^{intron5} au niveau des cortex frontal, pariétal, occipital et temporal mais aussi au niveau de l'insula et de l'hippocampe (Urwin et al., 2010). Ces données montrent l'importance de *CHMP2B* dans le bon fonctionnement de l'autophagie.

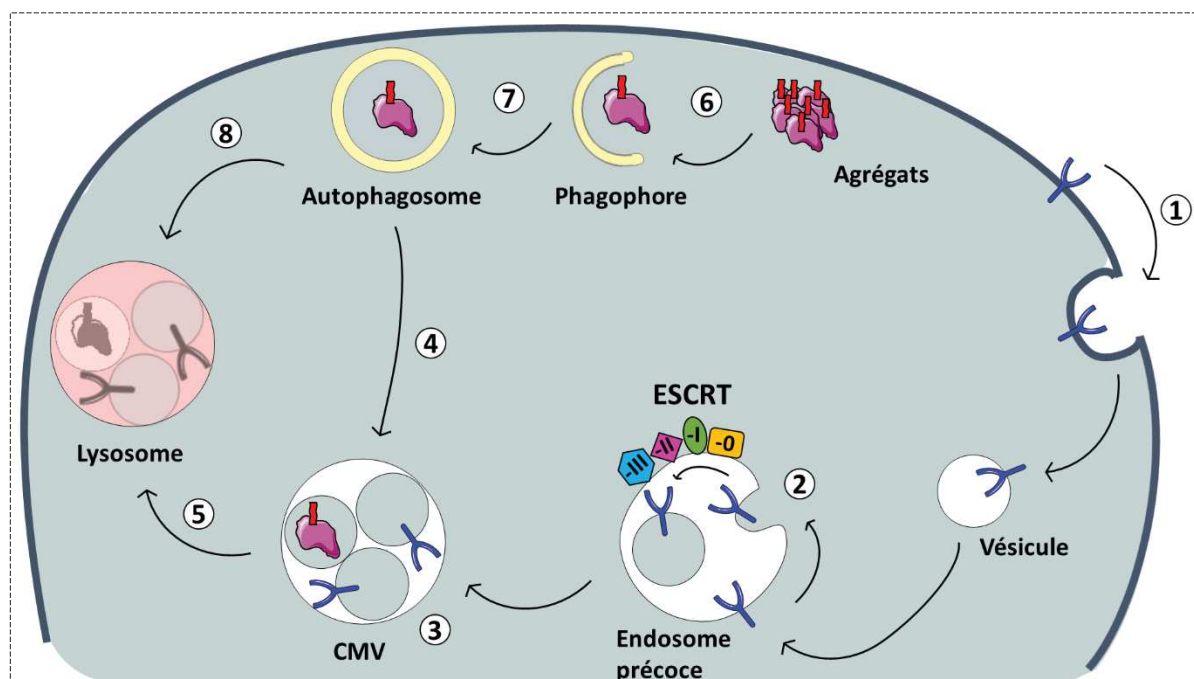


Figure 11 : Processus autophagique.

(1) Les récepteurs membranaires voués à être dégradés par le processus d'autophagie sont endocytés. (2) Les complexes ESCRT permettent l'invagination de la membrane endosomale et la formation de corps multivésiculaires (CMV) (3). Les CMV fusionnent soit directement avec les lysosomes, soit avec les autophagosomes (4) puis les lysosomes pour dégrader les récepteurs précédemment internalisés (5). En parallèle, la formation et la croissance du phagophore permet de phagocyter les protéines malconformées/agrégées ubiquitinées (étiquettes rouges) présentes dans le cytoplasme (6). Les phagophores circularisés deviennent ensuite des autophagosomes (7). Les autophagosomes fusionnent soit avec un CMV (4), soit directement avec un lysosome (8). Le contenu lysosomal est ensuite dégradé via l'action des hydrolases acides contenues dans les lysosomes (inspirée de Rusten and Simonsen, 2008).

3. Les modèles murins de SLA et de DFT

Au cours des 30 dernières années, l'avènement de la génétique et ses nombreuses avancées ont permis la création de nombreux modèles animaux transgéniques. Majoritairement murins, ils permettent une meilleure compréhension de la physiopathologie de la SLA et de la DFT. Dans cette

sous-partie, je présenterai les deux modèles murins *Sod1*^{G86R} et *CHMP2B*^{intron5} qui sont, respectivement, des modèles de SLA et de SLA-DFT.

Il est important de noter qu'il existe un grand nombre de modèles animaux utilisés pour comprendre la SLA et la DFT. Ces modèles vont de la drosophile aux rats, en passant par *C. elegans* et la souris. Ces modèles permettent ainsi d'étudier les nombreuses mutations retrouvées dans ces pathologies. Pour la SLA par exemple, il existe également de nombreux modèles représentatifs des mutations *C9ORF72*, *TARDBP*, *FUS*, etc. Toutefois, chaque modèle animal possède ses limites, et parfois, il ne reflète pas entièrement les mécanismes physiologiques de la maladie : on appelle cela des « modèles partiels » (Poindron et al., 2008). Afin qu'il soit au plus proche et représentatif de la maladie humaine, le modèle doit valider 3 conditions fondamentales qui sont :

- L'isomorphisme : similarité des symptômes humains,
- L'homologie : similitude étiologique (génétique, environnementale, etc.),
- La prédictivité : efficacité pharmacologique identique, c'est-à-dire sensibilité aux médicaments connus pour améliorer l'état clinique des humains souffrant de la maladie.

3.1. Les modèles murins *SOD1* et *CHMP2B*^{intron5} dans la SLA et la DFT

a. Les principaux modèles murins *SOD1*

De nombreux modèles *SOD1* ont été créés afin de mieux caractériser les mutations retrouvées dans ce gène à l'origine d'un grand nombre de SLA. Ces modèles représentent à l'heure actuelle, les modèles de SLA les plus utilisés dans la recherche. En 1994, Gurney et collaborateurs créent le premier modèle murin transgénique *SOD1* : le modèle *SOD1*^{G93A}. Dans ce modèle, la surexpression de la protéine humaine mutée provoque des symptômes semblables à ceux retrouvés chez les patients SLA : atteintes des fonctions motrices, perte des MN spinaux, dénervation musculaire, inclusions protéiques *SOD1* et mort de l'animal après paralysie progressive (Gurney et al., 1994). Dans ce modèle, le nombre de copies du transgène intégrées impacte la sévérité de la maladie et la durée de vie. On parle de *SOD1*^{G93A} « low copy » (<5 et progression lente de la maladie) ou « high copy » (>30 et progression rapide) (Canto and Gurney, 1997; Dal Canto and Gurney, 1995). Bien qu'il ait longtemps été suggéré que les mutations retrouvées dans le gène *SOD1* provoquaient une perte de fonction de la protéine, des études ont montré que la suppression totale du gène *Sod1* chez la souris n'entraîne pas de dégénérescence des MN ni de déficit moteur (Reaume et al., 1996). De manière étonnante, la surexpression de la protéine *SOD1* sauvage humaine ou l'élimination de la protéine *SOD1* endogène chez les souris portant la mutation humaine *SOD1*^{G85R} ne modifie pas l'évolution de la maladie (Bruijn, 1998).

Les souris porteuses de mutations *SOD1^{G93A}* et *SOD1^{G37R}* uniquement dans les neurones (grâce à des promoteurs neuronaux spécifiques), ne présentent pas ou peu de déficits moteurs (Lino et al., 2002; Pramatarova et al., 2001). Ce qui démontre que des acteurs cellulaires autres que les MN sont impliqués. La SLA n'est donc pas seulement une pathologie neuronale mais une maladie multifactorielle à l'origine pluricellulaire.

b. Le modèle *Sod1^{G86R}*

Le modèle *Sod1^{G86R}* utilisé dans notre laboratoire a vu le jour en 1995 (Ripps et al., 1995). Ripps et collaborateurs ont mis au point ce modèle qui est l'équivalent de la mutation *SOD1^{G85R}* chez l'Homme. Ces souris portent un nombre élevé de copies du gène *Sod1* murin muté introduit par recombinaison homologue, dont la protéine produite contient la substitution d'une Glycine par une Arginine en position 86. A l'inverse des autres modèles *SOD1* (*SOD1^{G93A}* et *SOD1^{G37R}*) qui surexpriment la protéine mutante humaine et ont une forte activité enzymatique *SOD1*, le modèle *Sod1^{G86R}* surexprime une protéine murine inactive d'un point de vue enzymatique. En effet, la mutation *SOD1^{G85R}* retrouvée chez l'homme et la mutation *Sod1^{G86R}* murine affectent le site catalytique de la *SOD1* et lui font perdre ses capacités antioxydantes.

D'un point de vue clinique, ce modèle possède une évolution rapide de la maladie puisqu'il est considéré comme asymptomatique aux alentours de 75 jours. Bien que les souris ne présentent aucun signe moteur visible à cet âge-là, des analyses du laboratoire suggèrent que la dénervation musculaire a déjà commencé, précédant l'atteinte des MN spinaux, et conduirait au démantèlement des jonctions neuromusculaires (JNM) bien que les fibres musculaires semblent intactes (Dupuis et al., 2000, 2002). Quelques jours avant les premiers phénotypes moteurs, les souris commencent à perdre également du poids : c'est un phénotype indicateur de la mise en place de la maladie. A 90 jours, la majorité des animaux présentent les premiers symptômes moteurs qui sont détectables par EMG : les muscles présentent un état de dénervation conséquent. A ce moment-là, les souris ne présentent pas encore de paralysie mais elles perdent rapidement en force musculaire. L'aggravation des symptômes moteurs se fait en quelques jours et entre 95 et 105 jours, les souris présentent une paralysie motrice prononcée et progressive qui conduit à leur mort vers l'âge de 110 jours. Au stade final de la maladie, l'analyse histopathologique de ces animaux montre une dégénérescence des MN de la corne ventrale de la moelle épinière, une amyotrophie, des dénervations neuromusculaires (Dupuis et al., 2004) mais également des inclusions avec des neurofilaments phosphorylés (Morrison et al., 1998). Enfin, comme les patients SLA, ce modèle présente une altération du métabolisme énergétique caractérisée par une intolérance au glucose et un hypermétabolisme (Dupuis et al., 2004; Palamiuc et al., 2015).

La plus grande partie de mes travaux de thèse a été menée sur ce modèle murin *Sod1^{G86R}*. Ce modèle présente également des altérations du métabolisme des sphingolipides qui sont de lipides complexes. Leurs rôles seront mieux définis dans la PARTIE 2. Ainsi, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence les effets bénéfiques d'une modulation des sphingolipides sur les phénotypes moteurs et la survie du modèle *Sod1^{G86R}* grâce à la molécule d'ambroxol hydrochloride (chapitre A, « publication 2 » de la partie « RESULTATS »).

c. Les modèles murins *CHMP2B^{intron5}*

La protéine codée par le gène murin *Chmp2b* compte 213 acides aminés et présente 99% d'homologie avec la protéine humaine. A la différence du gène humain qui se trouve sur le chromosome 3, le gène *Chmp2b* de la souris se trouve sur le chromosome 16. Dans la littérature, il n'existe que quelques études *in vivo* portant sur la mutation *M178V/L* (appelée aussi *CHMP2B^{intron5}*). Il existe 4 modèles animaux porteurs de cette mutation : 1 modèle transgénique de drosophile (développé en 2009 par l'équipe du Dr Fen-Biao Gao) (Ahmad et al., 2009), et 3 modèles murins décrits ci-dessous.

Le premier modèle murin *CHMP2B^{intron5}* a été généré en 2012 par Ghazi-Noori et collaborateurs dans lequel les souris transgéniques expriment la protéine humaine mutée uniquement dans les neurones et la glie (Ghazi-Noori et al., 2012). Ces souris expriment, comme les patients porteurs de mutation *CHMP2B^{intron5}*, des inclusions protéiques P62 positives et TDP-43 négatives (Holm et al., 2007; Ling et al., 2013; Onyike and Diehl-Schmid, 2013). Cette équipe a ainsi montré que les souris *CHMP2B^{intron5}* expriment des phénotypes semblables à ceux des patients (réduction de la survie, inclusions neuronales, atrophies cérébrales, dénervation musculaire et troubles de la sociabilité). Cependant, ils ont également montré que la délétion totale du gène *Chmp2b* n'engendre pas de phénotype chez les souris *Chmp2b^{-/-}*, qui vivent aussi longtemps que les souris contrôles. Il en est de même lors d'une surexpression de la protéine sauvage (Clayton et al., 2017; Ghazi-Noori et al., 2012). En 2015, Clayton et collaborateurs ont montré que leur modèle présente des altérations du processus endolysosomal (Clayton et al., 2015). Un autre modèle murin *CHMP2B^{intron5}* a également été développé en 2014 par Gascon et collaborateurs. Dans ce modèle, les souris transgéniques qui expriment la mutation uniquement au niveau des neurones du cortex frontal, développent aussi des troubles du comportement social qui seraient dû à une altération du microARN-124, un microARN abondant dans le cerveau et important dans le développement neuronal (Gascon et al., 2014).

Le dernier modèle murin *CHMP2B^{intron5}* a été créé en 2016 par notre équipe (Vernay et al., 2016). Les souris transgéniques de ce modèle surexpriment la protéine mutante humaine *CHMP2B^{intron5}*. Le transgène humain portant la mutation *M178L/V* a été intégré dans le génome murin par

recombinaison hétérologue. Pour que la protéine CHMP2B^{intron5} soit exprimée spécifiquement dans les neurones, le transgène a été placé sous le contrôle du promoteur Thy1.2 (promoteur spécifique des neurones). Les souris possèdent 6 copies par allèle soit 12 copies pour les souris homozygotes. Les souris transgéniques *CHMP2B^{intron5}* développent des dénervations musculaires ainsi que des altérations comportementales : désinhibition, diminution de l'interaction sociale, stéréotypies. Ces dénervations musculaires entraînent une paralysie progressive aboutissant à la mort des animaux aux alentours de 12 mois pour les souris homozygotes et de 24 mois pour les souris hétérozygotes. D'un point de vue physiopathologique, ces souris développent, comme les patients, une astroglie (corticale et spinale) et des inclusions protéiques qui sont positives pour CHMP2B, P62 et l'ubiquitine, et qui sont négatives pour TDP-43, FUS et TAU. Les données internes du laboratoire ont montré que ces inclusions étaient majoritairement présentes dans la moelle épinière lombaire et le cortex frontal des animaux. Une étude transcriptomique du laboratoire a récemment mis en évidence que la moelle épinière de ces souris présentait des perturbations du métabolisme lipidique avant même l'apparition des premiers symptômes moteurs (Waegaert et al., 2020). Parmi ces gènes, certains sont impliqués dans le métabolisme des glycosphingolipides.

Mes travaux de thèse ont consisté à évaluer les effets de l'AMB sur les phénotypes moteurs et cognitifs de ce modèle de SLA-DFT (chapitre C de la partie « RESULTATS »).

PARTIE 2 : L'implication des sphingolipides dans la SLA et dans le syndrome SLA-DFT

A. Les sphingolipides, des composants majeurs du système nerveux central et périphérique

1. Structure générale des sphingolipides et distribution tissulaire

Le tissu nerveux est hautement spécialisé dans la transmission d'informations sur de courtes ou longues distances. Les lipides constituent environ 60% d'un cerveau humain et jouent un rôle actif dans la propagation des signaux électriques et chimiques dans le système nerveux (Tamiji and Crawford, 2010). Les sphingolipides appartiennent à une classe majeure de lipides complexes qui dérivent de la sphingosine. Ils ont été identifiés pour la première fois dans les années 1880 par un chimiste allemand, Johann Ludwig Wilhelm Thudichum, qui a isolé la sphingomyéline tout en étudiant la composition chimique du tissu nerveux (van Echten-Deckert and Herget, 2006). Les sphingolipides représentent près de 20% des lipides du système nerveux (Fasano et al., 2006).

Bien qu'il existe diverses formes de sphingolipides, toutes sont caractérisées par l'inclusion d'un squelette de sphingosine. Selon la classe de sphingolipide, un certain nombre de groupes différents peuvent être ajoutés au squelette de la sphingosine ([figure 12](#)). Les sphingolipides les plus simples sont les céramides, qui sont constitués d'un squelette de sphingosine lié à une chaîne d'acide gras (AG). Les sous-classes de sphingolipides sont caractérisées par l'ajout de divers groupes au céramide. Lorsqu'un phospholipide (lipide associé à un acide phosphorique) se lie à un céramide, on appelle cette sous-classe les sphingophospholipides. Notamment, les sphingomyélines (SM) résultent de l'ajout d'une phosphocholine au céramide. Parmi les sous-classes de sphingolipides, on distingue notamment les glycosphingolipides « GSLs » qui sont des céramides liés à un ose. L'addition d'acide(s) sialique(s) au LacCer permet la formation de GSLs « complexes » appelés les gangliosides.

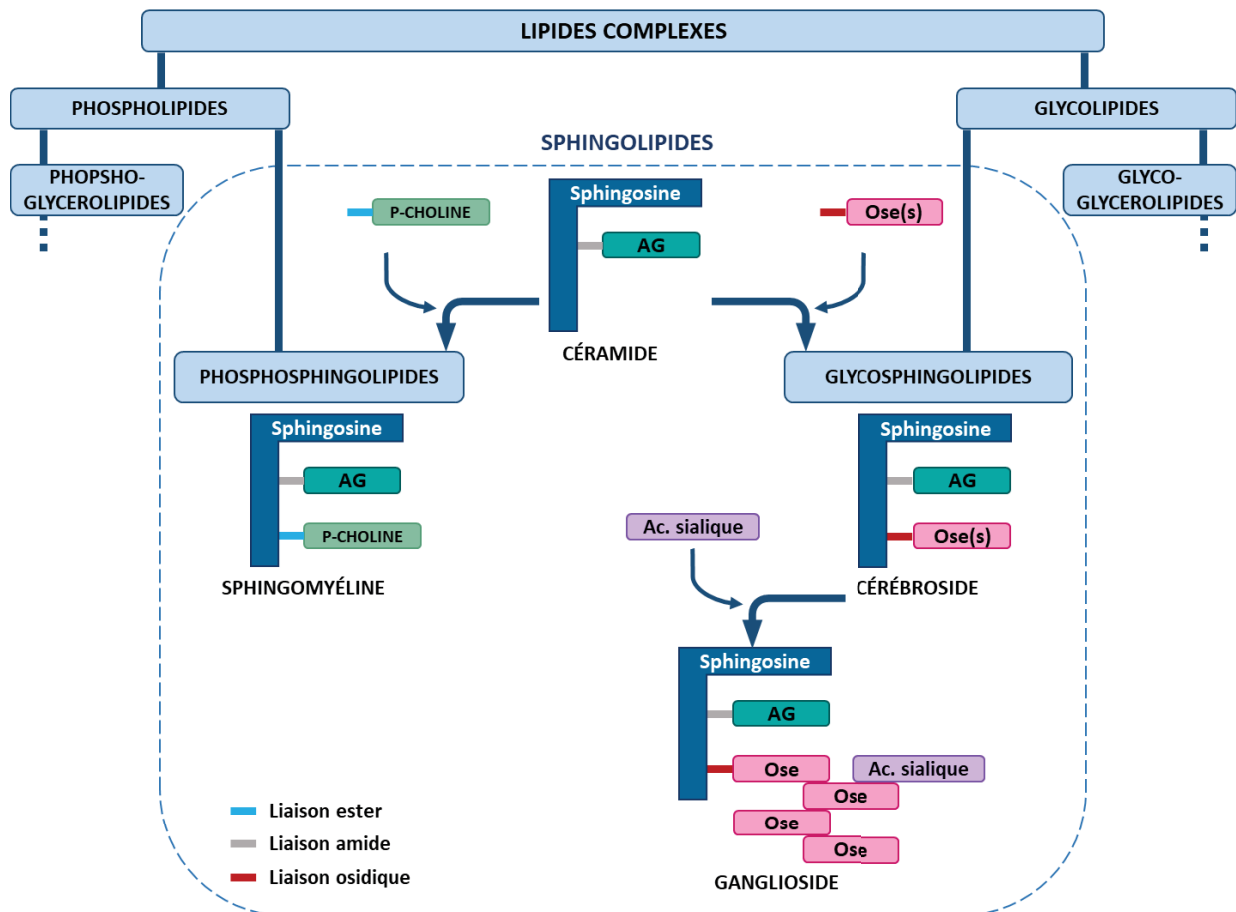


Figure 12 : Classification simplifiée des sphingolipides.

Les lipides complexes se divisent en de nombreuses catégories. Parmi ces catégories, on retrouve les phospholipides et les glycolipides. Selon la famille lipidique qui s'associe à un céramide, on obtient des phosphosphingolipides ou des glycosphingolipides. Parmi les glycosphingolipides, il y a les cérébrosides qui sont composés d'un céramide et d'un ou plusieurs oses. L'ajout d'un acide sialique sur un cérébroside le transforme en ganglioside.

Lorsque l'ose qui s'ajoute à un cérébroside est un glucose, cela forme un glucosylcéramide (GlcCer). Si cet ose est un galactose cela forme un galactosylcéramide (GalCer). L'ajout d'un galactose au GlcCer permet la formation du lactosylcéramide (LacCer). Les cérébrosides regroupent les GlcCer, les GalCer et les LacCer. L'addition d'acide(s) sialique(s) au LacCer permet la formation de gangliosides. Parmi les premiers gangliosides synthétisés on retrouve GM3 et GD3. Leurs dérivés sont caractérisés par l'ajout d'oses tels que du N-acétylgalactosamine (GalNac) et du galactose (notamment GM1, GD1a, GD1b, GT1b...) ([Figure 13](#)).

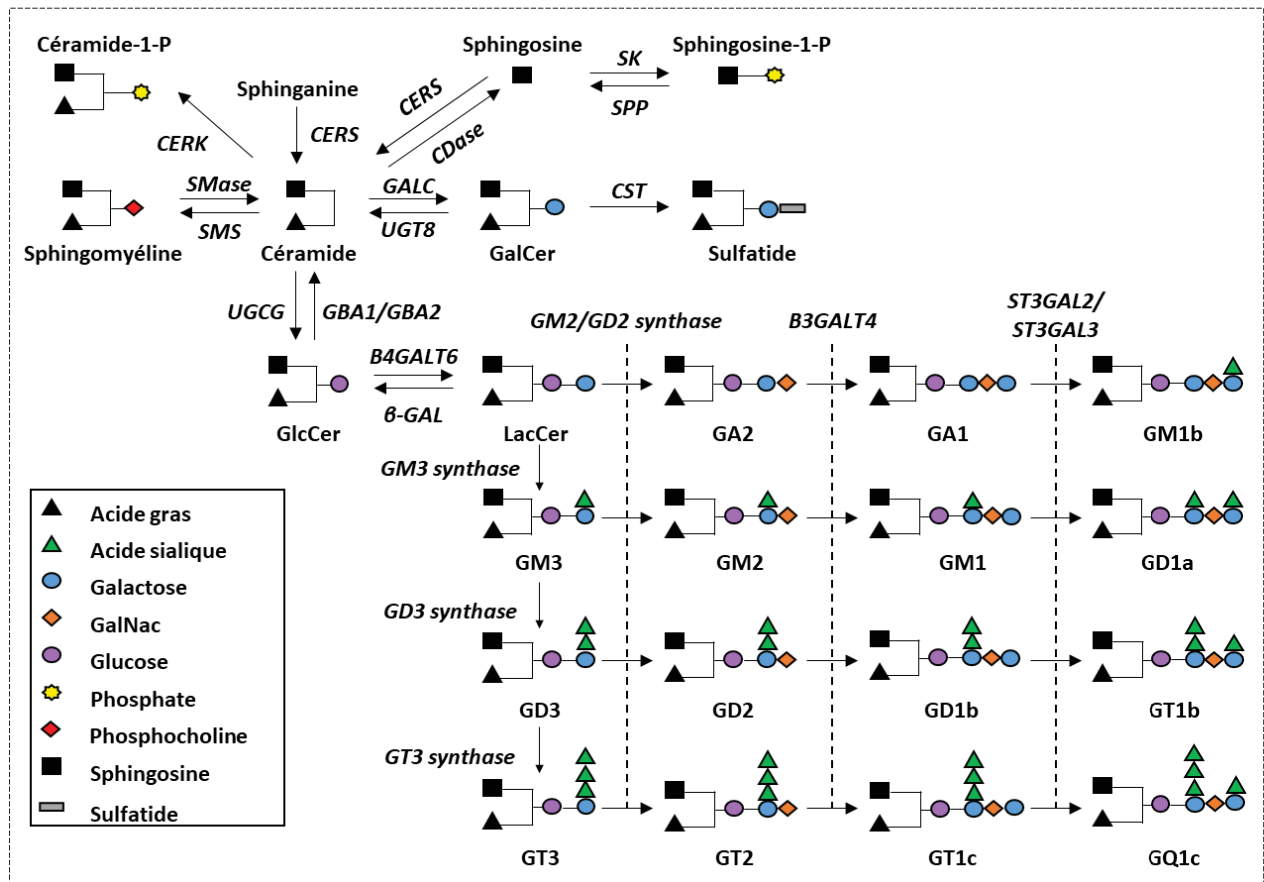


Figure 13 : Vue générale de la synthèse des sphingolipides.

Représentation simplifiée de la voie des sphingolipides. Abréviations : β -1,3-galactosyltransferase 4 (B3GALT4), β -1,4-Galactosyltransferase 6 (B4GALT6), ceramidase (CDase), ceramide kinase (CERK), ceramide synthase (CERS), galactosylceramide sulfotransferase (CST), Galactosylcéramidase (GALC), β -Glucocérébroside 1/2 (GBA1/GBA2), sphingomyelin synthase (SMS), sphingomyelinase (SMase), sphingosine kinase (SK), sphingosine 1-phosphate phosphatase (SPP), ST3 β -galactoside α -2,3-sialyltransferase 2/3 (ST3GAL2/ST3GAL3), Glucosylcéramide synthase UGCG, Céramide galactosyltransferase (UGT8) (inspirée de Olsen and Færgeman, 2017).

La distribution tissulaire des GSLs est assez variée. De nombreuses études ont montré que les sphingolipides se trouvent en fortes concentrations dans le système nerveux, particulièrement dans les membranes cellulaires, et que la distribution et la composition en sphingolipides diffèrent selon les régions et les types cellulaires du SNC. Dans le SNC, se forme plus généralement du GalCer et des gangliosides (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Olsen and Færgeman, 2017). En effet, les neurones sont particulièrement enrichis en gangliosides, tandis que les oligodendrocytes et la myéline sont fortement enrichis en GalCer (Kracun et al., 1992). Le GalCer est aussi très exprimé dans les cellules de Schwann qui font partie du système nerveux périphérique (SNP) (Schaeren-Wiemers et al., 2002). Le cerveau contient une forte concentration de gangliosides qui, au cours du développement, varie selon la composition en gangliosides, pour passer des gangliosides simples aux gangliosides complexes. Ce changement de composition en gangliosides est partie intégrante des processus de neurogenèse, de

synaptogénèse et d'arborisation axonale (Wennekes et al., 2009; Yu et al., 2012). Les gangliosides sont également présents dans les fluides biologiques tels que le sang et le LCR. Dans les tissus non-neuronaux, on retrouve plutôt du GlcCer et ses dérivés.

2. Biosynthèse, transport et catabolisme

La biosynthèse des sphingolipides débute au niveau du feuillet cytosolique du RE et progresse en passant par plusieurs structures subcellulaires. Le céramide est obtenu par la transformation de la sphinganine en dihydrocéramide par les enzymes « céramide synthase » (CERS) ([figure 13](#)). Les CERS regroupent une grande famille d'enzymes du RE qui catalysent la synthèse des céramides. Chez les mammifères, on en distingue 6 et sont très exprimées dans les neurones du cerveau. Le dihydrocéramide est par la suite converti en céramide par la céramidase (CDase) (D'Angelo et al., 2013a).

Le céramide est le précurseur clé de la synthèse d'un grand nombre de sphingolipides et de glycosphingolipides ([figure 14](#)). Une fois formé dans le RE, il peut être utilisé par la cellule, ou transporté vers l'appareil de Golgi. Au niveau du RE, une partie du céramide peut également être transformé en GalCer par l'enzyme céramide galactosyltransférase (UGT8) ([figure 14 : 1](#)). Son hydrolyse est effectuée par l'enzyme Galactosylcéramidase (GALC). Si le céramide est transporté vers l'appareil de Golgi, le mode de transport différera de deux façons :

- a) Le céramide peut être transporté par la protéine Ceramide Transfer Protein (CERT) au niveau de l'appareil trans-Golgi ([figure 14 : 2](#)), où il est ensuite converti en SM du côté luminal du RE grâce à l'ajout d'une phosphocholine par la sphingomyéline synthase 1 (SMS1) ([figure 14 : 3](#)).

Il existe deux formes de sphingomyéline synthase : SMS1 et SMS2. SMS1 se trouve préférentiellement au niveau de l'appareil trans-Golgi tandis que SMS2 se trouve généralement sur la membrane plasmique ([figure 14 : 4](#)). On retrouve donc du céramide membranaire pouvant être également phosphorylé en céramide 1 phosphate (C1P) par la céramide kinase (CERK). Le C1P pouvant être aussi hydrolysé en céramide par la lipide-phosphate phosphatase (LPP) ([figure 14 : 5](#)). Toutefois, le céramide membranaire peut également être dégradé en sphingosine par une CDase ([figure 14 : 6](#)). Chez l'homme, on distingue 7 CDases. Ces CDases peuvent se localiser à la membrane plasmique, au niveau du RE ou de l'appareil de Golgi mais aussi dans les lysosomes. Elles assurent un « pool » de sphingosine aux différents endroits de la cellule. Les sphingosines peuvent ensuite être phosphorylées par la phosphatase kinase 1 (SK1), enzyme localisée au niveau de la membrane à l'inverse de la Sphingosine Kinase (SK2) localisée au niveau du RE ([figure 14 : 7 et 7'](#)). Son produit, la sphingosine 1 phosphate

(S1P), peut être hydrolysée par l'enzyme déphosphorylante S1P phosphatase (SPP) (Wennekes et al., 2009).

- b) Le céramide peut également être transporté vers l'appareil cis-Golgi, par un processus encore aujourd'hui incompris, où il sera le précurseur d'un grand nombre de glycosphingolipides ([figure 14 : 8](#)).

La formation des glycosphingolipides démarre ainsi au niveau du feuillet lumineuse du RE. Au niveau de l'appareil cis-Golgi, le céramide est converti en GlcCer par l'enzyme glucosylcéramide synthase (UGCG) qui lui ajoute un résidu de glucose ([figure 14 : 9](#)). A ce stade, le GlcCer peut être transporté vers le trans-Golgi selon deux mécanismes différents : par voie vésiculaire ou par la protéine de transport FAPP2 (four-phosphate adaptor protein 2) ([figure 14 : 10](#)) (D'Angelo et al., 2013b; Tracey et al., 2018). Au niveau de l'appareil trans-Golgi, le GlcCer peut être transformé en différents GSLs (lactocylcéramide, gangliosides, etc.) qui peuvent rejoindre la membrane plasmique et les rafts lipidiques après transport vésiculaire ([figure 14 : 11 et 13](#)). S'il n'est pas transformé en GSLs au niveau du Golgi, le GlcCer peut être acheminé vers la membrane plasmique à travers la protéine de transport GLTP (Glycolipid transfer protein) ([figure 14 : 12](#)). A la membrane plasmique, le GlcCer intègre les rafts lipidiques où il peut être glycosylé plusieurs fois jusqu'à sa transformation en gangliosides ([figure 14 : 13](#)). Il peut aussi être reconverti en céramide par l'enzyme GBA2 au niveau de la membrane ([figure 14 : 14](#)) ou du RE ([figure 14 : 15](#)) (Wennekes et al., 2009).

La dégradation des GSLs s'effectue dans les endosomes et les lysosomes formés par endocytose à partir de la membrane ([figure 14 : 16](#)). Les GSLs des endosomes sont recyclés vers d'autres compartiments subcellulaires (RE et appareil de Golgi) ([figure 14 : 17](#)). Tandis que les GSLs redirigés vers les lysosomes sont hydrolysés jusqu'en céramide puis en sphingosine ([figure 14 : 18](#)). Au niveau du lysosome, la dégradation du GlcCer en céramide s'effectue par l'enzyme GBA1 ([figure 14 : 19](#)).

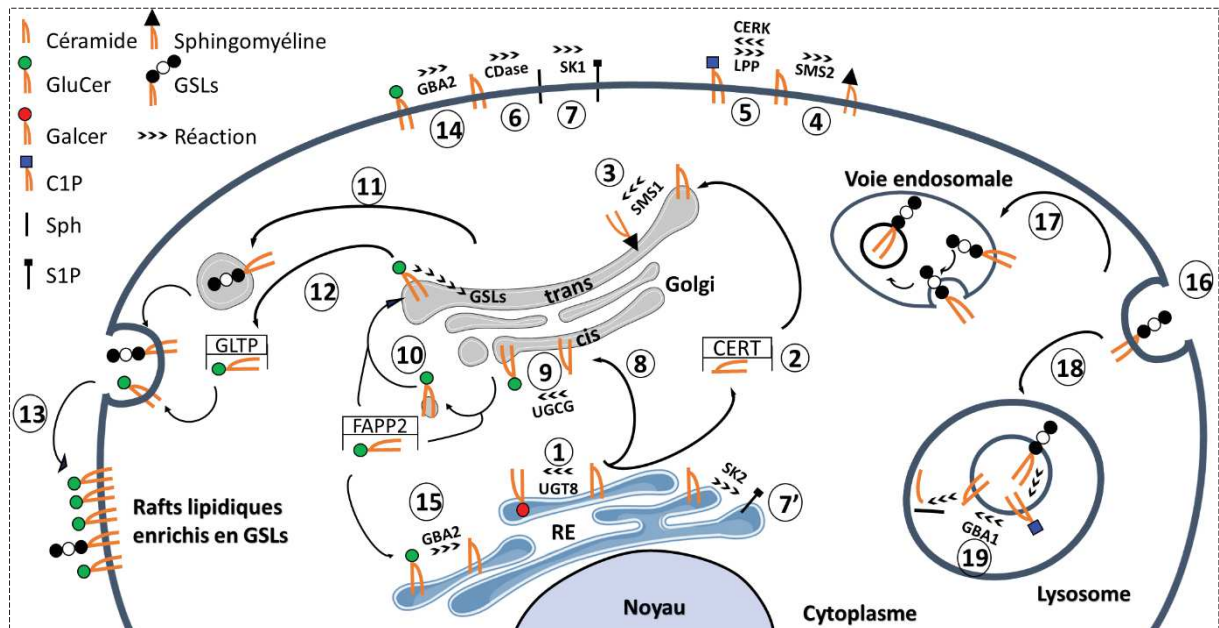


Figure 14 : Métabolisme des sphingolipides.

Le céramide synthétisé dans le RE peut être transformé en différents métabolites. (1) est la transformation du céramide en Galactosylcéramide (GalCer) au niveau du RE. (2) représente le transport du céramide par la protéine de transport « Ceramide Transfer Protein » (CERT), du RE jusqu'à l'appareil trans-Golgi, où il est transformé en sphingomyéline (3). Le céramide membranaire peut aussi être transformé en sphingomyéline (4), en céramide-1-phosphate (C1P) (5) ou encore en sphingosine (Sph) (6). A la membrane ou au niveau du RE, la Sph transformé en sphingosine-1-phosphate (S1P) (7 ; 7'). Au niveau du RE, le céramide peut aussi être transporté jusqu'à l'appareil cis-Golgi (8). (9) est la transformation du céramide en Glucosylcéramide (GlcCer) dans l'appareil cis-Golgi. (10) représente le transport du GlcCer par voie vésiculaire ou par la protéine de transport « four-phosphate adaptor protein 2 » (FAPP2) jusqu'à l'appareil trans-Golgi. FAPP2 peut également ramener le GlcCer vers le RE. Au niveau du trans-Golgi, le GlcCer peut être transformé en différents glycosphingolipides (GSLs) qui peuvent transporter vers la membrane plasmique par voie vésiculaire (11) et intégrer les rafts lipidiques (13). Le GlcCer transporté jusqu'à la membrane par la protéine « Glycolipid transfer protein » (GLTP) (12) pourra aussi être transformé en GSLs dans les rafts lipidiques (13) ou converti en céramide par l'enzyme GBA2 (14 et 15). Après endocytose (16), les GSLs peuvent être recyclés par voie endosomale (17) vers le RE ou l'appareil de Golgi, ou dégradés par voie lysosomale (18). La dégradation du GlcCer au niveau du lysosome s'effectue par GBA1 (19) (inspirée de Wennekes et al., 2009).

- La voie du GlcCer, une voie clé dans le métabolisme des GSLs

Le GlcCer occupe un rôle clé dans la biosynthèse des GSLs. En effet, de nombreuses pathologies du système nerveux comme la SLA, les ataxies cérébelleuses, la maladie de Gaucher ou encore de Parkinson, montrent l'implication de la voie du GlcCer dans leurs physiopathologies.

La dégradation du GlcCer en céramide est réalisée par deux β -glucocérébrosidases (GCase) transmembranaires : GBA1 et GBA2. Ces deux enzymes ne présentent aucune homologie de séquence mais clivent toutes les deux la liaison glucose-sphingosine présente dans le GlcCer et les autres GSLs (Boot et al., 2007; Wennekes et al., 2009; Yildiz et al., 2006). Elles partagent donc une même activité enzymatique mais présentent cependant des localisations cellulaires différentes. GBA1 est une GCase d'environ 60 kDa qui se localise au niveau du lysosome et qui a une activité enzymatique optimale à

pH acide (pH 4) ([figure 14 : 19](#)) (Körschen et al., 2013). Cette enzyme est abondante dans les macrophages, qui dégradent de grandes quantités de lipides par phagocytose. La perte de fonction de la protéine GBA1 est à l'origine d'une pathologie nommée la maladie de Gaucher, un trouble autosomique récessif résultant d'une mutation dans le gène *GBA1*. Dans cette maladie, l'absence de GBA1 provoque une accumulation de GlcCer dans les lysosomes des macrophages (Beutler and Gelbart, 1996; Dvir et al., 2003; Yildiz et al., 2006). Il est maintenant connu que les mutations dans le gène *GBA1* sont un facteur de risque pour la maladie de Parkinson (Horowitz et al., 2016; Mullin et al., 2019).

La GCase GBA2 est une protéine de 105kDa qui intervient au niveau du RE et de l'appareil de Golgi, mais sa concentration est plus élevée au niveau de la membrane plasmique ([figure 14 : 14 et 15](#)). Son activité enzymatique est optimale à un pH plus proche du neutre (pH 6) (Körschen et al., 2013). Chez l'homme, GBA2 est une protéine ubiquitaire dont la quantité est fortement élevée dans le foie, le cerveau, le cœur, le muscle squelettique et les testicules (Matern et al., 2001; van Weely et al., 1993; Woeste and Wachten, 2017). Bien qu'on trouve que très peu de GBA2 dans les muscles des souris, cette protéine est proche à 87% de celle de l'homme. C'est pourquoi une perte de fonction de GBA2 résulte en une accumulation de GlcCer particulièrement dans ces organes et engendre des défauts de la spermatogénèse chez la souris (Walden et al., 2007; Yildiz et al., 2006). Les mutations dans le gène *GBA2* sont également associées à certaines pathologies neurologiques touchant la locomotion (Paraplégie spastique héréditaire (PSH), ataxie spastique et l'ataxie cérébelleuse autosomique récessive (ARCA)) (Citterio et al., 2014; Martin et al., 2013; Sultana et al., 2015; Votsi et al., 2014; Woeste and Wachten, 2017).

Peu connue, il existe une troisième enzyme GBA (d'environ 50 kDa) qui est cytosolique : GBA3 aussi nommée KLRP (Klotho-related protein). Son rôle n'est pas encore totalement élucidé mais cette enzyme semblerait pouvoir dégrader de nombreux substrats (notamment le GlcCer, le GalCer et le LacCer) (Hayashi and Ito, 2016). On la retrouve en particulier dans le cytosol des cellules du foie, des reins, et de l'intestin (Dekker et al., 2011). Enfin, il faut noter qu'il existe également une quatrième GCase dans l'intestin, au niveau des microvillosités intestinales. Située à la membrane plasmique de ces cellules intestinales, l'enzyme LPH (β -lactasephlorizin hydrolase, 300 kDa) hydrolyse le GlcCer. Cette enzyme jouerait un rôle dans la digestion des GSLs issus de l'alimentation (Vesper et al., 1999).

3. Les sphingolipides dans les fonctions cellulaires du système nerveux

Les sphingolipides sont des molécules bioactives qui jouent un rôle fondamental dans le système nerveux. Dans cette sous-partie, je présenterai tout d'abord la fonction des sphingolipides dans les

membranes des neurones, où ils interviennent en tant que modulateurs des voies de signalisations. Ensuite, je m'intéresserai à leur rôle dans le développement et le maintien du système nerveux. En effet, du développement embryonnaire jusqu'à la mort, les sphingolipides interviennent dans la maturation neuronale, la plasticité axonale mais aussi dans les processus de myélinisation et de transmission du signal nerveux. Un déséquilibre de l'homéostasie des sphingolipides entraîne généralement de graves pathologies du système nerveux. Enfin, je montrerai que certains de ces sphingolipides, les gangliosides, présentent aussi la particularité d'être neuroprotecteur en interagissant avec les facteurs neurotrophiques (Ledeen and Wu, 2018).

3.1. Localisation et fonction dans les membranes cellulaires du système nerveux

La famille des sphingolipides regroupe des dizaines de molécules distinctes, qui sont des composants de la membrane cellulaire où ils agissent comme modulateurs des voies de signalisation. Au sein de la membrane plasmique, il existe des microrégions enrichies en phospholipides, cholestérol et sphingolipides (notamment en SM et GSLs), appelées « rafts lipidiques ». Les rafts lipidiques sont des sites d'ancrage de nombreuses protéines membranaires. La composition en cholestérol et en sphingolipides dans ces micro-domaines confère une structure rigide aux bicouches membranaires et favorise ainsi la forte concentration en protéines. Les protéines qui s'intègrent à ces rafts sont impliquées dans une multitude de processus, allant des voies d'endocytose jusqu'à la transduction du signal, l'adhésion cellulaire et le réarrangement du cytosquelette (Allen et al., 2007; Posse de Chaves and Sipione, 2010; Prinetti et al., 2009). Les rafts lipidiques jouent également de nombreux rôles dans les processus neuronaux. Des hypothèses suggèrent que les rafts lipidiques seraient impliqués dans l'organisation spatiale des molécules de signalisation. Ils rassembleraient ainsi les récepteurs des neurotransmetteurs (ionotropes ou couplés aux protéines G) afin de favoriser la transduction du signal (Allen et al., 2007). Certains sphingolipides sont connus pour interagir avec les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). C'est par exemple le cas du C1P, de la S1P, de la SM mais aussi de GM1 qui sont des ligands connus des RCPGs présents dans les rafts lipidiques (Hannun and Obeid, 2018; Kiyokawa et al., 2005; Ledeen and Wu, 2018). Il est également connu que les gangliosides peuvent agir comme récepteurs d'agents pathogènes et des toxines (Fishman, 1982; Schnaar et al., 2014; Yowler et al., 2002).

Dans la gaine de myéline, les gangliosides participent directement aux fonctions du système nerveux en facilitant la transmission de l'influx nerveux. Au niveau des rafts lipidiques des cellules musculaires, ils participent au regroupement des récepteurs à l'acétylcholine, à la maturation et à la stabilité de la JNM (Campagna and Fallon, 2006; Marchand et al., 2002; Stetzkowski-Marden et al., 2006). Fortement concentré dans le cerveau, les gangliosides jouent également un rôle crucial dans le maintien de

l'intégrité du tissu nerveux. Ils sont essentiels à la stabilisation de l'architecture des rafts lipidiques, notamment en stabilisant les glycoprotéines MAG (myelin-associated glycoprotein) entre l'axone et la gaine de myéline. En effet, les gangliosides complexes GD1a et GT1b interagissent avec MAG pour stabiliser la myéline. Il en est de même pour le GalCer et le Sulfatide, situés à l'opposé l'un de l'autre, qui interagissent ensemble pour assurer une stabilité à long terme de la myéline (**figure 15**) (Lopez and Schnaar, 2009; Olsen and Færgeman, 2017; Pan et al., 2005; Schnaar, 2010). Les souris dépourvues des enzymes GM3 et GM2 synthase, qui sont des enzymes de synthèse des gangliosides, ne possèdent pas de gangliosides cérébraux et présentent de graves perturbations dans les interactions axone-myéline (Yamashita et al., 2005). Toutefois, la SM et le GalCer restent les composants principaux des gaines de myéline. Ils stabilisent la myéline et participent aussi directement à la transduction du signal (van Meer et al., 2008).

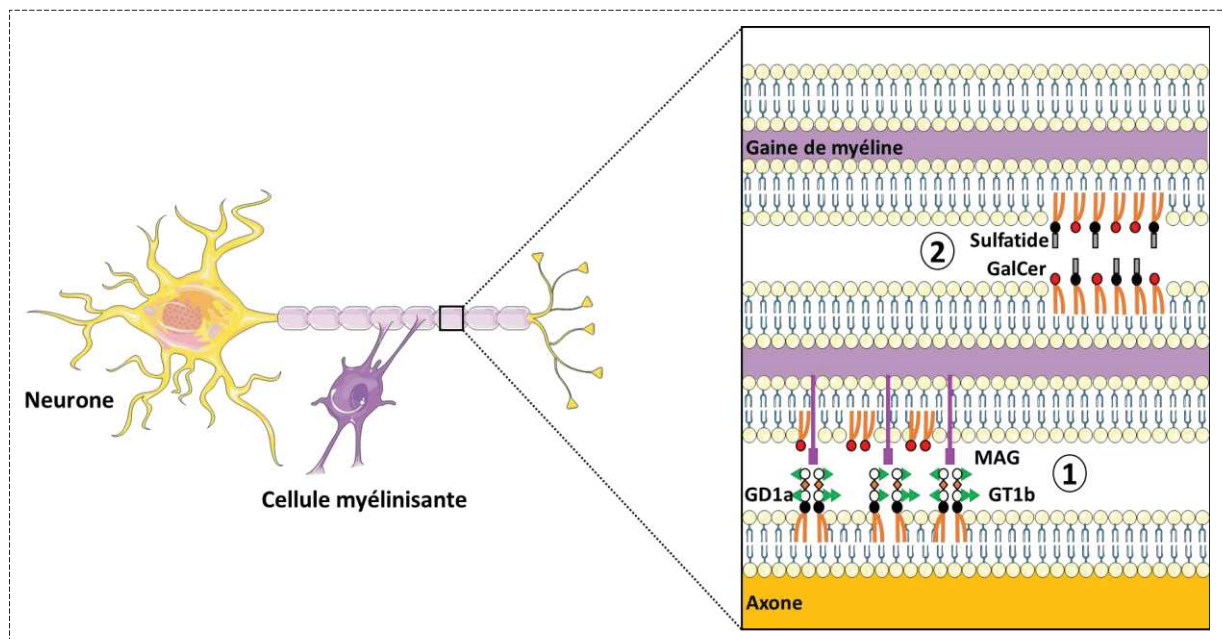


Figure 15 : Stabilisation de la gaine de myéline par les sphingolipides.

Les sphingolipides sont essentiels à la bonne stabilisation des gaines de myéline. (1) Au niveau des rafts lipidiques, le GalCer (en rouge) stabilise les glycoprotéines MAG (en violet). Les glycoprotéines MAG peuvent ainsi interagir avec les gangliosides complexe GD1a et GT1b (en vert) et assurer la liaison « myéline-axone ». (2) La stabilisation de la myéline à long terme passe par l'interaction du GalCer avec le sulfatide (inspirée de Olsen and Færgeman, 2017).

Bien que l'on trouve des gangliosides dans les membranes de toutes les cellules, ils restent les composants majeurs des membranes neuronales. Dans les membranes neuronales, les gangliosides peuvent représenter jusqu'à 12% de la teneur totale en lipides (Posse de Chaves and Sipione, 2010). Le système nerveux mature requiert des gangliosides complexes, tels que GM1, au niveau des rafts lipidiques mais aussi au niveau des synapses neuronales. GM1 est ancré dans la membrane plasmique, et sa partie glycosylée se positionne dans l'environnement extracellulaire, où celle-ci pourra interagir

avec des récepteurs membranaires, tels que le récepteur du BDNF ou NGF (Duchemin et al., 2002; Pitto et al., 1998; Rabin and Mocchetti, 1995). GM1 est également localisé au niveau de l'enveloppe nucléaire et interagit avec l'échangeur sodium-calcium ou avec des histones afin de réguler l'expression de gènes durant le développement neuronal (Tsai and Boxer, 2016; Wu et al., 2009).

Enfin, il est montré que les sphingolipides peuvent également intervenir au niveau des vésicules de transport. En outre, à pH neutre, la sphingomyélinase (SMase) participerait à la formation et la sécrétion des vésicules d'exosomes qui est un processus crucial dans la communication cellulaire tandis que la SK interviendrait dans les processus de régulation des endosomes (Hannun and Obeid, 2018). Toutes ces données montrent que les sphingolipides sont capables d'agir sur l'organisation des membranes et de leur dynamique.

3.2. Développement, maturation et maintien du système nerveux

a. *Les gangliosides dans le développement et la croissance du système nerveux*

Nous avons vu que les gangliosides jouent un rôle majeur dans la modulation des protéines membranaires, la régulation des récepteurs, l'adhésion cellule-cellule et la transmission synaptique. Toutefois, ils sont également essentiels au développement du système nerveux, à la croissance axonale et la différenciation neuronale (Yu et al., 2009, 2012). Les proportions de gangliosides ne sont pas les mêmes tout au long de la vie. Tandis que certains gangliosides participent au développement embryonnaire, d'autres gangliosides maintiennent les fonctions du SNC et du SNP à l'âge adulte ([figure 16](#)) (Kracun et al., 1992; Olsen and Færgeman, 2017; Segler-Stahl et al., 1983). Au cours du développement, la teneur en gangliosides augmente dans le cerveau où ils assurent, dès les premiers stades embryonnaires, la formation du tube neural ainsi que la prolifération et la différenciation des cellules souches neuronales. Ainsi, GM3 et GD3 font partie des premiers gangliosides synthétisés dans le cerveau à un stade embryonnaire qui participent à ces processus de développement (Olsen and Færgeman, 2017; Yu et al., 1988). Lors de la différenciation neuronale, le précurseur GM3 cède alors sa place à des gangliosides plus complexes, tels que GM1, GD1a, GD1b et GT1b. Ces quatre gangliosides complexes sont étroitement liés aux étapes cruciales de la synaptogenèse, de l'axonogenèse et des différents processus de myélinisation jusqu'à l'âge adulte (Palmano et al., 2015). Notamment, chez l'homme, les niveaux de GD1a retrouvés au cours de la grossesse (entre les 16ème et 30ème semaines), coïncident avec la synaptogénèse corticale. Il est aussi montré que GM1 peut également stimuler la réparation neuronale dans les modèles animaux de neuro-traumatismes (Hadjiconstantinou and Neff, 1998a, 1998b). GD3 et son enzyme de synthèse, la GD3 synthase, sont également impliqués dans la croissance axonale et dans la myélinisation. Une carence en GD3 ou en GD3 synthase, retarde considérablement les processus de croissance de l'axone et de sa myélinisation

(Ribeiro-Resende et al., 2014; Wang et al., 2014). Après l'âge de 5 ans, la proportion de GM1 et GD1a diminue, tandis que les niveaux de GM3, GT1b et GD1b augmentent vers l'âge adulte (Olsen and Færgeman, 2017). Lors des processus de myélinisation, d'autres sphingolipides sont alors synthétisés comme la SM, le GalCer et le sulfatide, qui sont les composants majeurs de la gaine de myéline. Tous ces changements d'expression des gangliosides, qui sont dépendants de l'âge, sont donc cruciaux au bon développement du système nerveux.

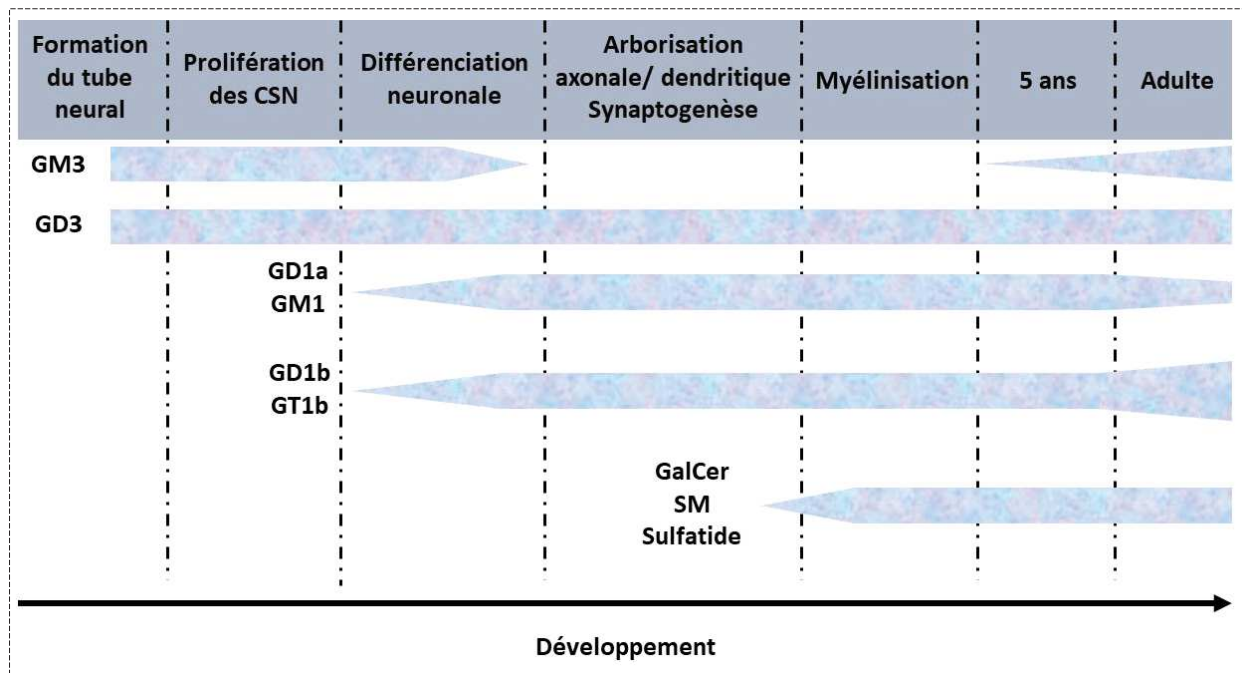


Figure 16 : Expression des gangliosides dans le système nerveux au cours du développement.

Durant le développement la composition en gangliosides change. Les premières espèces de gangliosides produites lors de la formation du tube neural sont GD3 et GM3, qui sont des gangliosides dits « simples ». Ces derniers sont présents pendant la phase de prolifération des cellules souches neurales (CSN) et leurs expressions diminuent au cours de la différenciation neuronale. Puis des espèces plus complexes telles que GD1a, GM1, GD1b et GT1b, nécessaires à la différenciation neuronale, sont synthétisées. GD3 et son enzyme de synthèse GDA3 synthase sont également impliqués dans la prolifération axonale et les processus de myélinisation. A l'âge adulte, les niveaux de GM3 réaugmentent, les niveaux de GD1a et GM1 diminuent tandis que les niveaux de GD1b et GT1b continuent d'augmenter. Le GalCer, la SM et le sulfatide sont synthétisés durant la synaptogenèse. Leur synthèse est maintenue jusqu'à l'âge adulte (inspirée de Olsen and Færgeman, 2017; Yu et al., 2009).

b. Implication des glycosphingolipides dans la différenciation neuronale et la croissance axonale

Même si les structures cérébrales sont enrichies en gangliosides, ils ne sont pas les seuls sphingolipides à avoir de l'importance pour le système nerveux (figure 17). Au cours du développement comme tout au long de la vie, les glycosphingolipides permettent la mise en place des processus de prolifération et de maturation des neurones ainsi que ceux impliqués dans la pousse axonale (Aureli et al., 2011, 2014; Olsen and Færgeman, 2017).

Par exemple, lors de la différenciation neuronale, l'expression de GBA2 augmente (Aureli et al., 2012). Pourtant, il est aussi montré que l'inhibition de la dégradation du GlcCer, lors de la phase de prolifération axonale, stimule la croissance axonale et dendritique (Olsen and Færgeman, 2017). La croissance axonale est un processus important dans la formation du réseau neuronal à travers l'organisme. De nombreux glycosphingolipides sont essentiels à la croissance axonale. La présence de enzymes CERS et UGCG, s'est révélée être aussi une condition préalable à la croissance des axones et des dendrites. En effet, l'inhibition de l'activité de CERS dans des neurones murins en culture, conduit à une réduction critique des niveaux de céramide, de la SM et des GSLs en général. De cette inhibition résulte également une altération de la croissance neuritiques et des ramifications (Furuya et al., 1995; Harel and Futerman, 1993; Schwarz et al., 1995). Chez la souris, la délétion en UGCG provoque dégénérescence axonale et une démyélinisation des nerfs périphériques provoquant la mort des animaux (Jennemann et al., 2005). Ces études montrent donc l'importance de la synthèse et de la dégradation du céramide et du GlcCer dans tous ces processus. En effet, le céramide semble également assurer le bon développement de l'hippocampe car l'accumulation de céramide dans l'hippocampe résulte en une diminution de la prolifération et de la maturation neuronale. Une autre étude montre que l'utilisation d'antidépresseur permettrait de réduire la concentration en céramide dans l'hippocampe tout en favorisant la prolifération neuronale (Gulbins et al., 2013). Enfin, Neu3 (enzyme de dégradation du GM3 en LacCer) est impliqué dans la croissance axonale et sa surexpression permettrait la polarisation des axones (Da Silva et al., 2005).

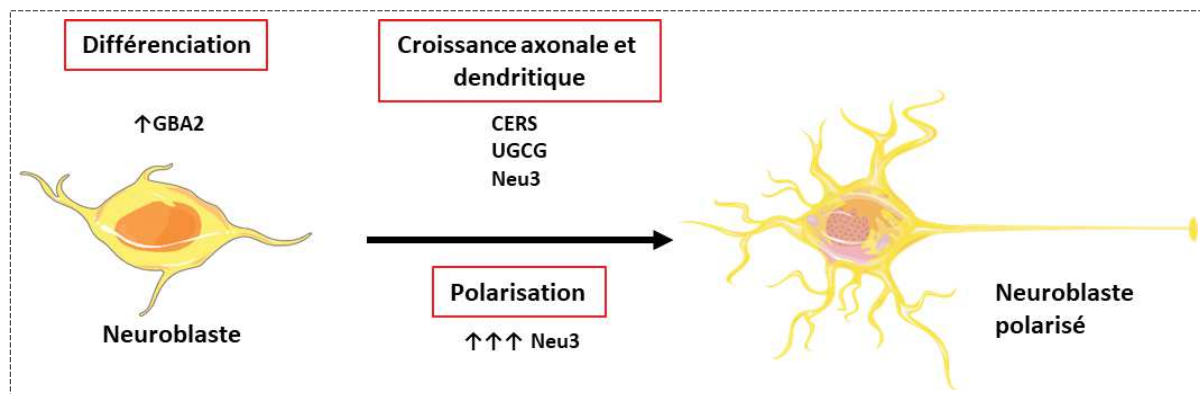


Figure 17 : Implication des glycosphingolipides dans la différenciation neuronale et la croissance axonale.

La prolifération et la différenciation neuronale ainsi que la pousse et arborisation axonale/dendritique implique l'expression de certains glycosphingolipides et de leurs enzymes de synthèse et de dégradation. L'augmentation des niveaux de GBA2, l'enzyme de dégradation du GlcCer en céramide, est importante pour la différenciation neuronale. Lors de la croissance axonale et dendritique, la synthèse du céramide et du GlcCer par les enzymes CERS et UGCG est également essentielles. Neu3 serait également impliqué dans le processus de croissance axonale et dendritique. La surexpression de Neu3 permettrait la polarisation des neurones.

Toutes ces données suggèrent que l'implication des sphingolipides dans les processus de prolifération et de différenciation neuronale pourrait directement être liée à leurs interactions avec les récepteurs

membranaires. En effet certains sphingolipides, comme GM1, interagissent directement avec des récepteurs impliqués dans les processus de neuroprotection.

c. GM1 et neuroprotection

Les facteurs neurotrophiques forment un groupe de protéines responsables de la croissance et de la survie des neurones. Ils sont exprimés lors du développement mais ils permettent également l'entretien des neurones matures. On retrouve parmi les facteurs neurotrophiques plusieurs grandes familles : les neurotrophines, la famille des ligands GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), les Ephrines, la famille CNTF (ciliary neurotrophic factor) ainsi que d'autres familles de facteurs tels que celles des facteurs neurotrophiques épidermiques (EGF), des facteurs de croissance analogue à l'insuline (IGF-1), *etc.* (Henriques et al., 2010). Du fait de leur implication dans le développement, la survie et les fonctions des neurones, mais également de leur interaction avec le ganglioside GM1, nous nous intéresserons exclusivement dans cette sous-partie à la famille des neurotrophines. On retrouve dans cette catégorie : le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), le « nerve growth factor » (NGF), la neurotrophine 3 (NT3) et la neurotrophine 4 (NT4). Ces facteurs interagissent avec des récepteurs communs tels que les récepteurs Tryptophan Kinase TrkA, TrkB, TrkC et le récepteur de régulation des neurotrophines p75NTR (p75 neurotrophin receptor). Toutefois, les récepteurs TrkA sont connus pour interagir avec le facteur NGF, tandis que les récepteurs TrkB interagissent avec les facteurs BDNF et NT4. Les TrkC interagissent plutôt avec les facteurs NT3 ([figure 18](#)).

L'interaction de GM1 avec les neurotrophines est connue depuis déjà de nombreuses années. GM1, ancré dans la membrane cellulaire par sa partie « céramide », possède 5 sucres exposés au niveau de l'environnement extracellulaire. Cela rend possible son interaction avec des récepteurs aux facteurs de croissance. Avant de mettre en évidence l'interaction directe de GM1 avec les récepteurs tryptophane kinase, la communauté scientifique avait déjà appuyé le fait que GM1 potentialisait l'effet neurotrophique du facteur NGF *in vivo* (Duchemin et al., 2002). Plus précisément, les premières études ont montré que GM1 favorisait la croissance des neurites dans les lignées de neuroblastomes murins (Byrne et al., 1983; Ferreira et al., 1990; Olsen and Færgeman, 2017; Roisen et al., 1981). C'est dans les années 1990 que les équipes scientifiques ont commencé à mettre en évidence l'interaction directe entre GM1 avec le récepteur TrkA, et la capacité du GM1 à augmenter l'activation de TrkA induite par le NGF (Mutoh et al., 1995; Rabin and Mocchetti, 1995). Ainsi, il a été montré que le facteur NGF active la voie Ras/Raf/MEK/Erk par sa liaison au récepteur TrkA, ce qui induit l'extension des neurites (Olsen and Færgeman, 2017). Fait intéressant, les cellules déficientes en GM1 en raison d'une mutation dans le gène de l'enzyme GM1 synthase (B3GALT4), ne sont plus capables d'exprimer le récepteur TrkA. Ce défaut peut néanmoins être corrigé par transfection de GM1 synthase (Mutoh et

al., 2002). Moins de 10 ans plus tard, d'autres équipes montraient que les quantités de GM1 membranaires peuvent directement moduler l'activité de TrkB et de TrkA, et indirectement les cascades de signalisations associées (Fukumoto et al., 2000; Furukawa et al., 2014; Pitto et al., 1998), que GM1 phosphoryle et active les récepteurs tropomyosine kinase (Trk A, B et C) (Duchemin et al., 2002), et que, sans se lier directement à TrkC, GM1 peut participer à l'autophosphorylation du récepteur (Rabin et al., 2002). Une autre étude suggère GM1 limite l'excitotoxicité à travers l'activation du récepteur TrkB (Bachis et al., 2002). Toutefois, des études suggèrent que d'autres sphingolipides, notamment l'enzyme Neu3, sont potentiellement aussi impliqués dans la pousse et la polarisation axonale via l'activation des récepteurs TrkA (Da Silva et al., 2005).

Toutes ces données montrent un lien étroit entre l'activation des récepteurs Trk et GM1. Etant donné le rôle des neurotrophines dans la survie et les fonctions des neurones, l'implication du ganglioside complexe GM1 dans la mort neuronale mérite d'être approfondie. Car au-delà de son rôle dans le développement, il se pourrait que GM1 soit un acteur direct de la neuroprotection.

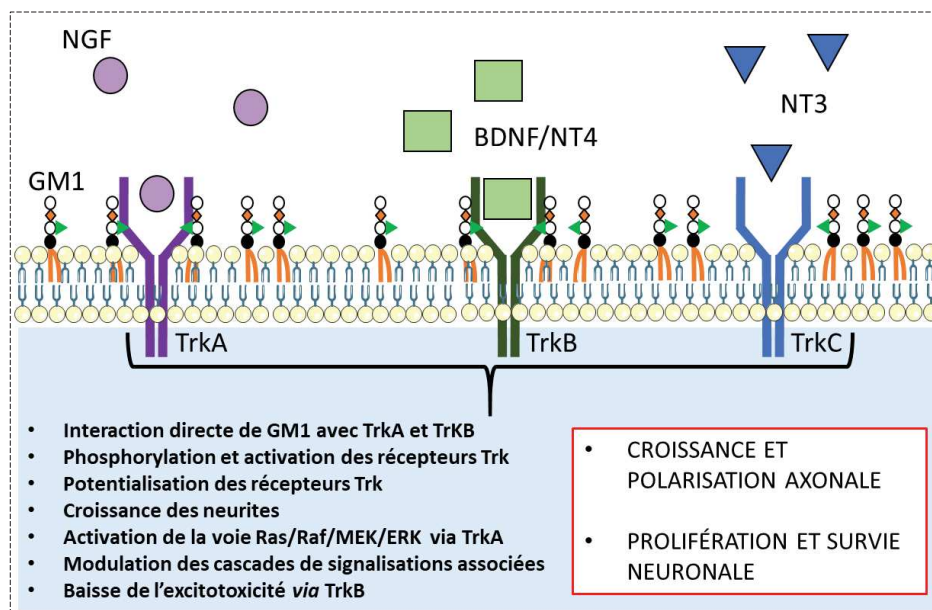


Figure 18 : Effets de l'interaction des gangliosides GM1 avec les récepteurs Trk.

Les gangliosides GM1 peuvent directement (TrkA/TrkB) ou indirectement (TrkC) interagir avec les récepteurs tropomyosine kinase (Trk). La finalité de ces interactions donne lieu à différents processus essentiels à la bonne croissance des axones mais aussi à la prolifération et à la survie des neurones.

B. Les sphingolipides dans les maladies du système nerveux

De nos jours, plus de 30 millions de personnes sont touchées par les maladies neurodégénératives dans le monde. De plus en plus de preuves suggèrent que les sphingolipides jouent un rôle crucial dans les maladies neurodégénératives ainsi que dans certaines pathologies caractérisées par l'accumulation de sphingolipides (Schmitt et al., 2014). Parmi ces maladies, on retrouve notamment la SLA et la

maladie de Gaucher mais aussi des pathologies qui peuvent être associées à des démences comme le syndrome SLA-DFT ou encore la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson qui sont deux synucléinopathies.

1. Les changements du métabolisme des sphingolipides dans la SLA

Depuis quelques années, de nombreuses études suggèrent que la SLA n'est pas seulement une maladie du MN. En effet, le métabolisme des lipides dans la SLA est un domaine de recherche en plein essor. Ce champ de recherche fait l'objet d'intenses recherches précliniques et cliniques. Les changements du métabolisme lipidique se répercutent sur la gestion des réserves énergétiques ainsi que sur un vaste panel de fonctions cellulaires telles que la maturation neuronale, la transmission du signal nerveux, ou encore la fonction lysosomale. Les études montrent que le métabolisme énergétique est directement lié à l'espérance de vie des patients SLA. Notamment l'hypermétabolisme et la dyslipidémie qui sont des troubles métaboliques cliniquement associés à la sévérité des symptômes. En effet, tandis que l'hypermétabolisme semble plutôt délétère, l'hyperlipidémie semble être un facteur protecteur chez les patients (Dupuis et al., 2008; Jésus et al., 2018). Il est montré qu'un régime alimentaire supplémenté en lipides permet de ralentir la progression de la maladie chez les patients SLA (Dorst et al., 2013; Ludolph et al., 2020). Malheureusement, le domaine de la SLA manque de biomarqueurs qui pourraient être nécessaire à un diagnostic plus précoce de la maladie. Il existe toutefois deux études récentes qui montrent que les patients SLA présentent un profil métabolique spécifique capable de renseigner sur l'évolution de la maladie. En effet, la SM et les triglycérides à longue chaînes sembleraient être corrélés à la progression de la SLA (Blasco et al., 2017, 2018). D'autres récentes études sur la physiopathologie de la SLA ouvrent également la perspective d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Le métabolisme des sphingolipides constitue une de ces cibles thérapeutiques, et plus particulièrement les glycosphingolipides, qui semblent notamment être des modulateurs de l'évolution de la SLA (Cutler et al., 2002). En 2015, l'étude de Dodge et collaborateurs, a mis en évidence que la moelle épinière des patients SLA présentent des augmentations de certains métabolites des glycosphingolipides (tels que le GlcCer, céramide, galactosylcéramide, lactosylcéramide, GM3 et GM1) ainsi que des augmentations des niveaux des enzymes associées et de leurs activités enzymatiques (GBA1, GBA2, hexosaminidase (Hex), galactosylceramidase, α et β -galactosidase). Et fait intéressant, l'inhibition de la synthèse de GlcCer accélère considérablement la progression de la pathologie dans le modèle murin SLA *SOD1^{G93A}*, tandis que l'injection de GM3 dans le cerveau des animaux permet de ralentir le développement de la maladie (Dodge et al., 2015).

Les travaux du laboratoire montrent également une augmentation des niveaux de GlcCer et de GM1 dans le LCR des patients SLA (Henriques et al., 2017). Les études transcriptomiques sur des biopsies musculaires de patients SLA ont mis en évidence une augmentation significative de l'expression du gène *UGCG*, codant pour l'enzyme du métabolisme des sphingolipides qui synthétise le GlcCer. Tout comme les patients SLA, les modèles murins SLA SOD présentent des accumulations de GSLs. Une analyse lipidomique a montré un réarrangement complet des principales classes de lipides, incluant les sphingolipides GlcCer et les céramides, dans les muscles et les moelles épinières des souris *Sod1^{G86R}* et cela bien avant le début de la maladie. Dans les muscles de ces souris, les niveaux de GM3 et de GM2 étaient également augmentés. Par ailleurs, chez les souris nTg ayant subi une axotomie on retrouve aussi des augmentations de GM3/GM2, ce qui suggère qu'elles sont une conséquence de la dénervation. De plus, l'inhibition de la synthèse du GlcCer par l'administration d'un inhibiteur de l'UGCG (l'AMP-DMN) retarde significativement la récupération fonctionnelle après une lésion du nerf sciatique (Henriques et al., 2015a). A l'inverse, une inhibition de la dégradation du GlcCer par l'administration de Condurotol B Epoxyde (CBE), un inhibiteur irréversible de GBA1 et GBA2, améliore la récupération fonctionnelle dans un modèle de régénérescence du nerf sciatique tout en ralentissant la progression de la maladie chez les souris *Sod1^{G86R}* (Henriques et al., 2017). En 2018, nous avons combiné une étude transcriptomique avec une étude lipidomique et nous avons mis en évidence une forte dérégulation du métabolisme des sphingolipides dans la moelle épinière de souris *Sod1^{G86R}* à un âge symptomatique (Henriques et al., 2018). Toutes ces données suggèrent que le GlcCer joue un rôle clé dans la physiopathologie de la SLA et qu'il serait fortement impliqué dans la récupération de l'axe neuromusculaire.

Cependant, même si le CBE est un très bon outil pharmacologique, son profil pharmacologique n'est pas compatible avec une utilisation à finalité thérapeutique. En effet, à forte dose (100mg/kg/d), le CBE induit une toxicité neuronale et peut être utilisé pour inhiber GBA1 et générer un modèle murin chimique de la maladie de Gaucher (Kanfer et al., 1975; Vardi et al., 2016). C'est pour cela, que le laboratoire s'est penché sur l'utilisation d'un autre agent pharmacologique : l'ambroxol hydrochloride. Dans le chapitre C, la molécule d'ambroxol sera plus précisément décrite. La partie « RESULTATS » présentera également un résumé de la publication de nos données sur la molécule dans le modèle *Sod1^{G86R}*, suivie du manuscrit **Bouscary et collaborateurs (2019)** publié dans le journal « Frontiers in Pharmacology » (Bouscary et al., 2019).

2. Les sphingolipides : une voie lipidique potentiellement impliquée dans le syndrome SLA-DFT

Parmi la littérature, il n'existe que peu de publications relatant un lien entre les lipides et le syndrome SLA-DFT. Le lien entre les sphingolipides et cette pathologie est donc d'autant moins connu. Néanmoins, quelques études ont montré que les mutations génétiques impliquées dans la DFT peuvent aussi causer des dysfonctionnements dans les voies des sphingolipides. Par exemple, les mutations dans le gène de la protéine VCP peuvent notamment provoquer une élévation des niveaux de céramide dans les muscles squelettiques des souris *VCP^{R155H/R155H}*. Chez ces souris, on retrouve également une expression élevée de certains gènes de l'autophagie notamment LC3 et P62, traduisant une altération de l'autophagie qui peut être reversée par un régime enrichi en lipides. Chez les patients SLA ou DFT, ces mutations provoquent également des atrophies musculaires, une dégénérescence progressive ainsi que des accumulations des protéines TDP-43 et ubiquitine dans les muscles (Llewellyn et al., 2014). Une autre étude a montré l'implication de la PGRN dans les causes génétiques de DFT. PGRN est une protéine clé dans la régulation des voies lysosomales. Les mutations dans le gène *PGRN* provoquent une réduction de l'activité de GBA1 (Arrant et al., 2019; Valdez et al., 2020). Cet effet serait dû à l'interaction de PGRN avec la saposine C, qui est un activateur critique de GBA1. Les mutations dans le gène *PSAP* (pro-saposine C) sont connues pour causer cliniquement des symptômes proches de ceux de la maladie de Gaucher. Enfin, une étude récente de transcriptomique sur de la moelle épinière de souris SLA-DFT *CHMP2B^{intron5}* a montré que plusieurs enzymes du métabolisme des sphingolipides étaient dérégulées de manière précoce. Notamment l'expression de l'enzyme SPP (responsable de la dégradation de la S1P en sphingosine), et de l'enzyme GALC (qui catalyse la synthèse du GalCer à partir de céramide) étaient diminuées. A l'inverse l'expression de l'enzyme HexB, enzyme de conversion du GM2 en GM3, était surexprimée. Ces dérégulations étaient retrouvées à un âge asymptomatique, ce qui montrent que les altérations de la voie des sphingolipides peuvent apparaître bien avant le début des symptômes moteurs (Waegaert et al., 2020).

Toutes ces altérations du métabolisme des sphingolipides peuvent affecter le métabolisme cellulaire et l'organisation des membranes cellulaires. Cela pourrait expliquer les dysfonctionnements neuronaux retrouvés dans la SLA et la DFT, et plus généralement dans les maladies neurodégénératives, mais pourrait aussi participer à la progression de ces pathologies. Pour ma thèse, j'ai également utilisé l'ambroxol hydrochloride pour étudier les effets d'une modulation des sphingolipides sur le modèle SLA-DFT *CHMP2B^{intron5}*.

3. Les sphingolipides dans les maladies neurodégénératives et à surcharge lysosomale

L'accumulation de sphingolipides dans certaines maladies altère sévèrement le métabolisme des patients. On trouve généralement à l'origine de ces pathologies, une activité enzymatique lysosomale défectueuse de manière complète ou partielle, qui déclenche une accumulation de lipides à l'intérieur des organites du système « endosomal-autophagique-lysosomal ». Ces perturbations contribuent également à la pathogénèse de certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson.

3.1. Les mutations dans les gènes *GBA1* et *GBA2*

a. *Les implications GBA1/GBA2 dans la maladie de Gaucher et de Parkinson*

La perte de l'activité *GBA1* peut fortement moduler la fonction lysosomale, qui intervient dans l'élimination du matériel cellulaire à travers l'autophagie. Des mutations sur le gène codant pour *GBA1* conduisent à des enzymes non fonctionnelles, soit par la perte totale de fonctions, soit par un défaut de l'adressage de *GBA1* vers le lysosome. Ces mutations provoquent une forte accumulation de GlcCer dans les lysosomes. Les mutations *GBA1* peuvent être associées à la maladie de Gaucher et à la maladie de Parkinson (Dodge, 2017; Horowitz et al., 2016; Mullin et al., 2019).

La maladie de Gaucher (MG) est une maladie à surcharge lysosomale, fréquemment retrouvée dans la communauté Ashkénaze, une population juive d'Europe centrale et orientale (particulièrement en Allemagne, Pologne et Russie). La perte totale de fonction de la protéine *GBA1* entraîne une accumulation systémique de GlcCer qui peut être à l'origine de trois formes de MG : une forme « non-neuropathique » (MG de type 1 : GD1) et deux formes « neuropathiques » (MG de type 2 et 3) (Dodge, 2017). La forme de type 1 est marquée par l'absence d'altération neurologique du SNC bien que l'atteinte du SNP sous la forme d'une polyneuropathie symétrique se produise (Biegstraaten et al., 2010). Dans le cas des formes neuropathiques, en plus du SNP, le SNC est touché et une atteinte neurologique est retrouvée. La forme de type 2 se distingue du type 3 par une évolution de la pathologie rapide. Cependant, ces deux formes étant parfois difficiles à discerner, elles sont plus généralement caractérisées par l'appellation « MG neuropathique ou nGD » (Beutler and Gelbart, 1996; Dodge, 2017; Yildiz et al., 2013). Même si génétiquement, aucune corrélation n'a été faite entre la sévérité de MG et le gène *GBA2*, des études suggèrent que *GBA2* serait impliquée dans la physiopathologie de la maladie (Dekker et al., 2011; Horowitz et al., 2016). L'accumulation toxique de sphingosine dans la MG pourrait être due à l'inhibition de l'activité de *GBA2* par la sphingosine elle-même (Schonauer et al., 2017). D'autres données suggèrent que *GBA2* et l'enzyme SMS2 co-localisent

dans la membrane plasmique et que GBA2 est ainsi capable de convertir rapidement le GlcCer en céramide. Ce céramide serait ensuite plus facilement converti en sphingosine (Boot et al., 2007). En accord avec cette théorie, il est montré que la perte de GBA1 dans des fibroblastes de patients atteints de MG diminue les niveaux d'activité de GBA2 (Schonauer et al., 2017). A l'inverse, il est pourtant montré que les niveaux d'activité de GBA2 sont augmentés dans un modèle de souris déficient en GBA1 (Burke et al., 2013) et que les niveaux protéiques et d'ARN messager de GBA2 sont significativement aussi augmentés dans les fibroblastes murins déficients en GBA1 (Yildiz et al., 2013). En 2004, une mutation du gène *GBA3* (le mutant *KLRP D106N*) a été identifiée chez des patients atteints d'une forme sévère de MG, mais la fréquence de cette mutation serait rare (Beutler et al., 2004). Une autre équipe a également étudié la possibilité de l'influence des mutations *GBA3 1368T->A* chez des patients atteints de MG. Cependant, aucune corrélation n'a été observée entre la mutation et la sévérité de la maladie (Dekker et al., 2011). Les traitements actuels de la MG comprennent une thérapie de remplacement enzymatique (ERT) avec du GBA1 recombinant et/ou une thérapie de réduction du substrat (SRT) avec des molécules comme le Miglustat et l'Eliglustat, qui diminuent la biosynthèse du GlcCer et réduisent son accumulation. Plus récemment, une stratégie de « molécule chaperonne » avec la molécule d'AMB, a également été développée pour la MG (Futerman et al., 2004; Horowitz et al., 2016).

Bien qu'il soit répertorié que les patients GD1 ne développent normalement pas d'altérations du SNC, il est démontré depuis les années 2010 que certains d'entre eux présentent une déficience cognitive générale associée à une altération de l'olfaction. Ces symptômes étaient également retrouvés chez les patients hétérozygotes pour *GBA1* non atteints de maladie apparente. Fait intéressant, ils corrélaient également avec la phase préclinique de la maladie de Parkinson (MP) (Mullin et al., 2019). En effet, les mutations dans le gène *GBA1* ont également été considérées comme un facteur de risque très élevé pour la MP. En effet, ces mutations concernent 10 à 25% des patients parkinsoniens (Barrett et al., 2013; Migdalska-Richards et al., 2016; Mitsui et al., 2009; Mullin et al., 2019; O'Regan et al., 2017; Schapira, 2015; Sidransky et al., 2009; Stojkovska et al., 2018). Les personnes atteintes de la MP présentent généralement des symptômes moteurs, mais la maladie se caractérise également par un déclin cognitif insidieux, qui augmente en fonction de la durée de la maladie. Même lorsqu'un seul des deux allèles est atteint, les niveaux de GBA1 sont considérablement réduits (Migdalska-Richards et al., 2016). Dans les modèles cellulaires récapitulant les anomalies biochimiques de la MP, les mutations *GBA1* engendrent une baisse des niveaux de la protéine et de son activité enzymatique, tout en augmentant les accumulations d' α -synucléine et provoquant un défaut de l'autophagie (Shachar et al., 2011; Yang et al., 2017). En effet, cette protéine qui est le composant agrégé majeur de la maladie de Parkinson, semblerait aussi jouer un rôle dans le trafic vésiculaire, notamment au niveau des

endosomes (Burré et al., 2018). En 2016, l'étude de Mazzulli et collaborateurs montre que l'activation de GBA1 induit la clairance de l' α -synucléine et restaure la fonction lysosomale dans des neurones dopaminergiques de patients Parkinsoniens (Mazzulli et al., 2016). Enfin, une autre étude montre que l'inhibition de l'activité GBA1 par l'inhibiteur CBE dans un modèle de souris de synucléinopathies, conduit à une accumulation de GlcCer avec exacerbation du phénotype moteur et cognitif. A l'inverse, augmenter l'activité GBA1 permet de ralentir la progression de la maladie dans ce modèle (Rockenstein et al., 2016). Toutefois, même si de nombreuses hypothèses sont émises sur la façon dont GBA1 influence le développement de la MP, les mécanismes moléculaires liant l' α -synucléine et GBA1 sont encore mal compris. Des études suggèrent que l'accumulation toxique d' α -synucléine et des corps de Lewy dans les neurones seraient la suite d'une potentielle action directe de GBA1 sur l' α -synucléine et/ou, que l'accumulation de GlcCer et ces métabolites induirait l'altération des mécanismes de régulation de l' α -synucléine (Blanz and Saftig, 2016; Migdalska-Richards et al., 2016; Sidransky and Lopez, 2012). L'ensemble de ces données montre que le gène *GBA1* est fortement impliqué dans la physiopathologie de ces maladies.

b. Les mutations GBA2 et les troubles du système nerveux

Les mutations dans le gène *GBA2*, le gène codant pour la GCCase non lysosomale, ont également été associées à plusieurs pathologies affectant le système nerveux. On retrouve dans ces pathologies : la PSH, l'ataxie spastique et l'ARCA (Citterio et al., 2014; Hammer et al., 2013; Sultana et al., 2015; Votsi et al., 2014). Toutefois les mutations *GBA2* sont bien moins caractérisées que les mutations *GBA1*. En effet, seules quelques études ont été réalisées sur des modèles animaux présentant une mutation dans le gène *GBA2* (Martin et al., 2013; Woeste and Wachten, 2017; Woeste et al., 2019). Les données sur *GBA2* semblent néanmoins concorder sur le fait que le gène *GBA2* est important pour la coordination motrice. Sécrété lors des processus de différenciation neuronale (Aureli et al., 2012), l'étude Martin et collaborateurs (2013) suggère que *GBA2* est directement impliqué dans la croissance axonale des MN et dans le comportement moteur. En effet, la perte totale de *GBA2* engendre un phénotype moteur chez le poisson zèbre qui peut être compensé par l'injection d'ARNm *GBA2* humain non muté (Martin et al., 2013). Cette étude suggère que *GBA2* est un acteur clé dans la physiopathologie des PSH.

Les mécanismes moléculaires liant les mutations du gène *GBA2* au développement d'un dysfonctionnement locomoteur restent cependant à éclaircir. En effet, les mutations du gène *GBA2* chez les patients humains ont été associées à une altération de la locomotion et des anomalies neurologiques mais les modèles de souris knockout *GBA2* ou hétérozygotes n'ont pas révélé de symptômes neurologiques ni de défaut de la fonction locomotrice (Yildiz et al., 2006). Chez ces animaux, les analyses ont révélé une forte accumulation de GlcCer dans le cerveau, le foie et les

testicules ainsi qu'un défaut de régénérescence hépatique après hépatectomie partielle. Les mâles déficients en GBA2 sont notamment stériles en raison d'un défaut morphologique des spermatozoïdes survenant pendant la spermatogenèse (Gonzalez-Carmona et al., 2012; Yildiz et al., 2006). Autre fait intéressant, dans le cas de l'injection d'inhibiteur de GCase tel que le Miglustat chez des souris nTg, l'accumulation de GlcCer dans les testicules est retrouvée. Toutefois, l'accumulation de GlcCer n'altère pas nécessairement la spermatogénèse et va dépendre de la souche murine utilisée (Walden et al., 2007). Ces données suggèrent que l'inhibition de GBA2 ne peut se concevoir que de manière partielle (ou transitoire) dans un cadre thérapeutique.

3.2. Homéostasie des gangliosides et dysfonctionnement du système nerveux

Etant donné l'importance des gangliosides dans le système nerveux, la perte de fonction des gènes liés aux gangliosides peut être la cause directe de maladies neuronales. Certaines gangliosidoses sont notamment des maladies neurodégénératives à surcharge lysosomale, caractérisée par une déficience des enzymes intervenant dans la synthèse et la dégradation des gangliosides. Ces maladies résultent en une accumulation de gangliosides dans les lysosomes. La maladie de Sandhoff, caractérisée par la déficience en enzyme HexA/HexB (enzymes de dégradation du GM2 en GM3 et du GA2 en LacCer) et la maladie de Tay-Sachs, caractérisée par la déficience en enzyme HexA, sont des gangliosidoses neurodégénératives à GM2 (Dastsooz et al., 2018; Dodge, 2017; Pan et al., 2017; Sandhoff et al., 1971, 2018). Mais d'autres maladies caractérisées par l'accumulation de GM1 et GM3 ont également été répertoriées. Le Syndrome d'Epilepsie Symptomatique Infantile, comme son nom l'indique, est un syndrome épileptique associée à une cécité et une stagnation du développement chez le nouveau-né. Sans être une gangliosidose, cette pathologie est provoquée par une perte de fonction totale de l'enzyme GM3 synthase (Simpson et al., 2004b). Chez les souris, la perte des enzymes GM2 et GM3 synthase génère une ataxie grave, qui est la conséquence d'une dégénérescence axonale. Il en est de même dans les cas de délétion des enzymes GM2/GD2/GD3 synthase : les souris déficientes pour ces enzymes présentent une neurodégénérescence du cervelet, accompagnée de troubles de la marche et de tremblements (Chiavegatto et al., 2000; Ohmi et al., 2009; Yamashita et al., 2005). Le syndrome de Guillain-Barré est causé par la présence d'anticorps auto-immuns spécifiques des gangliosides complexes ayant pour conséquence une dégénérescence des axones moteurs. Plus précisément, cette maladie est caractérisée par la présence d'anticorps qui se lient aux gangliosides GM1 et GD1a au niveau des nœuds de Ranvier et dans la zone présynaptique des JNM (Kaida et al., 2008; Kuwabara and Yuki, 2013). Ainsi, les altérations du fonctionnement physiologique des gangliosides sont liées à de nombreuses maladies. Toutes ces données démontrent donc l'importance des gangliosides dans le maintien de l'intégrité du système nerveux.

C. L'ambroxol et le métabolisme des glycosphingolipides

L'implication des glycosphingolipides dans la physiopathologie de la SLA a mené notre laboratoire à s'intéresser à de potentielles cibles thérapeutiques. Durant ma thèse, nous avons mis en évidence que les niveaux de GBA2 sont augmentés dans le modèle murin *Sod1^{G86R}*. Pour contrecarrer cet effet, j'ai utilisé un inhibiteur de GBA2 : l'ambroxol hydrochloride (AMB). En effet, l'AMB présente la particularité de stimuler l'activité enzymatique de GBA1 tout en inhibant l'activité enzymatique de GBA2.

1. Qu'est-ce que l'ambroxol ?

Utilisé depuis les années 1970, l'AMB ($C_{13}H_{18}Br_2N_2O$) est un médicament générique expectorant et mucolytique utilisé dans le traitement des maladies des voies respiratoires (toux, bronchites, etc.). L'AMB est le métabolite actif de la bromhexine qui est elle-même un dérivé semi-synthétique de la vasicine, une substance active de la plante *Adhatoda Vasica* (figure 19) (Grange and Snell, 1996; Nepali et al., 2013). Cette plante était utilisée dans l'Inde ancienne pour ces mêmes propriétés (Malerba and Ragnoli, 2008; Weiser, 2008).



Figure 19 : Structures chimiques de la vasicine et de ses dérivés synthétiques.

(A) vasicine, (B) bromhexine, (C) ambroxol. La bromhexine est un dérivé synthétique de la vasicine. L'AMB est le métabolite actif de la bromhexine. Il diffère de la bromhexine par l'absence de groupe méthyle (cercle rouge) et l'introduction d'un groupe hydroxyle (cercle bleu) sur le cyclohexane (cercle vert) de la molécule.

Après administration orale, l'AMB possède une biodisponibilité très élevée de l'ordre de 70-80%, c'est-à-dire que 70 à 80 % de la dose administrée ou du principe actif libéré parvient sous forme inchangée dans la circulation sanguine systémique. L'absorption de l'AMB est rapide : la molécule arrive à la circulation sanguine 1 à 2h après administration orale. Sa demi-vie d'élimination est assez longue, variant entre 7 et 10h selon la forme galénique du médicament : comprimé ou pastille (Faroongsarng et al., 2004; Malerba and Ragnoli, 2008; Rojpiulstet et al., 2003; Yang et al., 2015).

L'AMB est approuvé pour le traitement des maladies respiratoires par la *Food and Drug Administration* (FDA), un organisme américain d'autorisation à la commercialisation des médicaments et denrées

alimentaires sur le territoire des États-Unis. Cet agent pharmacologique fluidifiant des sécrétions bronchiques est capable de passer la BHE, et est de plus en plus envisagé comme traitement thérapeutique pour diminuer les taux de GlcCer de certaines pathologies (Narita et al., 2016). C'est le cas de la MG et de la MP pour lesquelles des procédures d'essai clinique ont déjà débuté ou sont sur le point de commencer (voir « 4 » du chapitre actuel).

Actuellement en vente libre dans la majeure partie de l'Union Européenne, l'AMB a l'avantage de présenter un profil de sécurité favorable à forte dose orale et un très faible risque d'effets secondaires. La toxicologie de l'AMB a largement été étudiée chez de nombreux animaux (chien, rat, lapin, souris, cobaye) et n'a montré que très peu d'effets indésirables quel que soit la voie d'administration (orale, intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale). L'AMB ne s'est montré ni cancérigène, ni embryotoxique, ni tératogène et n'a ni altéré le développement post-natal, ni la fertilité des individus. Les potentiels effets toxiques pouvant être induit par l'AMB sont à l'origine d'un très fort surdosage provoquant les symptômes suivants : dyspnée, ataxie et convulsions. Et tous ces effets se sont montrés réversibles. Aucune histopathologie n'a été retrouvée à la suite de ces tests. D'un point de vue clinique, dans le cadre de maladies respiratoires aiguës et chroniques, un nombre considérable d'études ont été menées pour évaluer l'efficacité de l'AMB (plus de 100 études estimées avec plus de 15 000 patients) (Malerba and Ragnoli, 2008). Il est important de noter que l'AMB s'est révélé sûr lorsqu'il a été administré à des femmes enceintes pour la prévention du syndrome de détresse respiratoire néonatal (Gonzalez Garay et al., 2014). Néanmoins, même si l'AMB est une molécule bien tolérée, de rares cas d'allergie et d'éruptions cutanées ont été répertoriés.

2. Propriétés de l'ambroxol

L'AMB possède des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires qui sont, de nos jours, bien établies et documentées. Au-delà de ses effets sur le mucus des voies respiratoires, l'AMB est connu pour supprimer les symptômes dans les cas d'inflammations chroniques et de douleurs neuropathiques. Les études de l'AMB ont montré que ses propriétés sur le système immunitaire résultaient de ses effets sur les ROS et les cytokines pro-inflammatoires produits lors d'une réaction inflammatoire. D'autres études ont montré que ses effets analgésiques sur le système sensitif périphérique étaient dus à l'inhibition de certains types de canaux sodiques et calciques. Une figure récapitulative des propriétés de l'AMB se trouve à la fin de la sous-partie 2 ([figure 20](#)).

2.1. Propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes

De nombreuses études ont montré que l'AMB a des effets protecteurs sur les tissus et les cellules pulmonaires. En effet, l'AMB est connu pour stimuler la formation et la libération du surfactant pulmonaire (Malerba and Ragnoli, 2008), qui est la substance principale de défense contre les micro-organismes. Il est essentiellement constitué de lipides (phospholipides et acides gras) et de protéines qui permettent d'agrégier les micro-organismes afin de les présenter aux macrophages alvéolaires. Les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de l'AMB sont très liées. Lors d'une réaction inflammatoire pulmonaire, certaines cellules immunitaires (comme les macrophages alvéolaires et les granulocytes neutrophiles) peuvent induire un stress oxydatif par la sécrétion de ROS (radicaux superoxydes et peroxydes d'hydrogènes). Un bon nombre d'étude sur des modèles animaux variés (lapins, rats, souris, chiens) et des cultures cellulaires (cellules de l'immunité), suggèrent que l'AMB protège contre le stress oxydatif en piégeant et dégradant les ROS produits par ce type de cellules ou sont la conséquence d'agents polluants environnementaux (fumée de tabac, gaz diesel, etc.) (Felix et al., 1996; Gillissen et al., 1997; Lee et al., 2002; Nowak et al., 1994). Au-delà de ses effets sur les ROS, l'AMB est également capable de limiter la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Gibbs et al., 1999; Jang et al., 2003; Kim et al., 2002; Ottonello et al., 2003) et, dans le cas de lésions cardiaques induites par la Doxorubicine chez la souris, de limiter la peroxydation des lipides (Nowak et al., 1993, 1995). Malheureusement, il n'existe qu'une seule étude qui porte sur les effets de l'AMB sur l'inflammation cérébrale. L'AMB favoriserait la survie neuronale en limitant le stress du RE des microglies (Jiang et al., 2020b). De plus, une autre étude montre également que l'AMB peut réduire le stress du RE du modèle *Drosophila Melanogaster* qui modélise la maladie de Parkinson via une mutation dans le gène *GBA1* (Sanchez-Martinez et al., 2016). Il serait intéressant de connaître les effets potentiels de l'AMB sur les cellules du SNC dans le cadre de certaines pathologies comme la SLA et la DFT.

Enfin, l'AMB semble également avoir des effets inhibiteurs sur l'enzyme Guanylate cyclase cytosolique, qui est un système de réponse cellulaire lié à l'activité d'une protéine kinase G. L'AMB permettrait d'inhiber l'activation de cette enzyme dépendante du monoxyde d'azote (NO). Dans un contexte inflammatoire, l'enzyme inductible NO synthase (iNOS) qui se trouve dans les macrophages, permet la production de NO. Ce NO est un médiateur de la réponse immunitaire en activant la Guanylate cyclase et les voies de signalisation cellulaires associées à la protéine kinase G. Ainsi, dans les poumons, les niveaux de NO sont impliqués dans les processus physiologiques des voies respiratoires (bronchodilatation, régulation du débit sanguin pulmonaire, battement ciliaire des voies respiratoires, etc.) mais aussi dans les perturbations inflammatoires respiratoires (asthmes, inflammation chronique provoquée par la libération de cytokines TNF- α et IL-1 β , etc.). Les propriétés bénéfiques anti-

inflammatoires de l'AMB sur les voies respiratoires tiendraient donc aussi en partie de son effet inhibiteur sur la Guanylate cyclase cytosolique, en limitant la production de cytokines et de ROS par les cellules après activation de cette enzyme (Severina et al., 2000).

2.2. Propriétés anesthésiques

Les propriétés anesthésiques de l'AMB ont été découvertes lors d'essais ophtalmiques de la molécule qui n'ont pas pu aboutir en solution collyre chez l'homme en raison de sensations de démangeaisons (Malerba and Ragnoli, 2008). Quelques années plus tard, l'AMB est commercialisé en tant que traitement pour les maux de gorge (Fischer et al., 2002; Schutz et al., 2011). De nos jours, nous savons que l'AMB agit sur la transduction des signaux neuronaux, et que les propriétés anesthésiques de l'AMB tirent leurs effets de ses actions sur les canaux voltage-dépendants Na^+ et Ca^{2+} . Néanmoins, même si l'AMB possède des propriétés anesthésiques qui ont cliniquement été démontrées dans des études de maux de gorge chez le patient, aucune autre donnée ne démontre clairement son mécanisme sur le système nerveux.

a. Les canaux sodiques voltage-dépendants Na^+

Les effets de l'AMB sur la douleur ont été mis en évidence grâce à des tests neuropathiques sur des modèles animaux. Les effets de l'AMB se sont révélés efficaces chez les animaux dans le cas de douleurs chroniques comme l'inflammation et les douleurs neuropathiques persistantes mais pas dans le cadre de douleur aiguë (douleur intense, limitée dans le temps). Ces effets sont la conséquence d'une inhibition sélective des canaux ioniques. Notamment la forte inhibition des canaux voltage-dépendants sodiques Nav1.8 et plus faiblement Nav1.2 (Gaida et al., 2005). Les canaux sodiques (Nav) sont des pores ioniques sélectifs aux ions sodium, dont l'ouverture est contrôlée par le potentiel transmembranaire. Les canaux Nav1.8 sont des canaux résistants à la tetrodotoxine (TTX-r) exprimés spécifiquement dans les neurones sensoriels non myélinisés des ganglions spinaux. Ils sont impliqués dans la nociception mais ne sont pas exprimés dans le SNC, à l'inverse des canaux Nav1.2 qui sont essentiellement exprimés dans les neurones du cerveau. La suppression de la fonction du canal Nav1.8 par blocage pharmacologique, ou par réduction des niveaux protéiques, atténue de manière efficace le comportement lié à la douleur inflammatoire et neuropathique sans provoquer de déficit moteur chez les animaux (Ekberg et al., 2006; Jarvis et al., 2007; Lai et al., 2002; Yoshimura et al., 2001). En 2002 et 2006 Weiser et collaborateurs ont montré, grâce à une expérience de patch-clamp sur des neurones de ganglions spinaux et sur des cellules recombinées exprimant les Nav1.2, que l'AMB bloque très fortement les courants Nav1.8 et faiblement les canaux Nav1.2. Les canaux sodiques qui sont exprimés dans les neurones sensoriels sont les cibles principales des analgésiques. Ainsi, les auteurs de ces deux études ont conclu que l'expression des Nav1.8 étant essentiellement limitée aux neurones

sensoriels, les inhibiteurs sélectifs des canaux Nav1.8 sont des analgésiques efficaces avec un faible risque d'induire des effets secondaires (Weiser, 2006; Weiser and Wilson, 2002).

b. Les canaux calciques voltage-dépendants Ca^{2+}

Les canaux calciques voltage-dépendants représentent une des voies principales d'entrée du calcium dans les neurones. La caractérisation moléculaire de plus en plus fine des voies de la nociception a montré l'implication des canaux calciques dans le traitement de la douleur. L'auteur Weiser (2008) est aujourd'hui le seul auteur à montrer que l'AMB agit sur certains types de canaux calciques (L et N) des neurones sensoriels (Hull and Lyon, 2018; Weiser, 2008).

2.3. Autres potentielles actions pharmacologiques

Plus récemment, une étude pharmacologique de l'AMB a pu mettre en évidence de nouvelles cibles de la molécule. En effet, l'AMB semblerait être un antagoniste des récepteurs 5-HT3 (5-hydroxytryptamine) et un inhibiteur du transporteur de la sérotonine SERT (Hull and Lyon, 2018). Le récepteur 5-HT3 est un récepteur ionotrope cationique activé par la sérotonine. Il est retrouvé au niveau des extrémités des fibres sensibles impliquées dans les réflexes nauséux.

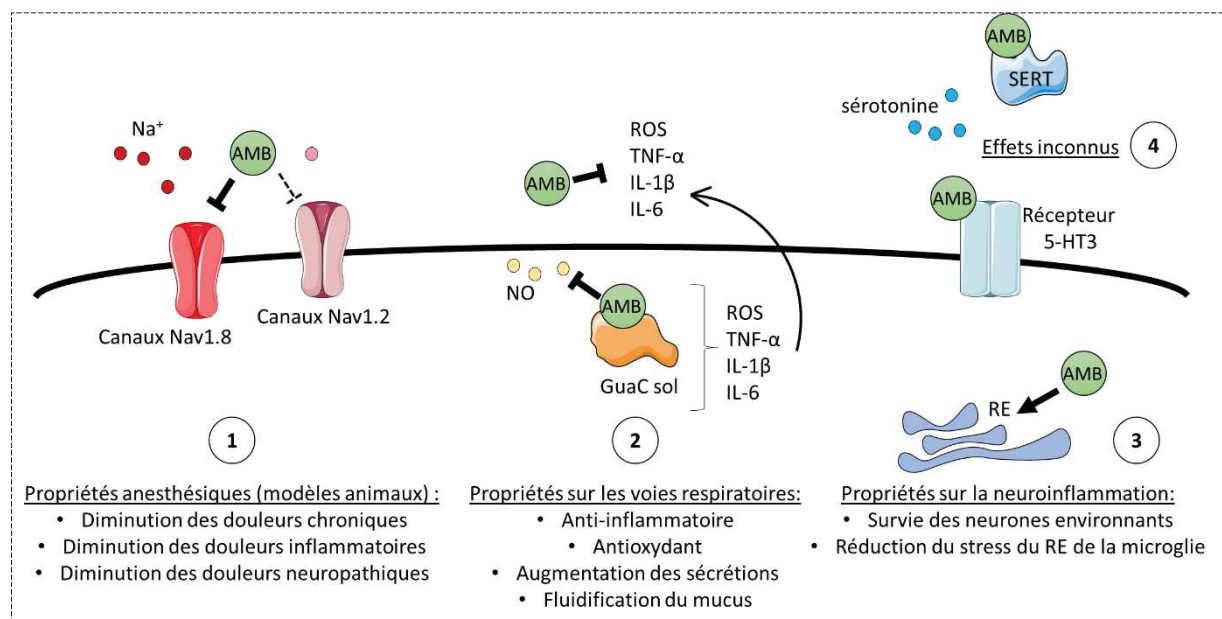


Figure 20 : Effets connus et supposés de l'AMB.

(1) L'AMB possède des propriétés anesthésiques qui seraient liées à l'inhibition de canaux Nav1.8 impliqués dans la nociception. (2) Les propriétés de l'AMB sur les voies respiratoires seraient liées à l'inhibition de la Guanylate cyclase soluble (GuaC sol). Le monoxyde d'azote (NO) ne peut donc plus se lier à la GuaC sol, ce qui limite la réponse inflammatoire. L'AMB semblerait également capable de favoriser la dégradation des ROS et des cytokines produites par les cellules. (3) L'AMB aurait des propriétés sur la neuroinflammation en limitant le stress du RE et l'activation microgliale, favorisant la survie des neurones. (4) L'AMB semblerait inhiber le transporteur de la sérotonine SERT et les récepteurs 5-HT3 impliqués dans le réflexe nauséux. Aucune donnée ne répertorie les effets de l'AMB sur les voies sérotoninergiques.

3. L'ambroxol : une molécule chaperonne et inhibitrice

3.1. La stratégie « molécule chaperonne »

L'AMB se situe au sein d'une nouvelle stratégie thérapeutique pour les maladies incurables présentant un défaut enzymatique : la « Pharmacological Chaperone Therapy » ou « thérapie chaperonne ». Cette stratégie consiste à utiliser une petite molécule capable d'entrer dans les cellules et de promouvoir l'activité d'une enzyme défaillante pour par exemple empêcher la formation d'agrégats toxiques, responsables de la mort des neurones (Arakawa et al., 2006; Brooks, 2007; Fan, 2003; Parenti et al., 2015). Ces petites molécules sont capables de se lier spécifiquement aux enzymes mutantes pour promouvoir leur bon repliement dans le RE ainsi que leurs redonner leurs fonctions ([figure 21](#)). Une expérience de thérapie chaperonne a été démontrée en 2007 par Lieberman et collaborateurs, dans le cas de l'utilisation d'Isogomine sur des fibroblastes de patients atteints de la MG (Lieberman et al., 2007). Cette molécule est capable de lier le site actif de l'enzyme GBA1 pour assurer son bon repliement, stabiliser sa structure et augmenter son activité enzymatique. Cette expérience démontre que la stratégie de molécule pharmacologique chaperonne pourrait être envisagée pour les nombreuses maladies concernées par l'agrégation de protéines malconformées (maladies d'Alzheimer, MP, Huntington, etc.) ou encore pour les maladies à carence enzymatique entraînant des surcharges lysosomales (MG, entre autres).

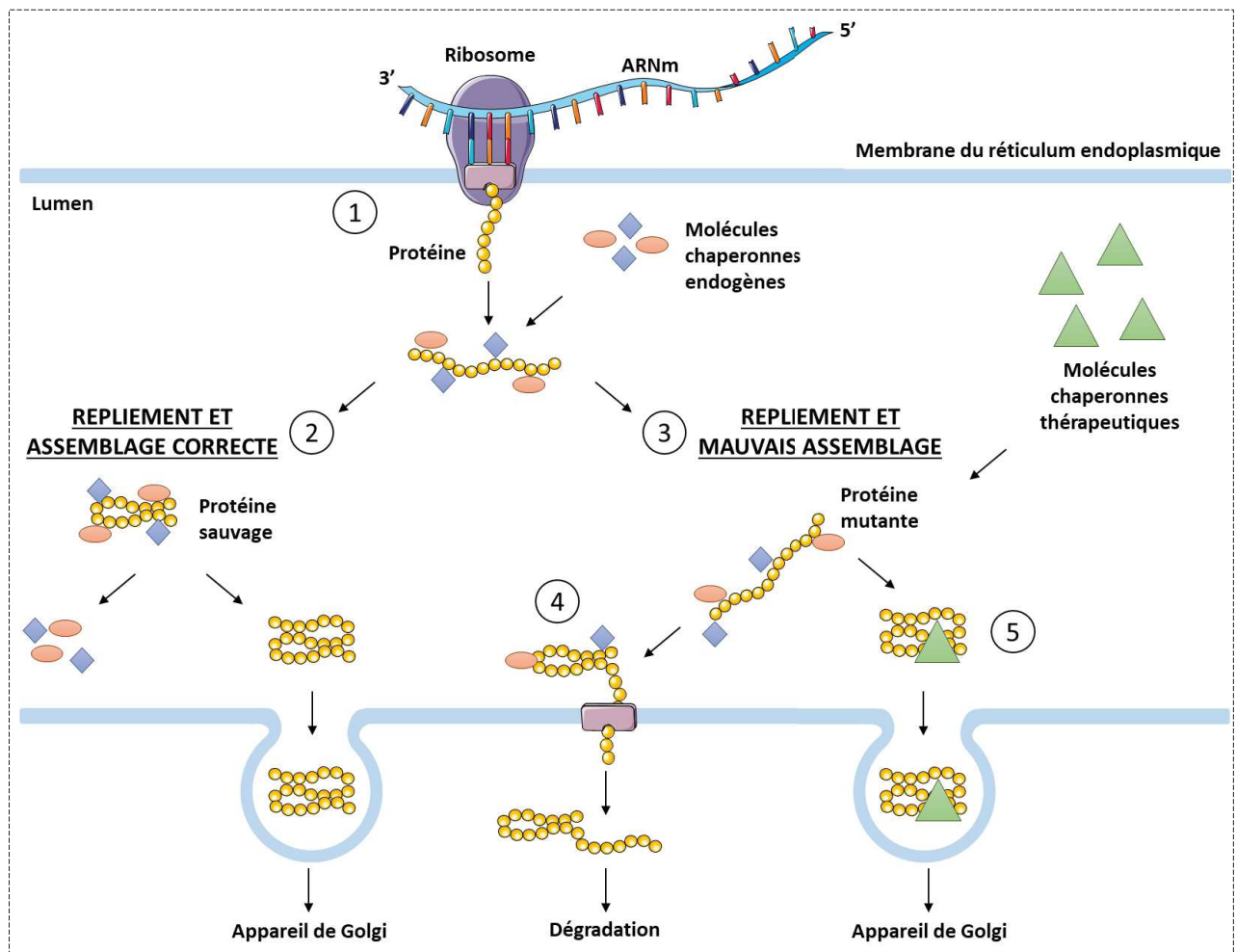


Figure 21 : Principe de la « Pharmacological Chaperone Therapy ».

(1) Lorsqu'une nouvelle protéine est synthétisée, les protéines chaperons ont la fonction d'assister les autres protéines dans leur maturation. Elles assurent leur bon repliement tridimensionnel. (2) Les protéines correctement assemblées et repliées sont transportées en dehors du RE. (3) Les protéines malconformées et mal-assemblées sont dégradées (4). Dans le cas de l'utilisation de molécules chaperonnes, ces molécules se fixent sur le site actif des enzymes mutantes pour induire leur bon repliement et leur transport vers l'appareil de golgi (5). L'activité enzymatique de ces enzymes mutées est ainsi assurée (inspirée de Fan, 2003).

3.2. L'ambroxol et ses interactions avec les enzymes GBA1/GBA2

L'AMB est un inhibiteur allostérique mixte c'est-à-dire un inhibiteur qui n'entre pas en compétition directe avec le substrat GlcCer, puisqu'il agit en se liant au site « allostérique » sans bloquer la liaison du substrat au site catalytique (Nussinov and Tsai, 2012). Des études ont montré que l'AMB est une molécule chaperonne de la GCase GBA1 lysosomale ([figure 22A](#)) et possède des propriétés inhibitrices sur la GCase non-lysosomale GBA2 ([figure 22B](#)) (Maegawa et al., 2009; Shanmuganathan and Britz-McKibbin, 2011). GBA1 assure sa fonction enzymatique au niveau des lysosomes dans des conditions fortement acide (pH 4,3). Lorsque le gène *GBA1* est muté, l'enzyme est malconformée et ne peut plus être apportée au lysosome. L'AMB est connu pour améliorer la stabilité conformationnelle de GBA1 et augmenter les niveaux de protéines GBA1. Dès un pH de 5,6 l'AMB peut réduire l'activité enzymatique

de GBA2. Les propriétés de liaison de l'AMB à GBA2 dépendent du pH. En effet, l'affinité de l'AMB pour l'enzyme GBA2 seule (donc sans liaison du substrat) est plus forte à pH 5.6. A pH 7, l'inhibition de GBA2 par l'AMB est encore plus forte lorsque l'enzyme est liée à son substrat. L'IC50 dépend aussi fortement du pH : plus le pH est proche du neutre, plus l'inhibition est forte. Selon l'étude de Maegawa et collaborateurs, l'IC50 de l'AMB à pH 6.7 est de 8,1 μ M (Maegawa et al., 2009).

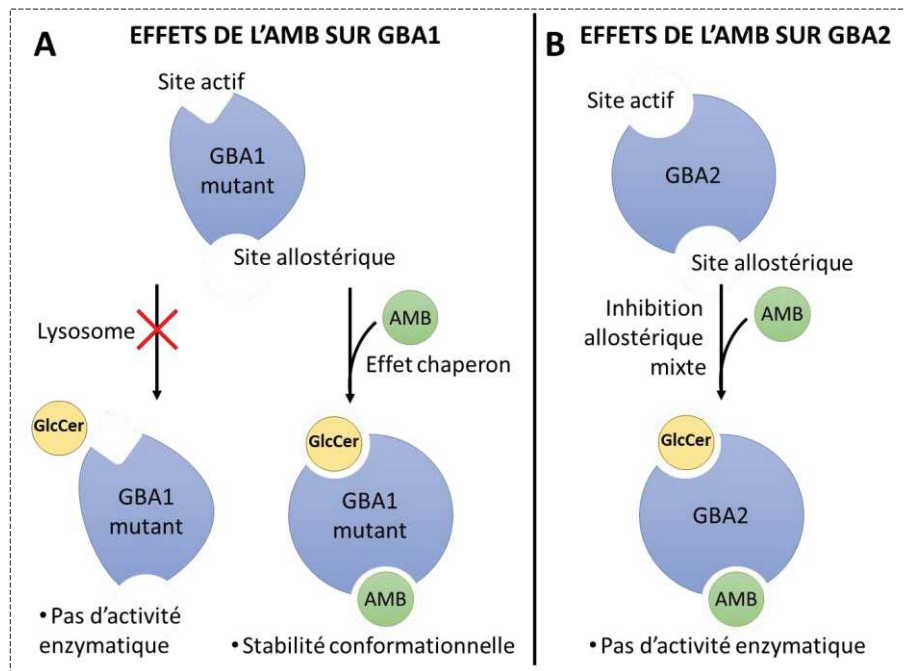


Figure 22 : Propriétés chaperonnes et inhibitrices supposées de l'AMB.

(A) Dans certaines pathologies, l'enzyme GBA1 mutée présente une malconformation qui ne permet pas son adressage vers le lysosome. Il est montré que l'AMB possède des propriétés chaperonnes capables d'assurer la bonne conformation de l'enzyme, ce qui permet un meilleur adressage de l'enzyme vers le lysosome. (B) L'AMB est un inhibiteur allostérique mixte pour GBA2. La liaison de l'AMB sur le site allostérique de GBA2 inhibe son activité enzymatique.

4. L'ambroxol dans la maladie de Gaucher et la maladie de Parkinson : des souris aux essais cliniques

Les deux dernières décennies ont montré de réel progrès dans le développement de thérapies pour traiter les maladies caractérisées par une accumulation de substrat. La MP et la MG sont deux pathologies concernées par l'accumulation toxique de GlcCer dans le système nerveux. Cette accumulation est due à un déficit d'activité enzymatique de GBA1. La stratégie thérapeutique est d'utiliser l'AMB comme molécule chaperonne pour restaurer l'activité enzymatique de GBA1 en améliorant son adressage vers le lysosome et en augmentant son activité. Ci-dessous je présenterai les principales études menées sur l'animal qui ont permis les essais cliniques actuels. Des tableaux récapitulatifs des études présentées ci-dessous sont disponibles à la fin de chaque sous-partie.

4.1. Les thérapies de la maladie de Gaucher (MG)

Nous avons vu précédemment que les mutations associées à GBA1 provoquent un mauvais repliement post-traductionnel, empêchant l'adressage de l'enzyme vers le lysosome. L'accumulation de GlcCer est ainsi la conséquence principale de la MG. De nos jours, il existe 3 formes de thérapies pour la MG. Bien qu'elles ne soignent pas totalement la pathologie, ces thérapies améliorent considérablement les symptômes. La thérapie de remplacement enzymatique (ERT) consiste à remplacer l'enzyme défectueuse ou absente par une injection intraveineuse de l'enzyme en question. Mais cette méthode ne permet pas un passage de l'enzyme dans le SNC. Une autre thérapie consiste en la réduction du substrat (SRT) par inhibition de la synthèse de GlcCer et ses dérivés. Enfin, la plus récente est la stratégie « molécule chaperonne », dont les molécules données passent la BHE et sont capables de « réparer » des protéines malconformées pour leur redonner leurs fonctions (Horowitz et al., 2016).

Le Miglustat et l'Eliglustat sont les molécules qui sont actuellement approuvées dans le cas d'un traitement de la MG par SRT. Ces molécules sont des inhibiteurs de UGCG, enzyme de dégradation du céramide en GlcCer. Malgré leur passage de la BHE, ces molécules ne sont pas capables de compenser les altérations du SNC rencontrées dans les formes nGD (Childers et al., 2020; Kim et al., 2020; Nabizadeh et al., 2018). Même si le Miglustat et l'Eliglustat rééquilibrent la balance de synthèse et de dégradation du GlcCer dans la MG, d'autres alternatives de SRT sont actuellement en train d'être développées. Notamment des alternatives capables de corriger l'accumulation de GlcCer grâce à des molécules qui facilitent le trafic de la GCase GBA1 du RE vers le lysosome. C'est le cas de la molécule d'AMB (Bendikov-Bar et al., 2011; Lieberman et al., 2007; Maegawa et al., 2009). Les premiers essais cliniques de l'AMB sur la MG ont fait suite à des tests sur des animaux, essentiellement murins, qui ont permis de confirmer les propriétés pharmacologiques chaperonnes de la molécule dans ce type de pathologie. Les traitements à l'AMB dans la MG se sont avérés efficaces chez la souris et les fibroblastes des patients. Les fibroblastes de patients atteints de MG et porteurs de mutation hétérozygote GBA1 (avec et sans MP) ont une activité enzymatique de GBA1 fortement diminuée et un niveau de ROS cellulaire très élevé. Ces anomalies sont reversées en présence d'un traitement à l'AMB (McNeill et al., 2014). L'une des principales études qui a confirmé la dépendance de l'AMB au pH pour lier et stabiliser l'enzyme GBA1 est celle de Maegawa et collaborateur en 2009. Dans cette étude, les auteurs montrent que le traitement à l'AMB augmente significativement l'activité de la GCase mutante et les niveaux de protéines GBA1 dans les fibroblastes des patients atteints de MG. Ces augmentations se limitent principalement à la fraction enrichie en lysosomes des cellules traitées. De plus, dans les lymphoblastes de patients MG, l'AMB augmente aussi l'activité de la GCase et réduit le stockage du glucosylcéramide (Maegawa et al., 2009). En 2013, Luan et collaborateurs ont testé la toxicité de l'AMB dans les cellules de patients atteints de MG et sur des souris sauvages. Dans cette étude, les auteurs

montrent que l'AMB améliore l'activité de GBA1 dans les fibroblastes des patients mais aussi dans cervelet, le cœur et la rate des souris sauvages, même à forte dose et sans induire de toxicité. Toutefois, *in vivo*, les doses les plus fortes ont semblé être les doses les plus efficaces (3mM et 10mM) et *in vitro*, les doses au-delà de 60µM ont commencé à induire de la cytotoxicité (Luan et al., 2013).

Actuellement, il n'existe que très peu d'essais cliniques (phase 2) utilisant de l'AMB dans la MG. Parmi les études les plus récentes, on retrouve deux d'entre elles qui combinent une stratégie d'ERT avec l'AMB (Ishay et al., 2018, procédure en cours de recrutement, ID ClinicalTrials.gov : NCT03950050) (Kim et al., 2020 ; KCT0003218). La première étude est proposée aux patients atteints de la MG qui ne répondent pas suffisamment bien au traitement ERT. Peu d'informations sont encore disponibles sur cette étude en cours de recrutement de patients. L'étude de Kim et collaborateurs a duré 4,5 ans et s'est porté sur 4 patients. Selon cette étude, les 2 premières années de traitement à 21mg/kg/jour n'ont pas montré d'effets de l'AMB, et les symptômes cognitifs des patients se sont aggravés. Toutefois, ces symptômes ont été améliorés après une augmentation de la dose d'AMB à 27mg/kg/jour. A long terme, la combinaison d'AMB et d'ERT a permis de stopper la progression des manifestations neurologiques. Deux autres études utilisant l'AMB dans la MG semblent encourageantes. En effet, dans l'étude de Narita et collaborateur en 2016, l'administration orale d'AMB a permis d'augmenter l'activité enzymatique de GBA1 et d'améliorer les symptômes cliniques des patients tels que la myoclonie et l'altération des fonctions motrices (étude menée sur 5 patients avec des doses d'AMB de 25 mg/kg/jour) (Narita et al., 2016). Enfin, un enfant de l'âge de 5 ans atteint de la MG, a été traité à l'AMB pendant 3 ans (15mg/kg/jour). Le traitement a montré des effets thérapeutiques notables, notamment une réduction de la taille de la rate et du foie, une amélioration des paramètres hématologiques (hémoglobine et taux de plaquettes proche de la normal) et une amélioration morphologique des os de la hanche (Jiang et al., 2020a).

Toutes ces données montrent le potentiel thérapeutique de l'AMB et de ses effets sur la voie du GlcCer. Ce qui permet d'envisager l'AMB dans d'autres maladies neurodégénératives concernées par les dérégulations du GlcCer, comme la SLA.

Maladie	Modèle(s)	Effets de l'AMB	Dose	Référence
Maladie de Gaucher	Fibroblastes	Stabilisation de la conformation de GBA1 Augmentation de son activité enzymatique	60 µM	(Maegawa et al., 2009)
	Fibroblastes	Réduction du stockage du GlcCer	20µM	
	GCase humaine recombinante	L'inhibition de l'activité enzymatique de GBA2 dépend du pH	Dose maximale 125µM	
	Fibroblastes	Augmentation de l'activité GBA1	Dépendante de la mutation (entre 0,3 et 3 µM)	(Luan et al., 2013)
		Cytotoxicité <i>in vitro</i>	60µM	
	Souris nTg	Augmentation de l'activité GBA1 dans le cervelet, le cœur et la rate Pas de toxicité <i>in vivo</i>	3mM et 10mM	
	Fibroblastes	Diminution des ROS Augmentation de l'activité GBA1	60µM	(McNeill et al., 2014)
	Patients	Non déterminé	600 mg/jour	(Ishay et al., 2018); procédure en cours de recrutement, ID ClinicalTrials.gov : NCT03950050
	Patients	Augmentation de l'activité GBA1 ; Diminution de la myoclonie Augmentation des fonctions motrices	Dose maximale : 1300mg/jour	(Narita et al., 2016)
	Patients	Pas d'effets	21mg/kg/jour	(Kim et al., 2020); KCT0003218
Effets bénéfiques sur la progression des manifestations neurologiques		27mg/kg/jour		
Enfant patient	Réduction de la taille de la rate, du foie et améliorations des paramètres hématologiques et squelettiques	15mg/kg/jour	(Jiang et al., 2020a)	

Tableau 1 : récapitulatif des effets de l'AMB dans la maladie de Gaucher.

4.2. L'ambroxol une nouvelle thérapie pour la maladie de Parkinson (MP)

Ces dernières années, des équipes scientifiques ont investigué la possibilité d'un traitement AMB dans la MP. L'ensemble des études que je vais présenter ci-dessous ont été menées sur différents modèles de la MP. Je présenterai également les essais cliniques actuels qui testent le potentiel thérapeutique de l'AMB sur la MP. La majorité de ces études a été menée par l'équipe du Pr Schapira et ses collaborateurs.

En 2014, les travaux de McNeill et collaborateurs ont montré sur des fibroblastes de patients atteints de MG et de patients portant une mutation de GBA1 (Parkinsonien ou non), que l'AMB améliore le processus lysosomal défectueux retrouvé dans ces cellules. Une étude semblable a montré les mêmes effets en 2017, où l'AMB s'est également révélé efficace sur les niveaux d' α -synucléine qui étaient considérablement réduits (Yang et al., 2017). En 2016, Migdalska-Richards et collaborateurs ont montré que l'AMB pouvait augmenter l'activité de GBA1 cérébrale, réduire les niveaux d' α -synucléine

(phosphorylée ou non) chez les souris sauvages, mutées pour *GBA1* ou surexprimant l' α -synucléine. Sur les 4 doses utilisées (1mM ; 3mM ; 4mM ; 5mM, eau de boisson) seule la dose 4mM s'est montré significativement efficace (Migdalska-Richards et al., 2016). Ces mêmes auteurs ont également mesuré les niveaux de GBA1 cérébral chez le primate non humain après traitement AMB, et seule la dose de 100mg/jour a augmenté les niveaux d'activité de GBA1 mais aussi ceux de l'enzyme HexB (enzyme impliquée dans la synthèse de GM3). Cependant, dans cette étude, les tests statistiques ne permettent pas de conclure étant donné le faible nombre d'animaux par traitement (n=1) (Migdalska-Richards et al., 2017). L'AMB semblerait également montré des propriétés « neuro-régénératrices ». Après 1 mois d'injection intrastriatale unilatérale au 6-OHDA (6-hydroxydopamine, agent dopaminergique toxique), des rats nTg ont été traités à l'AMB à des doses de 800mg/kg/jour. Ils ont présenté au fur et à mesure du traitement à l'AMB, une restauration des performances motrices mais également une élévation des niveaux de la Tyrosine hydrolase (TH) et le transporteur dopamine DAT (marqueurs des concentrations dopaminergiques cellulaires) et une réduction des niveaux d' α -synucléine (Mishra and Krishnamurthy, 2020).

Ces études ont mené à deux essais cliniques de phase 2 sur la MP. L'une de ces deux études évalue le potentiel de l'AMB sur les symptômes cognitifs et moteurs chez les patients atteints de démence Parkinsonienne (Silveira et al., 2019, procédure en cours de recrutement, ID ClinicalTrials.gov : NCT02914366), tandis que la seconde étude évalue le potentiel thérapeutique de l'AMB sur des patients atteints de la MP avec et sans mutations GBA1 (Mullin et al., 2020, procédure en cours, ID ClinicalTrials.gov : NCT02941822). L'étude de Silveira et collaborateurs, recrutant encore des patients, ne présente pas encore de résultats. L'étude portera sur 75 patients atteints de MP (d'atteintes légères à modérées) qui seront traités au placebo, ou par un traitement fort ou faible d'AMB (1050 mg/jour ; 525 mg/jour respectivement). L'étude de Mullin et collaborateurs, actuellement en cours, montre déjà des résultats positifs. Cette étude compte 17 patients (8 avec mutations GBA1, 9 sans) qui ont reçu des doses croissantes d'AMB (jusqu'à 420mg, 3 fois par jour en fin d'étude). Le traitement à l'AMB n'a pas montré d'effets indésirables particuliers et a bien été toléré par les patients. L'AMB a bien pénétré le LCR, témoignant d'un passage dans le SNC, et a modulé les activités GCCase dans le LCR et les cellules. Concernant le LCR, l'étude n'a pas montré de corrélation entre les concentrations d'AMB et les variations de l'activité des GCCase. Toutefois, les concentrations en α -synucléine étaient augmentées dans le LCR, suggérant que l'exocytose de cette protéine par les cellules du SNC a été stimulée par l'AMB. Le LCR ayant des propriétés d'élimination des « déchets », ces résultats semblent en faveur de la molécule. De plus, lors de l'évaluation motrice des patients, l'AMB semble avoir amélioré les scores. Ces résultats qui se sont montrés concluant sur les deux cohortes de patients, avec et sans mutations

GBA1, permettent ainsi d'envisager l'AMB dans le traitement des maladies avec accumulation protéique.

Maladie	Modèle(s)	Effets de l'AMB	Dose	Référence
Maladie de Parkinson	Fibroblastes	Processus lysosomal amélioré	60µM	(McNeill et al., 2014)
	Souris nTg Souris GBA1 ^{L444P/+} Souris surexprimant l'α-synucléine humaine	Augmentation cérébrale de GBA1 Réduction des niveaux d'α-synucléine	4mM	(Migdalska-Richards et al., 2016)
	Primate non humain	Augmentation de GBA1 et de HexB cérébral	100mg/jour	(Migdalska-Richards et al., 2017)
	Lignées NCSC de patients PD et de porteurs de mutations GBA1	Processus lysosomal amélioré Diminution des niveaux d'α-synucléine	60µM	(Yang et al., 2017)
	Rats nTg	Restauration des performance motrices après injection de 6-OHDA Augmentation de la TH et DAT Réduction des niveaux d'α-synucléine	800mg/kg/jour	(Mishra and Krishnamurthy, 2020)
	Patients	Non déterminé	Dose minimale : 525mg/jour Dose maximale : 1050mg/jour	(Silveira et al., 2019), procédure en cours de recrutement, ID ClinicalTrials.gov : NCT0291436
	Patients	Innocuité de la molécule Passage dans le SNC Modulation des activités GCCase Stimulation de l'activité lysosomale	1,23g/jour	(Mullin et al., 2020), procédure en cours, ID ClinicalTrials.gov : NCT02941822

Tableau 2 : récapitulatif des effets de l'AMB dans la maladie de Parkinson.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE THÈSE

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE THESE

La SLA et la DFT sont deux maladies neurodégénératives fatales pour lesquelles il n'existe, à ce jour, aucun traitement curatif. Lorsque l'origine de ces maladies n'est pas génétique, elle est généralement inconnue. Plus de 90% des SLA et 70% des DFT sont sporadiques. Malgré un tableau clinique qui peut opposer ces deux maladies, il existe bel et bien un continuum qui permet de lier la SLA et la DFT. En effet, 15-20% des patients SLA développent une DFT, tandis que 15% des patients DFT développent une SLA (Ling et al., 2013; Nguyen et al., 2018). Si l'aspect clinique n'est pas le lien le plus évident entre ces deux maladies, l'aspect génétique l'est en revanche un peu plus puisque ces deux pathologies partagent un même terrain génétique. En effet, de nombreux gènes de causalité sont en commun dans la SLA et la DFT. De plus, dans la SLA comme dans la DFT, certains patients présentent une hyperlipidémie ainsi qu'un hypermétabolisme. Si ces deux caractéristiques ne sont pas très étudiées dans la DFT, elles ont montré que dans la SLA, ce sont des facteurs prédictifs de l'évolution de la maladie. Tandis que l'hypermétabolisme est délétère chez les patients SLA, l'hyperlipidémie semble plutôt protectrice (Dupuis et al., 2008; Jésus et al., 2018). Ainsi, les patients SLA qui possèdent des ratios élevés en LDL/HDL, en triglycérides et cholestérols, présentent un avantage de survie plus élevée (Dorst et al., 2011; Dupuis et al., 2008). Une étude montre également qu'un régime alimentaire supplémenté en lipides permet de ralentir la progression de la maladie des patients SLA (Dorst et al., 2013).

Au-delà de leur rôle dans le métabolisme énergétique, les lipides interviennent dans les voies de signalisations cellulaires mais surtout dans la maintenance et la réparation des différentes composantes de l'axe moteur comme les neurones et les muscles. Depuis quelques années, la communauté scientifique a mise en évidence une dérégulation des glycosphingolipides, une classe de lipides complexes, dans la SLA. Notamment une dérégulation des niveaux de GlcCer. Une étude transcriptomique réalisée à partir de biopsie musculaire de patients SLA a permis au laboratoire de mettre en évidence une augmentation significative de l'expression du gène *UGCG*, codant pour l'enzyme du métabolisme des sphingolipides qui synthétise le GlcCer (Henriques et al., 2015a). Cette perturbation est également retrouvée dans les muscles et la moelle épinière des souris *Sod1^{G86R}*, dont les niveaux de sphingolipides sont particulièrement dérégulés, et cela bien avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie. Les travaux de cette même étude ont également montré que l'injection d'un inhibiteur de l'enzyme UGCG, est délétère et ralentit la récupération fonctionnelle après compression nerveuse. Ces résultats suggèrent que le GlcCer contribue à la stabilité de l'unité motrice. La dégradation du GlcCer est réalisée par les enzymes GBA1 et GBA2. GBA1 se localise au niveau du lysosome tandis que GBA2 intervient au niveau du RE et de la membrane plasmique. En

2017, les travaux du laboratoire ont mis en évidence que l'administration de CBE, un inhibiteur irréversible des enzymes GBA1 et GBA2, améliore la récupération fonctionnelle dans un modèle de compression du nerf sciatique (Henriques et al., 2017). Par ailleurs, cette même étude a montré que le CBE permet de ralentir la progression de la maladie des souris SLA *Sod1^{G86R}*. La voie du GlcCer semble donc jouer un rôle crucial dans la physiopathologie de la SLA.

Toutefois, le profil pharmacologique du CBE n'est pas compatible avec un traitement thérapeutique, du fait de sa toxicité à long terme. C'est pourquoi le laboratoire s'est penché sur l'utilisation d'un autre agent pharmacologique : l'AMB. L'AMB est un médicament générique expectorant et mucolytique utilisé dans le traitement des maladies des voies respiratoires. L'AMB a l'avantage de présenter un profil de sécurité favorable. Il est également décrit comme étant une molécule chaperonne. En effet, l'AMB est capable de favoriser l'adressage de GBA1 vers le lysosome et d'augmenter son activité enzymatique. En plus de son activité chaperonne sur GBA1, l'AMB a la capacité d'inhiber l'activité enzymatique de GBA2. Malgré la dérégulation du métabolisme du GlcCer dans la SLA, cette maladie n'est pas caractérisée par une accumulation toxique de GlcCer dans les lysosomes. Des études suggèrent que certains sphingolipides précurseurs du GlcCer, notamment les gangliosides, sont capables de potentialiser les neurotrophines et leurs récepteurs. Il est donc possible que les effets bénéfiques de l'AMB dans les maladies neurodégénératives résident aussi dans sa capacité à stimuler ou interagir avec ces facteurs neuroprotecteurs.

L'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer l'impact d'une modulation des glycosphingolipides, grâce à une approche pharmacologique, sur le développement de la maladie d'un modèle murin de SLA mais aussi de SLA-DFT. Pour cela, j'ai tout d'abord utilisé l'AMB sur le modèle *Sod1^{G86R}* pour vérifier ses effets sur le comportement moteur des animaux *Sod1^{G86R}*, qui présentent une augmentation de l'enzyme GBA2 dans la moelle épinière. En parallèle, j'ai également commencé à vérifier *in vivo* que les effets bénéfiques de l'AMB sont liés à l'inhibition de GBA2. Pour cela j'ai utilisé un inhibiteur spécifique de GBA2. Puis dans un second temps, j'ai étudié les effets de l'AMB sur le modèle SLA-DFT *CHMP2B^{intron5}* afin de déterminer si, au-delà des bénéfices de l'AMB sur la composante motrice, la molécule peut également améliorer les altérations comportementales retrouvés chez les souris *CHMP2B^{intron5}*. Etant donné l'activité chaperonne de l'AMB, j'ai également étudié ses effets sur quelques gènes des voies lysosomales et autophagiques.

Les résultats de cette thèse seront répartis en trois parties :

- Dans un premier temps, je présenterai le premier article publié au cours de ma thèse, où nous avons combiné une étude transcriptomique avec une étude lipidomique pour affiner notre

compréhension des troubles métaboliques de la SLA. Cette étude met en évidence la forte dérégulation du métabolisme des sphingolipides dans la moelle épinière des souris *Sod1^{G86R}* symptomatiques.

- La partie suivante est la seconde publication de ma thèse, qui traite des effets bénéfiques de l'AMB sur l'évolution de la pathologie, la durée de vie des souris *Sod1^{G86R}* et de ses propriétés bénéfiques sur l'axe moteur. En plus de cette publication, j'ai ajouté une partie supplémentaire sur nos travaux les plus récents qui visent à confirmer *in vivo* la cible GBA2, et cela grâce à un second agent pharmacologique ayant une forte affinité et spécificité pour GBA2.
- La troisième partie est constituée d'une publication en cours de préparation, qui présente les effets bénéfiques de l'AMB sur l'axe moteur des souris SLA-DFT *CHMP2B^{intron5}* ainsi que sur les changements comportementaux retrouvés dans ce modèle. Bien que ces données doivent encore être complétées, cette étude montre que l'AMB favorise la clairance des agrégats cytoplasmiques et stimule les voies d'adressage des protéines vers le lysosome lorsqu'elles sont indépendantes du mannose-6-phosphate. Les effets de l'AMB sur l'autophagie et la neuroinflammation doivent encore être approfondis.

RÉSULTATS

RESULTATS

A. PUBLICATION 1: Sphingolipid Metabolism Is Dysregulated at Transcriptomic and Metabolic Levels in the Spinal Cord of an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Le métabolisme des lipides est fortement dérégulé dans la SLA et peut être un indicateur du pronostic des patients. En effet, le métabolisme énergétique et lipidique est directement lié à l'espérance des patients SLA où l'hypermétabolisme et la dyslipidémie peuvent influencer la sévérité de la maladie (Dupuis et al., 2008; Jésus et al., 2018; Steyn et al., 2018). Les études menées sur le LCR et le sang des patients indiquent que certains marqueurs métaboliques, comme ceux de la voie des glycosphingolipides, sont également capables de renseigner sur l'évolution de la maladie (Blasco et al., 2017, 2018). Depuis quelques années, il est clairement reconnu que le métabolisme des sphingolipides est fortement affecté dans la SLA. Dans la moelle épinière, dans les muscles et dans le LCR des patients, de nombreux métabolites de la voie des glycosphingolipides et leurs enzymes associées sont fortement dérégulés (Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2015a, 2017). Ces données démontrent bien l'importance de la voie des sphingolipides dans la SLA.

Les souris SLA *Sod1^{G86R}* récapitulent les altérations du métabolisme énergétique retrouvé chez les patients, y compris l'hypermétabolisme, la perte sévère du tissu adipeux et la dérégulation des métabolites de la voie du GlcCer dans la moelle épinière et les muscles des animaux (Dupuis et al., 2004; Henriques et al., 2015a, 2017). Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la dérégulation des lipides dans la SLA, nous avons effectué le séquençage de l'ARN et établi un profil lipidomique de la moelle épinière de souris *Sod1^{G86R}* symptomatiques en début de maladie. La finalité de cette étude a été de combiner ces deux analyses et ainsi de détecter les voies physiologiques altérées.

L'analyse transcriptomique de cette étude a permis dans un premier temps de démontrer que le génotype influence fortement la distribution de nos échantillons. Parmi les gènes dérégulés, beaucoup sont impliqués dans les processus biologiques du système immunitaire et de la signalisation des cytokines, de la différenciation et de la plasticité axonale mais également dans les processus des voies lipidiques notamment ceux des rafts lipidiques, de la membrane plasmique et du lysosome. En parallèle, l'analyse métabolique n'a pas permis d'établir un profil lipidique spécifique aux souris *Sod1^{G86R}*. Toutefois, de nombreux métabolites sont dérégulés à la baisse, en particulier les phospholipides, les tri/di-glycérides ainsi que les sphingolipides. Fait intéressant, l'analyse conjointe

de ces deux expériences révèle un enrichissement significatif du métabolisme des glycosphingolipides chez les souris *Sod1^{G86R}*, et particulièrement une surexpression des gènes impliqués dans le recyclage lysosomal. Par ailleurs, les gènes et les métabolites de la voie de synthèse de la sphingosine-1-phosphate, corrélient aussi avec la progression de la maladie. Nos résultats suggèrent donc que les lipides complexes jouent un rôle critique au cours de la première phase des symptômes moteurs chez le modèle murin SLA *Sod1^{G86R}*. Moduler la voie des sphingolipides est donc bénéfique sur le développement de la maladie et représente une cible thérapeutique potentielle pour la SLA.

Les données supplémentaires de cette publication se trouvent en annexe.



Sphingolipid Metabolism Is Dysregulated at Transcriptomic and Metabolic Levels in the Spinal Cord of an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Alexandre Henriques^{1,2,3*}, Vincent Croixmarie⁴, Alexandra Bouscary^{1,2}, Althéa Mosbach^{1,2}, Céline Keime⁵, Claire Boursier-Neyret⁶, Bernard Walter⁶, Michael Spedding³ and Jean-Philippe Loeffler^{1,2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Isabel Varela-Nieto,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC), Spain

Reviewed by:

Yolanda Leon,
Universidad Autonoma de Madrid,
Spain

Adam Keith Walker,
Macquarie University, Australia

Chiara Donati,
University of Florence, Italy

*Correspondence:

Alexandre Henriques
henriques.a@gmx.com
Jean-Philippe Loeffler
loeffler@unistra.fr

Received: 31 October 2017

Accepted: 15 December 2017

Published: 04 January 2018

Citation:

Henriques A, Croixmarie V,
Bouscary A, Mosbach A, Keime C,
Boursier-Neyret C, Walter B,
Spedding M and Loeffler J-P (2018)
Sphingolipid Metabolism Is
Dysregulated at Transcriptomic and
Metabolic Levels in the Spinal Cord of
an Animal Model of Amyotrophic
Lateral Sclerosis.
Front. Mol. Neurosci. 10:433.
doi: 10.3389/fnmol.2017.00433

¹ Université de Strasbourg, UMR_S 1118, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France, ² INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Strasbourg, France, ³ Spedding Research Solutions SAS, Le Vesinet, France, ⁴ Institut de Recherche International Servier, Suresnes, France, ⁵ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, INSERM, U964, CNRS, UMR7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France, ⁶ Technologie Servier, Orleans, France

Lipid metabolism is drastically dysregulated in amyotrophic lateral sclerosis and impacts prognosis of patients. Animal models recapitulate alterations in the energy metabolism, including hypermetabolism and severe loss of adipose tissue. To gain insight into the molecular mechanisms underlying disease progression in amyotrophic lateral sclerosis, we have performed RNA-sequencing and lipidomic profiling in spinal cord of symptomatic SOD1^{G86R} mice. Spinal transcriptome of SOD1^{G86R} mice was characterized by differential expression of genes related to immune system, extracellular exosome, and lysosome. Hypothesis-driven identification of metabolites showed that lipids, including sphingomyelin(d18:0/26:1), ceramide(d18:1/22:0), and phosphatidylcholine(o-22:1/20:4) showed profound altered levels. A correlation between disease severity and gene expression or metabolite levels was found for sphingosine, ceramide(d18:1/26:0), *Sgpp2*, *Sphk1*, and *Ugt8a*. Joint-analysis revealed a significant enrichment of glycosphingolipid metabolism in SOD1^{G86R} mice, due to the down-regulation of ceramide, glucosylceramide, and lactosylceramide and the overexpression of genes involved in their recycling in the lysosome. A drug-gene interaction database was interrogated to identify potential drugs able to modulate the dysregulated genes from the signaling pathway. Our results suggest that complex lipids are pivotally changed during the first phase of motor symptoms in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, RNA-sequencing, transcriptomics, metabolomics, SOD1 mice, sphingolipids, therapy, lipids

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a non-cell autonomous disease characterized by a severe muscle denervation and degeneration of upper and lower motor neurons. ALS has prevalence close to 7 in 100,000. Death usually occurs 1–5 years after diagnosis, but survival can exceed 10 years for 10% of patients. Etiology remains unclear for the majority of patients even though genetic mutations are known to trigger or to increase the risk of ALS. The main ALS-linked genetic mutations concern *SOD1*, *TARBP*, *FUS* genes. Expansion repeats in *C9ORF72* is also an important risk factor for ALS (Taylor et al., 2016). Altered RNA metabolism, oxidative stress, impaired axonal transport, protein misfolding, and inflammation participate to disease severity. Mutation on the *SOD1* gene was the first identified genetic cause for ALS (Rosen et al., 1993). Transgenic mice harboring mutations in the *Sod1* gene are used as models of ALS, such as the SOD1^{G93A} and the SOD1^{G86R} models. They recapitulate the main symptoms of ALS, including motor neuron degeneration, muscle denervation associated with severe paralysis and death (Ripps et al., 1995).

Multiple stages of energy and lipid metabolism dysregulations exist in ALS. Incidences of hypermetabolism and glucose insensitivity are higher in ALS and severe loss of body mass negatively affects patient's prognosis (Schmitt et al., 2014). High adiposity (Paganoni et al., 2011), dyslipidaemia (Dupuis et al., 2008; Mariosa et al., 2017), and circulating metabolic markers (Henriques et al., 2015a) are associated with survival. High caloric diets stabilize weight loss and extend life expectancy of patients under gastrostomy (Wills et al., 2014; Dorst et al., 2015). Hypermetabolism and preferential use of lipids as nutrients have been reported in SOD1 mice (Dupuis et al., 2004; Palamiuc et al., 2015). The causes of the metabolic dysfunctions in ALS remain unknown and could result from central pathologies combined with peripheral alterations. Early metabolic shift from glycolysis to beta-oxidation has been evidenced in skeletal muscles in SOD1^{G86R} mice (Palamiuc et al., 2015). SOD1^{G93A} present with glucose intolerance and impaired muscle glucose metabolism, which could be reversed by physical exercise (Desseille et al., 2017). Fibroblast from sporadic or familial ALS patients exhibits a metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis (Raman et al., 2015). Hypothalamus is a cerebral structure key for the integration of central and peripheral signals related to energy balance. Neuronal loss and altered melanocortin pathway have been described in the hypothalamus of ALS patients and can account for weight unbalance and defective energy metabolism (Vercruyssen et al., 2016).

The nervous system is remarkably enriched in lipids compared to other tissues. They range from simple fatty acids to glycosphingolipids. Lipids directly contribute to cell signaling, neuronal energy balance during stress, and membrane stability/fluidity. Different research groups have reported dysregulations of lipids in the central nervous system of neurodegenerative diseases. Elevated diacylglycerols have been reported in the frontal cortex of patients diagnosed with Alzheimer's disease (Wood et al., 2016) and levels of sphingolipids, phospholipids, and neutral lipids were reported as

significantly dysregulated in the central nervous system (CNS) of patients diagnosed with Parkinson's disease (Cheng et al., 2011). Genetic mutations causing disrupted lipid metabolism have been linked to neurological and neuromuscular phenotypes in human diseases, like hereditary spastic paraplegia (Dodge, 2017).

In ALS, accumulation of lipid metabolites (i.e., ceramides and cholesterol esters), occurred in the post-mortem spinal cord samples of ALS patients (Cutler et al., 2002). Accumulation of ceramide species in ALS post-mortem spinal samples was confirmed, by targeted metabolomics, in a second study (Dodge et al., 2015). Using this approach with spinal tissues from SOD1^{G93A} mice, one ceramide metabolite was upregulated at disease endpoint in this animal model of ALS. Nevertheless, at earlier disease stage, ceramides, and other sphingolipids showed marked dysregulations. We have recently reported that almost all lipid classes (e.g., triglycerides, phospholipids, sphingolipids) were strongly dysregulated at both presymptomatic and late disease stages, with metabolites showing either with an upregulation or downregulation in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice (Henriques et al., 2015b).

Gene expression analysis by RNA-sequencing gives information on the expression levels of genes in specific cells or tissues. In ALS, several molecular pathways have been already detected as altered at transcriptional levels in the CNS of ALS patients and animal models (Henriques and Gonzalez De Aguilar, 2011). A recent study has reported that targeted metabolomics (limited to 188 metabolites) combined to targeted gene expression analysis (limited to 84 genes) was able to provide information on the regulation of branched-chain amino acid metabolism in SOD1^{G93A} mice (Patin et al., 2016). We present for the first time an integrated analysis of RNA-sequencing and lipidomic data from the spinal cord of symptomatic SOD1^{G86R} mice. These results allow an unbiased vision of the metabolic changes in the course of ALS, and pinpoint specific pathways which are pathologically important.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed by authorized investigator (A67-402 to A.H.), after approval of experimental procedure by the ethic committee of the University of Strasbourg and by the ministry of higher education and research (APAFIS#2255; AL/25/32/02/13). They followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU). FVB/N female mice, overexpressing the SOD1^{G86R} protein (Ripps et al., 1995), were generated by breeding male SOD1^{G86R} mice with non-transgenic FVB/N female mice in our animal facility. Genotyping was performed as previously described (Ripps et al., 1995). Mice were maintained in our animal facility at 23°C with a 12 h light/dark cycle. Mice had access to water and to regular A04 rodent chow *ad libitum*. Body mass and muscle strength were analyzed on a daily basis to access disease onset. For muscle strength measurements (mean of three tests, grip test, Bioseb, Chaville, France), a mouse was placed on grid where they spontaneously gripped it with their four paws. They were then gently pulled back by the experimenter until they released the grid (mean of

three tests, grip test, Bioseb, Chaville, France). A strength-meter recorded the peak grip strength of the mouse. Age and litter matched non-transgenic female mice served as control. At 95 days of age, mice were sacrificed by intraperitoneal injection with ketamine chlorohydrate (100 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and intracardially perfused with PBS at 4°C. Lumbar spinal cords were quickly dissected, fresh frozen, and kept at -80°C until further analysis.

RNA-Sequencing

RNA-sequencing was performed as previously described (Henriques et al., 2017). Briefly, total RNA was extracted from frozen samples of spinal cord from 95 days old mice ($n = 5/\text{group}$). Libraries of template molecules suitable for high throughput DNA sequencing were created and reads were mapped onto mm10 assembly of mouse genome using Tophat v2.0.14 (Kim et al., 2013). Quantification of gene expression was performed using HTSeq v0.6.1 (Anders and Huber, 2010) and Ensembl release 81 database. Supervised statistical analysis for differential gene expression has been performed using R (3.3.2) and the DESeq2 Bioconductor (v3.2) library. Multiple testing was adjusted by Benjamini and Hochberg FDR correction (Benjamini and Hochberg, 1995).

After normalization and rlog transformation, hierarchical clustering (single method), and PCA (principal component analysis) was performed with the indicated subset of genes, accordingly to KEGG pathways, using JMP 11.0.0. Validation of gene expression was assessed by qPCR with a CFX96 using SYBR green Supermix reagent (BioRad), with the samples used for RNA-sequencing. Relative quantification of each gene was determined using the Biorad software and normalized to reference genes (Pol2, TBP, and 18S). Primers sequences are provided in Supplementary Table 1. Comparison between groups was studied with student's t -test and p -value < 0.05 were considered significant (PRISM 6.0b, GraphPad, San Diego, CA). Data are expressed as the mean \pm SEM. RNA-sequencing data are available at the Gene Expression Omnibus (GEO) database repository, under the accession number GSE106364.

Metabolomic Analysis

Lipid extraction and UPLC/TOF-MS (ultra performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry) was performed as previously described (Henriques et al., 2015b). Briefly, spinal cord samples from 95 days old mice were homogenized in precooled methanol ($n = 7$, for SOD1^{G86R} mice; $n = 8$, for wild type). Chloroform was added and after centrifugation, organic phase was collected and evaporated. Residues were solubilized with acetonitrile/isopropanol. Chromatography was performed on an Acquity UPLC system using an Acquity BEH C18 column. The chromatographic system was coupled to a LCT Synapt G2S mass spectrometer (Waters Corporation), equipped with an electrospray source operating in positive or negative ion mode with a lockspray interface for accurate mass measurements. Refiner MS 6.0 (Genedata, Basel, Switzerland) was used to normalize metabolomics data. Data with retention times between 3 and 15 min, with a mass range between 300 and 1,000 and peak intensity distinct from zero were retained

and normalized to fresh tissue mass. Data were submitted to PARETO transformation before statistical analysis. Statistical analysis for differential lipid metabolite level was performed by using supervised multivariate orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA), as implemented in SIMCA-P. A difference was considered significant when the corresponding variable [correlation coefficient] was greater than or equal to 0.7, according to the $p(\text{corr})$ coordinate in the S-plot built after the OPLS-DA model. Molecular features with significant changes were associated with theoretically identified metabolites based on their atomic mass (m/z), by using online HMDB 2.5 databases. Together with lipid extraction from samples and liquid chromatography gradient, the brut formula associated with the exact mass-over-ionization-state ratio allowed tentative lipid identification.

Pathway Analysis

Gene enrichment analysis was performed with dysregulated genes ($p_{\text{adj}} < 0.01$) by using Gene Ontology/Panther (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2015). Only the most specific subclass was considered per parent items. Given p -value were adjusted using the Bonferroni correction. For lipid metabolites, over-representation analysis was carried out with consensuspathDB (Kamburov et al., 2009, 2011b). All significantly dysregulated and identified lipid metabolites were considered for this analysis. Parameters were set to a minimum overlap of four distinct metabolites and a p -value cutoff of 0.001. Pathway over-representation analysis was conducted by using IMPaLA (Kamburov et al., 2011a) with genes and lipid metabolites whose levels were altered in SOD1^{G86R} mice. Pathways represented by at least 3 genes and 3 lipid metabolites and with q -value for enrichment below 0.05 were considered as significantly altered.

RESULTS

Gene Regulation in the Spinal Cord of SOD1^{G86R} Mice

To gain insight into the nature and extent of metabolic reorientation occurring in ALS, the spinal cord transcriptomes of five 95 days old SOD1^{G86R} and five age- and litter-matched non-transgenic wild type mice were studied by RNA-sequencing. This time point corresponds to the symptomatic disease stage of this animal model. At 95 days of age, all SOD1^{G86R} mice present with motor symptoms and muscle denervation, even if the severity of symptoms may vary (Supplementary Figure 1). Disease onset, defined as a loss of more than 10% of muscle strength is taking place around 90 days of age (Henriques et al., 2017). Disease end-stage, corresponding to full paralysis, occurs later in this mouse line, around 105 days of age.

Group comparison identified a total of 751 genes significantly dysregulated (adjusted p -value < 0.01), including 660 up-regulations and 91 down-regulations. **Table 1** presents all genes found either up- or down-regulated in SOD1^{G86R} mice with a fold change higher than 2 (adjusted p -value < 0.01 , $|\log_2 \text{fold change}|$ greater than 1). Genes that were the most down-regulated were *Tram111* (translocation associated

membrane protein 1-like 1), *Rwdd3* (RWD domain containing 3), *Mettl14* (methyltransferase like 14), and *Prss12* (protease, serine 12 neurotrypsin; or motopsin). The highest up-regulation concerned *Sod1* (superoxide dismutase 1, soluble), which is expected due to the presence of the *Sod1*^{G86R} transgene. *Gm8566* is the second most dysregulated gene. Its altered expression could result from a real difference between SOD1^{G86R} and WT mice, although we cannot completely rule out the possibility of an artifact as *Gm8566* shares 98% homology with the *Sod1* transcript. Aside from the *Sod1* gene and *Gm8566*, highly dysregulated transcripts with known functions were *Cd180* (CD180 antigen), *Calca* (calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha), *Slc15a3* (solute carrier family 15, member

3), and *Runx1* (runt related transcription factor 1). Differential regulation of gene expression was assessed by quantitative PCR to confirm RNA-sequencing. Selected genes were *Tram111*, *Mettl14*, *Cd180*, *Calca*, *Slc15a3*, *Runx1*, *Rwdd3*, and *Prss12*. These genes were selected because they were either the most up-regulated or down-regulated (adjusted *p*-value < 0.01, |log₂ fold change| greater than 1) and had known biological functions. Expression levels of the selected transcripts were highly similar when comparing qPCR and RNA-sequencing analysis (Figure 1).

Next, in an attempt to identify biological processes and cellular components affected in the diseased mice, gene ontology (GO) analysis was performed with significantly dysregulated genes. Immune system process was the highest over-represented biological process with a fold enrichment (FE) of 3.9 and an adjusted *p*-value (*p*_{adj}) below 4.4.10⁻⁷⁷. In SOD1^{G86R} mice, 248 genes were associated to this particular biological process, which corresponds to almost of a third of all transcriptomic reorientations. Notably, “positive regulation of signal transduction” (126 genes; FE = 2.87; *p*_{adj} < 2.63.10⁻²²), “regulation of locomotion” (96 genes; FE = 3.4; *p*_{adj} < 3.97.10⁻²¹), “regulation of apoptotic process” (122 genes; FE = 2.5; *p*_{adj} < 3.99.10⁻¹⁷), and “response to lipid” (72 genes; FE = 3.7; *p*_{adj} < 4.5.10⁻¹⁷) showed strong enrichment in SOD1^{G86R} mice. A putative location of the products of genes showing altered expression was investigated. Over-represented cellular components were mainly associated to membranes or vesicles, such as “extracellular exosome” (170 genes; FE = 2.0; *p*_{adj} < 6.6.10⁻¹⁶), “lysosome” (47 genes; FE = 3.0; *p*_{adj} < 6.2.10⁻⁰⁸), “external side of plasma membrane” (42 genes; FE = 2.89; *p*_{adj} < 2.72.10⁻⁰⁶), and “membrane raft” (36 genes; FE = 3.18; *p*_{adj} < 3.57.10⁻⁰⁶). Accordingly, unsupervised principal component analysis (PCA) plots performed with genes from the GO terms “lysosome,” “membrane raft,” and “external side of plasma membrane,” revealed a strong influence of genotype on the distribution of samples (Figures 2A–C). These results suggest that these pathways are strongly impacted in symptomatic SOD1^{G86R} mice.

TABLE 1 | Transcriptomic dysregulation in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice.

Gene name	Description	log ₂ FC	Adjusted <i>p</i> -value
<i>Sod1</i>	Superoxide dismutase 1, soluble	4.1	1.5E-254
<i>Gm8566</i>	Predicted pseudogene 8566	3.1	1.2E-101
RP23-182M12.4		1.4	3.6E-15
<i>Cd180</i>	CD180 antigen	1.2	1.3E-11
<i>Calca</i>	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	1.2	4.6E-21
<i>Slc15a3</i>	Solute carrier family 15, member 3	1.2	1.1E-10
<i>Runx1</i>	Runt related transcription factor 1	1.1	6.7E-11
<i>Slamf9</i>	SLAM family member 9	1.1	4.2E-09
<i>Mmp12</i>	Matrix metalloproteinase 12	1.1	2.6E-09
<i>Bcl3</i>	B cell leukemia/lymphoma 3	1.1	5.1E-09
<i>Slc7a7</i>	Solute carrier family 7, member 7	1.1	1.8E-13
<i>Fcrls</i>	Fc receptor-like 5, scavenger receptor	1.1	7.6E-09
<i>Tnfsf8</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	1.1	1.4E-08
<i>Slfm9</i>	Schlafen 9	1.0	1.9E-08
<i>Glipr1</i>	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	1.0	2.7E-09
<i>Hcar2</i>	Hydroxycarboxylic acid receptor 2	1.0	2.7E-08
<i>Fcgr1</i>	Fc receptor, IgG, high affinity I	1.0	7.6E-09
<i>Ctsh</i>	Cathepsin H	1.0	2.6E-15
<i>Irf8</i>	Interferon regulatory factor 8	1.0	3.0E-09
<i>Arl11</i>	ADP-ribosylation factor-like 11	1.0	5.0E-08
<i>Ctsc</i>	Cathepsin C	1.0	4.1E-11
<i>Apol9a</i>	Apolipoprotein L 9a	1.0	3.3E-08
<i>Cd52</i>	CD52 antigen	1.0	7.9E-08
<i>Egr2</i>	Early growth response 2	1.0	5.6E-08
<i>Klr1b</i>	Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1B	1.0	5.6E-08
<i>Klhl6</i>	Kelch-like 6	1.0	7.0E-12
<i>Prss12</i>	Protease, serine 12 neurotrypsin (motopsin)	-1.0	1.1E-20
<i>Mettl14</i>	Methyltransferase like 14	-1.1	1.3E-65
<i>Rwdd3</i>	RWD domain containing 3	-1.1	1.8E-23
<i>Tram111</i>	Translocation associated membrane protein 1-like 1	-1.1	3.2E-58

Given is a list of genes showing altered expression level in SOD1^{G86R} mice, with a |log₂ fold change (FC)| higher than 1 and with an adjusted *p* < 0.01.

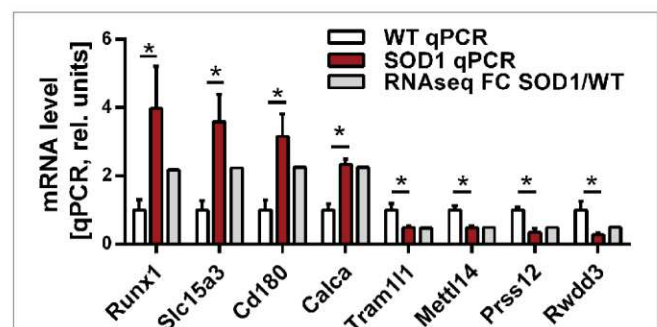


FIGURE 1 | Expression level of selected genes as determined by RNA-sequencing and qPCR. Validation of differential gene expression by qPCR and compared to the fold change determined by RNA sequencing. qPCR values were normalized to the mean of the respective WT group. qPCR data is presented as mean ± standard variation of the mean. FC, fold change; **p* < 0.05.

Lipidomic Changes in the Spinal Cord of SOD1^{G86R} Mice

In order to better characterize metabolomic changes at disease onset, lipid metabolites were studied in seven symptomatic SOD1^{G86R} mice and eight age-matched non-transgenic wild type mice. Analysis of spinal tissue by mass spectrometry identified a total of 7,603 distinct peaks after positive ionization. A total of 293 metabolites was found altered according to the chosen threshold in the SOD1^{G86R} mice compared to wild type controls. A hypothesis-driven identification was attributed to 196 of them accordingly to their atomic mass. All tentatively identified metabolites were down-regulated. An enrichment analysis was performed with the identified and altered metabolites using ConsensusPathDB (Kamburov et al., 2009, 2011b). According to three independent databases, “sphingolipid metabolism” (KEGG database, $p_{adj} < 3.00.10^{-05}$; and Reactom database, $p_{adj} < 3.9.10^{-05}$) as well as “glycosphingolipid metabolism” (EHMN database; $p_{adj} < 2.5.10^{-04}$) were the metabolic pathways showing the most significant enrichment. Indeed, many metabolites showing altered levels were identified as sphingolipids. Sphingomyelin (d18:0/26:1), ceramide-P (d18:1/26:1), and ceramide (d18:1/22:0) were among the most down-regulated lipid metabolites (Table 2). Notably, several phospholipid metabolites, such as phosphatidylcholine(o-22:1/20:4), presented with significant down-regulation (Table 3). Other subclasses of dysregulated lipids included di- and triglycerides. Saturation and unsaturation of acyl chains directly influence biophysical properties of complex lipids with repercussion on membrane fluidity. According to HMDB identification, down-regulated sphingolipid metabolites mainly quasi-exclusively contained saturated and monounsaturated fatty acids. This suggests that sphingolipids having polyunsaturated acyl chains were not significantly affected in SOD1^{G86R} mice. This difference in acyl chains could reflect enzymatic activities involved in the synthesis, transformation or degradation of fatty acids and lipids.

When considering negative ionization, similar results were obtained. HMDB identification was attributed to 165 lipids metabolites showing significantly altered levels in SOD1^{G86R} mice. A majority of lipid metabolites were down-regulated. Main lipid subclasses were fatty acids, phospholipids (mainly

phosphatidylcholine), sphingolipids (e.g., ceramide), and tri-, di-, or mono-acylglycerides (Table 4). Notably, several significantly altered lipid metabolites received an identical identification after both positive and negative ionizations. These lipids were sphingolipids [Cer(d18:1/22:1); Cer-P(d18:1/26:1); Cer(d18:1/18:0)], triglycerides [TG(18:4/15:0/18:4); TG(14:1/20:5/14:1)] or from other lipid subclasses [5-Hydroxy-7-methoxy-2-tritriacontylchromone; N-oleoylethanolamine; Randilongin; Persenone a].

Sphingolipid Metabolism Is Altered at Transcriptomic and Lipidomic Levels in the Spinal Cord of SOD1^{G86R} Mice

To investigate the relationship between transcriptomic and lipidomic changes in SOD1^{G86R} mice, a joint inter-omics analysis was performed using significantly dysregulated genes and metabolites (Kamburov et al., 2011a). The objective was to identify molecular pathways associated with ALS, with a special regard toward lipid metabolism. Three distinct databases have identified “sphingolipid,” “glycosphingolipid metabolism,” and “sphingolipid signaling” pathways as significantly enriched in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice (Table 5, Supplementary Table 2). Overlapping genes are those coding for lysosomal proteins involved in the recycling of glycosphingolipids (e.g., *Hexb*, *Glb1*, *Asah1*), for ceramide kinase (*Cerk*), for *Sgpl1*, an enzyme involved in the degradation of sphingosine-1-phosphate. Overlapping lipid metabolites were ceramide, mono-hexosylceramide (glucosylceramide or galactosylceramide), lactosylceramide, and sphingomyelin. Pathways related to other lipids, such as phospholipids or triglycerides, were not detected as significantly enriched.

Next, hierarchical clustering was performed using all genes, dysregulated or not, listed as part of the sphingolipid metabolism by KEGG. Genotype had a strong influence on the distribution of samples on unsupervised hierarchical clustering plot (Figure 3A). A cluster of genes, which are associated with the breakdown of glycosphingolipids, showed a clear differential pattern of expression in SOD1^{G86R} mice compared to wild type controls. Differential expression for genes (i.e., *Hexb*, *Asah1*, *Cerk*, *Glb1*, and *Arsb*) involved in the breakdown of

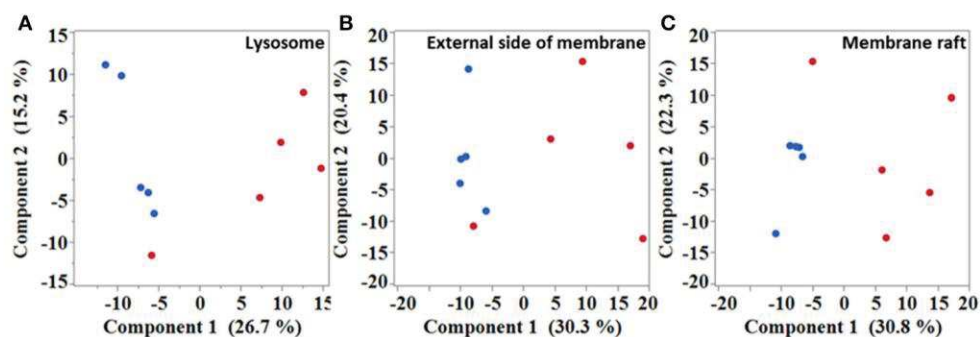


FIGURE 2 | Multivariate analysis showing samples distribution based on different subset of genes. Unsupervised principal component analysis performed with genes isolated from “lysosome” (A), “external side of membrane” (B), and “membrane raft” (C) gene ontology terms. Blue dots, wild type; red dots, SOD1^{G86R}.

TABLE 2 | Dysregulation of sphingolipid metabolites in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice, after positive ionization, and tentative identification.

m/z	RT	HMDB	Name	Fold change
686.61	12.23	HMDB32794	As 1-1	0.43
624.57	10.41	HMDB11765	Ceramide(d18:0/22:0)	0.57
638.64	11.5	HMDB11767	Ceramide(d18:0/23:0)	0.44
564.54	10.25	HMDB04948	Ceramide(d18:1/18:1)	0.51
594.59	11.59	HMDB04951	Ceramide(d18:1/20:0)	0.52
622.61	10.41	HMDB04952	Ceramide(d18:1/22:0)	0.00
620.62	11.5	HMDB11775	Ceramide(d18:1/22:1)	0.44
636.6	10.82	HMDB00950	Ceramide(d18:1/23:0)	0.54
678.65	10.68	HMDB04955	Ceramide(d18:1/26:0)	0.46
730.61	9.56	HMDB10704	Ceramide-P(d18:1/24:0)	0.54
784.66	10.16	HMDB10707	Ceramide-P(d18:1/26:1)	0.41
784.65	10.92	HMDB10707	Ceramide-P(d18:1/26:1)	0.49
802.65	10.26	HMDB35402	Culinariside	0.51
812.69	11.09	HMDB00140	Glucosylceramide	0.50
812.69	10.83	HMDB00140	Glucosylceramide	0.61
728.61	9.57	HMDB04972	Glucosylceramide(d18:1/18:0)	0.55
784.66	10.93	HMDB04974	Glucosylceramide(d18:1/22:0)	0.53
810.68	10.84	HMDB04975	Glucosylceramide(d18:1/24:1)	0.36
656.57	11.49	HMDB35469	N-(2r-hydroxydocosanoyl)-2s-amino-1,3s,4r-octadecanetriol	0.51
712.6	9.56	HMDB35472	N-(2r-hydroxyhexacosanoyl)-2s-amino-1,3s,4r-octadecanetriol	0.53
536.51	9.6	HMDB35480	N-[(4e,8e)-1,3-dihydroxyoctadeca-4,8-dien-2-yl]hexadecanamide	0.54
650.65	14.07	HMDB00831	N-lignoceroylsphingosine	0.48
650.65	11.08	HMDB00831	N-lignoceroylsphingosine	0.49
538.53	10.27	HMDB00790	N-palmitoylsphingosine	0.48
566.56	10.94	HMDB00829	N-stearoylsphingosine	0.46
786.67	10.92	HMDB11694	Sphingomyelin(d16:1/24:1)	0.52
800.69	11.25	HMDB11696	Sphingomyelin(d17:1/24:1)	0.51
706.58	9.59	HMDB10168	Sphingomyelin(d18:0/16:0)	0.32
781.67	11.25	HMDB13468	Sphingomyelin(d18:0/22:3)	0.46
841.7	10.19	HMDB13461	Sphingomyelin(d18:0/26:1)	0.45
729.61	9.57	HMDB12101	Sphingomyelin(d18:1/18:1)	0.69
785.67	10.92	HMDB12104	Sphingomyelin(d18:1/22:1)	0.53
844.72	12.1	HMDB11698	Sphingomyelin(d18:1/26:0)	0.51
300.29	3.83	HMDB00252	Sphingosine	0.55

Given are the dysregulated metabolites identified as sphingolipids by the Human Metabolome Database (HMDB), in the spinal cord of symptomatic SOD1^{G86R} mice, after positive identification. m/z, mass to charge ratio; RT, retention time (min).

glycosphingolipids was confirmed by qPCR (**Figure 3B**). Muscle weakness is an early event in SOD1^{G86R} mice and ALS patients. SOD1^{G86R} spinal samples were collected at symptomatic disease stage, when motor weakness was established and ranged from mild to severe. In an attempt to identify biological processes influenced by disease severity, correlation between levels of genes or lipid metabolites from the “sphingolipid metabolism” and muscle strength was studied. Expression levels of *Ugt8a* (UDP galactosyltransferase 8A), *Sgpp2* (sphingosine-1-phosphate

TABLE 3 | Dysregulation of phospholipids metabolites in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice, after positive ionization, and tentative identification.

m/z	RT	HMDB	Name	Fold change
762.6	10.9	HMDB07878	PC(14:0/20:0)	0.55
790.7	11.6	HMDB07886	PC(14:0/22:0)	0.56
804.6	10.2	HMDB07953	PC(15:0/22:0)	0.48
832.7	10.2	HMDB07959	PC(15:0/24:0)	0.58
830.7	10.2	HMDB07960	PC(15:0/24:1)	0.56
866.7	10.2	HMDB08191	PC(18:3/24:1)	0.45
738.6	9.6	HMDB08258	PC(18:4/P-16:0)	0.61
764.7	10.9	HMDB08260	PC(18:4/P-18:1)	0.56
902.7	11.3	HMDB08289	PC(20:0/24:0)	0.56
794.7	10.8	HMDB08392	PC(20:3/P-18:1)	0.59
794.6	10.9	HMDB08489	PC(20:4/P-18:0)	0.46
792.7	11.6	HMDB08457	PC(20:4/P-18:1)	0.57
792.7	14.3	HMDB08457	PC(20:4/P-18:1)	0.57
792.7	10.8	HMDB08457	PC(20:4/P-18:1)	0.68
824.7	12.2	HMDB08622	PC(22:2/P-18:1)	0.49
810.6	11.1	HMDB08626	PC(22:4/16:0)	0.63
822.7	11.5	HMDB08653	PC(22:4/P-18:0)	0.47
822.7	11.3	HMDB08653	PC(22:4/P-18:0)	0.56
820.7	11.3	HMDB08654	PC(22:4/P-18:1)	0.52
806.6	10.4	HMDB08725	PC(22:6/16:0)	0.44
806.6	10.2	HMDB08725	PC(22:6/16:0)	0.60
862.7	11.5	HMDB08734	PC(22:6/20:0)	0.49
818.7	12.2	HMDB08755	PC(24:0/14:0)	0.50
856.7	11.3	HMDB08786	PC(24:0/P-18:1)	0.46
866.7	12.3	HMDB08797	PC(24:1/18:3)	0.61
766.7	10.9	HMDB13415	PC(o-16:1/20:4)	0.48
850.7	12.1	HMDB13451	PC(o-22:1/20:4)	0.42
740.6	10.3	HMDB11213	PC(p-16:0/18:3)	0.62
768.6	10.9	HMDB11218	PC(p-16:0/20:3)	0.57
792.6	10.6	HMDB11227	PC(P-16:0/22:5)	0.48
766.6	10.3	HMDB11247	PC(p-18:0/18:4)	0.62
766.6	10.3	HMDB11278	PC(p-18:1/18:3)	0.43
798.7	10.8	HMDB11282	PC(p-18:1/20:1)	0.45
798.7	9.5	HMDB11282	PC(p-18:1/20:1)	0.47
798.7	11.3	HMDB11282	PC(p-18:1/20:1)	0.50
796.7	11.6	HMDB11316	PC(p-18:1/20:2)	0.53
722.5	8.9	ECMDB23488	PE(14:0(3-oh)/19:iso)	0.51
632.5	3.9	HMDB08855	PE(14:1/14:1)	0.45
734.6	10.3	ECMDB23529	PE(19:iso/16:0)	0.54
860.7	11.5	HMDB09501	PE(22:0/22:0)	0.47
782.7	11.3	HMDB09578	PE(22:2/P-18:1)	0.47
780.7	11.3	HMDB09610	PE(22:4/P-18:0)	0.46
816.7	9.7	HMDB11395	PE(p-18:0/24:0)	0.62
750.6	9.6	HMDB11452	PE(p-18:1/20:4)	0.56
765.6	10.2	ECMDB23696	PG(16:0/19:iso)	0.61
765.6	10.3	ECMDB23696	PG(16:0/19:iso)	0.61
823.6	10.4	HMDB10614	PG(18:0/22:6)	0.56
775.6	10.2	HMDB10647	PG(18:2(9z,1)/18:0)	0.58
805.6	10.2	ECMDB23712	PG(19:0cycv8c/19:iso)	0.46
805.6	9.8	ECMDB23712	PG(19:0cycv8c/19:iso)	0.58
737.6	9.6	ECMDB23717	PG(19:iso/14:0)	0.63
807.6	10.4	ECMDB23726	PG(19:iso/19:iso)	0.49
889.6	10.4	HMDB09814	PI(18:0/20:3)	0.58

Given are the dysregulated metabolites identified as phospholipids by the Human Metabolome Database (HMDB), in the spinal cord of symptomatic SOD1^{G86R} mice, after positive identification. m/z, mass to charge ratio; RT, retention time (min).

TABLE 4 | Dysregulation of lipid metabolites in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice, after negative ionization, and tentative identification.

m/z	RT	HMDB	Name	Class	Fold change
311.3	6.5	HMDB02212	Arachidic acid (20:0)	Fatty acid	0.61
309.3	5.3	HMDB02231	Eicosenoic acid (20:1n-9)		0.44
337.3	6.6	HMDB02068	Erucic acid (22:1n-9)		0.51
305.2	3.4	HMDB02925	8,11,14-Eicosatrienoic acid (20:3n-6)		0.34
305.2	3.7	HMDB02925	8,11,14-Eicosatrienoic acid (20:3n-6)		0.45
331.3	3.9	HMDB02226	Adrenic acid (22:4n-6)		0.62
335.3	5.7	HMDB61714	Docosadienoate (22:2n-6)		0.52
335.3	5.6	HMDB61714	Docosadienoate (22:2n-6)		0.53
329.2	3.1	HMDB01976	Docosapentaenoic acid (22n-6)		0.54
333.3	4.7	HMDB02823	Docosatrienoic acid (22:3n-3)		0.42
333.3	4.9	HMDB02823	Docosatrienoic acid (22:3n-3)		0.42
307.3	4.4	HMDB05060	Eicosadienoic acid (20:2n-6)		0.41
307.3	4.3	HMDB05060	Eicosadienoic acid (20:2n-6)		0.49
355.3	3.6	HMDB02007	Tetracosahexaenoic acid (24:6n-12)		0.63
357.3	4.3	HMDB06322	Tetracosapentaenoic acid (24:5n-6)		0.58
359.3	5.1	HMDB06246	Tetracosatetraenoic acid (24:4n-6)		0.57
379.3	6.5	HMDB11545	MG(0:0/20:3n-3/0:0)	Mono, di, triglyceride	0.61
377.3	5.3	HMDB11549	MG(0:0/20:4n-3/0:0)		0.40
405.3	6.6	HMDB11554	MG(0:0/22:4n-6/0:0)		0.51
641.5	11.5	HMDB07119	DG(16:0/22:5n-6/0:0)		0.59
637.5	10.9	HMDB11188	TG(12:0/12:0/12:0)		0.46
845.7	11.9	HMDB42567	TG(14:0/18:3n-3/20:5n-6)		0.48
843.7	11.5	HMDB42807	TG(14:0/18:4n-3/20:5n-3)		0.43
715.6	11.2	HMDB47885	TG(14:1n-5/14:1n-5/14:1n-5)		0.55
791.6	10.9	HMDB47904	TG(14:1n-5/14:1n-5/20:5n-3)		0.50
781.6	10.2	HMDB43186	TG(15:0/14:1n-5/18:4n-3)		0.58
833.7	11.6	HMDB43190	TG(15:0/14:1n-5/22:6n-3)		0.48
831.7	11.6	HMDB43679	TG(15:0/18:4n-3/18:4n-3)		0.43
760.6	9.6	HMDB07878	PC(14:0/20:0)	Phospholipid	0.56
800.6	10.0	HMDB07952	PC(15:0/22:1n-5)		0.54
792.6	9.8	HMDB07956	PC(15:0/22:5n-6)		0.54
828.6	10.2	HMDB07960	PC(15:0/24:1n-9)		0.54
844.7	11.5	HMDB07992	PC(16:0/24:0)		0.54
842.7	10.4	HMDB07993	PC(16:0/24:1n-9)		0.54
744.6	10.9	HMDB07995	PC(16:0/P-18:0)		0.56
772.6	11.6	HMDB08061	PC(18:0/P-18:0)		0.53
884.6	10.3	HMDB08616	PC(22:2n-6/22:6n-3)		0.59
914.7	11.6	HMDB08750	PC(22:6n-3/24:1n-9)		0.54
820.6	10.4	HMDB09212	PE(18:4n-3/24:1n-9)		0.51
758.6	11.9	HMDB09247	PE(20:0/dm18:0)		2.46
719.5	8.5	HMDB10571	PG(16:0/16:1n-9)		0.42
777.6	10.3	HMDB10602	PG(18:0/18:0)		0.59
789.6	9.8	ECMDB23708	PG(18:1n-9/19:iso)		0.53
564.5	9.4	HMDB04950	Ceramide (d18:1n-9/18:0)	Sphingolipid	0.52
566.5	10.1	HMDB11761	Ceramide (d18:1n-9/18:0)		0.63
620.6	10.7	HMDB04952	Ceramide (d18:1n-9/22:0)		0.53
562.5	9.4	HMDB04948	Ceramide (d18:1n-9/18:1n-9)		0.52
562.5	9.5	HMDB04948	Ceramide (d18:1n-9/18:1n-9)		0.52
618.6	10.7	HMDB11775	Ceramide(d18:1n-9/22:1n-13)		0.50
672.5	10.0	HMDB10702	CerP(d18:1n-9/20:0)		0.59
782.6	10.4	HMDB04974	Glucosylceramide (d18:1n-9/22:0)		0.51
886.6	10.9	HMDB11592	Lactosylceramide (d18:1n-9/18:1n-9)		0.46
714.6	10.5	HMDB29216	SM C16:1n-7		0.61

Given are the dysregulated metabolites identified by the Human Metabolome Database (HMDB), in the spinal cord of symptomatic SOD1^{G86R} mice, after negative identification. m/z, mass to charge ratio; RT, retention time (min).

TABLE 5 | Integrated pathway analysis of spinal transcriptomic and lipidomic data of SOD1^{G86R} mice.

Pathway name	Source	Overlapping genes	Genes	Overlapping metabolites	Metabolites	p-value	q-value
Glycosphingolipid metabolism	EHMN	3	Glb1;Asah1;Sgpl1	4	Ceramide (3) Glucosylceramide (4) Sphingosine (1) Sphingomyelin (5)	0.00047	0.0125
Sphingolipid metabolism	KEGG	4	Glb1; Asah1; Cerk; Sgpl1	4	Ceramide (3) Glucosylceramide (4) Sphingosine (1) Sphingomyelin (5)	0.0001	0.00062
Retrograde endocannabinoid signaling	KEGG	6	Gabrq;Gngt2;Adcy7; Plcb2; Gng8;ltpr2	3	Anandamide (1) Phosphatidylethanolamine (4) Phosphatidylcholine (17)	0.00057	0.0141
Sphingolipid signaling pathway	KEGG	11	Ctsd; Asah1; Pik3cg; Sgpl1; Plcb2; Gab2; Rac2; Rac3; S1pr3; Tnfrsf1a; Fcer1g	3	Ceramide (3) Sphingosine (1) Sphingomyelin (5)	0.0001	0.00297

Given are the metabolic pathways identified as significantly dysregulated in a joint inter-omic analysis performed with IMPaLA. The analysis was performed with the 751 genes and 293 lipid metabolites significantly dysregulated. The table shows the pathways, the source of the database, number and identity of genes and metabolites dysregulated per pathway, and p-value and q-value (false discovery rate) for each pathway.

phosphatase 2), and *Sphk1* (sphingosine kinase 1) were significantly correlated or anti-correlated to muscle strength (Figures 3C–E). *Ugt8a* codes for the galactosylceramide synthase. SGPP2 and SPHK1 are two enzymes involved respectively in the synthesis and degradation of sphingosine-1-phosphate.

Interestingly, muscle strength showed a significant correlation between the intensity level of ceramide(d18:1/26:0) and sphingosine, product and/or substrate of *Ugt8a*, *Sgpp2*, and *Sphk1* (Figures 3F,G). Collectively, our results suggest that the metabolism of sphingolipids, and particularly the glycosphingolipid and the axis “ceramide, sphingosine, sphingosine-1-phosphate” is impaired at transcriptomic and lipidomic levels, and vary depending on disease progression (Figure 3H). Several sphingolipids, such as sphingosine-1-P, ceramide and sphingomyelin, are bioactive molecules able to modulate cell response to stress, survival, and neuroinflammation. KEGG identified “sphingolipid signaling pathway” as dysregulated, suggesting that altered levels of sphingolipids in ALS could translate into changes in cell signaling.

DGIdb database was used to search for potential pharmaceutical modulators of the “sphingolipid signaling pathway” using genes identified as dysregulated in this pathway (Wagner et al., 2016). A total of 67 compounds were identified, including 10 negative modulators of TNF- α signaling, and 5 modulators of sphingosine-1-phosphate. Notably, 6 of them are currently investigated or were tested at preclinical and/or clinical level in ALS (Pyrimethamine, fingolimod phosphate, pentoxifylline, celestrol, lenalidomide, thalidomide; Supplementary Table 3). These findings indicate that the metabolism of sphingolipid shows dysregulation at gene and metabolites levels, in the spinal cord of symptomatic SOD1^{G86R} mice.

DISCUSSION

ALS is a fatal condition characterized by degeneration of motor neurons. Several lines of evidence suggest that gene expression and lipid metabolism are differentially regulated in ALS, and could contribute to disease progression. Here, we report a joint analysis of lipidomic and transcriptomic changes in the spinal cord of symptomatic SOD1^{G86R} mice.

Transcriptomic Changes in Spinal Cord from SOD1^{G86R} Mice

For the first time, we report RNAseq analysis of spinal tissue from SOD1^{G86R} mice. This specific mouse line presents with the advantage to overexpress a mutated SOD1 protein without dismutase activity. Based on our transcriptomic analysis, spinal cord of SOD1^{G86R} mice was characterized by the dysregulation of immune system, cell death and regulation of membrane and vesicles. “Immune system” was the biological pathway showing the greatest enrichment in SOD1^{G86R} mice. Numerous studies pin point neuroinflammation in ALS. Activation of glial cells has been linked to degeneration of motor neurons (Yamanaka et al., 2008; Endo et al., 2015; Cooper-knock et al., 2017) or to defects in the integrity of peripheral motor axons (Nardo et al., 2016). Infiltration of peripheral monocytes and lymphocytes into CNS was also demonstrated in ALS (Hooten et al., 2015). Among dysregulated genes identified in our RNAseq analysis, several genes are directly connected to a pro-inflammation state. For instance, *Cd180*, one of the most up-regulated gene in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice, is a pro-inflammatory gene participating in the activation of TLR4 receptors (Bastiaansen et al., 2014). Our results also show that *Gfap* (log2FC: 0.54, adjusted p-value < 0.01) and *Aif-1/Iba1* (FC: 0.77, adjusted p-value < 0.01),

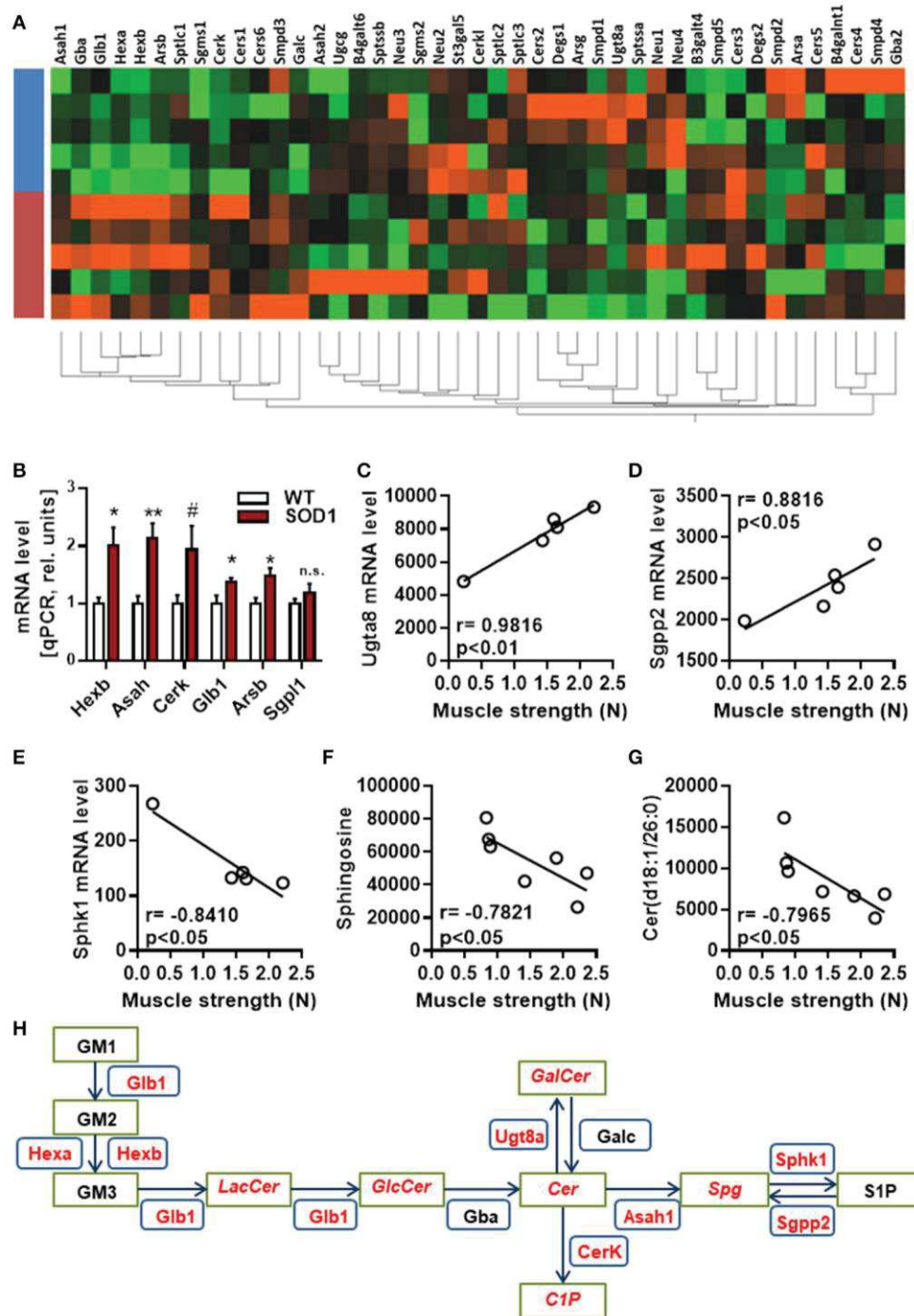


FIGURE 3 | Regulation and interaction of genes related to glycosphingolipid pathway. **(A)** Unsupervised hierarchical clustering, performed with genes from the KEGG pathway “sphingolipid metabolism pathway,” showing distribution of SOD1^{G86R} and wild type samples (blue, wild type; red, SOD1^{G86R}). **(B)** Validation by qPCR of differential expression level of genes from the sphingolipid pathway previously found dysregulated by RNAseq. **(C–G)** Pearson correlations between muscle strength and gene expression levels of *Ugt8a* **(C)**, *Sgpp2* **(D)**, *Sphk1* **(E)**, and metabolite levels of sphingosine **(F)** and ceramide(d18:1/26:0) **(G)**. **(H)** Schematic representation of the main dysregulations related to glycosphingolipids, ceramide, and sphingosine. Green boxes represent metabolites and blue boxes refer to genes. In red are given genes and metabolites showing either altered levels or a correlation with disease severity. LacCer, lactosylceramide; GlcCer, glucosylceramide; GalCer, galatosylceramide; Cer, ceramide; Sph, sphingosine; S1P, sphingosine 1-phosphate, C1P, ceramide 1-phosphate. Gene abbreviation follows the *HUGO Gene Nomenclature Committee*-approved gene nomenclature. Data are presented as mean ± standard variation of the mean. n.s., not significant; #p < 0.1; *p < 0.05; **p < 0.01.

markers for astrocyte and microglial activations, were both up-regulated in our study. Interestingly, we noted an up-regulation for *Htr2b* (log2FC: 0.34; adjusted *p*-value < 0.05), gene coding for 5-HT_{2b} receptor, in SOD1^{G86R} mice. A recent report connected serotonin signaling in microglial cells to neuroinflammatory process and neurodegeneration in ALS patients and animal models (El Oussini et al., 2016). *Csf3r* (log2FC: 0.96; adjusted *p*-value < 0.01) and *Csf2rb* (log2FC: 0.96; adjusted *p*-value < 0.01), coding for the receptors of granulocyte (G-CSF) and granulocyte-macrophage stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte-macrophage stimulating factor (GM-CSF), were significantly up-regulated the SOD1^{G86R} group. The hematopoietic factor G-CSF, ligand of *Csf3r*, is neuroprotective in SOD1^{G93A} mice (Henriques et al., 2011) and is able to re-adjust gene expression in lumbar motor neurons (Henriques et al., 2015c).

Our analysis also identified genes whose regulation could promote neurodegeneration or impair neuronal function in SOD1^{G86R} mice. *Calca*, encoding for calcitonin gene-related peptide, is up-regulated in our RNAseq analysis. This gene is tightly associated to neurodegeneration and to motor neuron function (Enjin et al., 2010). In spinal bulbar muscular atrophy, its overexpression triggered cell damage while its inhibition reduced, or even abolished, neurodegeneration in an animal model of this disease (Minamiyama et al., 2012). High expression level of *Calca* has been also associated to higher motor neuron loss in SOD1^{G93A} mice (Ringer et al., 2012). *Prss12*, or motopsin, is a neuronal protease which positively regulates axonal plasticity (Mitsui et al., 2013). *Prss12* expression is known to be down-regulated during acute stress (Numajiri et al., 2006) and in laser-captured SOD1^{G93A} motoneurons (Henriques et al., 2015c). Down-regulation of *Prss12* in SOD1^{G86R} mice could therefore relate to axonal dysfunction. *Rwdd3* is a gene coding for RSUME, a protein taking part in HIF-1 alpha signaling (Carbia-nagashima et al., 2007) and known to be activated during cell stress. RSUME modulates the sumoylation of the glucocorticoid receptor (Druker et al., 2013), connects to immune system, energy metabolism and axonal plasticity. RSUME down-regulation in spinal tissues of SOD1^{G86R} mice could negative impact motor units through these biological processes. *Runx1* is a transcription factor stimulating neuronal differentiation and axonal plasticity and reduces BMP signaling and expression of *Calca* (Yoshikawa et al., 2015, 2016; Halevy et al., 2016). *Runx1* is a positive regulator of the expression of genes related to sphingolipid metabolism (Kilbey et al., 2010). Thus, the up-regulation of *Runx1* in the spinal tissue of SOD1^{G86R} mice could represent a compensatory neuroprotective mechanism.

Main altered cellular component were “extracellular exosome” and “lysosome.” Exosomes are vesicles releasing proteins, lipids and RNA in the extracellular environment. Involvement of exosome in ALS has been recently a subject of extensive studies. Exosomes participate in the propagation of misfolded SOD1 and TDP-43 proteins (Nonaka et al., 2013; Grad et al., 2014), in aberrant phenotype of immune cells (Pinto et al., 2017) and could impair synaptic plasticity in neurodegenerative diseases (Wang et al., 2017). In fly neuromuscular junctions, presynaptic exosomes transfer synaptotagmin 4 to post-synaptic cells, thereby enabling retrograde signaling in activity-dependant synaptic growth (Korkut et al., 2013). Physiological adaptations

to exercise have been proposed to be mediated, at least partially, by muscle-derived exosomes (Safdar et al., 2016). Lysosomes are intracellular organelles with important function in recycling of macromolecules, including complex lipids. Lysosomes interact with autophagosomes to promote autophagy. Defect in lysosomal function results in pathological accumulation of biomolecules, such as sphingolipids, and cause lysosomal storage diseases, such as Gaucher's disease. In ALS, activity of lysosomal enzymes is increased in post-mortem spinal tissues of ALS patients (Dodge et al., 2015) and mutations on genes related to autophagy are causing genetic forms of ALS (Lee et al., 2015).

Lipidomic Changes in Spinal Cord from SOD1^{G86R} Mice

At disease onset, SOD1^{G86R} mice presented with clear rearrangement of lipid metabolites, such as phospholipids and sphingolipids. We and other previously reported that nervous tissue of SOD1^{G86R} and SOD1^{G93A} mice had altered levels for lipid metabolites, at presymptomatic, or late-symptomatic disease stages (Cutler et al., 2002; Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2015b; Patin et al., 2016). Due to technical restrictions, most of these studies focussed on a limited number of lipid metabolites. In the present study, we have detected more than 7,500 metabolites which covered main lipid subclasses (fatty acids, triglycerides, phospholipids, sphingolipids, and sterols). Shortage in energetic lipids (e.g., triglyceride) is compatible with increased energy expenditure which negatively impact prognosis in ALS patients (Jésus et al., 2018). We have previously reported that triglycerides were massively depleted in spinal cord, muscle, and plasma samples, showing the scale of the metabolic dysfunction in this animal model of ALS (Henriques et al., 2015b). Our data also shows that sphingolipids and phospholipids are under-represented. These lipid classes are key components of the cell membrane.

Changes in proportion of phospholipids could result from a defect in synthesis or higher degradation by phospholipases. Interestingly, we noted an up-regulation of lysosomal phospholipase A2 (Pla2g15; log2FC: 2.56; adjusted *p*-value < 0.01), phospholipase C, beta 2 (Plcb2; log2FC: 1.75; adjusted *p*-value < 0.001), phospholipase C, epsilon 1 (Plce1; log2FC: 1.67; adjusted *p*-value < 0.001), phospholipase C, gamma 2 (log2FC: 2.38; adjusted *p*-value < 0.01), and phospholipase D4 (log2FC: 1.04; adjusted *p*-value < 0.001). It is therefore plausible that the loss in phospholipids could be due, in part, to higher expression, and potentially higher activity, of phospholipases. We noted that sphingolipids with saturated and mono-unsaturated acyl chain were prone to be dysregulated. The nature of acyl chains in complex lipids may reflect dietary habits as well as the state of peripheral energy metabolism. High content in saturated fatty acids is often associated with increased basal metabolism. Lipidomic analysis in yeast revealed a regulatory role for glucose-sensing pathways in acyl chains in phospholipids (da Silveira Dos Santos et al., 2014). Altered levels of saturated fatty acids were described in the cell fraction of blood of ALS patients and higher content in monounsaturated fatty acids was associated with higher survival (Henriques

et al., 2015a). Unsaturation impacts membrane fluidity and low proportion in monounsaturated acyl chains leads to higher stiffness. Disturbance in membrane fluidity is known to impair cellular function such as cell signaling.

Sphingolipids in Spinal Cord from SOD1^{G86R} Mice

Here, we describe, for the first time, common dysregulations in the spinal cord of an animal model of ALS, at gene and lipid levels. Our analysis identified sphingolipid metabolism as the most dysregulated biological pathway. Sphingolipids are complex lipids derived from sphingosine.

These lipids act as structural lipids, signaling molecules (e.g., ceramide, ceramide-phosphate) or as ligands for cell membrane receptors (e.g., sphingosine-1-P, lysophosphatidic acid). The causes behind the modifications of sphingolipid metabolism could be multiple. Sphingolipids are involved in key pathways for ALS, such as autophagy and protein clearance, cell survival, energy metabolism, and neuroinflammation. In yeast, the ceramide synthase genes are termed “lag-genes,” for “longevity-associated genes” regulating nutrient sensing, autophagy and lifespan. However, excess in ceramide in rodents promotes accumulation of lipids, triggers endoplasmic reticulum, and lipotoxic stress (Martínez-Sánchez et al., 2017). In multiple sclerosis, increased level of ceramides is suspected to contribute to mitochondrial dysfunctions and axonal damage (Vidaurre et al., 2014). Loss of ceramide in the CNS of SOD1^{G86R} mice could therefore directly impact autophagy process, cell bioenergetics and neuronal integrity. Sphingosine-1-phosphate exerts trophic effects on neuron (Míguez et al., 2015; Geffin et al., 2017) but also on muscle during acute stress such as denervation (Danieli-Betto et al., 2005; Zanin et al., 2008).

Similarly, ceramide-phosphate promotes cell survival through the PI3-K/PKB pathway (Gómez-Muñoz et al., 2005; Gómez-Muñoz, 2006). Interestingly, the upregulation of *Cerk* and *Sphk1*, two genes involved in the synthesis of ceramide-phosphate and sphingosine-1-phosphate could be a protective, or compensatory, mechanism for counteracting neurodegeneration. Our results reinforce the critical role of complex lipids, which are dysregulated, in neuronal stress.

At disease onset, SOD1^{G86R} mice present with marked down-regulation of monohexosylceramide (glucosylceramide or galactosylceramide), and lactosylceramide. Similarly to phospholipids, lower levels of these lipids could be due to lower synthesis or higher degradation/conversion. *Ugt8a* codes for the galactosylceramide synthase and was found down-regulated in SOD1^{G86R} mice. Interestingly, its expression level correlated to disease severity in SOD1^{G86R} mice. It suggests a reduced synthesis of galactosylceramide in SOD1^{G86R} mice, and depends on disease severity. Galactosylceramide and glucosylceramide are precursors of sulfatides and gangliosides, which are particularly abundant in the CNS. Gangliosides in particular are enriched in lipid rafts and contribute to signal transduction. For instance, ganglioside GM1a interacts with TrkA and potentiates BDNF signaling and neuroprotection. Defect in GM1a-TrkA signaling could lead to serious neuronal

phenotypes as this complex has been proposed as a binding site for toxins from clostridium perfringens (Oda et al., 2012). Dysregulated glycosphingolipid metabolism could therefore participate in the progression of ALS symptoms in SOD1^{G86R} mice.

Clinical Perspectives for ALS

One issue with data obtained with the SOD1 mice is the translatability to clinic. Many clinical trials, based on preclinical data obtained with the SOD1 models, have failed in ALS. This has raised concerns regarding the reliability of the SOD1 mice as models for ALS. In our opinion, the SOD1^{G86R} line remains a good experimental tool for studying ALS. Indeed, these mice present with the main motor and metabolic symptoms found in ALS patients, although only 2% of patients harbor mutations on the *Sod1* gene. Regarding lipid metabolism, both ALS patients and SOD1^{G86R} mice present higher incidence of hypermetabolism (Dupuis et al., 2004; Funalot et al., 2009) and with similar increases in glycosphingolipids in the CNS, such as GM1a (Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2017).

Riluzole and edaravone are two drugs approved for the treatment of ALS in the USA. They both have beneficial effects on motor functions and survival in the SOD1^{G93A} mice (Gurney et al., 1996; Waibel et al., 2004; Ito et al., 2008; Del Signore et al., 2009; Shin et al., 2012), although riluzole's effects in SOD1 mice are questioned as they were not confirmed in other studies (Scott et al., 2009; Li et al., 2013; McAllum et al., 2013). Discrepancies between studies could originate from the experimental protocols (e.g., dose, route of administration) or from low rigorosity in study design (e.g., sample size, blinding of experimenters) (Scott et al., 2009; Ludolph et al., 2010). Nutritional interventions, which have shown promising results in ALS patients (Dorst et al., 2013; Wills et al., 2014), extend significantly the survival of SOD1^{G86R} mice (Dupuis et al., 2004). Therefore, we believe that the SOD1 models, and particularly the SOD1^{G86R} model, remain predictive tools for studying pathological processes of ALS.

Our study highlights dysregulations of sphingolipid metabolism in SOD1^{G86R} mice at symptomatic disease stage. As bioactive molecules, sphingolipids interplay with many cell pathways that could be targeted with drug candidates. Pharmacological modulators targeting the metabolism of sphingolipids exist and have been proposed for the treatment of human diseases (Canals et al., 2011). *In silico* analysis has identified fingolimod and pyrimethamine as tentative modulators for ALS. These two drugs modulate sphingosine-1-phosphate signaling and have been already tested in ALS. Fingolimod improved motor functions and survival of SOD1^{G93A} mice and has been given to ALS patients in a clinical phase 2a safety study. Pyrimethamine has been shown to successfully lower mutant SOD1 proteins in the cerebrospinal fluid of ALS patients carrying SOD1 mutations. Other potential drug candidates have been tentatively identified and most of them have not been investigated in ALS. The facts that our data-driven analysis identified pharmacological compounds already tested in ALS reinforce the relevance of our results.

To conclude, spinal cord of SOD1^{G86R} mice present with profound dysregulations at transcriptomic and metabolomic levels that point to sphingolipids. Our results complement existing data on dysregulation of complex lipids in ALS and could open new therapeutic strategies linked to sphingolipids.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AH, VC, CK, MS, J-PL, and BW: Conceived and designed the experiments; AH, VC, AB, AM, and CK: Performed the experiments; AH, VC, AB, AM, CK, BW, CB-N, MS, and J-PL: Analysis and interpretation of the data; VC, CB-N, BW, CK, MS, and J-PL: Contributed reagents, materials, and analysis tools; AH, VC, AB, AM, CK, BW, CB-N, MS, and J-PL: Wrote, discussed and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11:R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25–29. doi: 10.1038/75556
- Bastiaansen, A. J., Karper, J. C., Wezel, A., de Boer, H. C., Welten, S. M., de Jong, R. C., et al. (2014). TLR4 accessory molecule RP105 (CD180) regulates monocyte-driven arteriogenesis in a murine hind limb ischemia model. *PLoS ONE* 9:e99882. doi: 10.1371/journal.pone.0099882
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc.* 57, 289–300.
- Canals, D., Perry, D. M., Jenkins, R. W., and Hannun, Y. A. (2011). Drug targeting of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases. *Br. J. Pharmacol.* 163, 694–712. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01279.x
- Carbia-nagashima, A., Gerez, J., Perez-castro, C., Paez-pereda, M., Silberstein, S., Stalla, K., et al. (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during *Cell* 13, 309–323. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.044
- Cheng, D., Jenner, A. M., Shui, G., Cheong, W. F., Mitchell, T. W., Jessica, R., et al. (2011). Lipid pathway alterations in Parkinson's disease primary visual cortex. *PLoS ONE* 6:e17299. doi: 10.1371/journal.pone.0017299
- Cooper-knock, J., Green, C., Altschuler, G., Wei, W., Bury, J. J., Heath, P. R., et al. (2017). A data-driven approach links microglia to pathology and prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* 5:23. doi: 10.1186/s40478-017-0424-x
- Cutler, R. G., Pedersen, W. A., Camandola, S., Rothstein, J. D., and Mattson, M. P. (2002). Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 52, 448–457. doi: 10.1002/ana.10312
- Danieli-Betto, D., Germinario, E., Esposito, A., Megighian, A., Midrio, M., Ravara, B., et al. (2005). Sphingosine 1-phosphate protects mouse extensor digitorum longus skeletal muscle during fatigue. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, 1367–1373. doi: 10.1152/ajpcell.00246.2004
- Del Signore, S. J., Amante, D. J., Kim, J., Stack, E. C., Goodrich, S., Cormier, K., et al. (2009). Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10, 85–94. doi: 10.1080/17482960802226148
- Desseille, C., Deforges, S., Biondi, O., Houdebine, L., D'amico, D., Lamazière, A., et al. (2017). Specific physical exercise improves energetic metabolism in the

FUNDING

This work was supported by the European Community's Health Seventh Framework Programme under grant agreement No. 259867 (Euro-MOTOR), Target ALS, "Association André combat la SLA" and "Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives" (AREMANE). RNA-sequencing was performed by the IGBMC GenomEast platform, a member of the "France Génomique" consortium (ANR-10-INBS-0009).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00433/full#supplementary-material>

- skeletal muscle of amyotrophic-lateral- sclerosis mice. *Front. Mol. Neurosci.* 10:332. doi: 10.3389/fnmol.2017.00332
- Dodge, J. C. (2017). Lipid involvement in neurodegenerative diseases of the motor system: insights from lysosomal storage diseases. *Front. Mol. Neurosci.* 10:356. doi: 10.3389/fnmol.2017.00356
- Dodge, J. C., Treleaven, C. M., Pacheco, J., Cooper, S., Bao, C., Abraham, M., et al. (2015). Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1:201508767. doi: 10.1073/pnas.1508767112
- Dorst, J., Cypionka, J., and Ludolph, A. C. (2013). High-caloric food supplements in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: a prospective interventional study. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 14, 533–536. doi: 10.3109/21678421.2013.823999
- Dorst, J., Dupuis, L., Petri, S., Kollwe, K., Abdulla, S., Wolf, J., et al. (2015). Percutaneous endoscopic gastrostomy in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective observational study. *J. Neurol.* 262, 849–858. doi: 10.1007/s00415-015-7646-2
- Druker, J., Liberman, A. C., Antunica-Noguerol, M., Gerez, J., Paez-pereda, M., Rein, T., et al. (2013). RSUME enhances glucocorticoid receptor SUMOylation and transcriptional activity. *Mol. Cell Biol.* 33, 2116–2127. doi: 10.1128/MCB.01470-12
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J.-L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., et al. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70, 1004–1009. doi: 10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27
- Dupuis, L., Oudart, H., René, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., and Loeffler, J.-P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11159–11164. doi: 10.1073/pnas.0402026101
- El Oussini, H., Bayer, H., Scekcic-Zahirovic, J., Verccruysse, P., Sinniger, J., and Dirrig-Grosch, S. (2016). Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 131, 465–480. doi: 10.1007/s00401-016-1534-4
- Endo, F., Komine, O., Wyss-coray, T., Yamanaka, K., Endo, F., Komine, O., et al. (2015). Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease progression in ALS Mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells. *Cell Rep.* 11, 592–604. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.053
- Enjin, A., Rabe, N., Nakanishi, S. T., Vallstedt, A., Gezelius, H., Memic, F., et al. (2010). Identification of novel spinal cholinergic genetic subtypes disclose Chodl and Pitx2 as markers for fast motor neurons and partition cells. *J. Comp. Neurol.* 518, 2284–2304. doi: 10.1002/cne.22332
- Funalot, B., Desport, J.-C., Sturtz, F., Camu, W., and Couratier, P. (2009). High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral

- sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10, 113–117. doi: 10.1080/17482960802295192
- Geffin, R., Martinez, R., de Las Pozas, A., Issac, B., and McCarthy, M. (2017). Fingolimod induces neuronal-specific gene expression with potential neuroprotective outcomes in maturing neuronal progenitor cells exposed to HIV. *J. Neurovirol.* 23, 808–824. doi: 10.1007/s13365-017-0571-7
- Gómez-Muñoz, A. (2006). Ceramide 1-phosphate / ceramide, a switch between life and death. *Biochem. Biophys. Acta* 1758, 2049–2056. doi: 10.1016/j.bbame.2006.05.011
- Gómez-Muñoz, A., Kong, J., Parhar, K., Wang, S., Gangoiti, P., Gonzalez, M., et al. (2005). Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase / protein kinase B pathway. *FEBS Lett.* 579, 3744–3750. doi: 10.1016/j.febslet.2005.05.067
- Grad, L. I., Yerbury, J. J., Turner, B. J., Guest, W. C., Pokrishevsky, E., and O'Neill, M. A. (2014). Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 3620–3625. doi: 10.1073/pnas.1312245111
- Gurney, M. E., Cutting, F. B., Zhai, P., Doble, A., Taylor, C. P., Andrus, P. K., et al. (1996). Benefit of Vitamin E, Riluzole, and Gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 39, 147–157. doi: 10.1002/ana.410390203
- Halevy, T., Biancotti, J., Yanuka, O., Golan-lev, T., and Benvenisty, N. (2016). Molecular Characterization of down syndrome embryonic stem cells reveals a role for RUNX1 in neural differentiation. *Stem Cell Rep.* 7, 777–786. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.08.003
- Henriques, A., Blasco, H., Fleury, M.-C., Corcia, P., Echaniz-LAguana, A., Robelin, L., et al. (2015a). Blood cell palmitoleate-palmitate ratio is an independent prognostic factor for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 10:e0131512. doi: 10.1371/journal.pone.0131512
- Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D. A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., D'Ambra, E., et al. (2015b). Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. *Hum. Mol. Genet.* 24, 7390–7405. doi: 10.1093/hmg/ddv439
- Henriques, A., and Gonzalez De Aguilar, J.-L. (2011). Can transcriptomics cut the gordian knot of amyotrophic lateral sclerosis? *Curr. Genomics* 12, 506–515. doi: 10.2174/138920211797904043
- Henriques, A., Huebner, M., Blasco, H., Keime, C., Andres, C. R., Corcia, P., et al. (2017). Inhibition of β -Glucocerebrosidase activity preserves motor unit integrity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* 7:5235. doi: 10.1038/s41598-017-05313-0
- Henriques, A., Kastner, S., Chatzikonstantinou, E., Pitzer, C., Plaas, C., Kirsch, F., et al. (2015c). Gene expression changes in spinal motoneurons of the SOD1 G93A transgenic model for ALS after treatment with. *Front. Cell. Neurosci.* 8:464. doi: 10.3389/fncel.2014.00464
- Henriques, A., Pitzer, C., Dittgen, T., Klugmann, M., Dupuis, L., and Schneider, A. (2011). CNS-targeted viral delivery of G-CSF in an animal model for ALS: improved efficacy and preservation of the neuromuscular unit. *Mol. Ther.* 19, 284–292. doi: 10.1038/mt.2010.271
- Hooten, K. G., Beers, D. R., Zhao, W., and Appel, S. H. (2015). Protective and toxic neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics* 12, 364–375. doi: 10.1007/s13311-014-0329-3
- Ito, H., Wate, R., Zhang, J., Ohnishi, S., Kaneko, S., Ito, H., et al. (2008). Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Exp. Neurol.* 213, 448–455. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.07.017
- Jésus, P., Fayemendy, P., Nicol, M., Lautrette, G., Sourisseau, H., Preux, P.-M., et al. (2018). Hypermetabolism is a deleterious prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 25, 97–104. doi: 10.1111/ene.13468
- Kamburov, A., Cavill, R., Ebbels, T. M. D., Herwig, R., and Keun, H. C. (2011a). Integrated pathway-level analysis of transcriptomics and metabolomics data with IMPaLA. *Bioinformatics* 27, 2917–2918. doi: 10.1093/bioinformatics/btr499
- Kamburov, A., Pentchev, K., Galicka, H., Wierling, C., Lehrach, H., and Herwig, R. (2011b). ConsensusPathDB: toward a more complete picture of cell biology. *Nucleic Acids Res.* 39, 712–717. doi: 10.1093/nar/gkq1156
- Kamburov, A., Wierling, C., Lehrach, H., Herwig, R. (2009). ConsensusPathDB — a database for integrating human functional interaction networks. *Nucleic Acids Res.* 37, 623–628. doi: 10.1093/nar/gkn698
- Kilbey, A., Terry, A., Jenkins, A., Borland, G., Zhang, Q., Wakelam, M. J., et al. (2010). Runx regulation of sphingolipid metabolism and survival signaling. *Cancer Res.* 70, 5860–5870. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0726
- Kim, D., Perteza, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14:R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36
- Korkut, C., Li, Y., Koles, K., Brewer, C., Ashley, J., Yoshihara, M., et al. (2013). Report regulation of postsynaptic retrograde signaling by presynaptic exosome release. *Neuron* 77, 1039–1046. doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.013
- Lee, J. K., Shin, J. H., Lee, J. E., and Choi, E.-J. (2015). Role of autophagy in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 2517–2524. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.08.005
- Li, J., Sung, M., and Rutkove, S. B. (2013). Electrophysiologic biomarkers for assessing disease progression and the effect of Riluzole in SOD1 G93A ALS Mice. *PLoS ONE* 8:e65976. doi: 10.1371/journal.pone.0065976
- Ludolph, A. C., Bendotti, C., Blaugrund, E., Chio, A., Greensmith, L., Loeffler, J., et al. (2010). Guidelines for preclinical animal research in ALS / MND: a consensus meeting. *Amyotroph. Lateral Scler.* 11, 38–45. doi: 10.3109/17482960903545334
- Mariosa, D., Hammar, N., Malmström, H., Ingre, C., Jungner, I., and Ye, W. (2017). Blood Biomarkers of carbohydrate, lipid, and apolipoprotein metabolisms and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a more than 20-year follow-up of the Swedish AMORIS Cohort. *Ann. Neurol.* 81, 718–728. doi: 10.1002/ana.24936
- Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroja, J., Rial-Pensado, E., et al. (2017). Hypothalamic AMPK-ER stress-JNK1 axis mediates the central actions of thyroid hormones on energy balance. *Cell Metab.* 26, 212–229. doi: 10.1016/j.cmet.2017.06.014
- McAllum, E. J., Lim, N. K.-H., Hickey, J. L., Paterson, B. M., Donnelly, P. S., Li, Q.-X., et al. (2013). Therapeutic effects of Cu (atsm) in the SOD1-G37R mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 14, 586–590. doi: 10.3109/21678421.2013.824000
- Miguez, A., Barriga, G. G., Brito, V., Straccia, M., Giral, A., Ginés, S., et al. (2015). Fingolimod (FTY720) enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in Huntington's disease by preventing p75 NTR up-regulation and astrocyte-mediated inflammation. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4958–4970. doi: 10.1093/hmg/ddv218
- Minamiyama, M., Katsuno, M., Adachi, H., Doi, H., Kondo, N., Iida, M., et al. (2012). Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. *Nat. Med.* 18, 1531–1538. doi: 10.1038/nm.2932
- Mitsui, S., Hidaka, C., Furihata, M., Osako, Y., and Yuri, K. (2013). A mental retardation gene, motopsin / prss12, modulates cell morphology by interaction with seizure-related gene 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436, 638–644. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.112
- Nardo, G., Trolese, M. C., Vito, G., De Cecchi, R., Riva, N., Dina, G., et al. (2016). Immune response in peripheral axons delays disease progression in SOD1 G93A mice. *J. Neuroinflammation* 13:261. doi: 10.1186/s12974-016-0732-2
- Nonaka, T., Masuda-suzukake, M., Arai, T., Hasegawa, Y., Akatsu, H., Obi, T., et al. (2013). Article prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep.* 4, 124–134. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.007
- Numajiri, T., Mitsui, S., Hisa, Y., and Ishida, T. (2006). The expression of a motoneuron-specific serine protease, motopsin (PRSS12), after facial nerve axotomy in mice. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* 59, 393–397. doi: 10.1016/j.bjps.2005.04.018
- Oda, M., Kabura, M., Takagishi, T., Suzue, A., Tominaga, K., Urano, S., et al. (2012). *Clostridium perfringens* alpha-toxin recognizes the GM1a-TrkA complex. *J. Biol. Chem.* 287, 33070–33079. doi: 10.1074/jbc.M112.393801
- Paganoni, S., Deng, J., Jaffa, M., Cudkowicz, M. E., and Wills, A.-M. (2011). Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 44, 20–24. doi: 10.1002/mus.22114
- Palamíuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S. T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., et al. (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an

- early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol. Med.* 7, 526–546. doi: 10.15252/emmm.201404433
- Patin, F., Baranek, T., Vourc'h, P., Nadal-Desbarats, L., Goossens, J.-F., Marouillat, S., et al. (2016). Combined metabolomics and transcriptomics approaches to assess the IL-6 blockade as a therapeutic of ALS: deleterious alteration of lipid metabolism. *Neurotherapeutics* 13, 905–917. doi: 10.1007/s13311-016-0461-3
- Pinto, S., Cunha, C., Barbosa, M., Vaz, A. R., and Brites, D. (2017). Exosomes from NSC-34 Cells transfected with hSOD1-G93A Are Enriched in miR-124 and drive alterations in microglia phenotype. *Front. Neurosci.* 11:273. doi: 10.3389/fnins.2017.00273
- Raman, R., Allen, S. P., Goodall, E. F., Kramer, S., Ponger, L. L., Heath, P. R., et al. (2015). Gene expression signatures in motor neurone disease fibroblasts reveal dysregulation of metabolism, hypoxia-response and RNA processing functions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 41, 201–226. doi: 10.1111/nan.12147
- Ringer, C., Weihe, E., and Schütz, B. (2012). Calcitonin gene-related peptide expression levels predict motor neuron vulnerability in the superoxide dismutase 1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 45, 547–554. doi: 10.1016/j.nbd.2011.09.011
- Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H., and Gordont, J. W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 689–693. doi: 10.1073/pnas.92.3.689
- Rosen, D., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D., Sapp, P., Hentati, A., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62. doi: 10.1038/362059a0
- Safdar, A., Saleem, A., and Tarnopolsky, M. A. (2016). The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 504–517. doi: 10.1038/nrendo.2016.76
- Schmitt, F., Hussain, G., Dupuis, L., Loeffler, J.-P., and Henriques, A. (2014). A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. *Front. Cell. Neurosci.* 8:25. doi: 10.3389/fncel.2014.00025
- Scott, S., Kranz, J. E., Cole, J., Lincecum, J. M., Thompson, K., Kelly, N., et al. (2009). Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler.* 9, 4–15. doi: 10.1080/17482960701856300
- Shin, J. H., Lee, Y. A., Lee, J. K., Lee, Y. B., Cho, W., Im, D. S., et al. (2012). Concurrent blockade of free radical and microsomal prostaglandin E synthase-1-mediated PGE2 production improves safety and efficacy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 122, 952–961. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07771.x
- Taylor, J. P., Brown Jr, R. H., and Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS : from genes to mechanism. *Nature* 539:197. doi: 10.1038/nature20413
- The Gene Ontology Consortium (2015). Gene Ontology Consortium : going forward. *Nucleic Acids Res.* 43, 1049–1056. doi: 10.1093/nar/gku1179
- Vercruyse, P., Sinniger, J., El Oussini, H., Scekcic-Zahirovic, J., Dieterlé, S., Dengler, R., et al. (2016). Alterations in the hypothalamic melanocortin pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 139, 1106–1122. doi: 10.1093/brain/aww004
- Vidaurre, O. G., Haines, J. D., Katz Sand, I., Adula, K. P., Huynh, J. L., McGraw, C. A., et al. (2014). Cerebrospinal fluid ceramides from patients with multiple sclerosis impair neuronal bioenergetics. *Brain* 137, 2271–2286. doi: 10.1093/brain/awu139
- Wagner, A. H., Coffman, A. C., Ainscough, B. J., Spies, N. C., Skidmore, Z. L., Campbell, K. M., et al. (2016). DGIdb 2.0 : mining clinically relevant drug – gene interactions. 44, 1036–1044. doi: 10.1093/nar/gkv1165
- Waibel, S., Reuter, A., Malessa, S., Blaugrund, E., and Ludolph, A. C. (2004). Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. *J. Neurol.* 251, 1080–1084. doi: 10.1007/s00415-004-0481-5
- Wang, J. K. T., Langfelder, P., Horvath, S., and Palazzolo, M. (2017). Exosomes and homeostatic synaptic plasticity are linked to each other and to Huntington's, Parkinson's and other neurodegenerative diseases by database-enabled analyses of comprehensively curated datasets. *Front. Neurosci.* 11:149. doi: 10.3389/fnins.2017.00149
- Wills, A.-M., Hubbard, J., Macklin, E. A., Glass, J., Tandan, R., Simpson, E. P., et al. (2014). Hypercaloric enteral nutrition in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet* 383, 2065–2072. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60222-1
- Wood, P. L., Medicherla, S., Sheikh, N., Terry, B., Philipps, A., Kaye, J. A., et al. (2016). Targeted lipidomics of frontal cortex and plasma Diacylglycerols (DAG) in Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's disease: validation of DAG Accumulation early in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 48, 537–546. doi: 10.3233/JAD-150336
- da Silveira Dos Santos, A. X., Riezman, I., Aguilera-romero, M., David, F., Piccolis, M., Loewith, R. (2014). Systematic lipidomic analysis of yeast protein kinase and phosphatase mutants reveals novel insights into regulation of lipid homeostasis. *Mol. Biol. Cell* 25, 3234–3246. doi: 10.1091/mbc.E14-03-0851
- Yamanaka, K., Chun, S. J., Boillee, S., Fujimori-tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D. H., et al. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* 11, 2007–2009. doi: 10.1038/nn2047
- Yoshikawa, M., Hirabayashi, M., Ito, R., Ozaki, S., Aizawa, S., Masuda, T., et al. (2015). Contribution of the Runx1 transcription factor to axonal pathfinding and muscle innervation by hypoglossal motoneurons. *Dev. Neurobiol.* 75, 1295–1314. doi: 10.1002/dneu.22285
- Yoshikawa, M., Masuda, T., Kobayashi, A., Senzaki, K., and Ozaki, S. (2016). Molecular and cellular neuroscience Runx1 contributes to the functional switching of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) from neurite outgrowth promoting to suppressing in dorsal root ganglion. *Mol. Cell. Neurosci.* 72, 114–122. doi: 10.1016/j.mcn.2016.02.001
- Zanin, M., Germinario, E., Dalla Libera, L., Sandona, D., Sabbadini, R. A., Betto, R., et al. (2008). Trophic action of sphingosine 1-phosphate in denervated rat soleus muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, 36–46. doi: 10.1152/ajpcell.00164.2007

Conflict of Interest Statement: AH and MS are employees of Spedding Research Solutions SAS. VC, BW, and CB-N are employees of Les Laboratoires Servier.

The other authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Copyright © 2018 Henriques, Croixmarie, Bouscary, Mosbach, Keime, Boursier-Neyret, Walter, Spedding and Loeffler. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

B. PUBLICATION 2: Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Functions and Extends Survival in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis

Les rapports métabolomiques récents relient la dérégulation des glycosphingolipides, en particulier la céramide et le glucosylcéramide, à la neurodégénérescence à un stade avancé de la SLA (Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2015a, 2017, 2018). De nombreuses études montrent que la voie du GlcCer est fortement dérégulée dans les tissus des patients. Il est donc possible que cette voie représente une cible thérapeutique pour la SLA. La dégradation du GlcCer s'effectue par : l'enzyme GBA1 qui est située au niveau du lysosome, et l'enzyme GBA2 qui intervient au niveau du RE et de la membrane plasmique. Nos précédents résultats montrent que l'inhibition de la synthèse du GlcCer est délétère pour la régénérescence axonale tandis que l'inhibition de GBA1 et GBA2 par le CBE permet d'améliorer la récupération motrice et ralentit la progression de la maladie des souris *Sod1^{G86R}* (Henriques et al., 2015a, 2017). La voie du GlcCer semble donc crucial dans le maintien de l'intégrité de la JNM.

L'AMB est un inhibiteur de GBA2 également connu pour favoriser l'adressage de GBA1 vers le lysosome et d'augmenter son activité enzymatique. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'enzyme GBA2 dans la moelle épinière des souris *Sod1^{G86R}*. Pour pallier cette augmentation, nous avons utilisé l'AMB pour son activité inhibitrice sur GBA2. Nous avons traité les souris *Sod1^{G86R}* soit à l'AMB (3mM) soit en eau de boisson :

- à un stade pré-symptomatique (de 75 à 95 jours) pour évaluer les effets de l'AMB sur l'apparition de la maladie,
- puis à un stade symptomatique (de 95 jours jusqu'au stade final de la maladie) afin de vérifier les effets du traitement sur la progression de la maladie et la survie des animaux.

En parallèle, nous avons administré l'AMB à des souris nTg après compression du nerf sciatique dans le but d'estimer l'effet d'une inhibition de GBA2 sur la plasticité axonale et sur la récupération motrice des animaux. Enfin, des approches *in vitro* ont été menées pour confirmer les effets du traitement sur la pousse axonale.

Dans cette publication, nous avons montré que l'AMB a des effets bénéfiques sur l'évolution de la pathologie et la durée de vie des animaux. Les souris *Sod1^{G86R}* ont une progression de la maladie qui est ralentit et survivent plus longtemps lorsqu'elles sont traitées à l'AMB. Par ailleurs, les fonctions motrices sont améliorées et les MN préservés. L'AMB ralentit également la destruction des JNM en préservant les muscles de la dénervation. De plus, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (dans le cadre d'une compression du nerf sciatique), nous avons démontré que l'AMB stimule la plasticité axonale et la formation des JNM.

La modulation des sphingolipides par l'AMB semble être une approche prometteuse et novatrice pour la SLA. L'ensemble de nos résultats met en lumière les propriétés neuroprotectrices de l'AMB dans un modèle murin de SLA qui étaient, jusqu'ici, inconnues. Ces résultats suggèrent la possibilité d'utiliser l'AMB comme candidat médicament pour le traitement de la SLA. La disponibilité de l'AMB sur le marché du médicament pourrait faciliter la mise en place rapide d'essais cliniques.

Les données supplémentaires de cette publication se trouvent en annexe.



Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Functions and Extends Survival in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis

Alexandra Bouscary^{1,2}, Cyril Quessada^{1,2}, Althéa Mosbach^{1,2}, Noëlle Callizot³, Michael Spedding^{4*}, Jean-Philippe Loeffler^{1,2*} and Alexandre Henriques^{1,2,4†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Mario Eduardo Guido,
Center for Research in Biological
Chemistry Córdoba (CIQUIBIC),
Argentina

Reviewed by:

Alberto Ferri,
Institute of Translational
Pharmacology (CNR), Italy
Mariano Soiza-Reilly,
CONICET Instituto de Fisiología,
Argentina

*Correspondence:

Michael Spedding
michael@speddingresearchsolutions.fr
Jean-Philippe Loeffler
loeffler@unistra.fr
Alexandre Henriques
alexandre.henriques@neuro-sys.com

†Present address:

Alexandre Henriques
Neuro-sys SAS, Gardanne, France

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 21 February 2019

Accepted: 15 July 2019

Published: 07 August 2019

Citation:

Bouscary A, Quessada C,
Mosbach A, Callizot N, Spedding M,
Loeffler J-P and Henriques A (2019)
Ambroxol Hydrochloride Improves
Motor Functions and Extends
Survival in a Mouse Model of Familial
Amyotrophic Lateral Sclerosis.
Front. Pharmacol. 10:883.
doi: 10.3389/fphar.2019.00883

¹ Université de Strasbourg, UMR_S 1118, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France, ² INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Strasbourg, France, ³ Neuro-sys SAS, Gardanne, France, ⁴ Spedding Research Solutions SAS, Le Vesinet, France

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a multifactorial and fatal neurodegenerative disease. Growing evidence connects sphingolipid metabolism to the pathophysiology of ALS. In particular, levels of ceramides, glucosylceramides, and gangliosides are dysregulated in the central nervous system and at the neuromuscular junctions of both animal models and patients. Glucosylceramide is the main precursor of complex glycosphingolipids that is degraded by lysosomal (GBA1) or non-lysosomal (GBA2) glucocerebrosidase. Here, we report that GBA2, but not GBA1, activity is markedly increased in the spinal cord, of SOD1^{G86R} mice, an animal model of familial ALS, even before disease onset. We therefore investigated the effects of ambroxol hydrochloride, a known GBA2 inhibitor, in SOD1^{G86R} mice. A presymptomatic administration of ambroxol hydrochloride, in the drinking water, delayed disease onset, protecting neuromuscular junctions, and the number of functional spinal motor neurons. When administered at disease onset, ambroxol hydrochloride delayed motor function decline, protected neuromuscular junctions, and extended overall survival of the SOD1^{G86R} mice. In addition, ambroxol hydrochloride improved motor recovery and muscle re-innervation after transient sciatic nerve injury in non-transgenic mice and promoted axonal elongation in an *in vitro* model of motor unit. Our study suggests that ambroxol hydrochloride promotes and protects motor units and improves axonal plasticity, and that this generic compound is a promising drug candidate for ALS.

Keywords: ambroxol, GBA2, glucocerebrosidase, ALS, neuromuscular junction, glucosylceramide

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by a loss of cortical motor neurons in the motor cortex and spinal motor neurons located in the brainstem and in the spinal cord with denervation. Considered to be the most common motor neuron disease in adults, ALS leads to progressive paralysis, muscle atrophy, fasciculation, and spasticity and affects the central nervous system and peripheral organs (Schmitt et al., 2014). ALS is associated with sporadic forms (90%) and familial form (10%). Mutations on genes encoding superoxide dismutase 1 (SOD1), TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) and fused in sarcoma (FUS), and repeat expansions in chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72) (Lattante et al., 2015) are now documented. It is

reported that lipid metabolism in ALS patient has a major impact on the disease severity. A high incidence of dyslipidemia and hypermetabolism is present in ALS patients (Desport et al., 2001; Funalot et al., 2009) and hypermetabolism and high low-density lipoprotein (LDL)/high-density lipoprotein (HDL) ratios or high body mass index are associated with better prognosis and slower disease progression (Dupuis et al., 2008; Paganoni et al., 2011; Jésus et al., 2018). The causes of the metabolic dysfunctions in ALS remain unknown and could result from central pathologies combined with peripheral alterations.

Metabolomic studies have now shown that recent human evolution has marked changes in lipid metabolism in muscle and brain to support increased metabolic activity (Noakes and Spedding, 2012; Bozek et al., 2014). Beyond their role in energy metabolism, lipids and particularly sphingolipids are modulators of cellular signaling pathways and participate in the maintenance and repair of the various components of the motor axis such as neurons and muscles. Our transcriptomic studies on muscle biopsies in ALS patients showed a significant increase in the expression of the UGCG gene (UDP-glucose ceramide glucosyltransferase), encoding the sphingolipid metabolism enzyme that synthesizes glucosylceramide (GlcCer) (Henriques et al., 2015; Dodge, 2017; Henriques et al., 2017). It has been shown in ALS that GlcCer and ceramide levels are deregulated (Cutler et al., 2002; Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2015; Henriques et al., 2018). These data suggest that GlcCer plays a key role in the pathophysiology of ALS. We performed a lipidomic analysis of different tissues of SOD1^{G86R} mice, an animal model of ALS, and we observed a complete rearrangement of the main lipid classes, including sphingolipids like GlcCer and ceramides in the muscles and spinal cords of SOD1^{G86R} mice, before the onset of the disease. Inhibition of GlcCer synthesis by administration of a UGCG inhibitor (AMP-DMN) significantly delays functional recovery after sciatic nerve injury (Henriques et al., 2015; Henriques et al., 2018). GlcCer is the precursor of gangliosides, and this hydrolysis is performed by GBA1 and GBA2, two beta-glucocerebrosidases (GCases).

Our previous results have shown a beneficial effect for SOD1^{G86R} mice after inhibition of GlcCer degradation (Henriques et al., 2017). Partial inhibition of GlcCer degradation with a low dose of conduritol B epoxide (CBE) (10 mg/kg/d) delays disease onset and improves motor functions in presymptomatic and in symptomatic SOD1^{G86R} mice. Pharmacological inhibition of GCCase by CBE preserves motor neuron number and the neuromuscular junctions (NMJs) in SOD1^{G86R} mice. Furthermore, CBE promotes recovery after sciatic nerve injury *in vivo* (Henriques et al., 2017). Conversely, a high dose CBE (100 mg/kg/d) induced neuronal toxicity and can be used to inhibit the lysosomal GCCase to induce a chemical model of Gaucher's diseases (Kanfer et al., 1975; Vardi et al., 2016). Indeed, CBE is an inhibitor of lysosomal GCCase (GBA1) and, less potently, of the non-lysosomal GCCase (GBA2) (Ridley et al., 2013). Moreover, loss-of-function mutations of GBA1 are a major cause of hereditary Parkinson's Disease (PD), while the activation of beta-GCCase increases alpha-synuclein clearance and lysosomal function in dopaminergic neurons (Schapira, 2015; Mazzulli

et al., 2016; Stojkowska et al., 2018); thus, there may be a risk of PD with GBA1 inhibitors.

GBA2 is localized at the plasma membrane and as a membrane-associated protein at the Golgi apparatus and at the endoplasmic reticulum (Woeste and Wachten, 2017). Loss of function of GBA2 is associated with hereditary spastic paraplegia suggesting that the regulation of GlcCer at the plasma membrane and/or at intracellular organelles is important for the maintenance of motor functions, even if the role of GBA2 in the central nervous system remains poorly understood.

Our approach was therefore to inhibit the non-lysosomal GBA2 without inhibiting GBA1. Among the safe molecules able to cross the blood–brain barrier (BBB), ambroxol hydrochloride (AMB) has been extensively studied (Albin and Dauer, 2014; McNeill et al., 2014; Ambrosi et al., 2015; Migdalska-Richards et al., 2016b; Migdalska-Richards et al., 2017; O'Regan et al., 2017). In our study, we confirmed that AMB inhibited GBA2 activity. We have then investigated the effects of AMB *in vivo*, in a transgenic model of ALS and on non-transgenic mice to determine whether it could improve the lifespan of SOD1^{G86R} mice and stimulate the plasticity of the neuromuscular junctions (NMJs).

RESULTS

GBA2 Activity Is Increased in Pre-Symptomatic SOD1^{G86R} Mice

GlcCer is a precursor of complex glycosphingolipids. It is synthesized from ceramide by the GlcCer synthase and degraded by GBA1 or GBA2, two GCases. We previously reported that inhibition of GCCase activity by a low dose of CBE is neuroprotective in the SOD1^{G86R} mice (Henriques et al., 2017). CBE has inhibitory activities on lysosomal and GBA2 activity (Ridley et al., 2013).

Here, we sought to measure GCCase activities at specific pH, and in presence or absence of detergent, to determine whether GBA1 (pH = 4.6, with detergent) and GBA2 (pH = 5.8, no detergent) activities are dysregulated in tissues of SOD1^{G86R} mice (Witte et al., 2010). At a symptomatic disease stage, characterized by moderate motor dysfunctions, GBA1 activity was not significantly altered in SOD1^{G86R} when compared to control non-transgenic mice (Figure 1A). However, GBA2 activity was strongly increased in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice at 105d (symptomatic) but not in muscle or in liver. This increase in GBA2 activity was also observed in presymptomatic SOD1^{G86R} mice (Supplementary Figure 1A). The GBA1 activity was not changed at either time point. GBA1 and GBA2 share common enzymatic activity but differ in structure, thus allowing the use of specific inhibitors. The effects of AMB on GCCase activities *in vitro* have been compared to those of CBE. As previously reported (Ridley et al., 2013), CBE had a strong inhibitory effect on the GBA1 activity being 10-fold less potent on GBA2 activity (Figure 1B). AMB has been reported to inhibit the GBA2 activity (Maegawa et al., 2009), which was confirmed in a dose-dependent manner (Figure 1C). Taken together, these results show that GBA2 activity is increased in SOD1^{G86R} mice, already

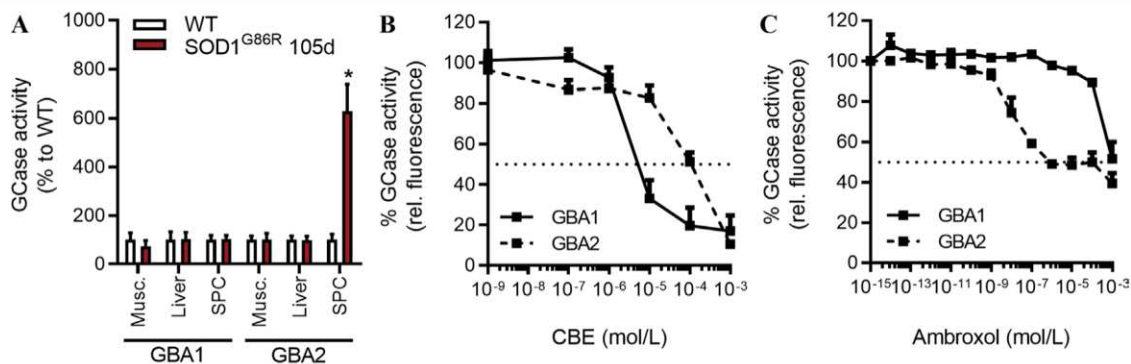


FIGURE 1 | GCCase activities in symptomatic SOD1^{G86R} mice. **(A)** GCCase activity in different tissues of SOD1^{G86R} and wild type (WT) mice at 105d ($n = 5-9$ /tissues, $*p < 0.05$). **(B)** GCCase [glucocerebrosidase (GBA)] activity after conduritol B epoxide (CBE) dose-response ($n = 6$ /group). **(C)** GCCase (GBA) activity after ambroxol hydrochloride (AMB) dose-response in liver tissue ($n = 4$ /group).

at pre-symptomatic disease stage, and that AMB can inhibit its activity.

Ambroxol Hydrochloride Delays Disease Onset, Preserve the Integrity of Motor Units, and Increases Survival of SOD1^{G86R} Mice

AMB was administrated to presymptomatic SOD1^{G86R} mice, to determine whether it could influence disease onset and loss of motor functions in a preventive manner. Grip strength was used as an indicator of muscle strength. SOD1^{G86R} mice were treated from 75 days to 95 days of age, and body mass and muscle strength were evaluated every other day (Figure 2). In the first cohort of presymptomatic SOD1^{G86R} mice, AMB had no significant effects on the body mass of treated mice (Figure 2A); however, it strongly improved the muscle strength of SOD1^{G86R} mice and significantly delayed of disease onset, defined as a drop of more than 20% of the mouse maximal strength (Figure 2B). These results were replicated in a separate cohort of SOD1^{G86R} mice, using the same experimental conditions (Supplementary Figure 2). Indeed, an improved muscle strength and a delayed disease onset were observed after AMB administration in the second cohort.

At 95 days of age, neurodegeneration of motor neurons is detected in the lumbar region of the spinal cord of SOD1^{G86R} mice (Henriques et al., 2017). As compared to the WT mice, 40% of motor neurons (MNs) are lost at this time point. The number of MNs in the lumbar region of the spinal cord was significantly higher in SOD1^{G86R} mice treated with AMB (Figures 2C, D), suggesting that presymptomatic administration of AMB delays neurodegeneration. In order to determine whether the spared MNs have axonal projection to hind limb muscles, fluorogold, a retrograde tracer, has been injected in gastrocnemius and tibialis anterior muscles. SOD1^{G86R} mice treated with AMB had more MNs-positive for fluorogold (Figures 2E, F).

Muscle strength is dependent on the innervation status of muscles. The integrity of NMJs was assessed by immunohistochemistry with the overlapping of post-synaptic

cluster of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) and the axonal markers neurofilament and synaptophysin. AMB has significantly protected muscle innervation in SOD1^{G86R} mice, as they had almost two times more NMJs than the vehicle group, at 95 days of age (Figure 2G, H). These results suggest that presymptomatic administration of AMB delays disease onset by improving the integrity of the motor units.

Next, we sought to determine whether a later administration of AMB, at disease onset, could slow down disease progression and improve survival of SOD1^{G86R} mice. AMB was administrated to SOD1^{G86R} mice and wild-type littermates, starting at 95 days of age. From 95 days of age, motor symptoms progress rapidly in SOD1^{G86R} mice, and they reach disease end stage around 110 days of age. Body mass, muscle strength, and overall survival were monitored to follow the progression of ALS symptoms (Figure 3). After administration of AMB, the decline in body mass was limited, and SOD1^{G86R} mice were heavier, although this effect was transient (Figure 3A). A clear improvement of muscle strength was observed, starting from day 101, in SOD1^{G86R} mice treated with AMB when compared to the SOD1^{G86R} vehicle group (Figure 3B). Most importantly, survival of SOD1^{G86R} mice was significantly increased by 6 days after administration of AMB (Figure 3C).

Altogether, these results show that AMB delays disease progression when the treatment is initiated at disease onset.

Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Recovery After Sciatic Nerve Injury in Non-Transgenic Mice

We have previously demonstrated that partial inhibition of GCCase activity with CBE improves axonal elongation *in vitro* and *in vivo* recoveries after sciatic nerve injury (Henriques et al., 2017).

We hypothesized that AMB could exert similar pro-regenerative effects. First, we investigated whether AMB could enhance axonal elongation and the formation of NMJs, in an *in vitro* model of motor units, based on a co-culture of myoblasts and spinal cord explants (Combes et al., 2015). This *in vitro* model allows the maturation of axons and the formation of NMJs, as

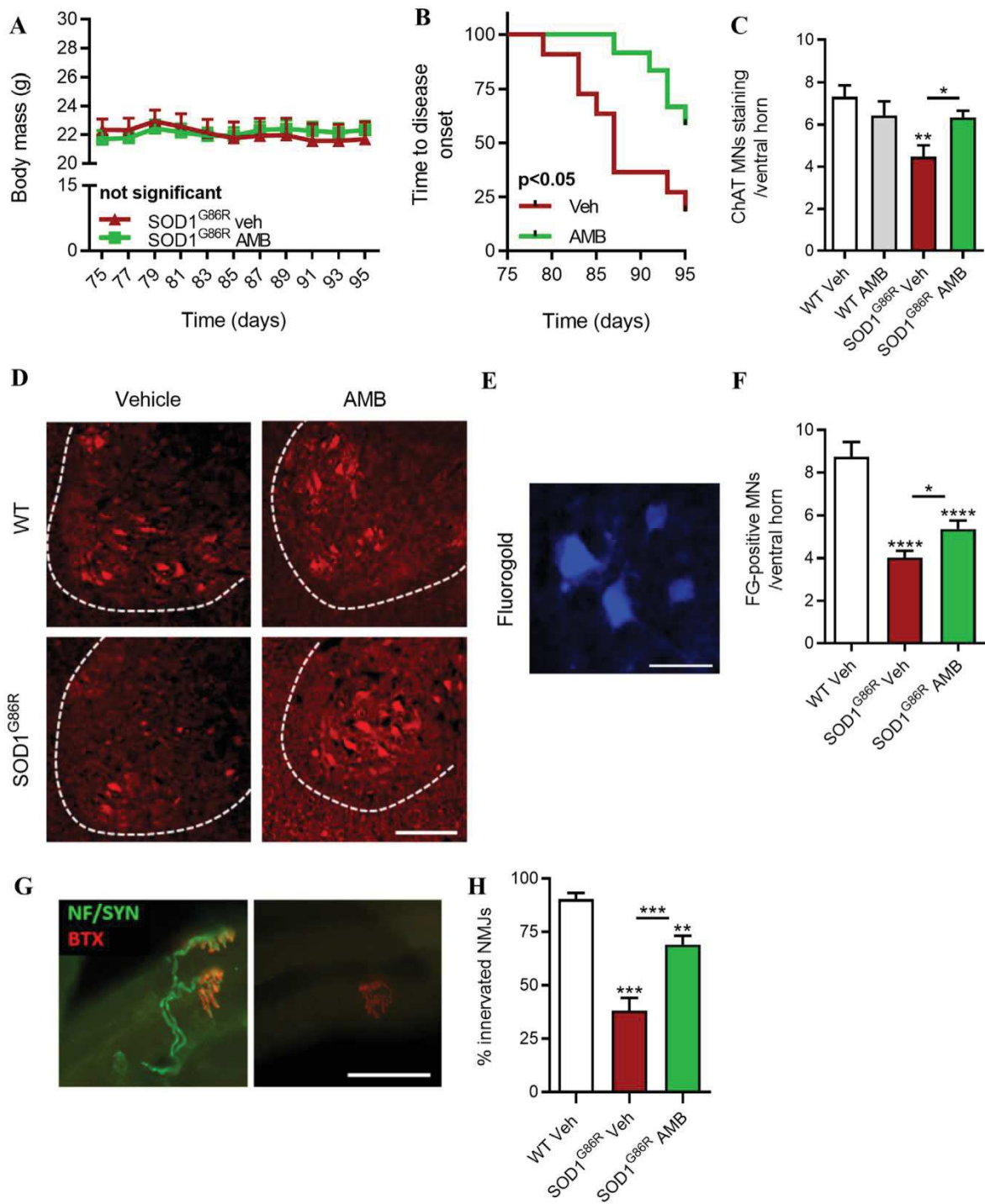


FIGURE 2 | AMB improves motor functions and preserves neuromuscular junction and the functional motor neurons (MNs) in pre-symptomatic SOD1^{G86R} mice. **(A)** Body mass evolution in SOD1^{G86R} mice after AMB treatment (not significant, $n = 11-12$ /group). **(B)** Kaplan–Meier showing time to onset of muscle strength loss in SOD1^{G86R} mice ($p < 0.05$, $n = 11-12$ /group). **(C)** Quantification of choline acetyl transferase (ChAT)-positive cells located in the ventral horn of the spinal cord and having a size bigger than $400 \mu\text{m}^2$ ($n = 5$ /group). **(D)** Representative pictures of the ventral horn of the L1–L3 lumbar area, after immunostaining with ChAT (red), a marker specific for spinal motor neurons. Ventral horns are delimited by dashed lines. Scale bar = $100 \mu\text{m}$. **(E)** Representative picture of retrogradely labeled spinal MNs after fluorogold (FG) injection in hindlimb muscles. Scale bar = $50 \mu\text{m}$. **(F)** Quantification of FG-positive MNs in ventral horn of the spinal cord ($n = 10$ /group, $*p < 0.05$; $****p < 0.00001$, one-way ANOVA test). **(G)** Representative pictures of innervated (left panel) and denervated (right panel) of neuromuscular junctions in SOD1^{G86R} mice (bungarotoxin, BTX, red; neurofilament and synaptophysin, green). Scale bar = $50 \mu\text{m}$. **(H)** Neuromuscular junctions (NMJ) integrity in tibialis anterior muscle ($**p < 0.01$; $***p < 0.001$).

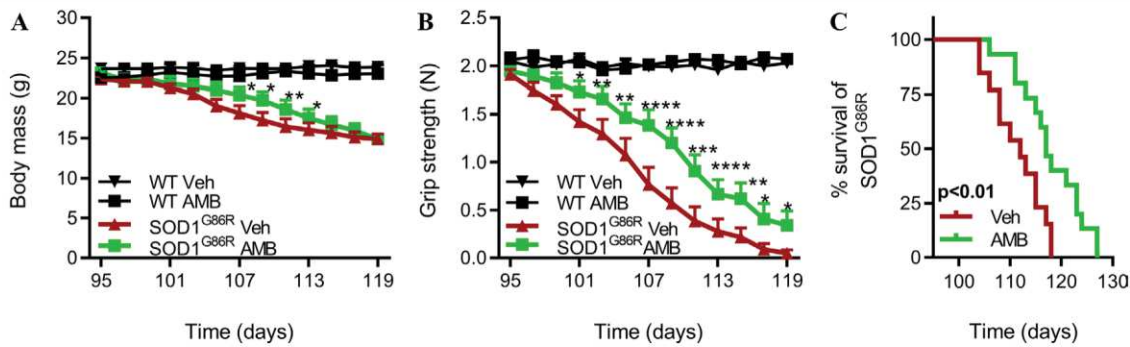


FIGURE 3 | AMB delays disease onset and improves motor functions in symptomatic SOD1^{G86R} mice. **(A)** Body mass evolution in SOD1^{G86R} and WT mice ($n = 12-15$ /group). **(B)** Muscle strength evolution in SOD1^{G86R} and WT ($n = 12-15$ /group). **(C)** Kaplan–Meier analysis of SOD1^{G86R} mice survival ($n = 13-15$ /group, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

observed by muscle contraction triggered by the application of acetylcholine. The presence of NMJs was confirmed by the colocalization of the axonal neurofilament and the presence of post-synaptic nicotinic acetylcholine receptors (**Figure 4A**, **Supplementary Figure 3**).

The neurite network was significantly longer in presence of the highest dose of AMB (100 μ M) (**Figure 4B**). This effect

corresponds to a +45% increase when compared to the vehicle group. Lower doses of AMB did not promote neurite elongation.

AMB was able to significantly increase the number of *in vitro* NMJs, determined by the number clustered nAChRs, in a linear dose-dependent manner, at doses ranging from 10 to 100 μ M. The effect of AMB was therefore stronger on the formation of NMJs than on the elongation of axons, in this model (**Figure 4C**).

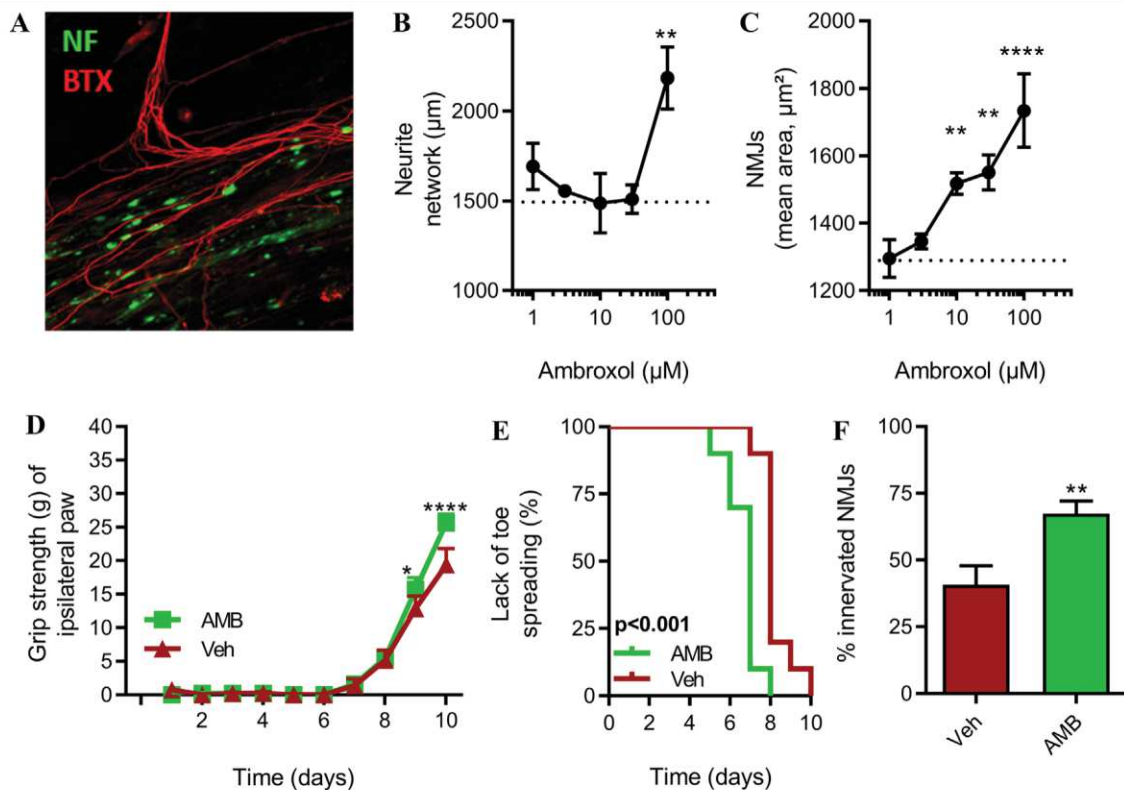


FIGURE 4 | Inhibition of GlcCer degradation by AMB improves *in vivo* axonal plasticity and nerve regeneration after sciatic nerve crush study in non-transgenic mice. **(A)** Representative picture of *in vitro* neuromuscular junctions (NMJs). **(B)** Total length of neurofilament-positive neurites and **(C)** total area NMJs ($n = 5$ /group). **(D)** Muscle strength of ipsilateral hind paws ($n = 10$ /group, * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$). **(E)** Kaplan–Meier showing time to observable toe spreading after sciatic nerve injury ($n = 10$ /group, $p < 0.001$). **(F)** NMJ integrity in tibialis anterior muscle ($n = 10$ /group, ** $p < 0.01$).

To further evaluate the pro-regenerative effect of AMB on the motor units, we have subjected non-transgenic mice to peripheral nerve injury, to follow-up functional recovery, such as muscle strength and toe spreading, and the number of functional NMJs after treatment with AMB. Upon treatment, mice recovered significantly faster when compared to the control group. Indeed, on days 9 and 10, muscle strength of the injured hindlimb was statistically higher after application of AMB (Figure 4D). In a second and independent cohort, we have confirmed the beneficial effect of AMB (3 mM) on functional recovery after sciatic injury. The regenerative effect of AMB was also observed at a dose of 1 mM in this model (Supplementary Figure 4). Spontaneous toe spreading is lost after hindlimb muscle denervation. The recovery of toe spreading is a proxy for early sign of reinnervation and was monitored every day. AMB caused a modest but significant effect, as the mice recovered between 1 to 2 days earlier as compared to the control group (Figure 4E). Most importantly, 10 days after injury, the number of innervated neuromuscular junctions was 70% greater after application of AMB, suggesting that AMB promotes the formation of new NMJs, which may strongly participate in the pro-regenerative effect of this compound (Figure 4F).

DISCUSSION

Glycosphingolipids and Motor Axis

Dysregulation of GlcCer and other glycosphingolipids (e.g., GM1a) was previously reported by us and others in ALS patients and in animal models (Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2015; Dodge, 2017; Henriques et al., 2017; Henriques et al., 2018).

GlcCer is degraded by GBA1 or GBA2 beta-GCases. Growing evidence suggests a tight connection between GBA2 activity and motor functions, as full loss of function of GBA2 is a cause of hereditary spastic paraplegia type 46 (SPG46) (Woeste and Wachten, 2017; Woeste et al., 2019). Conversely, pharmacological inhibition of GBA2 activity has been shown to improve the motor phenotype (e.g., motor coordination) of an animal model of Niemann's Pick disease (Marques et al., 2015). Moreover, GM1a, a downstream metabolite of GlcCer, is detected on the cell surface of motor axons and at nerve endings in NMJs. The presence of anti-GM1 autoantibodies has been associated with multifocal motor neuropathy and the acute motor axonal form of Guillain-Barré, suggesting a key role for glycosphingolipids in the maintenance of motor axons and possibly NMJs.

We have shown that inhibition of GCase by CBE causes a concentration-dependent increase in GlcCer, and in the downstream glycosphingolipid GM1a, which was associated with pro-survival and pro-regenerative effects. Treatment with CBE fully prevented loss of GM1a/CTB staining at NMJs in tibialis anterior muscle of SOD1^{G86R} mice, associated with delayed loss in grip strength (Henriques et al., 2017). Interestingly, the inhibition of GlcCer synthase (GCS) accelerates functional decline. Inhibition of GCS also delays the recovery to spinal crush in non-transgenic mice. Thus, a coherent picture emerges

in ALS where inhibiting GCase activity and increasing the pool of glycosphingolipids, presumably at the NMJs, are beneficial.

Ambroxol Improved Motor Function in SOD1^{G86R} Mice

Our results showed that GBA2 activity is increased in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice, even at the presymptomatic disease stage, which could impair the metabolism of glycosphingolipids and later contribute to the development of motor dysfunctions. Here, we propose ambroxol as a drug candidate for ALS. Ambroxol is known to inhibit of GBA2 activity, mainly catalyzed by GBA2. By inhibiting GBA2, we aimed to prevent the hydrolysis of GlcCer located outside the lysosome, mainly at the plasma membrane, the endoplasmic reticulum, and/or at the Golgi apparatus (Maegawa et al., 2009; Shanmuganathan and Britz-McKibbin, 2011). Our study showed that ambroxol delayed the decline of motor functions and protected motor neurons from degeneration in a transgenic animal model of ALS. Most importantly, ambroxol was able to maintain the functionality of spinal motor neurons in the SOD1^{G86R} mice. For these promising pre-clinical effects, ambroxol has recently been given orphan drug status for ALS by the European Medical Agency.

Clinical Relevance of Ambroxol for ALS

Ambroxol is marketed as an expectorant and mucolytic for lung diseases and for sore throat, with local anesthetic effects. In the CNS, ambroxol is potentially an inhibitor of sodium (Nav1.8) and calcium channels, with claimed anti-glutamatergic properties. Evidence suggests that ambroxol has direct anti-oxidative properties which could translate into beneficial effects in ALS (reviewed by Weiser, 2008).

In addition to its effects on GBA2, ambroxol is also known to bind the enzyme GBA1 in the cytosol and to correct enzyme folding and to improve its addressing to the acidic environment of the lysosome where the drug dissociates, thereby increasing GBA1 activity. The chaperone effect on ambroxol on GBA1 is combined with a positive modulation of GBA1 expression level (Magalhaes et al., 2018). It cannot be excluded that ambroxol could stimulate lysosomal-dependent pathway of protein clearance in ALS (Boland et al., 2018), as ambroxol reduces the alpha-synucleinopathy in an *in vivo* model of PD (Migdalska-Richards et al., 2016b).

Gaucher's disease is caused by genetic mutations of GBA1, resulting in the loss of GBA1 activity (Kanfer et al., 1975; Vardi et al., 2016). In addition, mutations on GBA1 and/or reduced expression of the protein are an important risk factor of PD (Barrett et al., 2013).

Recently, high dose of ambroxol was able to decrease the severity of neurological symptoms of patients with the neuropathic form of Gaucher's disease, suggesting that oral administration of ambroxol successfully target the metabolism of glycosphingolipids in the central nervous system (Narita et al., 2016). Two other clinical trials are currently investigating the effects of ambroxol in PD (NCT02941822; NCT02914366).

Ambroxol Improved the Plasticity of Motor Units

We have also shown that ambroxol hastened functional recovery in a non-transgenic animal model of sciatic nerve injury. Given the modest effect on the kinetic of recovery, the effects of ambroxol are most likely due to an increased ability to rebuilt NMJs. Indeed, in presence of ambroxol, the percentage of re-innervated NMJs was twice higher than that in the vehicle group. Moreover, the *in vitro* co-culture model of motor units provided similar results as ambroxol strongly increased the formation of NMJs but modestly promoted axonal elongation. It indicates that ambroxol was able to stimulate the formation of NMJs. This effect could explain the beneficial outcomes in the SOD1^{G86R} mice through motor axonal sprouting and muscle re-innervation.

Altogether, our results further connected the glycosphingolipid metabolism to the pathophysiology of ALS and indicated that inhibition of GBA2 may be a novel target for ALS.

METHODS

Animal Care and Maintenance

FVB/N non-transgenic female mice derived from Charles River were used to perform nerve sciatic injury experiment.

For others' experiments, FVB/N female mice, overexpressing the SOD1^{G86R} (Ripps et al., 1995), were generated and maintained in our animal facility at 23°C with 12-h light/dark cycle. They had water and regular A04 rodent chow *ad libitum*. AMB (3 mM, Sigma-Aldrich) was given by drinking water for mice treated, and vehicle mice was treated with animal facility water. For the presymptomatic stage study, the treatment started at 75 days of age and stopped at 95 days of age. For the symptomatic stage study (survival experiment), the treatment started to 95 days of age and stopped when mice were euthanized. Mice showing strong motor dysfunction at 93 days of age were not included in the symptomatic cohort. Mice were euthanized when animals were paralyzed and unable to roll over within 5 s after being pushed on their back. For euthanasia, mice were intracardially perfused with PBS 1X at 4°C after intraperitoneal injection with Dolethal (120 mg/kg).

Motor Assessment

Body mass was analyzed on a daily basis. Muscle strength (mean of three tests, grip test, Bioseb, Chaville, France) and the inverted grid test to assess the motor performance and coordination of mice were analyzed every 2 days. Onset of muscle strength loss was defined as a drop of more than 10% of the mouse maximal strength.

Sciatic Nerve Injury

Peripheral nerve injury was performed in order to induce muscle denervation and axonal regeneration. Wild-type mice were anesthetized with ketamine chlorohydrate (100 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). The sciatic nerve was exposed at mid-thigh level and lesioned with fine forceps for 30 s. The skin incision was sutured,

and mice were allowed to recover. The hind limb, contralateral to the lesion, served as control. Mice were treated with AMB (3 mM) for 13 days, starting the day before surgery. Mice were followed on a daily basis. Mice were sacrificed by intraperitoneal injection with Doléthal (120 mg/kg) and intracardially perfused with PBS at 4°C.

Retrograde Labeling

Mice were treated with AMB (3 mM in drinking water) or with the vehicle solution (regular drinking water) from 75d of age at 95d of age. Mice were anesthetized at 94 days of age with ketamine chlorohydrate (100 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), and their hind limb muscles were injected with fluorogold (hydroxystilbamidine bis[methanesulfonate], Sigma-Aldrich; 10 mg/ml in PBS, 10% DMSO) FG with Hamilton syringe (26 gauge, 10 µl), and tissues were collected 24 h after injection.

Motor Neurons Counting

Tissues were fixed paraformaldehyde 4% and stored in PBS at 4°C until further use. Lumbar segments L1–L3 fixed in paraformaldehyde 4% were used for studying the number of motor neurons innervating hind limb muscle. After cryoprotection in 30% sucrose, coronal sections 16 µm thick from L1–L3 spinal segment were realized with a cryostat and were either stained with an anti-choline acetylcholine transferase (1/100, Millipore, France) and an alexa594-conjugated goat (1/200, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) antibodies, either mount on slides for Fluorogold counting. All neurons located in the ventral horn, which were >400 µm² in size and ChAT-positive, were considered as alpha motor neurons. 10 sections of spinal cord were counted, and cell area of motor neurons was measured with ApoTome 2 (Zeiss) microscope.

Neuromuscular Junction Labeling

Tissues were fixed paraformaldehyde 4% and stored in PBS at 4°C until further use. Under a binocular microscope, tibialis anterior muscle fibers were prepared into thin bundles. Neuromuscular junction morphology was studied by labeling of the acetylcholine receptors with rhodamine-conjugated α -bungarotoxin (1/400, Sigma-Aldrich), and labeling of nerve terminals was performed with a rabbit polyclonal anti-synaptophysin antibody diluted 1/50 (Abcam, Cambridge, UK), and anti-neurofilament diluted 1/50. For immunofluorescence of terminal nerve, Alexa-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1/500 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) was used. Muscle bundles were mounted into slides, prior to fluorescence microscopy (ApoTome 2, Zeiss). NMJs were considered as denervated when the presynaptic nerve terminal was absent from the postsynaptic region.

Beta-Glucosidase Activity

Tissues were snap frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until further use. Frozen tissues were lysed with a TissuLyser (Qiagen, CA) and suspended in phosphate potassium (pH7) buffer extraction. After centrifugation (12,000 rpm for 15 min at 4°C), the supernatants were transferred to new tubes and stored at –80°C. The bichinchonic acid assay (BCA) method, a colorimetric assay method, was used to measured protein level with a BCA range (Interchim). A GBA buffer was used and adapted according

to the enzymatic activity desired (McIlvaine buffer, 150 mM). For GBA1, enzymatic reaction was carried out with the GBA buffer pH4.6 and adding 0.1% triton and 0.1% BSA. For GBA2, enzymatic reaction was carried out with the GBA buffer pH5.8 and adding 0.1% BSA. After inhibitor addition and fluorescent agent 4-methylumbelliferone addition (4-MU, Sigma-Aldrich), samples were incubated 2 h at 37°C. For reading results, excitation was carried out at 360-nm excitation, and absorbance was measured at 445 nm emission (TriStar LB 941, Berthold Technologies).

Co-Culture of Spinal Cord Explants and Myoblasts

The rat spinal cord–human muscle co-culture was performed as described previously (Combes et al., 2015). Human myoblast was grown on 96-well plate in a mix of MEM and M199 medium, supplemented with glutamine 2 mM, insulin, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, fetal bovine serum 10%, and penicillin/streptomycin. Spinal cord explants with dorsal roots of 13-day-old Wistar rat embryos (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were dissected and grown on the muscle monolayer. The co-cultures were maintained in a mix medium (MEM/M199), with 5% fetal calf serum, insulin, glutamine, and penicillin streptomycin. Ambroxol treatment was initiated when the spinal cord explants were added to the muscle monolayer and lasted 27 days. The treatment was renewed every other day during medium change. A total of 10 wells per conditions have been initiated. *In vitro* NMJs and neurite network were identified by immunostaining with alpha-bungarotoxin coupled with Alexa 488 and with a primary antibody against neurofilament 200 kD from mouse revealed with an anti-mouse Alexa 568. Sixty pictures have been automatically taken using same acquisition parameter with ImageXpress (Molecular Device) at 10× magnification and were analyzed with MetaXpress (Molecular Device). After segmentation of the pictures (Supplementary Figure 3), the total length of the neurite network and the total area of clustered nAChR were measured.

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean ± SEM and were analyzed with GraphPad Prism version 6.0 software. Student's *t* test was used to compare two groups, and ANOVA followed by Fisher's LSD test was applied to compare more than two groups. Grip strength curves were analyzed with two-way ANOVA, and survival curves were analyzed with log-rank test. Differences with *p*-values of <0.05 were considered significant.

REFERENCES

- Albin, R. L., and Dauer, W. T. (2014). Magic shotgun for Parkinson's disease? *Brain* 137, 1274–1275. doi: 10.1093/brain/awu076
- Ambrosi, G., Ghezzi, C., Zangaglia, R., Levandis, G., Pacchetti, C., and Blandini, F. (2015). Ambroxol-induced rescue of defective glucocerebrosidase is associated with increased LIMP-2 and saposin C levels in GBA1 mutant Parkinson's disease cells. *Neurobiol. Dis.* 82, 235–242. doi: 10.1016/j.nbd.2015.06.008
- Barrett, M. J., Giraldo, P., Capablo, J. L., Alfonso, P., Irun, P., Garcia-Rodriguez, B., et al. (2013). Greater risk of parkinsonism associated with non-N370S GBA1 mutations. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 575–580. doi: 10.1007/s10545-012-9527-5

DATA AVAILABILITY

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

Experiments were performed by authorized investigator after approval by the ethic committee of the University of Strasbourg and by the ministry of higher education and research (APAFIS #4555; #7146; #8828; #17157). They followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: AB, J-PL, AH; Performed the experiments: AB, CQ, AM, AH; Analysis and interpretation of the data: AB, NC, MS, J-PL, AH; Contributed reagents/materials/analysis tools: MS, J-PL; Wrote, discussed and approved the final version of the manuscript: AB, CQ, AM, NC, MS, J-PL, AH.

FUNDING

The work was funded by “Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives” (AREMANE, J.P.L.), the “Association française contre les myopathies” (AFM, JPL). SRS contributed with salary and reagents. J-PL and MS are currently receiving funds from Fight MND foundation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Annie Picchinenna for her help in the project.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00883/full#supplementary-material>

- Boland, B., Yu, W. H., Corti, O., Mollereau, B., Henriques, A., Bezdard, E., et al. (2018). Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 660–688. doi: 10.1038/nrd.2018.109
- Bozek, K., Wei, Y., Yan, Z., Liu, X., Xiong, J., Sugimoto, M., et al. (2014). Exceptional evolutionary divergence of human muscle and brain metabolomes parallels human cognitive and physical uniqueness. *PLoS Biol.* 12, e1001871. doi: 10.1371/journal.pbio.1001871
- Combes, M., Poindron, P., and Callizot, N. (2015). Glutamate protects neuromuscular junctions from deleterious effects of β -amyloid peptide and conversely: an in vitro study in a nerve-muscle coculture. *J. Neurosci. Res.* 93, 633–643. doi: 10.1002/jnr.23524

- Cutler, R. G., Pedersen, W. A., Camandola, S., Rothstein, J. D., and Mattson, M. P. (2002). Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 52, 448–457. doi: 10.1002/ana.10312
- Desport, J. C., Preux, P. M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J. M., Beaufrière, B., et al. (2001). Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 328–334. doi: 10.1093/ajcn/74.3.328
- Dodge, J. C. (2017). Lipid involvement in neurodegenerative diseases of the motor system: insights from lysosomal storage diseases. *Front. Mol. Neurosci.* 10 (356), 1–14. doi: 10.3389/fnmol.2017.00356
- Dodge, J. C., Treleaven, C. M., Pacheco, J., Cooper, S., Bao, C., Abraham, M., et al. (2015). Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 8100–8105. doi: 10.1073/pnas.1508767112
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J. L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., et al. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70 (13), 1004–1009. doi: 10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27
- Funalot, B., Desport, J.-C., Sturtz, F., Camu, W., and Couratier, P. (2009). High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10, 113–117. doi: 10.1080/17482960802295192
- Henriques, A., Croixmarie, V., Bouscary, A., Mosbach, A., Keime, C., Boursier-Neyret, C., et al. (2018). Sphingolipid metabolism is dysregulated at transcriptomic and metabolic levels in the spinal cord of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 10 (433), 1–14. doi: 10.3389/fnmol.2017.00433
- Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D. A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., D'Ambra, E., et al. (2018). Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. *Hum. Mol. Genet.* 24, 7390–7405. doi: 10.1093/hmg/ddv439
- Henriques, A., Huebeker, M., Blasco, H., Keime, C., Andres, C. R., Corcia, P., et al. (2017). Inhibition of β -glucocerebrosidase activity preserves motor unit integrity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* 7 (5235), 1–15. doi: 10.1038/s41598-017-05313-0
- Jésus, P., Fayemendy, P., Nicol, M., Lautrette, G., Sourisseau, H., Preux, P.-M., et al. (2018). Hypermetabolism is a deleterious prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 25, 97–104. doi: 10.1111/ene.13468
- Kanfer, J. N., Legler, G., Sullivan, J., Raghavan, S. S., and Mumford, R. A. (1975). The Gaucher mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 85–90. doi: 10.1016/0006-291X(75)90286-7
- Lattante, S., Ciura, S., Rouleau, G. A., and Kabashi, E. (2015). Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD). *Trends Genet.* 31, 263–273. doi: 10.1016/j.tig.2015.03.005
- Maegawa, G. H. B., Tropak, M. B., Buttner, J. D., Rigat, B. A., Fuller, M., Pandit, D., et al. (2009). Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for gaucher disease. *J. Biol. Chem.* 284, 23502–23516. doi: 10.1074/jbc.M109.012393
- Magalhaes, J., Gegg, M. E., Migdalska-Richards, A., and Schapira, A. H. (2018). Effects of ambroxol on the autophagy-lysosome pathway and mitochondria in primary cortical neurons. *Sci. Rep.* 8, 1385. doi: 10.1038/s41598-018-19479-8
- Marques, A. R. A., Aten, J., Ottenhoff, R., van Roomen, C. P. A. A., Herrera Moro, D., Claessen, N., et al. (2015). Reducing GBA2 activity ameliorates neuropathology in niemann-pick Type C mice. *PLoS One* 10, e0135889. doi: 10.1371/journal.pone.0135889
- Mazzulli, J. R., Zunke, F., Tsunemi, T., Tokar, N. J., Jeon, S., Burbulla, L. F., et al. (2016). Activation of β -glucocerebrosidase reduces pathological α -synuclein and restores lysosomal function in parkinson's patient midbrain neurons. *J. Neurosci.* 36, 7693–7706. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0628-16.2016
- McNeill, A., Magalhaes, J., Shen, C., Chau, K.-Y., Hughes, D., Mehta, A., et al. (2014). Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain* 137, 1481–1495. doi: 10.1093/brain/awu020
- Migdalska-Richards, A., Daly, L., Bezaud, E., and Schapira, A. H. V. (2016b). Ambroxol effects in glucocerebrosidase and α -synuclein transgenic mice: ambroxol in transgenic mice. *Ann. Neurol.* 80, 766–775. doi: 10.1002/ana.24790
- Migdalska-Richards, A., Ko, W. K. D., Li, Q., Bezaud, E., and Schapira, A. H. V. (2017). Oral ambroxol increases brain glucocerebrosidase activity in a nonhuman primate. *Synapse* 71, e21967. doi: 10.1002/syn.21967
- Narita, A., Shirai, K., Itamura, S., Matsuda, A., Ishihara, A., Matsushita, K., et al. (2016). Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: a pilot study. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3, 200–215. doi: 10.1002/acn3.292
- Noakes, T., and Spedding, M. (2012). Olympics: run for your life. *Nature* 487, 295–296. doi: 10.1038/487295a
- O'Regan, G., deSouza, R.-M., Balestrino, R., and Schapira, A. H. (2017). Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *J. Park. Dis.* 7, 411–422. doi: 10.3233/JPD-171092
- Paganoni, S., Deng, J., Jaffa, M., Cudkowicz, M. E., and Wills, A.-M. (2011). Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 44, 20–24. doi: 10.1002/mus.22114
- Ridley, C. M., Thur, K. E., Shanahan, J., Thillaiappan, N. B., Shen, A., Uhl, K., et al. (2013). β -Glucosidase 2 (GBA2) Activity and Imino Sugar Pharmacology. *J. Biol. Chem.* 288, 26052–26066. doi: 10.1074/jbc.M113.463562
- Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H., and Gordon, J. W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 689–693. doi: 10.1073/pnas.92.3.689
- Schapira, A. H. V. (2015). Glucocerebrosidase and Parkinson disease: recent advances. *Mol. Cell. Neurosci.* 66, 37–42. doi: 10.1016/j.mcn.2015.03.013
- Schmitt, F., Hussain, G., Dupuis, L., Loeffler, J.-P., and Henriques, A. (2014). A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. *Front. Cell. Neurosci.* 8 (52), 1–10. doi: 10.3389/fncel.2014.00025
- Shanmuganathan, M., and Britz-McKibbin, P. (2011). Inhibitor screening of pharmacological chaperones for lysosomal β -glucocerebrosidase by capillary electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2843–2853. doi: 10.1007/s00216-011-4671-6
- Stojkowska, I., Krainc, D., and Mazzulli, J. R. (2018). Molecular mechanisms of α -synuclein and GBA1 in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* 373, 51–60. doi: 10.1007/s00441-017-2704-y
- Vardi, A., Zigdon, H., Meshcheriakova, A., Klein, A. D., Yaacobi, C., Eilam, R., et al. (2016). Delineating pathological pathways in a chemically induced mouse model of Gaucher disease. *J. Pathol.* 239, 496–509. doi: 10.1002/path.4751
- Weiser, T. (2008). Ambroxol: a CNS drug? *CNS Neurosci. Ther.* 14, 17–24. doi: 10.1111/j.1527-3458.2007.00032.x
- Witte, M. D., Kallemeijn, W. W., Aten, J., Li, K.-Y., Strijland, A., Donker-Koopman, W. E., et al. (2010). Ultrasensitive in situ visualization of active glucocerebrosidase molecules. *Nat. Chem. Biol.* 6, 907–913. doi: 10.1038/nchembio.466
- Woeste, M. A., and Wachten, D. (2017). The Enigmatic Role of GBA2 in controlling locomotor function. *Front. Mol. Neurosci.* 10 (386), 1–9. doi: 10.3389/fnmol.2017.00386
- Woeste, M. A., Stern, S., Raju, D. N., Grahn, E., Dittmann, D., Gutbrod, K., et al. (2019). Species-specific differences in non-lysosomal glucosylceramidase GBA2 function underlie locomotor dysfunction arising from loss-of-function mutations. *J. Biol. Chem.* 294 (11), 3853–3871. doi: 10.1074/jbc.RA118.006311

Conflict of Interest Statement: MS, J-PL, and AH hold a patent entitled 'Inhibitors of GlcCer degradation in the treatment of diseases of the motor units', and the European Medicines Agency has granted AMB orphan designation for the therapy of amyotrophic lateral sclerosis to Spedding Research Solutions SAS. AH worked for part of the period of this work for Spedding Research Solutions SAS, where MS is president. AH and NC are currently employed by Neuro-sys SAS.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Bouscary, Quessada, Mosbach, Callizot, Spedding, Loeffler and Henriques. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

1. Données complémentaires de la publication 2

L'ensemble des travaux du laboratoire nous a conforté dans l'idée que cibler la voie des glycosphingolipides dans la SLA pourrait être une approche thérapeutique efficace. C'est pourquoi, pour mieux caractériser les effets de l'AMB, j'ai utilisé une seconde approche thérapeutique avec un inhibiteur spécifique de GBA2, actif à des concentrations de l'ordre du nM : l'inhibiteur OM2. Cet inhibiteur a été créé par l'équipe du Pr Olivier Martin de l'Université d'Orléans, avec qui nous avons collaboré.

Pour vérifier les effets d'une inhibition spécifique de GBA2, j'ai tout d'abord vérifié *in vitro* la spécificité de l'inhibiteur OM2 par dosage enzymatique sur des tissus de foie de souris non-transgéniques. Puis j'ai réalisé une expérience de compression du nerf sciatique sur des souris non-transgéniques et j'ai observé la récupération fonctionnelle comme la force musculaire, l'écartement des doigts et l'intégrité des JNM après traitement à l'OM2. Les protocoles utilisés pour ces expériences sont les mêmes que ceux décrits dans le matériel et méthode de la publication 2 : Bouscary et al., 2019. Les résultats préliminaires montrent, *in vitro* sur des tissus de foie murin, que la molécule OM2 inhibe 50% de l'activité enzymatique de GBA2 à partir de la dose 10^{-10} mol/L. Toutefois, plus la dose est forte, plus l'OM2 inhibe l'activité GBA1, sans jamais atteindre l'IC50 ([figure 23A](#)). La spécificité de l'inhibiteur est donc validée. Après écrasement du nerf sciatique, l'inhibition spécifique de GBA2 par l'OM2 ne montre pas d'effets délétères sur le poids ([figure 23B](#)), ni sur la force musculaire de la patte contrôle (appelée controlatérale) ([figure 23C](#)) des souris non-transgéniques (nTg) traitées à l'OM2 par rapport aux souris nTg traitées au véhicule. Après 9 jours de traitement, l'OM2 améliore significativement la récupération de la force musculaire des souris nTg ([figure 23D](#)). Nous avons ensuite évalué l'état d'innervation des JNM du muscle tibial antérieur. Le nombre de JNM innervées des souris traitées à l'OM2 est 41% supérieur à celui des souris nTg traitées au véhicule (Veh: $41,04 \pm 10,06$ vs OM2 : $69,68 \pm 7,20$) ([figure 23E](#)). Dans du muscle gastrocnémien, nous avons également mesuré les niveaux d'ARNm de la sous-unité gamma du récepteur de l'acétylcholine (AChR gamma). Les niveaux d'ARNm de l'AChR gamma sont réduits de 32% chez les souris traitées à l'OM2 par rapport aux souris nTg traitées au véhicule ([figure 23F](#)). L'OM2 permet donc une meilleure récupération fonctionnelle.

Ainsi, ces résultats nous ont permis de confirmer l'hypothèse que GBA2 représente une cible thérapeutique pour les atteintes neuromusculaires. Des expériences complémentaires testant les effets de l'OM2 sur le modèle *Sod1^{G86R}* sont à venir.

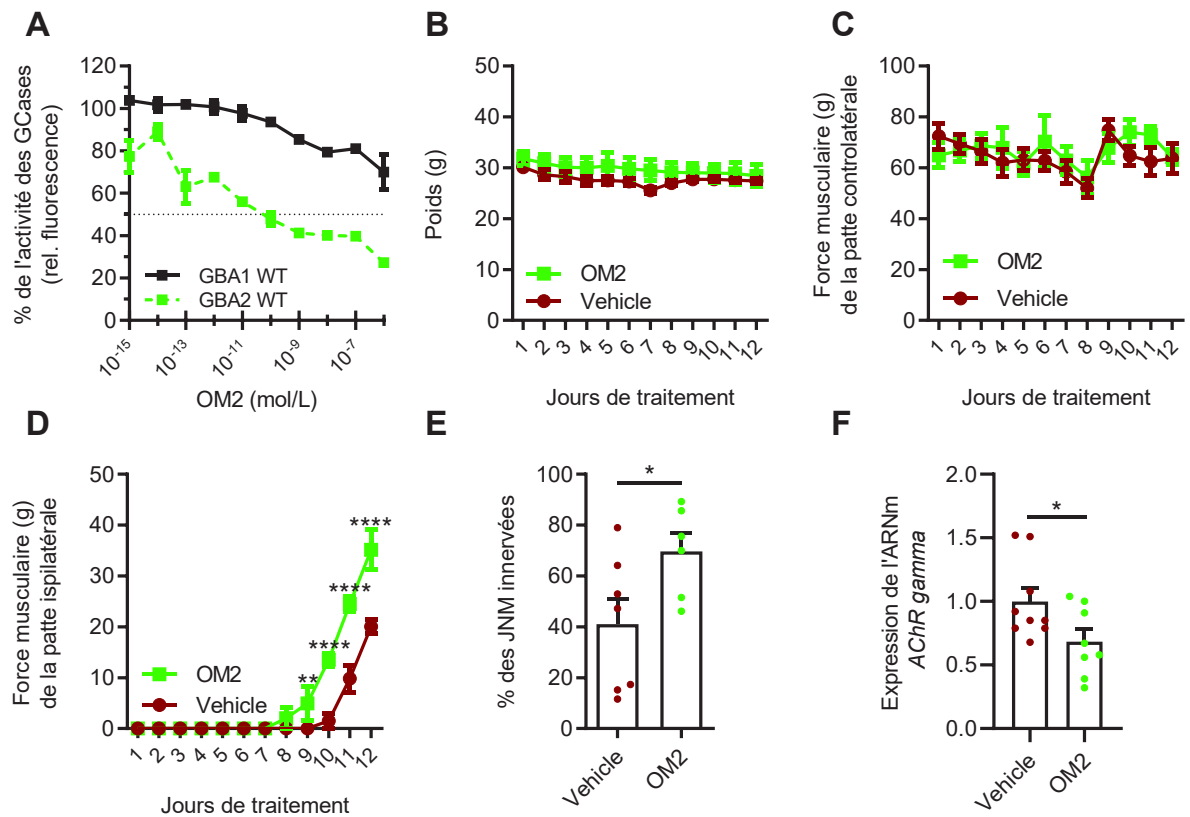


Figure 23 : L'inhibition de GBA2 par l'inhibiteur spécifique OM2 améliore *in vivo* la récupération motrice après lésion du nerf sciatique sur des souris non-transgéniques.

(A) Les activités enzymatiques de GBA1 (trait noir) et de GBA2 (trait vert) après ajout d'OM2 ont été mesurées sur des tissus de foie murin (n=4/groupe). (B) Evolution du poids des souris traitées au véhicule ou à l'OM2. (C) Force musculaire de la patte arrière controlatérale. (D) Force musculaire de la patte arrière ipsilatérale (Anova à deux facteurs). (E) Intégrité des JNM dans le muscle tibialis (n= 6-7/groupe, test de Student). (F) Niveaux d'expression des ARNs AchR gamma dans les muscles gastrocnémiens des souris après lésion du nerf sciatique (test de Student). Les valeurs de la figure sont représentées en moyennes \pm ESM, n= 6-7/groupe, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

C. L'ambroxol hydrochloride ralentit la progression de la physiopathologie du modèle SLA-DFT *CHMP2B^{intron5}* (En préparation)

La SLA et la DFT sont deux maladies neurodégénératives fatales. Bien que ces maladies semblent au premier abord à l'opposé l'une de l'autre, des études génétiques, histopathologiques et cliniques ont permis d'établir un continuum entre la SLA et la DFT. En effet, des mutations génétiques (sur les gènes *C9ORF72*, *CHMP2B*, etc.) sont connues pour provoquer des formes familiales de SLA et/ou de DFT. Ainsi, des études montrent que 15 à 20% des patients SLA développent une DFT, tandis que 15% des patients DFT développent une SLA (Ling et al., 2013; Nguyen et al., 2018). De plus, dans la SLA comme dans la DFT, de nombreuses études suggèrent une altération du processus autophagique à l'origine de l'accumulation protéique (TDP-43, FUS, etc.) retrouvée dans ces deux maladies. Dans ces maladies, l'autophagie n'assure plus le recyclage des protéines malconformées qui sont normalement transportées vers les lysosomes pour être dégradées. Certaines autres maladies neurodégénératives (telle que la maladie de Gaucher) sont également concernées par l'altération du processus lysosomal et montrent une accumulation toxique de GlcCer dans les lysosomes (Dodge, 2017). Au vu des résultats obtenus au laboratoire et de ceux de la littérature, il est aujourd'hui clairement établi que le métabolisme des glycosphingolipides, notamment la voie du GlcCer, participe à la physiopathologie de la SLA. En effet, sans être une maladie à surcharge lysosomale, la SLA s'accompagne d'une forte perturbation de l'homéostasie des glycosphingolipides (Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2015a, 2017). Chez la souris *Sod1^{G86R}*, un modèle murin de SLA, il existe une perturbation marquée du métabolisme des glycosphingolipides, associée à une surexpression des gènes impliqués dans le recyclage lysosomal à un âge symptomatique (Henriques et al., 2018).

Nos précédents travaux ont montré que la modulation de la voie de dégradation du GlcCer est bénéfique et ralentit la progression de la maladie dans le modèle *Sod1^{G86R}* (Bouscary et al., 2019; Henriques et al., 2017). La dégradation du GlcCer est réalisée par deux glucosylcéramidases : GBA1 au niveau du lysosome, et GBA2 au niveau du RE et de la membrane plasmique. L'AMB hydrochloride (AMB) est une molécule chaperonne capable de stimuler la voie lysosomale en adressant GBA1 vers le lysosome et en stimulant son activité enzymatique. En parallèle, l'AMB inhibe GBA2. Nous avons montré que l'AMB permet non seulement de préserver les muscles de la dénervation et de maintenir le nombre de motoneurones (MN) des souris *Sod1^{G86R}* mais également de prolonger la survie de ces animaux. De plus, lors d'une compression nerveuse, l'AMB stimule la plasticité axonale et accélère la récupération fonctionnelle. À l'appui de ces résultats *in vivo*, nous avons également montré *in vitro* que l'AMB favorise la croissance du réseau de neurites et la formation de jonctions neuromusculaires

(JNM) (Bouscary et al., 2019). Toutefois, au-delà des bénéfices de la molécule sur la composante motrice, nous ne savons pas si l'AMB est capable d'agir sur le déclin cognitif observé dans les DFT. Le modèle *CHMP2B^{intron5}* de notre laboratoire a la particularité de modéliser les atteintes des patients SLA-DFT. En effet, ces souris présentent à la fois des symptômes moteurs et cognitifs retrouvés dans ce syndrome. CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B) est une protéine connue pour interagir avec le système ESCRT (complexe de tri endosomal requis pour le transport) impliqué dans la dégradation des protéines membranaires via le processus d'autophagie (Rusten and Simonsen, 2008). Les mutations *CHMP2B^{intron5}* conduisent à des accumulations lysosomales dans les neurones des patients et ceux d'un modèle murin *CHMP2B^{intron5}* (Clayton et al., 2015, 2018).

Les modèles *Sod1^{G86R}* et *CHMP2B^{intron5}* présentent des caractéristiques histopathologiques et génétiques comparables. En effet, une récente étude transcriptomique du laboratoire a révélé que ces deux modèles partagent certaines altérations dans l'expression de gènes (Waegaert et al., 2020). De plus, comme pour le modèle *Sod1^{G86R}*, le modèle *CHMP2B^{intron5}* présente des agrégats protéiques. En effet, les neurones de ces souris contiennent de nombreux agrégats protéiques dans lesquels on retrouve la protéine CHMP2B mutée mais également P62 ou de l'ubiquitine. L'ensemble de ces données suggèrent un défaut du système lysosomal et autophagique chez les souris *CHMP2B^{intron5}*.

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la modulation des glycosphingolipides grâce à l'AMB pourrait permettre de stimuler la fonction lysosomale et améliorer les symptômes moteurs mais également cognitifs retrouvés dans le modèle *CHMP2B^{intron5}*. Pour tester cette hypothèse, nous avons traité des souris *CHMP2B^{intron5}* symptomatiques âgées de 18 mois, et cela jusqu'à l'âge de 21 mois. Trente jours avant le début du traitement (J-30), les souris ont été soumises à des tests moteurs (test d'agrippement, test du rotarod) et comportementaux (test des billes et le test en champs ouvert « openfield »). Les souris ont été traitées à partir de J0 après l'évaluation motrice et comportementale et ce pendant 80 jours. Ces tests ont été répétés 30 jours (J+30), 60 jours (J+60) et 80 jours (J+80) après le début du traitement à l'AMB.

Nos résultats indiquent que l'AMB améliore le phénotype moteur des souris *CHMP2B^{intron5}* et limite certains changements comportementaux retrouvés chez ces souris. D'un point de vue histologique, l'AMB préserve les MN de la neurodégénérescence et maintient l'innervation des JNM. Enfin, l'AMB stimule l'expression de gènes de la voie lysosomale ainsi que celle de marqueurs microgliaux associés à la neuroinflammation.

Ces données doivent être complétées avec des expériences de biologie moléculaire et de biochimie pour permettre de conclure sur l'ensemble des effets de l'AMB sur le modèle *CHMP2B^{intron5}* et soumettre un article complet.

1. Matériel et méthodes

1.1. Déclaration éthique

Les expériences ont été réalisées par des expérimentateurs agréés, en accord avec les réglementations actuelles de l'Union européenne (directive 2010/63/UE) et après approbation par le comité d'éthique régional en expérimentation animale de Strasbourg (CEEA35) et par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS #8828).

1.2. Animaux

d. Elevage et génotypage

Pour cette étude des souris transgéniques *CHMP2B^{intron5}* hémizygotes (HE), 6 copies du transgène, fond mixte FVB/N-DBA/2-C57BL/6) surexprimant le mutant *CHMP2B^{intron5}* humain sous contrôle du promoteur Thy1.2 (Vernay et al., 2016) et des souris non-transgéniques (nTg) issues des mêmes portées ont été générées. Ces souris ont été hébergées dans l'animalerie centrale de la faculté de médecine de Strasbourg, à 22±2°C avec un cycle lumière/obscurité de 12h et un accès à l'eau et à de la nourriture (Safe, A04) à volonté. Le génotype des souris a été déterminé par amplification PCR de l'ADN extrait à partir de biopsies de queue des souris. Les séquences d'amorces utilisées sont : GTCGGAAGCTTGGCACCTA (Forward) ; CCAATCTGGCCATTTCTT (Reverse). Les animaux ont été surveillés quotidiennement et pesés mensuellement, ainsi qu'à chaque évaluation phénotypique. Les souris présentant un dysfonctionnement moteur important avant la fin de l'expérience, c'est-à-dire paralysées et incapables de se retourner dans les 5 secondes après avoir été placées sur le dos, ont été mises à mort. Sur l'ensemble de la cohorte, seuls 2 animaux n'ayant pas atteints la fin de l'expérience ont été exclus.

e. Traitement à l'AMB

Les souris traitées à l'AMB ont reçu le traitement en eau de boisson (3mM, Sigma-Aldrich). Les souris non traitées (« véhicules » : VEH), ont reçu l'eau habituelle de l'animalerie. Le traitement a débuté à l'âge de 18 mois après l'évaluation motrice et comportementale des souris (noté « J0 »). Le traitement a été renouvelé tous les 2-3 jours pendant 80 jours jusqu'à l'âge de 21 mois.

1.3. Evaluation phénotypique

Les expériences ont été réalisées à l'aveugle par des expérimentateurs n'ayant pas connaissance des génotypes et du traitement des animaux. Le rapport des sexes est de 1:1. Tous les descendants transgéniques ont été évalués aux côtés de leur fratrie non-transgénique (nTg) ayant le même âge. Les évaluations de la force musculaire et de la coordination motrice ont commencé à l'âge de 17 mois (J-30) un âge symptomatique, puis répétée au bout de 30 jours (J0) à l'initiation du traitement ainsi que 30 (J+30), 60 jours (J+60) et 80 jours (J+80) après début du traitement à l'AMB. L'évaluation comportementale a été réalisée à J0, J+30, J+60 et J+80 pour le test d'enfouissement des billes ainsi qu'à J0 et J+80 pour le test en openfield (**figure supplémentaire 1**).

a. Evaluation de la force musculaire

La force musculaire a été évaluée par le test d'agrippement à l'aide d'un gripmètre (Bioseb, Chaville, France). Pour réaliser le test, la souris est placée sur une grille métallique qu'elle saisit instinctivement pour essayer d'arrêter le mouvement de recul involontaire effectué par le manipulateur jusqu'à ce que la force de traction dépasse sa force de préhension. Le dynamomètre enregistre la force de traction maximale. La force musculaire (en grammes) est mesurée trois fois pour chaque souris. Les résultats présentés sont la moyenne des trois essais consécutifs pour chaque individu.

b. Evaluation de la coordination motrice et de la fatigabilité

Pour évaluer la coordination et l'endurance des souris, le test Rotarod (modèle 7650, Ugo Basile) a été utilisé. Chaque session consiste en trois essais de 240 secondes avec une période d'accélération (4–40 tr/min pendant 180 secondes) suivie de 60 secondes à vitesse maximale constante. Chaque session a été espacée d'environ 5 min chacune. Les résultats présentés sont la moyenne des trois essais consécutifs.

c. Evaluation comportementale

Deux évaluations comportementales ont été réalisées sur les souris : le test d'enfouissement des billes (aussi appelé « Marble Burying » ou « MB ») et le test en « openfield ». Trente minutes avant la réalisation des expériences, les cages de souris sont placées dans la salle des tests.

Pour le MB, quinze billes noires (16 mm de diamètre) disposées en 5 rangées de 3 billes espacées de 3cm, sont placées sur 5 cm de litière dans une cage propre (425x276x153 mm). Chaque souris est mise individuellement en présence des billes pendant 30 min puis le nombre de billes enterrées est quantifié. Une quantification binaire est appliquée : les billes totalement recouvertes de litière sont considérées comme enfouies.

Le comportement exploratoire a été évalué grâce au test en openfield, dans une arène ouverte (40x40x40cm) pendant 15 minutes. Le sol est divisé en seize carrés de 10x10cm. Un carré central de 10x10cm est tracé au milieu de l'arène. La souris est placée au centre de l'arène et ses déplacements sont enregistrés par une caméra aérienne. A l'issue de chaque test, l'arène est nettoyée avec de l'alcool à 70%. Le test en openfield a été analysé avec un système de suivi automatisé (EthoVision XT, Noldus). La distance parcourue (cm), le nombre de passages dans le carré central et le temps passé dans celui-ci ont été automatiquement calculés et ont permis d'évaluer le comportement exploratoire et l'anxiété des animaux. Un tracé de trajectoire représentant l'activité de locomotion de chaque souris a également été obtenu.

1.4. Préparation des tissus

L'étude a été arrêtée 80 jours après le début du traitement à l'AMB. Les souris sont mises à mort par injection intrapéritonéale d'Euthasol (120 mg/kg, Virbac) puis perfusées par voie intracardiaque avec du PBS à 4 °C. Les tissus prélevés ont été soit congelés en azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à utilisation pour les expériences de biochimie ; soit fixés au paraformaldéhyde à 4% dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,4 (24h pour les moelles épinières lombaires, 2h pour les muscles), puis stockés dans du PBS contenant 0,002% de thimérosal à 4 °C jusqu'à utilisation, pour réaliser des techniques d'histologie.

a. *Extraction d'ARN et RT-PCR en temps réel*

Les ARN ont été préparés selon un protocole standard du laboratoire. Brièvement, chaque échantillon congelé de moelle épinière lombaire et de muscle gastrocnémien est placé sur de la glace dans un tube contenant une bille en acier inoxydable de 5 mm. Un millilitre de réactif Trizol (Invitrogen, Groningen, Pays-Bas) est ajouté, et l'homogénéisation est effectuée trois fois dans un TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) à 30Hz pendant 3 min. L'ARN est extrait avec une technique chloroforme/isopropanol/éthanol puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation. Un microgramme d'ARN total est utilisé pour synthétiser l'ADNc en utilisant une transcriptase inverse (iScript™ Reverse Transcription Supermix, 1708841, Bio-Ras, USA) et des amorces oligo-dT comme spécifié par le fabricant. L'expression des gènes a été mesurée par PCR quantitative en temps réel avec les amorces adaptées à chaque ARNm, des dNTP, de l'ADN polymérase hot-start et du SYBR Green dans un tampon, selon les instructions du fabricant (SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix, BioRad) dans un thermocycleur Bio-Rad iCycler. La PCR a été réalisée dans des conditions optimisées : dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, suivie de 40 cycles de 10 s à 95°C et 30 secondes à 60°C. Les séquences des amorces (Eurogentec Seraing, Belgique) utilisées pour chaque gène sont données dans le tableau supplémentaire 1. La quantification relative de chaque ARNm a été réalisée à l'aide du logiciel Biorad

(CFX Maestro Software, BioRad) et calculée en fonction du facteur de normalisation généré à partir des gènes de référence (Pol2, TBP et 18S pour la moelle épinière ; H2AC, H2AX, H1H2BC pour le muscle) grâce au logiciel Genorm v3.5.

b. Histologie

- Etudes des jonctions neuromusculaires (JNM) :

Au microscope binoculaire, les fibres du muscle tibial antérieur ont été séparés en faisceaux minces. Les JNM ont été visualisées par marquage des récepteurs post-synaptiques à l'acétylcholine avec de l' α -bungarotoxine (α BGT) et des terminaisons nerveuses avec des anticorps dirigés contre les neurofilaments et la synaptophysine. Pour ce faire, les fibres musculaires sont prétraitées avec une solution de saturation/perméabilisation contenant 3% d'Albumine de sérum bovin (BSA) et 0,5% de TritonX100 dans du PBS pendant 30 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite incubées sous agitation avec un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-synaptophysine (AB578, Eurogentec) et un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-neurofilament (AB575, Eurogentec) dilués chacun au 1/50 dans du PBS contenant du TritonX100 à 0,1% (PBST). Après une nuit à température ambiante, les fibres sont lavées trois fois 10 minutes au PBST puis incubées avec des anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa 488 (1/500, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) pour visualiser la terminaison nerveuse et de l' α BGT conjuguée à la rhodamine (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich) pour visualiser les récepteurs post-synaptiques à l'acétylcholine. Après 1h30 d'incubation et trois lavages au PBS, les faisceaux de fibres musculaires sont montés entre lame et lamelle dans un milieu aqueux (#18606, Aqua-Poly/mount, Polysciences) puis les JNM sont analysées avec un microscope à fluorescence (ApoTome 2, Zeiss). Les JNM ont été quantifiées directement sous le microscope à fluorescence et 100 à 120 JNM ont été quantifiées par animal. Les groupes de souris nTg étaient constitués de 4 souris par groupe, et les groupes de souris HE étaient constitués de 7 souris par groupe. Une JNM était considérée comme dénervée lorsque l'élément présynaptique n'atteignait pas la région postsynaptique.

- Comptage des MN :

La région lombaire L1–L3 des moelles épinières incluses dans de l'agarose à 4% ont été coupées transversalement au vibratome Leica VT1000S, à une épaisseur de 40 μ m. Les coupes sont incubées 30 min à 80°C avec du tampon citrate à 10mM pH6. Elles sont ensuite saturées 30 minutes avec une solution de PBS contenant 3% de BSA et 0,5% de TritonX100, puis incubées toute la nuit à température ambiante sous agitation avec un anticorps primaire de chèvre anti-choline acétylcholine transférase (ChaT) (1/100, #AB144P - Millipore, France) dilué dans du PBST. Après trois lavages de 10 minutes au PBST, les coupes sont incubées 1h30 dans avec des anticorps de lapin anti-IgG de chèvre conjugués à

l'Alexa594 (1/500, #A11058, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, USA). Les noyaux sont visualisés avec du Hoechst 33342 (1 µg/ml ; Sigma-Aldrich). Après lavage au PBS, les coupes sont montées entre lame et lamelle dans un milieu aqueux (#18606, Aqua-Poly/mount, Polysciences). Six sections de moelle épinière par animal ont été observées au microscope ApoTome 2 (Zeiss). Les deux cornes ventrales de chaque coupe ont été prises en photo à l'objectif x20. La surface du corps cellulaire de tous les MN positifs à la ChAT a été mesurée avec le logiciel Zen Lite (Zeiss). Tous les neurones d'une taille supérieure à 400 µm² ont été considérés comme des MN α. Les groupes de souris nTg étaient constitués de 4 souris par groupe, et les groupes de souris HE étaient constitués de 6 souris pour le groupe Veh et de 7 souris pour le groupe AMB.

- Immunohistochimie Cathepsine D (CathD) et P62 sur la moelle épinière lombaire :

Le protocole de préparation des moelles épinières et de marquage est le même que précédemment à l'exception des anticorps utilisés. Les moelles épinières ont été marquées avec un anticorps primaire de lapin anti-Cathepsine D (1/200, #AB75852 - Abcam) et un anticorps primaire de cochon d'inde anti-P62 (1/200, #GP-62C – Progen). Les anticorps secondaires respectifs étaient un anticorps d'âne anti-lapin conjugué à l'Alexa488 et un anticorps d'âne anti-cochon d'inde conjugué à l'Alexa594 (1/1000, Jackson ImmunoResearch). Les noyaux sont visualisés avec du Hoechst 33342 (1 µg/ml ; Sigma-Aldrich). Les coupes ont été observées et prises en photo à l'objectif x63 au microscope confocal (Leica SP5 Leica Microsystems CMS GmbH). Trois photos par champs ont été prises au plan focal espacées de 3µm chacune.

1.5. Statistiques

Les résultats présentés correspondent aux moyennes ± Erreur Standard de la moyenne (ESM) et ont été analysés avec le logiciel GraphPad Prism version 8.0. Le test t de Student a été utilisé pour comparer deux groupes, et le test d'analyse de variance ANOVA a été appliqué pour comparer plus de deux groupes. La PCR quantitative, le comptage des JNM et le comptage des MN ont été analysés avec un test ANOVA à un facteur. L'évaluation motrice et comportementale a été analysée avec un test ANOVA à deux facteurs. Les différences avec des valeurs p <0,05 ont été considérées comme significatives.

2. Résultats

2.1. L'AMB améliore la force motrice des souris *CHMP2B^{intron5}*

Avec l'apparition de la maladie, les patients atteints de SLA perdent du poids, et développent une atrophie musculaire et une paralysie progressive. Les souris HE *CHMP2B^{intron5}* présentent des signes typiques de la SLA avec une perte de poids visible à partir de 17 mois et des altérations progressives de la fonction motrice à partir de 10 mois aboutissant à une paralysie (Vernay et al., 2016).

Pour déterminer si l'AMB peut ralentir la progression de la maladie et/ou la perte des fonctions motrices, les souris ont été traitées (AMB) ou non (Veh) à l'AMB à partir de l'âge de 18 mois correspondant à un âge symptomatique. Les souris ont été pesées un mois avant le début du traitement (J-30), le premier jour de traitement (J0) puis 30, 60 et 80 jours après le début du traitement. Entre J0 et J+80, les souris HE montrent une perte de poids significative. Le traitement à l'AMB ne modifie pas le poids des souris traitées par rapport aux souris Veh de même génotype (**figure 1A**). Afin d'évaluer l'évolution de la force musculaire chez nos souris, nous avons utilisé le test d'agrippement. Au début du traitement (J0), les souris HE développent une force légèrement inférieure à celle des souris nTg bien que la différence ne soit pas significative. Chez les souris nTg le traitement ne modifie pas la force des souris nTg AMB par rapport aux souris nTg Veh. Dès 30 jours de traitement (J+30), la force musculaire des souris HE Veh diminue par rapport aux souris nTg Veh. Cette baisse atteint 21% à J+80 par rapport à J0. En revanche la force musculaire est maintenue chez les souris HE AMB (**figure 1B**). Afin de tester si l'AMB est capable d'améliorer les performances motrices (coordination motrice et fatigabilité), les souris ont été testées avec un rotarod. Avant le début du traitement, les souris HE présentent une coordination motrice inférieure à celles des souris nTg quel que soit le traitement. Aucune différence de performance n'est observée entre les souris HE Veh et les souris HE AMB (**figure 1C**). Le traitement à l'AMB initié au stade symptomatique permet donc de préserver la force musculaire des souris HE mais ne modifie pas leurs performances motrices.

2.2. L'AMB préserve les MN de la neurodégénérescence et maintient les JNM des souris *CHMP2B^{intron5}*

Pour mieux comprendre comment l'AMB préserve la force musculaire des souris HE, nous avons quantifié le nombre de MN spinaux des souris (**figure 2A, 2B**) ainsi que l'innervation des muscles squelettiques associés (**figure 2C-G**) à l'issue du traitement. A l'âge de 21 mois, après 80 jours de traitement, les souris HE Veh présentent une perte de MN de 42% par rapport aux souris nTg Veh (nTg Veh : $17,28 \pm 2,28$ vs HE Veh : $10,05 \pm 0,80$). Le traitement à l'AMB limite cette perte de MN. En effet, les souris HE AMB ont un nombre de MN supérieur de 33% comparées aux souris HE Veh (HE Veh : $10,05 \pm 0,80$ vs HE AMB : $14,93 \pm 1,43$) (**figure 2B**). Nous avons ensuite évalué l'état d'innervation des JNM du muscle tibial antérieur. Les JNM sont considérées comme innervées lorsque l'élément pré-synaptique (en vert) rejoint l'élément post-synaptique (en rouge) (**figure 2C**). Comme le montre la **figure 2D**, le nombre de JNM innervées chez les souris HE Veh est réduit de 53% par rapport aux souris nTg Veh ($75,35 \pm 6,105$ nTg Veh vs $35,71 \pm 6,689$ HE Veh). Cependant, le traitement à l'AMB limite cette dénervation. En effet, les souris HE AMB ont un taux d'innervation supérieur de 38% à celui des souris HE Veh ($35,71 \pm 6,689$ HE Veh vs $57,73 \pm 5,558$ HE AMB) qui se rapproche de celui des souris nTg traitées ou non à l'AMB. Nous avons ensuite mesuré les niveaux d'ARNm musculaire de la sous-unité

α du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (AChR α), de l'atrogine-1, et de la kinase 2 spécifique du muscle (MuSK) qui sont trois marqueurs de dénervation. Dans le muscle gastrocnémien, les niveaux d'ARNm de l'AChR α et de l'Atrogine-1 sont respectivement 3 et 1,5 fois plus élevés chez les souris HE Veh par rapport aux souris nTg Veh (**figure 2E, 2F**). Le traitement à l'AMB prévient l'augmentation de l'expression de ces deux marqueurs, les maintenant à un niveau comparable à celui des souris nTg. Cependant, les niveaux d'ARNm de *MuSK2* sont 10 fois plus élevés chez les souris HE Veh par rapport aux souris nTg Veh et le traitement à l'AMB ne modifie pas l'expression de *MuSK2* chez les HE (**figure 2G**). Le traitement à l'AMB limite donc la perte des MN, la dénervation des JNM et prévient l'augmentation de l'expression de certains marqueurs de dénervation.

En parallèle, nous avons évalué le profil métabolique des unités motrices sur la base de l'expression des chaînes lourdes de myosine (MyHC) et dont on sait qu'il est modifié chez les souris *SOD1^{G93A}* avec la progression de la maladie (Deforges et al., 2009; Hegedus et al., 2008). Quel que soit le génotype et le traitement aucune différence significative n'est observée pour les myosines *MyHC I* et *MyHC IIa*, (**figure supplémentaire 2A, 2B**). Cependant l'expression de la myosine *MyHC IIb*, un marqueur des fibres glycolytiques tend à diminuer chez les souris nTg AMB comparée aux souris nTg Veh. Une diminution significative de 50% de l'expression de cette myosine est observée entre les HE Veh et les nTg Veh mais l'AMB ne modifie pas l'expression de *MyHC IIb* chez les souris HE (**figure supplémentaire 2C**). Finalement, l'expression de *MyHC IIx/d*, qui est un marqueur des fibres intermédiaires possédant un métabolisme mixte glycolytique et oxydatif, est augmentée de 50% chez les souris HE Veh par rapport aux souris nTg Veh (**figure supplémentaire 2D**) et le traitement à l'AMB prévient cette augmentation. Le traitement à l'AMB empêche la surexpression de la myosine *MyHC IIx/d*.

2.3. L'AMB réduit l'expression du marqueur microgliale *Iba1* dans la moelle épinière des souris *CHMP2B^{intron5}*

La contribution de la glie dans la mort des MN au cours de la SLA est fortement suggérée par les données actuelles de la littérature. En effet, les patients SLA et DFT montrent une neuroinflammation cérébrale et spinale qui impacte la survie des neurones. Elle se caractérise par une activation et une prolifération microgliale et astrocytaire (Appel, 2011; Souza et al., 2016). Pour comprendre les effets bénéfiques de l'AMB sur la survie des MN, nous avons analysé les niveaux d'ARNm du marqueur de liaison au calcium ionisé 1 (IBA1) spécifique à la microglie et aux macrophages périphériques (dérivés des cellules myéloïdes), ainsi que ceux du marqueur astrocytaire Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) dans la moelle épinière des souris (**figure supplémentaire 3**). A l'âge de 21 mois, les souris HE Veh présentent une induction de l'expression de *Iba1* 2 fois supérieure à celle des souris nTg Veh et le traitement à l'AMB ne modifie pas l'expression d'*Iba1* chez les souris nTg. En revanche, il prévient son

augmentation chez les souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh (**figure supplémentaire 3A**). L'expression de *Gfap* est 2,5 fois plus élevée chez les souris HE Veh par rapport aux souris nTg Veh et le traitement à l'AMB ne modifie pas l'expression de *Gfap* chez les souris HE (**figure supplémentaire 3B**). L'AMB limite la surexpression du marqueur microgliale *Iba1* mais ne prévient pas celle du marqueur astrocytaire *Gfap*.

2.4. L'AMB modère les changements comportementaux des souris *CHMP2B^{intron5}*

En plus de l'atteinte des fonctions motrices, les patients SLA-DFT développent des atteintes comportementales pouvant se traduire par une diminution de l'anxiété, une désinhibition et/ou des comportements stéréotypés. Ces altérations comportementales sont liées au déclin cognitif retrouvé chez les patients DFT. Dès l'âge de 12 mois, les souris HE *CHMP2B^{intron5}* présentent des altérations comportementales en lien avec la DFT telles qu'une désinhibition et des troubles de l'interaction social et du comportement alimentaire (Vernay et al., 2016). Nous avons donc cherché à déterminer si l'AMB peut influencer l'évolution du déclin cognitif et ainsi réduire ou ralentir l'apparition des altérations comportementales. Pour cela, nous avons utilisé deux tests : le test d'enfouissement des billes (ou MB pour « Marble Burying ») qui mesure l'état d'anxiété des animaux, et le test en openfield qui permet l'analyse du comportement exploratoire des animaux dans une arène. Comme le montrent les **figures 3A et 3B**, à J0 les souris HE enterrent un nombre de billes significativement inférieur à celui des souris nTg quel que soit le traitement qui sera appliqué ensuite. Le traitement à l'AMB ne modifie pas le comportement d'enfouissement des billes chez les souris nTg quel que soit le temps de traitement. A partir de J+30, les souris HE AMB enfouissent un nombre de billes significativement plus élevé que les souris HE Veh. L'AMB favorise donc l'enfouissement des billes chez les souris HE et permet de restaurer le comportement anxieux qui correspond au comportement attendu face aux billes.

Nous avons ensuite utilisé le test de l'openfield pour étudier les effets du génotype ou de l'AMB sur le comportement exploratoire des animaux (**figure supplémentaire 4**). La **figure supplémentaire 4A** montre les tracés représentatifs du déplacement des souris nTg et HE dans l'openfield avant le début du traitement (J0). Les souris nTg restent à la périphérie de l'arène et se déplacent rarement dans le centre de celle-ci. A l'inverse, les souris HE ont un profil d'exploration de l'arène totalement différent des souris nTg. En effet, les tracés indiquent que les souris HE se déplacent de manière aléatoire en effectuant de nombreux passages au centre et dans les bords de l'arène. Nous avons quantifié 2 paramètres : la distance parcourue dans l'arène (en cm) et le nombre de passage des souris dans le centre de l'arène (**figure supplémentaire 4B-C**). A J0, les souris HE parcourent une distance de 41% plus élevée que les souris nTg (nTg : $3736 \pm 294,4$ vs HE : $6331 \pm 630,0$) (**figure supplémentaire 4B**) et passent dans le centre de l'arène 63% plus que les souris nTg (nTg : $7,9 \pm 1,3$ vs HE : $22,0 \pm 4,2$) (**figure**

supplémentaire 4C). Ensuite, nous avons étudié les effets de l'AMB sur le comportement exploratoire des souris HE. Nous avons étudié individuellement les profils exploratoires des souris HE Veh et des HE AMB. Comme le montre la **figure supplémentaire 4D**, le profil d'exploration des souris HE (tout traitement confondu) est très différent au sein d'un même groupe. Les souris HE Veh n°2 et n°3 ont un comportement exploratoire qui diminue fortement entre J0 et J+80 alors qu'il n'est pas modifié pour la souris n°1. Les tracés du comportement exploratoire des souris HE AMB montrent également une diminution entre J0 et J80. L'analyse de la distance et de la fréquence de passage dans le centre de l'arène ne révèle aucune différence significative entre les souris HE Veh et les souris HE AMB. Cependant on peut noter une tendance à la baisse de ces paramètres chez les souris HE AMB. (**figure supplémentaire 4E**).

2.5. L'AMB module l'expression des gènes de la voie lysosomale et autophagique

Le processus autophagique est fortement perturbé dans la SLA et la DFT. Les patients DFT porteurs de la mutation *CHMP2B^{intron5}* présentent des accumulations d'endosomes tardifs dans les neurones du cortex frontal (Urwin et al., 2010). Compte tenu de l'implication de *CHMP2B^{intron5}* dans les processus lysosomaux et autophagique, nous avons vérifié si l'AMB peut moduler l'expression des gènes de ces voies (**figure 4**). Nous avons mesuré l'expression de trois gènes en relation avec la fonction lysosomale dans la moelle épinière des souris : la cathepsine D (CathD), la cathepsine Z (CathZ), deux protéases lysosomales, et Gnptab (**figure 4A-C**), une enzyme qui initie la synthèse de mannose-6 phosphate nécessaire à l'adressage des hydrolases acides au lysosome. L'expression de la CathD est 2 fois plus élevée chez les souris nTg AMB par rapport aux souris nTg Veh ainsi que chez les souris HE Veh par rapport aux souris nTg Veh. Le traitement à l'AMB induit une augmentation de 23% de l'expression de la CathD chez les souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh (**figure 4A**). L'expression de la CathZ est 1,75 fois supérieure chez les souris HE Veh par rapport aux souris nTg Veh. Le traitement à l'AMB ne modifie pas l'expression de la CathZ chez les souris nTg en revanche, elle prévient l'induction de la CathZ chez les souris HE (**figure 4B**). Par rapport aux souris nTg Veh, l'expression de Gnptab est diminuée chez les souris HE Veh. Le traitement à l'AMB réduit de 30-40% l'expression de Gnptab par rapport à l'expression du contrôle correspondant (Veh) quel que soit le génotype (**figure 4C**).

Nous avons ensuite mesuré l'expression de 3 facteurs impliqués dans l'autophagie : ULK-1, une kinase impliquée dans l'initiation de l'autophagie, Beclin-1, une protéine impliquée dans la formation et la maturation des autophagosomes, et P62, une protéine adaptatrice qui assure l'adressage des protéines ubiquitinées à l'autophagosome (**figure 4D-F**). L'expression de *Ulk-1* est diminuée de 20% chez HE Veh par rapport aux souris nTg Veh. Après un traitement à l'AMB des souris HE, l'expression

de *Ulk-1* est restaurée et revient à un niveau comparable à celle mesurée chez les souris nTg traitées à l'AMB ou au Veh (**figure 4D**). Le traitement à l'AMB ne modifie pas l'expression de *Beclin-1* chez les nTg par rapport aux nTg Veh. L'expression de *Beclin-1* diminue de 20% chez les souris HE Veh par rapport aux souris nTg Veh. En revanche, l'expression de *Beclin-1* est diminuée de 10% chez les souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh (**figure 4E**). Enfin, aucune différence d'expression de *P62* n'est observée entre les souris HE Veh et les souris nTg Veh. L'expression de *P62* est réduite de 40% chez les souris HE AMB par rapport aux souris nTg AMB et de 20% par rapport aux souris HE Veh (**figure 4F**).

Afin de visualiser simultanément la distribution et la localisation de la CathD et de P62 dans la ME et de déterminer si l'AMB empêche l'accumulation de ces protéines dans le cytoplasme des MN, nous avons réalisé des co-marquages immunohistochimiques (**figure 4G**). Chez les souris nTg Veh on observe un marquage ponctiforme de petite taille, distribué dans l'ensemble du cytoplasme des MN pour la CathD et P62 avec une densité de marquage P62 inférieure à celle de la CathD. Le traitement à l'AMB semble réduire l'immunoréactivité CathD sans modifier celle de P62. De plus, on n'observe pas de colocalisation des marquages pour ces deux protéines. Chez les souris HE Veh, on observe une très forte augmentation des immunoréactivités CathD et P62 par rapport aux souris nTg Veh avec la présence de structures de très grande taille (flèches) qui correspondent à des agrégats protéiques. Chez les souris HE AMB, on note une forte réduction des deux marquages avec une baisse du nombre et de la taille des agrégats.

Pour conclure le traitement à l'AMB module l'expression des gènes de la voie lysosomale et ceux impliqués dans l'autophagie. L'AMB semble également limiter les agrégats protéiques dans les MN de la moelle épinière des souris HE.

3. Discussion

3.1. L'AMB préserve les unités motrices des souris *CHMP2B*^{intron5}

Au cours de la SLA, les patients développent une paralysie qui s'aggrave progressivement avec l'évolution de la maladie. Dans cette étude réalisée sur le modèle de SLA-DFT *CHMP2B*^{intron5}, nous mettons en évidence une perte de la force musculaire au cours du temps ainsi que des performances motrices altérées. Ces effets du mutant *CHMP2B*^{intron5} avaient déjà préalablement été mis en évidence dans Vernay et collaborateurs (2016). Le traitement à l'AMB permet de ralentir la perte de la force musculaire sans pour autant améliorer les performances motrices de ces animaux. Nous montrons également que ces souris développent une forte dénervation musculaire associée à la mise en place d'une paralysie progressive. Cette dénervation avait déjà été décrite par Vernay et collaborateurs (2016). Cependant, nous montrons que cette dénervation est également associée à une perte de MN

dans la moelle épinière à l'âge de 21 mois. L'étude de Vernay et collaborateurs (2016) n'avait pas mis en évidence de perte de MN à un stade terminal, où la paralysie ne permet plus à la souris de se retourner lorsqu'elle est placée sur le côté. Cette différence de résultats pourrait s'expliquer par le fait que dans l'étude décrivant le modèle, le comptage des MN réalisé après un immunomarquage de la ChAT, ne prenait pas en compte la taille du soma des MN. L'immunomarquage ChAT ne permet pas de différencier les MN α des MN γ ; or seuls les MN α dégénèrent dans la SLA (Roselli and Caroni, 2014). De plus, lors des processus neurodégénératifs, il existe une atrophie progressive du soma avant que le MN ne meure. Au niveau lombaire plus de 85% des MN α ont un soma dont la surface est $\geq 400\mu\text{m}^2$ alors que tous les MN γ ont un soma dont la surface est $< 400\mu\text{m}^2$. Dans ce travail, nous n'avons compté que les MN dont la taille était supérieure à $400\mu\text{m}^2$ (soit les MN qui survivent) et non l'ensemble des corps cellulaires immunoréactifs à la ChAT, ce qui montre donc que l'expression du mutant conduit à une perte de MN caractéristique de la SLA.

Nous avons également montré qu'un traitement des souris HE à l'AMB initié à un stade symptomatique, stade qui correspond à l'état du patient lorsqu'il vient en consultation pour se faire diagnostiquer, permet de ralentir la progression des symptômes moteurs. Il est intéressant d'étudier les effets de l'AMB à un âge symptomatique car cela permet de mieux considérer les effets potentiels de la molécule sur les patients déjà atteints par la maladie. Le fait que l'AMB puisse ralentir la perte de la force musculaire permet d'envisager que la molécule puisse aussi avoir des effets bénéfiques chez le patient. De plus, comme dans le modèle *Sod1^{G86R}* (Bouscary et al., 2019), nous montrons que l'AMB préserve les MN et les JNM des souris HE, et que les effets bénéfiques de l'AMB sur la composante motrice peuvent être retrouvés dans un autre modèle transgénique de la maladie. Toutefois, dans le modèle *Sod1^{G86R}*, même si l'AMB protège les MN, préserve les JNM et prolonge la survie, la molécule ne suffit cependant pas à empêcher la mort des animaux (Bouscary et al., 2019). Rouaux et collaborateurs avaient déjà montré, dans le modèle *Sod1^{G86R}*, que préserver le nombre de MN n'était pas suffisant pour augmenter la survie des souris car la stabilisation de la JNM est essentielle (Rouaux et al., 2007). Dans notre étude, nous n'avons pas vérifié si l'AMB est capable d'augmenter la survie des souris HE. Cependant, le traitement a permis d'empêcher l'augmentation de l'expression des marqueurs de dénervation : l'AchR α et l'atrofine-1, mais pas celui du marqueur post-synaptique MuSK. L'expression de l'AchR α est induite en réponse à la dénervation ou au dysfonctionnement synaptique (Duclert and Changeux, 1995). L'atrofine-1 est un marqueur important de l'atrophie musculaire associé à la perte de la masse musculaire (Pinheiro-Dardis et al., 2017). MuSK est essentiel au développement et au maintien de la stabilité des JNM (Sanes and Lichtman, 2001). La perte post-synaptique de MuSK précède généralement l'altération de l'assemblage des récepteurs à l'acétylcholine et l'altération des JNM (Cole et al., 2010). Si l'augmentation de l'AchR α et de l'atrofine-

1 n'est pas retrouvée en présence d'AMB, c'est probablement parce que MuSK est un marqueur précoce de l'altération des JNM et que le traitement retarde la dénervation. Ce qui confirme que même si l'AMB ralentit le développement de la maladie, il n'empêche pas son déclenchement.

3.2. Effets de l'AMB sur le métabolisme des unités motrices

Chez les patients SLA tout comme chez les modèles murins, les MN qui sont les plus touchés sont les MN α liés aux unités motrices « Fast-Fatigable (FF) » (Roselli and Caroni, 2014). Dans ce type d'unité motrice, on retrouve des fibres musculaires au métabolisme glycolytique qui ont une contraction rapide de grande intensité et présentent une fatigabilité importante. Ces fibres à contraction rapide sont plus vulnérables et sont atteintes dès les premiers stades de la SLA tandis que les fibres oxydatives à contraction lente résistent davantage (Atkin et al., 2005; Derave et al., 2003; Gordon et al., 2010; Hegedus et al., 2007). Les modèles murins SLA basés sur l'expression de mutants de la SOD1 présentent des changements métaboliques musculaires. En effet, les muscles des souris *Sod1^{G86R}* utilisent le métabolisme oxydatif plutôt que le métabolisme glycolytique (Palamiuc et al., 2015). Chez la souris *SOD1^{G93A}*, il est également possible d'observer une inversion du métabolisme musculaire (Deforges et al., 2009; Hegedus et al., 2008; Scaricamazza et al., 2020) et un changement des proportions des types de fibres dans plusieurs muscles (Deforges et al., 2009). Les muscles à contraction rapide évoluent au cours de la maladie vers un métabolisme oxydatif qui rend les contractions des muscles plus lentes et plus soutenues mais d'intensité inférieure (Sharp et al., 2005). Nous nous sommes donc intéressés au profil métabolique d'un muscle majoritairement glycolytique, le muscle gastrocnémien, chez les souris HE. L'expression du mutant induit une baisse de l'expression des chaînes lourdes de myosine *MYHC IIb* et une augmentation des chaînes lourdes de myosine *MYHC IIx/d*. Les chaînes lourdes de myosine *MYHC IIb* sont présentes dans les fibres glycolytiques associées aux unités motrices FF tandis que les chaînes lourdes de myosine *MYHC IIx/d* sont présentes dans des fibres dont la fatigabilité et la force de contraction sont inférieures et dont le métabolisme est mixte : glycolytique et oxydatif. Le traitement à l'AMB empêche l'induction de *MyHC IIx/d*, mais ne modifie pas l'expression de la *MyHC IIb* par rapport aux souris HE non traitées. Ces résultats suggèrent que l'AMB est capable d'influencer le métabolisme énergétique au niveau musculaire. Chez les souris *SOD1^{G93A}* les changements métaboliques des fibres musculaires sont liés à des changements mitochondriaux (Scaricamazza et al., 2020). De nombreuses études montrent que la peroxydation des lipides dans les maladies neurodégénératives est liée à des dysfonctionnements mitochondriaux (Panchal et al., 2019). L'AMB est un inhibiteur de la peroxydation des lipides dans les poumons et le cœur (Nowak et al., 1995; Wiktorska et al., 2010). En limitant la peroxydation des lipides, il est possible que l'AMB module différents acteurs mitochondriaux impliqués dans les changements métaboliques des fibres musculaires squelettiques. Il est notamment montré que l'AMB augmente l'expression de *PGC-1 α* , un

acteur de la biogénèse mitochondriale mais active aussi le facteur de transcription TFEB (Magalhaes et al., 2018) qui est un régulateur des voies lysosomales et autophagiques (comprenant la mitophagie et macroautophagie) (Ivankovic et al., 2016; Settembre et al., 2012; Wu et al., 2009). Ainsi, les effets de l'AMB sur la biogénèse mitochondriale méritent d'être étudiés. Enfin, une étude récente montre que la délétion en facteurs neurotrophiques BDNF chez la souris induit également une conversion des fibres rapides à lentes (Delezie et al., 2019). GBA2 se trouve au niveau de la membrane cellulaire où il assure la dégradation du GlcCer en céramide. En inhibant GBA2, il est possible que l'AMB assure un certain pool de glycosphingolipides à la membrane qui favorise la conversion du GlcCer en glycosphingolipides plus complexes, notamment en ganglioside GM1. Il est connu que le ganglioside GM1 interagit et potentialise les récepteurs au BDNF TrkB impliqués dans le bon développement du système nerveux (Bachis et al., 2002; Fukumoto et al., 2000; Furukawa et al., 2014; Pitto et al., 1998). L'un des mécanismes de l'AMB pourrait donc être que l'inhibition de GBA2 favorise l'activation des facteurs neurotrophiques via leur liaison avec GM1, ce qui contribue ainsi à la croissance axonale et dendritique, comme nous l'avons préalablement montré *in vivo* et *in vitro* (Bouscary et al., 2019).

Ainsi, plusieurs hypothèses non exclusives tendent à expliquer l'impact de l'AMB sur l'intégrité des unités motrices. Le mécanisme d'action de l'AMB sur les unités motrices reste donc à éclaircir.

3.3. L'AMB modère la progression des altérations comportementales des souris *CHMP2B^{intron5}*

Les patients DFT présentent un déclin cognitif engendrant des altérations comportementales. Parmi celles-ci, on retrouve la diminution de l'anxiété et la désinhibition. Ici, nous avons souhaité savoir si l'AMB peut restaurer ou ralentir ces symptômes qui sont décrits chez les souris HE comme chez les patients (Vernay et al., 2016). Nos résultats montrent que l'AMB ramène le niveau d'anxiété à une valeur normale, comparable à celle observée chez les souris nTg sans pour autant modifier le comportement désinhibé des souris. Pour étudier l'anxiété, nous avons utilisé le test d'enfouissement des billes (MB). Le MB est un test anxiogène basé sur le comportement réflexe des rongeurs qui consiste à enterrer les objets qu'ils considèrent comme « nocifs ». Ce test est à l'origine utilisé pour étudier le trouble obsessionnel-compulsif (TOC), l'autisme, la motivation et le comportement anxieux des rongeurs (de Brouwer et al., 2019; Dixit et al., 2020). En présence des billes, les souris nTg ont un comportement anxieux qui les motive à enterrer celles-ci. Dans notre étude, les souris HE n'enterrent pas ou peu les billes. Ce comportement suggère un manque d'intérêt des souris pour les billes ou une désinhibition qui altère leur perception du danger, comme cela peut s'observer chez les malades atteints de DFT. Cependant, après 30 jours de traitement à l'AMB ce désintérêt pour les billes a fortement diminué, les souris HE recommencent à enterrer une partie des billes, suggérant un effet

positif de la molécule sur le comportement des animaux avec une restauration, au moins partielle, d'un comportement normal.

En parallèle, nous avons étudié les effets de l'AMB sur la désinhibition des souris HE en observant leur comportement exploratoire. Le test de l'openfield permet d'étudier l'anxiété naturelle et le comportement exploratoire des souris placées dans un environnement inconnu et ouvert. Dans un contexte non pathologique, les souris passent naturellement plus de temps en périphérie de l'arène qu'au centre. Dans notre étude, avant le début du traitement, les souris HE montrent une altération globale du comportement exploratoire avec en particulier une diminution nette du thymotactisme (comportement naturel qui consiste à se déplacer le long des parois de l'arène) et une augmentation de la distance parcourue par rapport aux souris nTg. Statistiquement, l'AMB ne modifie pas le comportement des souris HE bien qu'on observe une tendance à la diminution de la distance parcourue et de la fréquence de passage au centre chez les souris traitées. L'observation détaillée des tracés met en évidence une très forte variabilité interindividuelle au sein des groupes qui ne permet pas de conclure. Néanmoins, comme les souris HE traitées à l'AMB conservent globalement leur force musculaire et que la distance qu'elles parcourent et le temps qu'elles passent au centre semblent s'améliorer avec le traitement, nous ne pouvons exclure l'hypothèse que l'AMB ait un effet sur le comportement exploratoire et/ou l'anxiété. En effet, malgré la distance parcourue qui reste élevée, le thymotactisme des souris HE AMB semble s'améliorer et se rapproche de celui des souris nTg. Ces données associées à celles obtenues lors du test d'enfouissement des billes permettent donc d'envisager un effet de la molécule sur la composante comportementale qui est montrée comme fortement altérée chez ce modèle. En plus de ralentir la progression des symptômes moteurs, l'AMB semble également modérer la progression des altérations comportementales retrouvées chez les souris HE.

3.4. L'AMB stimule la voie lysosomale

Dans la DFT, peu d'études s'intéressent au métabolisme des sphingolipides chez les patients. Cependant, certaines mutations DFT également associées à la SLA, comme celles retrouvées dans le gène *PRGN (Progranuline)* ont été associées à une accumulation de sphingolipides dans les neurones (Valdez et al., 2020), un déficit de la fonction lysosomale et une altération de l'activité enzymatique de GBA1 (Arrant et al., 2019; Valdez et al., 2020). L'AMB est connu pour être une molécule chaperonne de l'enzyme GBA1 tout en inhibant l'enzyme GBA2. L'AMB favorise l'adressage de GBA1 vers le lysosome (Ambrosi et al., 2015; Luan et al., 2013; Maegawa et al., 2009; McNeill et al., 2014; Siebert et al., 2014). Des données *in vitro* montrent un lien étroit entre GBA1 et la CathD. La CathD est impliquée dans le clivage de la prosaposine en saposine C, une protéine activatrice de GBA1 (Hiraiwa

et al., 1997; Tamargo et al., 2012). De plus, l'AMB augmente le niveau de CathD et stimule sa fonction enzymatique dans des neurones dopaminergiques (Yang et al., 2020). Par ailleurs, les mutations GBA1 conduisent à une réduction des niveaux de CathD et de son activité enzymatique. La récente étude transcriptomique réalisée sur la moelle épinière de souris HE menée par notre laboratoire montre que chez les souris HE, l'expression des *CathD* et *CathZ* est augmentée (Waegaert et al., 2020). Dans notre étude, nous retrouvons également l'augmentation des *CathD* et *CathZ* dans la moelle épinière des souris HE par rapport aux souris nTg. Parallèlement, l'expression de *Gnptab* est réprimée chez les HE et cette répression est accentuée lors du traitement à l'AMB. Ce traitement réprime également l'expression de *Gnptab* chez les souris nTg. Le gène *Gnptab* code pour l'enzyme (GlcNAc)-1-phosphotransférase impliquée dans le transport des hydrolases acide vers le lysosome. La (GlcNAc)-1-phosphotransférase est capable de réduire l'expression de l'hydrolase acide Cathepsine K (Lei et al., 2015). Si la (GlcNAc)-1-phosphotransférase est également un répresseur de la CathD, la diminution de l'expression de *Gnptab* chez les souris HE pourrait elle aussi expliquer l'augmentation de l'expression de la *CathD*. Mettre ces résultats en lien avec la littérature permet d'expliquer pourquoi un traitement à l'AMB amplifie davantage la surexpression de la *CathD* chez ces animaux. Fait intéressant, les souris nTg traitées à l'AMB montrent aussi une augmentation de l'expression de *CathD*, ce qui est en accord avec les travaux de Yang et al., 2020. L'étude des immunomarquages CathD révèle que les MN des souris HE contiennent des agrégats CathD qui pourraient être la conséquence de l'augmentation de son expression. Toutefois, l'immunoréactivité de la CathD semble globalement moins forte chez les souris traitées à l'AMB quel que soit le génotype, ce qui semble en contradiction avec l'expression augmentée de la CathD et les données de la littérature. Nous nous attendions à observer une immunoréactivité CathD plus forte or, les MN des souris HE traitées à l'AMB contiennent moins d'agrégats CathD que ceux des souris HE non traitées. Des études *in vitro* ont montré que l'AMB stimule l'exocytose et la libération d'exosomes (Fois et al., 2015; Magalhaes et al., 2018), et dans des modèles de maladie de Parkinson, la molécule est capable de diminuer les agrégats d' α -synucléine dans des lignées cellulaires murines et humaines (Magalhaes et al., 2018; Mazzulli et al., 2016; McNeill et al., 2014; Yang et al., 2017). Il est donc possible que l'AMB participe à la clairance des agrégats cytoplasmiques par stimulation de la voie exosomale.

La CathZ est induite chez les souris HE. Bien qu'elle intervienne dans les processus d'inflammation (Allan et al., 2017; Campden and Zhang, 2019; Stichel and Luebbert, 2007), le rôle de la CathZ dans les maladies neurodégénératives reste obscur. Dans la maladie d'Alzheimer, la CathZ abolie l'activité de la γ -enolase un facteur neurotrophique impliqué dans la croissance, la différenciation et la survie des neurones (Hafner et al., 2013). Des études *in vitro* suggèrent que l'inhibition de la CathZ limite les processus d'apoptose (Pišlar et al., 2014), induit la formation des neurites et augmente la survie

neuronale (Obermajer et al., 2009). Dans des conditions physiologiques normales l'AMB ne modifie pas l'expression de la *CathZ*. Cependant, chez les souris HE, le traitement à l'AMB prévient l'augmentation de la *CathZ* dont l'expression revient à un niveau comparable à celui des souris nTg. En limitant l'expression de la *CathZ*, l'AMB pourrait donc exercer des propriétés neuroprotectrices et/ou neurotrophiques et participer au maintien des JNM.

Les données de la littérature montrent également que l'AMB stimule la fonction lysosomale (Ambrosi et al., 2015; Magalhaes et al., 2018; Mazzulli et al., 2016; McNeill et al., 2014; Yang et al., 2020). Nos résultats permettent d'émettre une hypothèse semblable dans notre modèle. GNPTAB fait partie de la voie mannose-6-phosphate (M6P) qui permet d'acheminer les hydrolases acides vers le lysosome. Une étude suggère que la *CathZ* serait adressée vers le lysosome par la voie M6P qui dépend de GNPTAB (Blanz et al., 2015). Toutefois, il existe des voies indépendantes de la M6P. C'est notamment le cas de l'adressage de GBA1 et de la *CathD* vers le lysosome (Coutinho et al., 2012). L'adressage de GBA1 vers le lysosome fait intervenir le récepteur LIMP-2 (Blanz et al., 2015; Reczek et al., 2007) tandis que celui de la *CathD* fait intervenir le récepteur Sortilin (Coutinho et al., 2012). *In vitro*, l'AMB augmente l'expression de la protéine LIMP-2 (Ambrosi et al., 2015; Magalhaes et al., 2018). Ces données de la littérature suggèrent que l'AMB stimule l'adressage des protéines vers le lysosome lorsqu'elles sont indépendantes du M6P au détriment de la voie M6P. Cela expliquerait la diminution de l'expression de *Gnptab* et de la *CathZ*, ainsi que l'augmentation de l'expression de la *CathD*. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait mesurer les niveaux protéiques de LIMP-2, de la Sortilin et de la *CathD*.

3.5. L'AMB et l'autophagie

De nombreuses données suggèrent que les inclusions protéiques retrouvées dans les neurones des patients SLA et DFT sont la conséquence d'un processus autophagique altéré. CHMP2B est un composant du "complexe endosomal requis pour le transport-III" (ESCRT-III). Par sa liaison au complexe ESCRT III, CHMP2B intervient dans la formation des d'endosomes tardifs (ou corps multivésiculaires ou CMV) qui fusionnent avec les autophagosomes puis les lysosomes pour dégrader leur contenu. CHMP2B est donc essentiel pour la formation des endosomes et le trafic autophagique. Les neurones du cortex frontal des patients DFT porteurs de la mutation *CHMP2B^{intron5}* présentent des accumulations de CMV contenant la protéine CHMP2B mutée (Skibinski et al., 2005; Urwin et al., 2010). Le processus autophagique dans cette mutation semble donc fortement impacté. Nous avons donc analysé l'expression de quelques gènes impliqués dans l'autophagie et nous avons regardé si l'AMB module l'expression de ces gènes.

Notre étude montre que les souris HE présentent une diminution de l'expression de *Ulk1* et de *Beclin-1* par rapport aux souris nTg. ULK1 est un régulateur de l'initiation de l'autophagie et BECLIN-1 est impliqué dans la formation des autophagosomes (Harvald et al., 2015). Ces données suggèrent que chez les souris HE, il existe une répression de l'autophagie. Ces résultats vont dans le sens des données non publiées du laboratoire. En effet, la diminution de l'expression de *Beclin-1* et de *Ulk1* est associée à une diminution de la formation des lysosomes et des autophagosomes. Fait intéressant, le traitement à l'AMB rétablit l'expression de *Ulk-1* à un niveau comparable à celui des souris nTg. Néanmoins, la diminution de l'expression de *Beclin-1* est encore plus accentuée chez les souris HE après traitement à l'AMB. L'activation de BECLIN-1 se fait par le complexe ULK, qui comprend ULK1 et ULK2. Pour que l'autophagie soit induite et que BECLIN-1 soit activé, la protéine BCL-2 doit libérer BECLIN-1 (Harvald et al., 2015). La diminution de *Beclin-1* dans notre étude, chez les souris HE qu'elles soient traitées ou non à l'AMB, révèle peut-être que la protéine BECLIN-1 est encore associée à BCL-2, ce qui ne permet pas d'enclencher le processus autophagique.

En parallèle, nos immunomarquages mettent en évidence une agrégation importante de P62 chez les souris HE bien que son expression soit inchangée. Le traitement AMB a fortement diminué l'expression de P62 ainsi que ses agrégats cytoplasmiques. Dans la macroautophagie P62 intervient en aval de BECLIN-1. Lorsque l'autophagie se met en place, P62 se lie à LC3-II ainsi qu'aux protéines marquées à l'ubiquitine dans l'autophagosome (Harvald et al., 2015). Bien que l'expression de P62 ne semble pas modifiée chez les souris HE non traitées, la forte répression de *Beclin-1* par l'AMB pourrait indirectement induire la réduction de P62. Il est donc possible que comme chez les souris HE contrôles, la formation de l'autophagosome chez les souris HE traitées à l'AMB soit altérée. Le traitement à l'AMB n'est donc pas suffisant pour rétablir le processus autophagique. Toutefois, une étude récente menée *in vitro* sur des neurones corticaux primaires murin suggère que l'AMB bloque l'autophagie mais stimule l'élimination des agrégats protéiques par activation de la voie exosomale (Magalhaes et al., 2018). Il est donc nécessaire d'éclaircir les effets de l'AMB sur le processus autophagique, afin de préciser quels acteurs intracellulaires sont effectivement mis en jeu.

3.6. L'AMB et la neuroinflammation associée à la microglie

La neuroinflammation est une caractéristique clinique de la SLA et de la DFT. Une forte activation gliale est observée dans le système nerveux central des patients SLA et principalement au niveau des lobes frontaux et temporaux des patients DFT (Alshikho et al., 2018; Cagnin et al., 2004; Corcia et al., 2012). Cette neuroinflammation joue un rôle crucial dans la physiopathologie de la maladie où les cellules astrocytaires et microgliales peuvent influencer la survie des MN (Appel, 2011; Souza et al., 2016). Dans les modèles murins *CHMP2B^{intron5}* dont le nôtre, on observe une forte activation de la microglie

et des astrocytes au niveau du cortex qui s'accroît avec la progression de la maladie (Clayton et al., 2017; Gascon et al., 2014; Ghazi-Noori et al., 2012; Vernay et al., 2016). Dans notre étude, l'expression des gènes *Iba1* et *Gfap*, respectivement marqueurs de la microglie et des astrocytes, est très fortement induite au niveau de la moelle épinière des HE. Le traitement à l'AMB prévient l'augmentation de l'expression d'*Iba1*, sans pour autant empêcher l'élévation de *Gfap*. Nos résultats sur la microglie vont dans le sens d'une étude très récente qui montre que l'AMB améliore la survie des neurones en réduisant le stress du réticulum endoplasmique (RE) des cellules microgliales dans le cas d'une hémorragie cérébrale (Jiang et al., 2020a). Fait intéressant, l'AMB réduit également le stress du RE dans un modèle de maladie de Parkinson chez *Drosophila Melanogaster* basé sur une mutation dans le gène *GBA1* (Sanchez-Martinez et al., 2016). Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent donc que l'AMB puisse moduler la neuroinflammation, ce qui rendrait intéressant son utilisation dans le traitement des maladies neurodégénératives où elle est fortement présente. Lorsque les cellules neuronales sont endommagées, la microglie s'active et de nombreux médiateurs cytotoxiques et inflammatoires sont libérés. Ces facteurs affectent alors les autres neurones et astrocytes voisins (Hanisch, 2002; Kreutzberg, 1996; Souza et al., 2016). Toutefois, l'activation astrocytaire semble précéder l'activation microgliale. Dans le modèle murin *SOD1^{G85R}*, la suppression de la protéine mutée *SOD1^{G85R}* uniquement dans les astrocytes, permet de retarder l'activation microgliale et de ralentir la progression de la maladie (Wang et al., 2011). A l'inverse, une étude chez le rat montre que l'implantation d'astrocytes exprimant la protéine mutée *SOD1^{G93A}* chez un rat nTg, induit une activation microgliale et une dégénérescence des MN de la moelle épinière (Papadeas et al., 2011). Dans notre étude, l'AMB semble retarder l'activation microgliale bien que les astrocytes soient activés. Dans la neuroinflammation, la microglie de type M2 est anti-inflammatoire et associée aux processus de neuroprotection en sécrétant des facteurs neurotrophiques comme le BDNF, à l'inverse de la microglie pro-inflammatoire de type M1 qui sécrète du TNF- α et des interleukines de type IL-6 et IL-1 β (Appel, 2011; Souza et al., 2016). Des études montrent que l'AMB limite la synthèse de ces cytokines pro-inflammatoires (Jang et al., 2003). Par ailleurs, la déficience en CathZ, fortement sécrétée au niveau cérébral (Nakanishi, 2003; Wendt et al., 2007), réduit la neuroinflammation et diminue la sécrétion d'interleukines IL-1 β dans un modèle murin de sclérose en plaques (Allan et al., 2017). Nous avons vu que l'AMB réduit les niveaux de CathZ chez les souris HE. Les effets de l'AMB sur les cytokines pourraient donc passer par ses effets sur la CathZ. Afin de mieux comprendre les effets de l'AMB sur la neuroinflammation, il serait intéressant de compter les cellules microgliales et d'étudier la morphologie de la microglie chez les souris HE après traitement ainsi que d'analyser les molécules sécrétées par ces cellules. Cela permettrait d'évaluer si l'AMB est suffisant pour limiter l'activation et la prolifération microglie de type M1.

4. Conclusion

Nos données montrent que l'AMB ralentit l'apparition des symptômes moteurs d'un second modèle murin de SLA indépendant du gène *SOD1*. Une partie des effets de l'AMB semble passer par la préservation des unités motrices. Nous montrons également que l'AMB limite les altérations comportementales associées à la DFT. Cet aspect n'avait encore jamais été étudié dans la SLA-DFT et mérite d'être mieux approfondi. Afin de comprendre les mécanismes sous-tendant ces effets observés, nous avons analysé la voie lysosomale et la voie autophagique. Nos premiers résultats montrent que l'AMB stimule l'adressage des protéines vers le lysosome lorsqu'il est indépendant du M6P. En effet, la voie M6P associée à la (GlcNAc)-1-phosphotransférase semble inhibée. Néanmoins, malgré les données de la littérature qui montrent que l'AMB bloque l'autophagie, nos résultats ne permettent pas de conclure à un tel effet. Nous avons cependant observé que l'AMB participe à la clairance des agrégats cytoplasmiques (**figure 5**). Enfin, nous avons montré que l'AMB empêche l'activation microgliale, ce qui suggère un rôle de la molécule dans la modulation de la neuroinflammation qui doit être approfondi. Ainsi, nos résultats associés à ceux de la littérature montrent le potentiel thérapeutique de l'AMB pour le traitement de la SLA et permettent d'envisager un repositionnement de la molécule dans ce domaine.

5. Références

- Allan, E.R.O., Campden, R.I., Ewanchuk, B.W., Taylor, P., Balce, D.R., McKenna, N.T., Greene, C.J., Warren, A.L., Reinheckel, T., and Yates, R.M. (2017). A role for cathepsin Z in neuroinflammation provides mechanistic support for an epigenetic risk factor in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 14, 103.
- Alshikho, M.J., Zürcher, N.R., Loggia, M.L., Cernasov, P., Reynolds, B., Pijanowski, O., Chonde, D.B., Izquierdo Garcia, D., Mainero, C., Catana, C., et al. (2018). Integrated magnetic resonance imaging and [¹¹C]-PBR28 positron emission tomographic imaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 83, 1186–1197.
- Ambrosi, G., Ghezzi, C., Zangaglia, R., Levandis, G., Pacchetti, C., and Blandini, F. (2015). Ambroxol-induced rescue of defective glucocerebrosidase is associated with increased LIMP-2 and saposin C levels in GBA1 mutant Parkinson's disease cells. *Neurobiology of Disease* 82, 235–242.
- Appel, S.H. (2011). The Microglial-Motoneuron dialogue in ALS. 5.
- Arrant, A.E., Roth, J.R., Boyle, N.R., Kashyap, S.N., Hoffmann, M.Q., Murchison, C.F., Ramos, E.M., Nana, A.L., Spina, S., Grinberg, L.T., et al. (2019). Impaired β -glucocerebrosidase activity and processing in frontotemporal dementia due to progranulin mutations. *Acta Neuropathol Commun* 7, 218.
- Atkin, J.D., Scott, R.L., West, J.M., Lopes, E., Quah, A.K.J., and Cheema, S.S. (2005). Properties of slow- and fast-twitch muscle fibres in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscular Disorders* 15, 377–388.
- Bachis, A., Rabin, S.J., Fiacco, M., and Mocchetti, I. (2002). Gangliosides prevent excitotoxicity through activation of TrkB receptor. *Neurotox Res* 4, 225–234.
- Blanz, J., Zunke, F., Markmann, S., Damme, M., Bräulke, T., Saftig, P., and Schwake, M. (2015). Mannose 6-phosphate-independent Lysosomal Sorting of LIMP-2: Mannose 6-phosphate-independent Lysosomal Sorting of LIMP-2. *Traffic* 16, 1127–1136.
- Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. *Science* 312, 1389–1392.

- Bouscary, A., Quessada, C., Mosbach, A., Callizot, N., Spedding, M., Loeffler, J.-P., and Henriques, A. (2019). Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Functions and Extends Survival in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Pharmacol.* 10, 883.
- de Brouwer, G., Fick, A., Harvey, B.H., and Wolmarans, D.W. (2019). A critical inquiry into marble-burying as a preclinical screening paradigm of relevance for anxiety and obsessive–compulsive disorder: Mapping the way forward. *Cogn Affect Behav Neurosci* 19, 1–39.
- Cagnin, A., Rossor, M., Sampson, E.L., MacKinnon, T., and Banati, R.B. (2004). In vivo detection of microglial activation in frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 56, 894–897.
- Campden, R.I., and Zhang, Y. (2019). The role of lysosomal cysteine cathepsins in NLRP3 inflammasome activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 670, 32–42.
- Clayton, E.L., Mizielinska, S., Edgar, J.R., Nielsen, T.T., Marshall, S., Norona, F.E., Robbins, M., Damirji, H., Holm, I.E., Johannsen, P., et al. (2015). Frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutation is characterised by neuronal lysosomal storage pathology. *Acta Neuropathol* 130, 511–523.
- Clayton, E.L., Mancuso, R., Nielsen, T.T., Mizielinska, S., Holmes, H., Powell, N., Norona, F., Overgaard Larsen, J., Milioto, C., Wilson, K.M., et al. (2017). Early microgliosis precedes neuronal loss and behavioural impairment in mice with a frontotemporal dementia-causing CHMP2B mutation. *Hum. Mol. Genet.* ddx003.
- Clayton, E.L., Milioto, C., Muralidharan, B., Norona, F.E., Edgar, J.R., Soriano, A., Jafar-nejad, P., Rigo, F., Collinge, J., and Isaacs, A.M. (2018). Frontotemporal dementia causative CHMP2B impairs neuronal endolysosomal traffic-rescue by TMEM106B knockdown. *Brain* 141, 3428–3442.
- Cole, R.N., Ghazanfari, N., Ngo, S.T., Gervásio, O.L., Reddel, S.W., and Phillips, W.D. (2010). Patient autoantibodies deplete postsynaptic muscle-specific kinase leading to disassembly of the ACh receptor scaffold and myasthenia gravis in mice: Actions of MuSK autoantibodies in experimental myasthenia gravis. *The Journal of Physiology* 588, 3217–3229.
- Corcia, P., Tauber, C., Vercoillie, J., Arlicot, N., Prunier, C., Praline, J., Nicolas, G., Venel, Y., Hommet, C., Baulieu, J.-L., et al. (2012). Molecular Imaging of Microglial Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* 7, e52941.
- Coutinho, M.F., Prata, M.J., and Alves, S. (2012). A shortcut to the lysosome: The mannose-6-phosphate-independent pathway. *Molecular Genetics and Metabolism* 107, 257–266.
- Deforges, S., Branchu, J., Biondi, O., Grondard, C., Pariset, C., Lécolle, S., Lopes, P., Vidal, P.-P., Chanoine, C., and Charbonnier, F. (2009). Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Motoneuron activation and neuroprotection in ALS mice. *The Journal of Physiology* 587, 3561–3572.
- Delezie, J., Weihrauch, M., Maier, G., Tejero, R., Ham, D.J., Gill, J.F., Karrer-Cardel, B., Rüegg, M.A., Tabares, L., and Handschin, C. (2019). BDNF is a mediator of glycolytic fiber-type specification in mouse skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 16111–16120.
- Derave, W., Van Den Bosch, L., Lemmens, G., Eijnde, B.O., Robberecht, W., and Hespel, P. (2003). Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. *Neurobiology of Disease* 13, 264–272.
- Dixit, P.V., Sahu, R., and Mishra, D.K. (2020). Marble-burying behavior test as a murine model of compulsive-like behavior. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 102, 106676.
- Dodge, J.C. (2017). Lipid Involvement in Neurodegenerative Diseases of the Motor System: Insights from Lysosomal Storage Diseases. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 356.
- Dodge, J.C., Treleaven, C.M., Pacheco, J., Cooper, S., Bao, C., Abraham, M., Cromwell, M., Sardi, S.P., Chuang, W.-L., Sidman, R.L., et al. (2015). Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 8100–8105.
- Duclert, A., and Changeux, J.P. (1995). Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiological Reviews* 75, 339–368.
- Fois, G., Hobi, N., Felder, E., Ziegler, A., Miklavc, P., Walther, P., Radermacher, P., Haller, T., and Dietl, P. (2015). A new role for an old drug: Ambroxol triggers lysosomal exocytosis via pH-dependent Ca²⁺ release from acidic Ca²⁺ stores. *Cell Calcium* 58, 628–637.
- Fukumoto, S., Mutoh, T., Hasegawa, T., Miyazaki, H., Okada, M., Goto, G., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K. (2000). GD3 Synthase Gene Expression in PC12 Cells Results in the Continuous Activation of TrkA and ERK1/2 and Enhanced Proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 5832–5838.
- Furukawa, K., Ohmi, Y., Ohkawa, Y., Tajima, O., and Furukawa, K. (2014). Glycosphingolipids in the regulation of the nervous system. *Adv Neurobiol* 9, 307–320.

- Gascon, E., Lynch, K., Ruan, H., Almeida, S., Verheyden, J.M., Seeley, W.W., Dickson, D.W., Petrucelli, L., Sun, D., Jiao, J., et al. (2014). Alterations in microRNA-124 and AMPA receptors contribute to social behavioral deficits in frontotemporal dementia. *Nat Med* 20, 1444–1451.
- Ghazi-Noori, S., Froud, K.E., Mizielińska, S., Powell, C., Smidak, M., Fernandez de Marco, M., O'Malley, C., Farmer, M., Parkinson, N., Fisher, E.M.C., et al. (2012). Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain* 135, 819–832.
- Gordon, T., Tyreman, N., Li, S., Putman, C.T., and Hegedus, J. (2010). Functional over-load saves motor units in the SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 37, 412–422.
- Hafner, A., Glavan, G., Obermajer, N., Živin, M., Schliebs, R., and Kos, J. (2013). Neuroprotective role of γ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging Cell* 12, 604–614.
- Hanisch, U.-K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140–155.
- Harvald, E.B., Olsen, A.S.B., and Færgeman, N.J. (2015). Autophagy in the light of sphingolipid metabolism. *Apoptosis* 20, 658–670.
- Hegedus, J., Putman, C.T., and Gordon, T. (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 28, 154–164.
- Hegedus, J., Putman, C.T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Motor units in mouse ALS. *The Journal of Physiology* 586, 3337–3351.
- Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D.A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., D'Ambra, E., Huebecker, M., Hussain, G., Boursier-Neyret, C., Echaniz-Laguna, A., et al. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. *Hum. Mol. Genet.* 24, 7390–7405.
- Henriques, A., Huebecker, M., Blasco, H., Keime, C., Andres, C.R., Corcia, P., Priestman, D.A., Platt, F.M., Spedding, M., and Loeffler, J.-P. (2017). Inhibition of β -Glucocerebrosidase Activity Preserves Motor Unit Integrity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Rep* 7, 5235.
- Henriques, A., Croixmarie, V., Bouscary, A., Mosbach, A., Keime, C., Boursier-Neyret, C., Walter, B., Spedding, M., and Loeffler, J.-P. (2018). Sphingolipid Metabolism Is Dysregulated at Transcriptomic and Metabolic Levels in the Spinal Cord of an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 433.
- Hiraiwa, M., Martin, B.M., Kishimoto, Y., Conner, G.E., Tsuji, S., and O'Brien, J.S. (1997). Lysosomal Proteolysis of Prosaposin, the Precursor of Saposins (Sphingolipid Activator Proteins): Its Mechanism and Inhibition by Ganglioside. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 341, 17–24.
- Ivankovic, D., Chau, K.-Y., Schapira, A.H.V., and Gegg, M.E. (2016). Mitochondrial and lysosomal biogenesis are activated following PINK1/parkin-mediated mitophagy. *J. Neurochem.* 136, 388–402.
- Jang, Y.Y., Song, J.H., Shin, Y.K., Han, E.S., and Lee, C.S. (2003). Depressant Effects of Ambroxol and Erdosteine on Cytokine Synthesis, Granule Enzyme Release, and Free Radical Production in Rat Alveolar Macrophages Activated by Lipopolysaccharide. *Pharmacol Toxicol* 92, 173–179.
- Jiang, W., Yi, M., Maegawa, G.H.B., and Zhang, H. (2020). Ambroxol improves skeletal and hematological manifestations on a child with Gaucher disease. *J Hum Genet* 65, 345–349.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences* 19, 312–318.
- Lei, Y., Iwashita, M., Choi, J., Aikawa, M., and Aikawa, E. (2015). N-acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase Suppresses Lysosomal Hydrolases in Dysfunctional Osteoclasts: A Potential Mechanism for Vascular Calcification. *JCDD* 2, 31–47.
- Ling, S.-C., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2013). Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* 79, 416–438.
- Luan, Z., Li, L., Higaki, K., Nanba, E., Suzuki, Y., and Ohno, K. (2013). The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice. *Brain and Development* 35, 317–322.
- Maegawa, G.H.B., Tropak, M.B., Buttner, J.D., Rigat, B.A., Fuller, M., Pandit, D., Tang, L., Kornhaber, G.J., Hamuro, Y., Clarke, J.T.R., et al. (2009). Identification and Characterization of Ambroxol as an Enzyme Enhancement Agent for Gaucher Disease. *J. Biol. Chem.* 284, 23502–23516.
- Magalhaes, J., Gegg, M.E., Migdalska-Richards, A., and Schapira, A.H. (2018). Effects of ambroxol on the autophagy-lysosome pathway and mitochondria in primary cortical neurons. *Sci Rep* 8, 1385.
- Mazzulli, J.R., Zunke, F., Tsunemi, T., Toker, N.J., Jeon, S., Burbulla, L.F., Patnaik, S., Sidransky, E., Marugan, J.J., Sue, C.M., et al. (2016). Activation of β -Glucocerebrosidase Reduces Pathological α -Synuclein and Restores Lysosomal Function in Parkinson's Patient Midbrain Neurons. *Journal of Neuroscience* 36, 7693–7706.

- McNeill, A., Magalhaes, J., Shen, C., Chau, K.-Y., Hughes, D., Mehta, A., Foltynie, T., Cooper, J.M., Abramov, A.Y., Gegg, M., et al. (2014). Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain* 137, 1481–1495.
- Nakanishi, H. (2003). Neuronal and microglial cathepsins in aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews* 2, 367–381.
- Nguyen, H.P., Van Broeckhoven, C., and van der Zee, J. (2018). ALS Genes in the Genomic Era and their Implications for FTD. *Trends in Genetics* 34, 404–423.
- Nowak, D., Pierscinski, G., and Drzewoski, J. (1995). Ambroxol inhibits doxorubicin-induced lipid peroxidation in heart of mice. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 659–663.
- Obermajer, N., Doljak, B., Jamnik, P., Fonović, U.P., and Kos, J. (2009). Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1685–1696.
- Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S.T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J., et al. (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol Med* 7, 526–546.
- Pinheiro-Dardis, C.M., Erbereli, B.T., Gigo-Benato, D., Castro, P.A.T.S., and Russo, T.L. (2017). Electrical stimulation delays reinnervation in denervated rat muscle: ES and Reinnervation. *Muscle Nerve* 56, E108–E118.
- Pišlar, A.H., Zidar, N., Kikelj, D., and Kos, J. (2014). Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology* 82, 121–131.
- Pitto, M., Mutoh, T., Kuriyama, M., Ferraretto, A., Palestini, P., and Masserini, M. (1998). Influence of endogenous GM1 ganglioside on TrkB activity, in cultured neurons. *FEBS Letters* 4.
- Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T., and Saftig, P. (2007). LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase. *Cell* 131, 770–783.
- Roselli, F., and Caroni, P. (2014). Modeling Neuronal Vulnerability in ALS. *Neuron* 83, 758–760.
- Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Menger, Y., Boutillier, A.-L., and Loeffler, J.-P. (2007). Sodium Valproate Exerts Neuroprotective Effects In Vivo through CREB-Binding Protein-Dependent Mechanisms But Does Not Improve Survival in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Journal of Neuroscience* 27, 5535–5545.
- Rusten, T.E., and Simonsen, A. (2008). ESCRT functions in autophagy and associated disease. *Cell Cycle* 7, 1166–1172.
- Sanchez-Martinez, A., Beavan, M., Gegg, M.E., Chau, K.-Y., Whitworth, A.J., and Schapira, A.H.V. (2016). Parkinson disease-linked GBA mutation effects reversed by molecular chaperones in human cell and fly models. *Sci Rep* 6, 31380.
- Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2, 791–805.
- Scaricamazza, S., Salvatori, I., Giacobuzzo, G., Loeffler, J.P., Renè, F., Rosina, M., Quessada, C., Proietti, D., Heil, C., Rossi, S., et al. (2020). Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-SOD1G93A Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target. *IScience* 23, 101087.
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., et al. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB: Self-regulation of the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal* 31, 1095–1108.
- Sharp, P.S., Dick, J.R.T., and 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.
- Siebert, M., Sidransky, E., and Westbroek, W. (2014). Glucocerebrosidase is shaking up the synucleinopathies. *Brain* 137, 1304–1322.
- Skibinski, G., Parkinson, N.J., Brown, J.M., Chakrabarti, L., Lloyd, S.L., Hummerich, H., Nielsen, J.E., Hodges, J.R., Spillantini, M.G., Thusgaard, T., et al. (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 37, 806–808.
- Souza, P.V.S. de, Pinto, W.B.V. de R., Rezende Filho, F.M., and Oliveira, A.S.B. (2016). Far beyond the motor neuron: the role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 74, 849–854.
- Stichel, C.C., and Luebbert, H. (2007). Inflammatory processes in the aging mouse brain: Participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiology of Aging* 28, 1507–1521.
- Tamargo, R.J., Velayati, A., Goldin, E., and Sidransky, E. (2012). The role of saposin C in Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 106, 257–263.

- Urwin, H., Authier, A., Nielsen, J.E., Metcalf, D., Powell, C., Froud, K., Malcolm, D.S., Holm, I., Johannsen, P., Brown, J., et al. (2010). Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Human Molecular Genetics* 19, 2228–2238.
- Valdez, C., Ysselstein, D., Young, T.J., Zheng, J., and Krainc, D. (2020). Progranulin mutations result in impaired processing of prosaposin and reduced glucocerebrosidase activity. *Human Molecular Genetics* 29, 716–726.
- Vernay, A., Therreau, L., Blot, B., Risson, V., Dirrig-Grosch, S., Waegaert, R., Lequeu, T., Sellal, F., Schaeffer, L., Sadoul, R., et al. (2016). A transgenic mouse expressing CHMP2B intron5 mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum. Mol. Genet.* 25, 3341–3360.
- Waegaert, R., Dirrig-Grosch, S., Parisot, F., Keime, C., Henriques, A., Loeffler, J.-P., and René, F. (2020). Longitudinal transcriptomic analysis of altered pathways in a CHMP2Bintron5-based model of ALS-FTD. *Neurobiology of Disease* 136, 104710.
- Wang, L., Gutmann, D.H., and Roos, R.P. (2011). Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Human Molecular Genetics* 20, 286–293.
- Wendt, W., Zhu, X.-R., Lübbert, H., and Stichel, C.C. (2007). Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Experimental Neurology* 204, 525–540.
- Wiktorska, J.A., Lewinski, A., Stuss, M., Nowak, D., Pietras, T., and Sewerynek, E. (2010). Effects of certain antioxidants on lipid peroxidation process in lung homogenates of L thyroxine-receiving rats. *Neuro Endocrinol. Lett.* 31, 137–146.
- Wu, G., Xie, X., Lu, Z.-H., and Ledeen, R.W. (2009). Sodium-calcium exchanger complexed with GM1 ganglioside in nuclear membrane transfers calcium from nucleoplasm to endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 10829–10834.
- Yang, S., Gegg, M., Chau, D., and Schapira, A. (2020). Glucocerebrosidase activity, cathepsin D and monomeric α -synuclein interactions in a stem cell derived neuronal model of a PD associated GBA1 mutation. *Neurobiology of Disease* 134, 104620.
- Yang, S.-Y., Beavan, M., Chau, K.-Y., Taanman, J.-W., and Schapira, A.H.V. (2017). A Human Neural Crest Stem Cell-Derived Dopaminergic Neuronal Model Recapitulates Biochemical Abnormalities in GBA1 Mutation Carriers. *Stem Cell Reports* 8, 728–742.

6. Figures et légendes

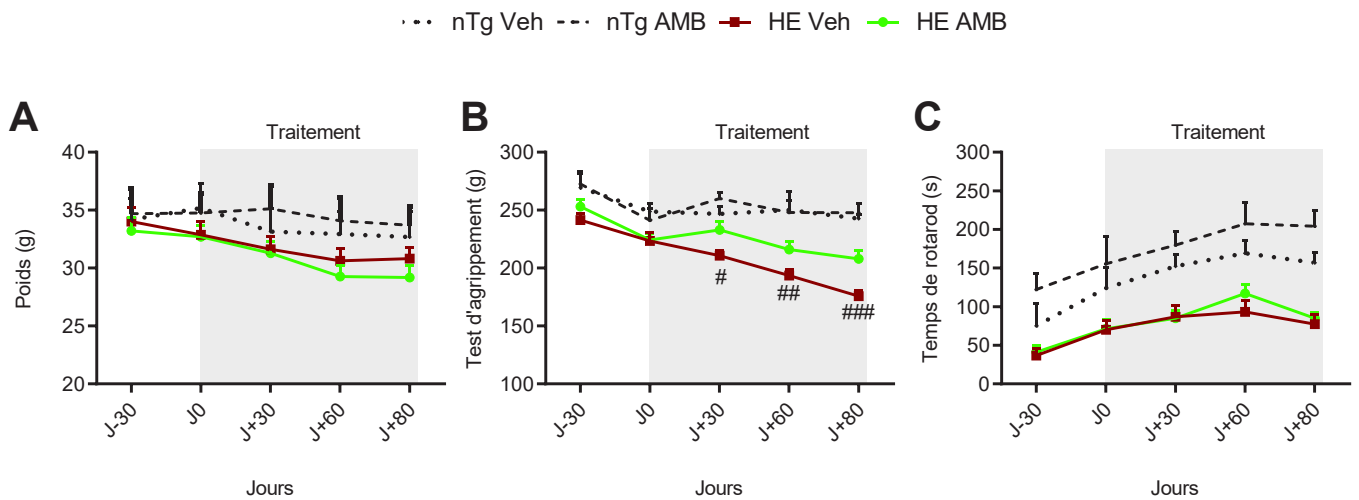


Figure 1 : L'AMB préserve la force musculaire des souris transgéniques *CHMP2B^{intron5}*.

(A) Evolution de la masse corporelle des souris *CHMP2B^{intron5}* (HE) et des souris non-transgéniques (nTg) après un traitement à l'ambroxol (AMB) ou à l'eau (« Veh » pour véhicule). Il n'existe aucune différence significative entre les souris quel que soit leur génotype. (B) Evolution de la force musculaire des souris au cours du temps. L'AMB améliore la force musculaire des souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh. Il n'existe aucune différence significative entre les souris nTg quel que soit le traitement. (C) Test du rotarod permettant l'évaluation de la coordination motrice et la fatigabilité au cours du temps. L'AMB n'a pas d'effets sur les performances des souris. Les valeurs de cette figure sont exprimées en moyenne \pm ESM ; n = 5-7/groupe pour les souris nTg et n=20-22/groupe pour les souris HE.

Statistiques : Anova à deux facteurs ;

p-value HE Veh vs HE AMB : #p <0,05 ; ##p <0,01 ; ###p <0,001.

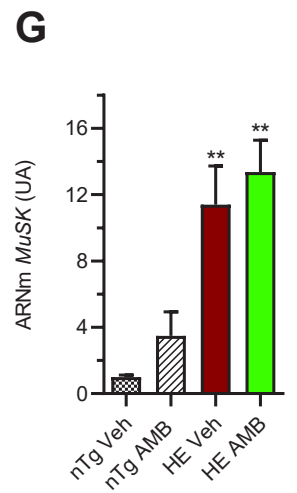
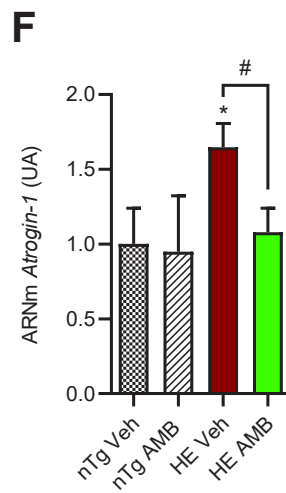
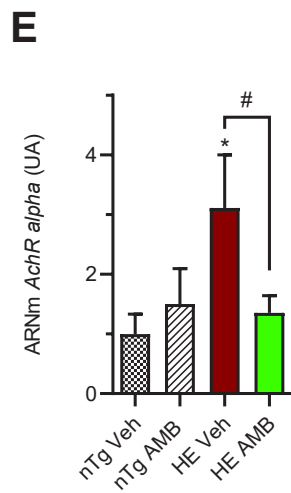
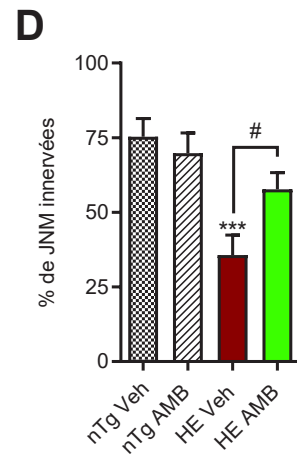
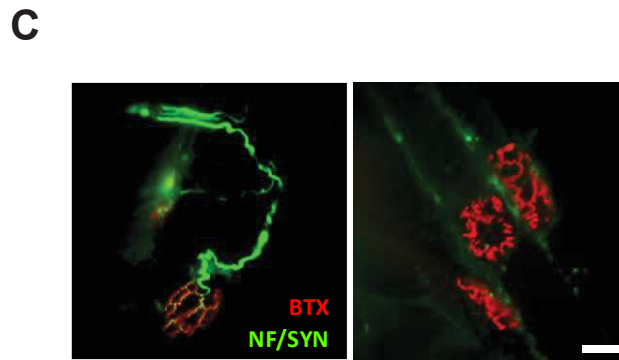
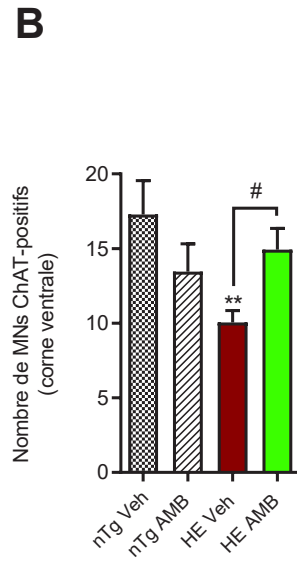
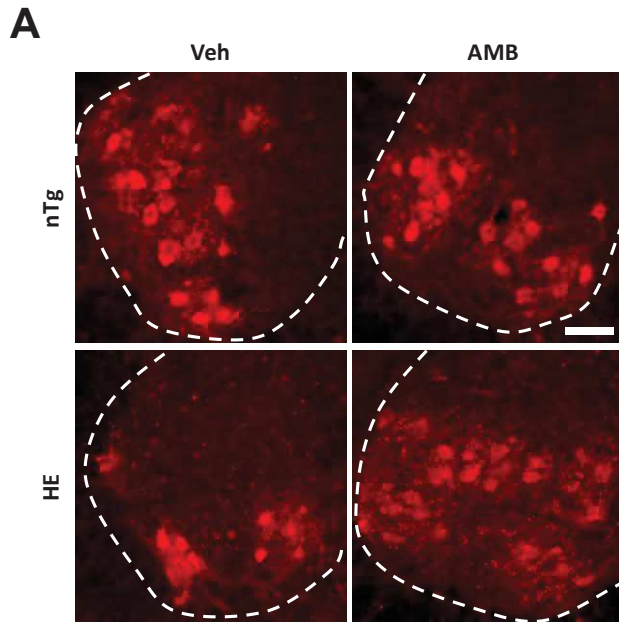


Figure 2 : L'AMB préserve les MN de la neurodégénérescence et maintient l'innervation musculaire des souris *CHMP2B^{intron5}*.

(A) Images représentatives de la corne ventrale de la moelle épinière lombaire située au niveau L1-L3 après immunohistochimie avec l'anticorps anti-choline acétyl transférase (ChAT ; en rouge) qui marque les motoneurons (MN). Les cornes ventrales sont délimitées par des lignes en pointillées. Barre d'échelle = 100 μm . (B) Quantification des cellules positives pour le marquage ChAT et dont la superficie du soma est supérieure à 400 μm^2 , au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière. L'AMB préserve le nombre de MN des souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh ; n=4/groupe pour les souris non-transgéniques (nTg) et n=6-7/groupe pour les souris HE. (C) Images représentatives de JNM innervées (image de gauche) ou dénervées (image de droite) (α -bungarotoxine (BTX) : en rouge ; neurofilament (NF) et synaptophysine (SYN) : en vert). Barre d'échelle = 50 μm . (D) Intégrité des JNM du muscle tibial antérieur (n=4/groupe pour les souris nTg et n=7/groupe pour les souris HE). L'AMB préserve les JNM des souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh. (E-G) Expression relative des niveaux d'ARNm des marqueurs de dénervation de la *sous-unité α du récepteur nicotinique à l'acétylcholine* (*AChR α*) (E), *Atrogine-1* (F) et *MuSK* (G) dans le muscle gastrocnémien des souris. L'AMB réduit l'expression de *AChR α* et de *Atrogine-1* chez les souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh mais n'a pas d'effet sur l'expression de *MuSK* ; n=4-6/groupe pour les souris nTg et n=10-13/groupe pour les souris HE. Les valeurs de cette figure sont exprimées en moyenne \pm ESM.

Statistiques : Anova à un facteur ;

p-value HE Veh vs HE AMB : #p <0,05 ;

* p-value nTg Veh vs HE Veh ou nTg AMB vs HE AMB : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001.

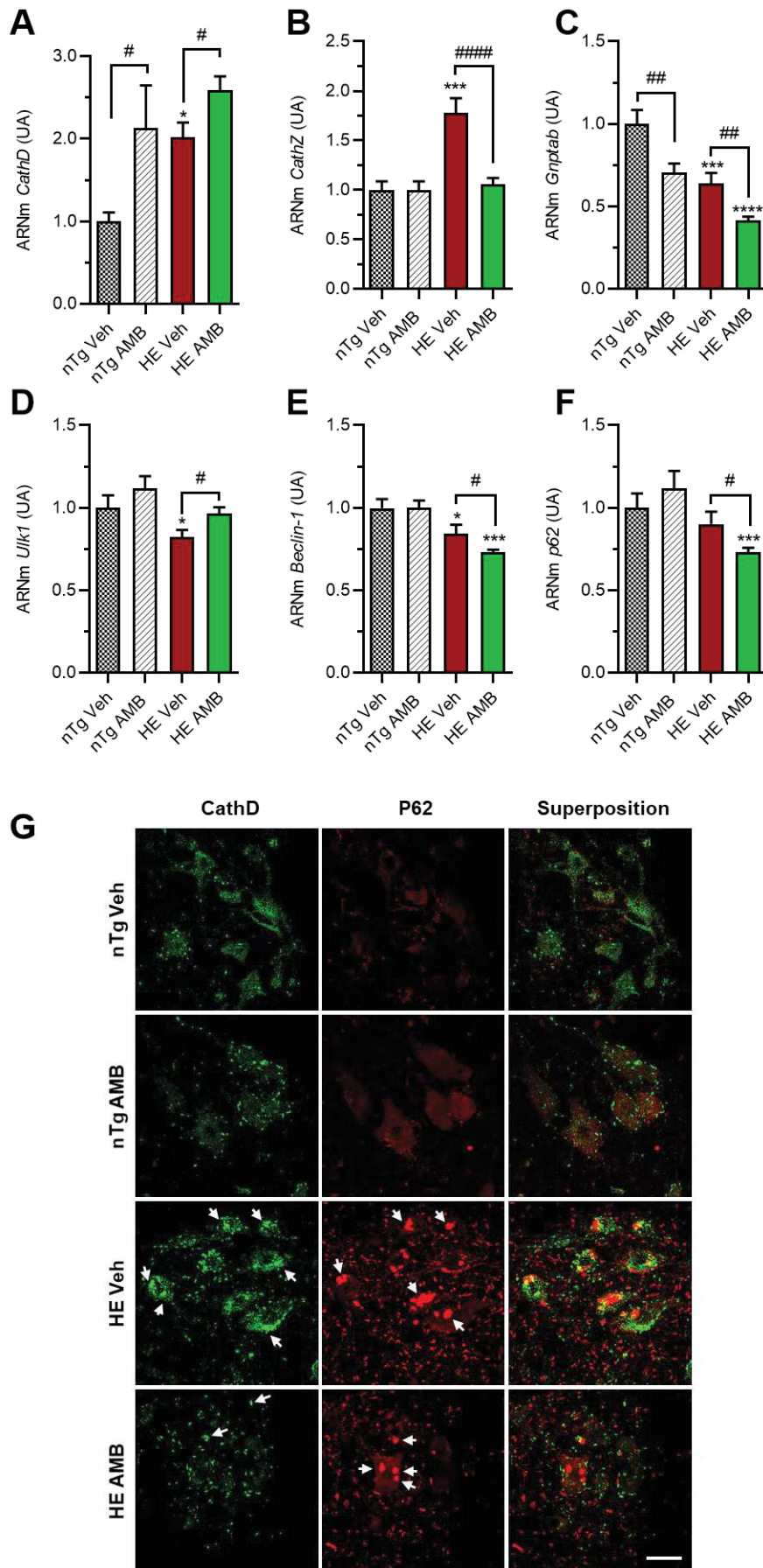


Figure 4 : L'AMB module l'expression des gènes de la voie lysosomale et autophagique.

Niveaux d'ARNm des marqueurs lysosomaux *CathD* (A), *CathZ* (B), *Gnptab* (C) et des marqueurs autophagiques *Ulk-1* (D), *Beclin-1* (E) et *P62* (F) dans la moelle épinière des souris. L'AMB augmente l'expression de la *CathD* chez les souris nTg AMB par rapport aux souris nTg Veh et chez les souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh. L'AMB ne modifie pas l'expression de la *CathZ* chez les souris nTg mais la réduit chez les souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh. L'AMB réduit l'expression de *Gnptab* chez les souris nTg AMB par rapport aux souris nTg Veh et chez les souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh. L'AMB augmente l'expression de *Ulk-1*, réduit l'expression de *Beclin-1* et de *P62* chez les souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh. (G) Images représentatives de la corne ventrale de la moelle épinière lombaire des souris HE et nTg après double immunohistochimie avec l'anticorps CathD (en vert) et P62 (en rouge). Barre d'échelle = 20 µm. Les flèches indiquent les agrégats dans les MN des souris HE. Les immunoréactivités CathD et P62 sont plus élevées chez les souris HE Veh par rapport aux souris nTg Veh. Le traitement à l'AMB diminue fortement l'immunoréactivité CathD et les agrégats.

Les valeurs de cette figure sont exprimées en moyenne ± ESM ; n= 5/groupe pour les souris nTg et n=9-12/groupe pour les souris HE.

Statistiques : Anova à un facteur ;

p-value HE Veh vs HE AMB ou nTg Veh vs nTg AMB : #p <0,05 ; ##p <0,01 ; ####p <0,0001

* p-value nTg Veh vs HE Veh ou nTg AMB vs HE AMB : *p <0,05 ; **p <0,01 ; ***p <0,001

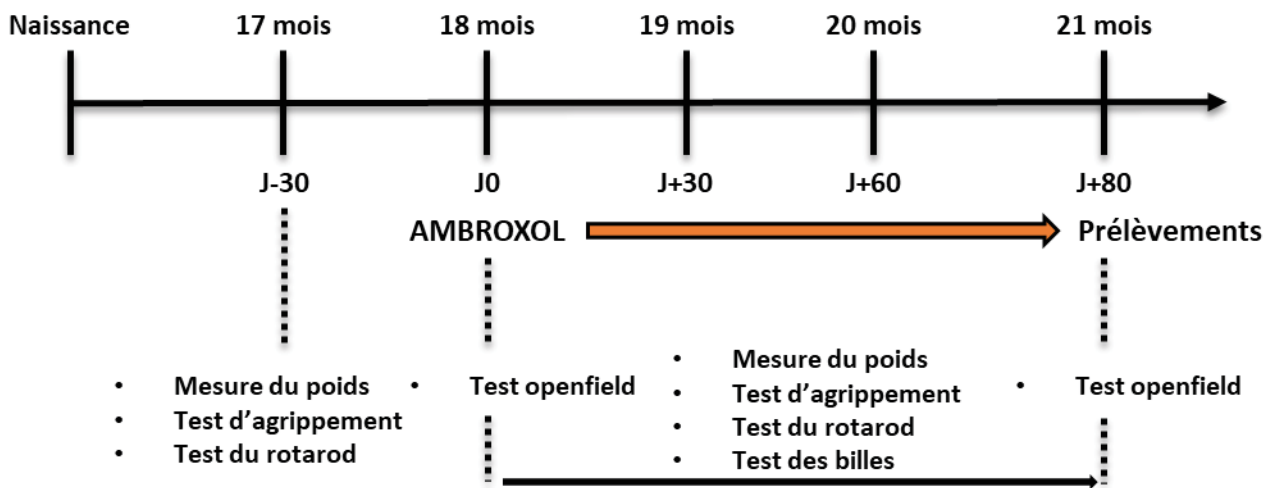


Figure supplémentaire 1 : Procédure expérimentale.

Les animaux ont été surveillés quotidiennement et pesés mensuellement. A 17 mois, un âge symptomatique, les souris ont été soumises à des tests d'évaluation de la force musculaire et de la coordination motrice tels que le test d'agrippement et du rotarod. Cette âge a été défini comme étant « J-30 », ce qui signifie que les tests ont été réalisés 30 jours avant le traitement à l'AMB. A 18 mois, les tests précédents ont été renouvelés et deux tests cognitifs ont été ajoutés : le test d'enfouissement des billes et le test en openfield. Après ces tests, le traitement à l'AMB a été donné aux souris et défini comme « J0 ». Le test d'agrippement, le test du rotarod et le test des billes ont été réalisés 30 jours (J+30), 60 jours (J+60) et 80 jours (J+80) après le traitement à l'AMB. Le test en openfield a été renouvelé à J+80. A la suite des tests comportementaux de J+80, les souris ont été sacrifiées et leur tissu ont été prélevés.

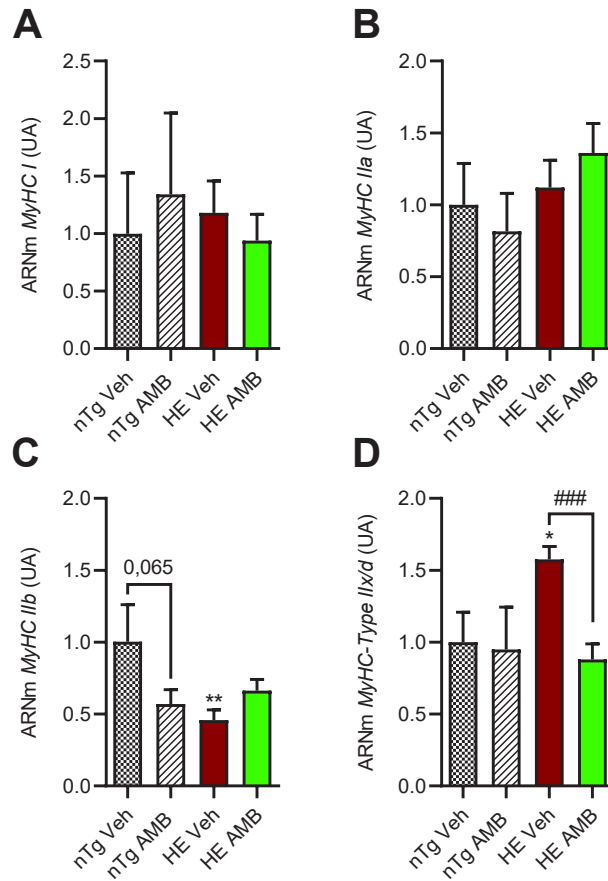


Figure supplémentaire 2 : Niveaux d'ARNm des isoformes des chaînes lourdes de myosines (MyHC).

Niveaux d'ARNm du marqueur oxydant *MyHC I* (A), des marqueurs oxydant-glycolytique *MyHC IIa* (B), du marqueur glycolytique *MyHC IIb* (C) et *MyHC IIx/d* (D) dans les muscles gastrocnémiens des souris. L'AMB réduit l'expression de *MyHC IIx/d* chez les souris HE par rapport aux souris HE Veh. Les valeurs de cette figure sont exprimées en moyenne \pm ESM ; n= 5/groupe pour les souris nTg et n=9-12/groupe pour les souris HE.

Statistiques : Anova à un facteur ;

p-value HE Veh vs HE AMB : ### p <0,001 ;

* p-value nTg Veh vs HE Veh ou nTg AMB vs HE AMB : *p <0,05.

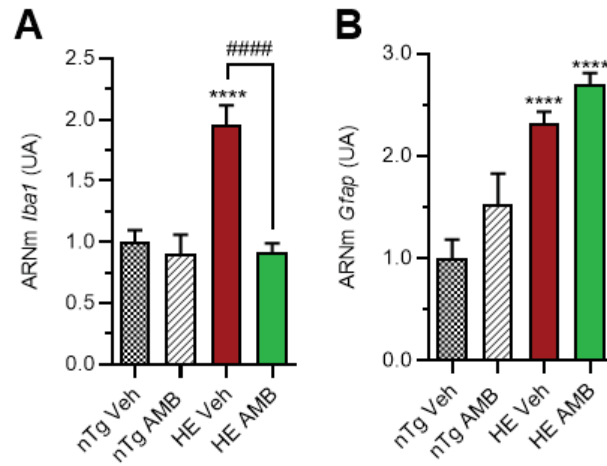


Figure supplémentaire 3 : L'AMB réduit l'expression du gène microgliale *Iba1* dans la moelle épinière des souris *CHMP2B*^{intron5}.

Niveaux d'ARNm du marqueur microgliale *Iba1* (A) et du marqueur astrocytaire *Gfap* (B) dans la moelle épinière des souris. L'AMB réduit l'expression de *Iba1* chez les souris HE AMB par rapport aux souris HE Veh mais ne réduit pas l'expression de *Gfap*. Les valeurs de cette figure sont exprimées en moyenne \pm ESM ; n= 5/groupe pour les souris nTg et n=9-12/groupe pour les souris HE.

Statistiques : Anova à un facteur ;

p-value HE Veh vs HE AMB : #####p <0,0001.

* p-value nTg Veh vs HE Veh ou nTg AMB vs HE AMB : ****p <0,0001.

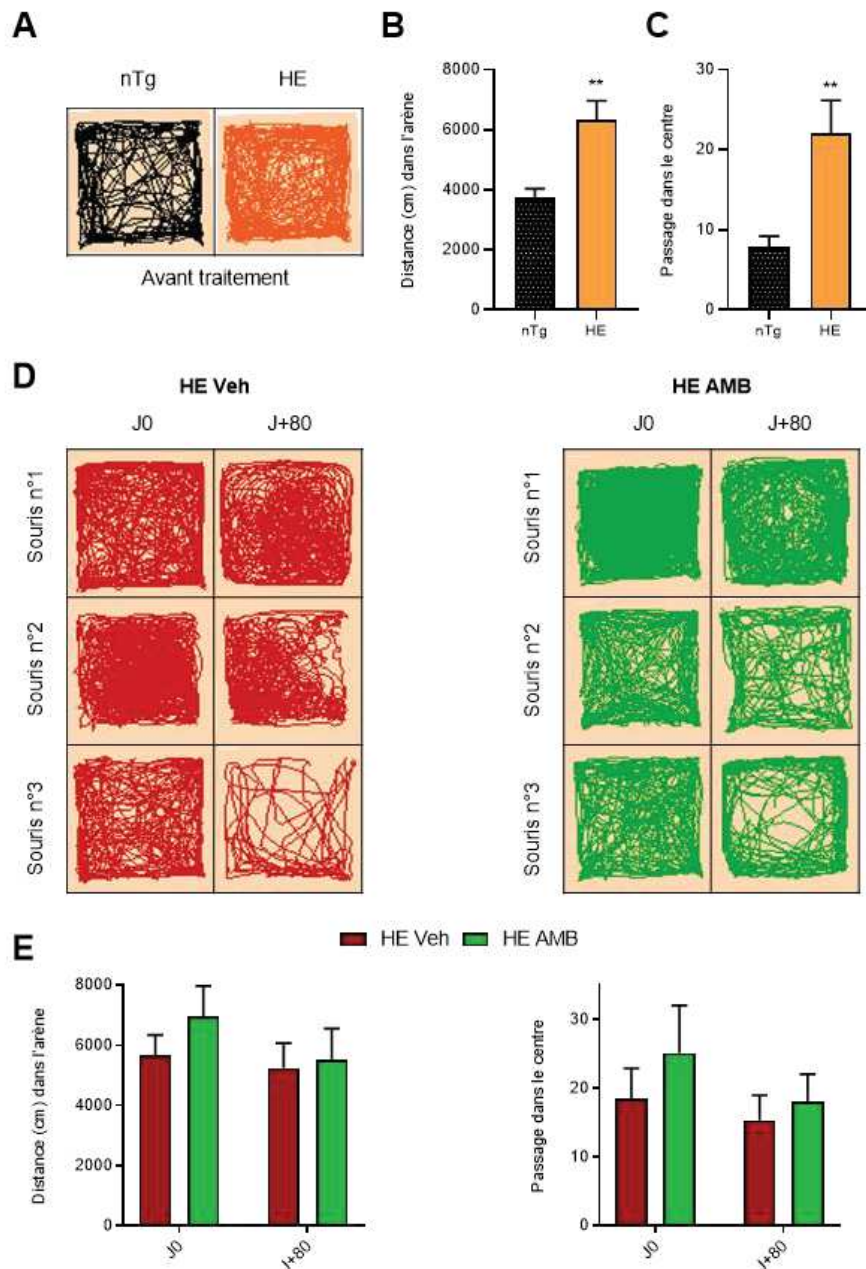


Figure supplémentaire 4 : L'AMB n'a pas d'effet sur le comportement exploratoire des souris transgéniques *CHMP2B^{intron5}* (HE).

(A) Tracés représentatifs des souris non-transgéniques (nTg) et HE enregistrés après 15 minutes dans l'arène avant traitement (J0). Les souris HE montrent des tracés de déplacement différents des souris nTg. (B) Quantification de la distance totale parcourue dans l'arène et du nombre de passage dans le centre de l'arène (C) de l'arène après 15 minutes de test à J0. La distance et la fréquence sont significativement plus élevées chez les souris HE par rapport aux souris nTg. (D) Tracés représentatifs des souris HE Veh et HE AMB à J0 et J+80. Les tracés montrent une grande variabilité interindividuelle au sein d'un même groupe. (E) Quantification de la distance totale parcourue dans l'arène et du nombre de passage dans le centre de l'arène après 15 minutes de test à J0 et J+80. Aucune différence significative n'est observée entre les traitements. Les valeurs de cette figure sont exprimées en moyenne \pm ESM ; n = 4-7/groupe pour les souris nTg et n=20-22/groupe pour les souris HE.

Statistiques : test t de student ;

* p-value nTg vs HE ou nTg AMB vs HE AMB : **p <0,01

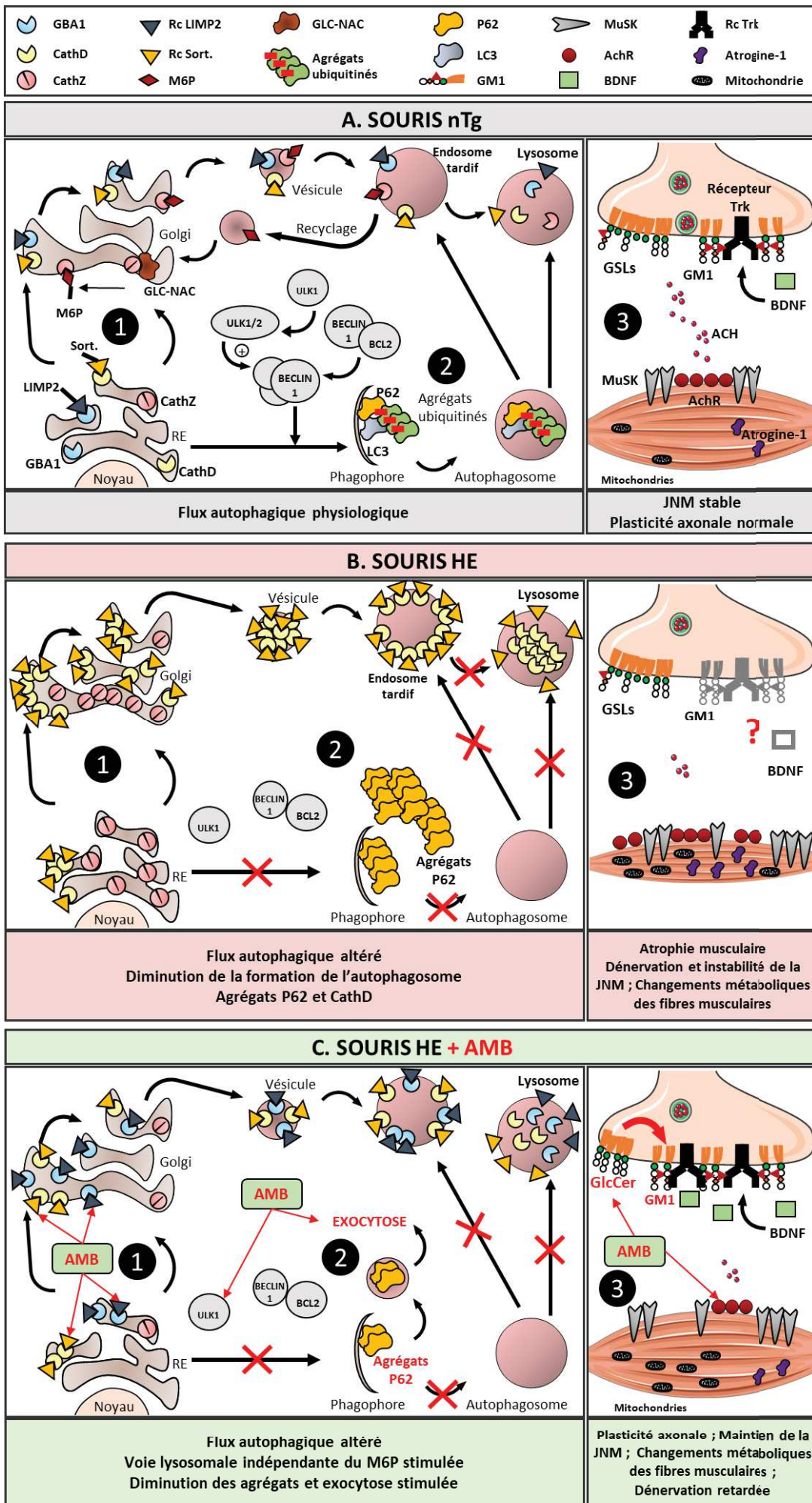


Figure 5 : Effets hypothétiques de l'AMB sur les désordres lysosomaux et autophagiques ainsi que sur le muscle des souris *CHMP2B^{intron5}*.

A. Dans des conditions physiologiques, le transport des protéines lysosomales débute dans le réticulum endoplasmique (RE) (1). GBA1 et CathD sont respectivement transportées par voie vésiculaire par les récepteurs LIMP-2 et Sortilin (Sort.) jusqu'à l'appareil de Golgi, puis par voie vésiculaire jusqu'au lysosome où elles effectueront leur fonction de dégradation. CathZ est transportée par voie vésiculaire du RE vers l'appareil de Golgi où un récepteur Mannose-6-phosphate (M6P) est ajouté par l'enzyme (GlcNAc)-1-phosphotransférase (GLC-NAC). CathZ est ensuite transporté jusqu'au lysosome et le récepteur M6P est recyclé vers l'appareil de Golgi. Lorsque l'autophagie se met en place (2) ULK1 rejoint le complexe UKL1/2 qui activera BECLIN-1 après avoir été libéré par BCL2. Le phagophore se forme et P62 lié aux protéines à dégrader se lie à LC3-II. Une fois l'autophagosome créée, il fusionne directement au lysosome ou à l'endosome tardif qui fusionnera par la suite au lysosome. Le contenu lysosomal est dégradé par les hydrolases acides (telles que GBA1, CathD, CathZ). En parallèle, la JNM (3) est fonctionnelle et stable.

B. Chez les souris *CHMP2B^{intron5}* (HE), on retrouve des accumulations de CathD (1) et la voie M6P est diminuée. On retrouve aussi des accumulations de P62 (2). La fusion de l'endosome tardif ou de l'autophagosome avec le lysosome est altérée. L'expression des protéines impliquées dans l'autophagie telles que BECLIN-1 et ULK1, est fortement diminuée, traduisant une autophagie altérée. Les protéines agrégées accumulées dans le cytoplasme ne peuvent donc pas être dégradées. Au niveau du muscle (3), la JNM est fortement impactée par le mutant *CHMP2^{intron5}*. On retrouve une forte dénervation et une instabilité de la JNM qui se traduit par une expression des marqueurs de dénervation *AchRa*, *MuSK* et *Atrogine-1* fortement augmentée. Le métabolisme musculaire semble également impacté et les fibres musculaires évoluent d'un métabolisme glycolytique vers un métabolisme oxydatif.

C. Après un traitement à l'AMB, l'expression de CathD est augmentée chez les souris *CHMP2B^{intron5}* (1). Selon la littérature, la synthèse et le transport de GBA1 sont également stimulés. A l'inverse l'expression de *GLC-NAC* est diminuée. L'AMB semble donc stimuler les voies lysosomales indépendantes du récepteur M6P. On observe également une augmentation de l'expression de *Ulk-1* et une expression de *Beclin-1* diminuée alors que la clairance des agrégats cytoplasmiques semble fonctionnelle : les agrégats P62 et CathD sont diminués. Il est possible que BCL2 empêche la libération de BECLIN-1. L'autophagie reste donc bloquée, même en présence d'AMB. Cependant, l'AMB diminue les agrégats cytoplasmiques en stimulant l'exocytose (2). Au niveau de la JNM (3), l'AMB augmente l'accumulation de GlcCer en inhibant son enzyme de dégradation (GBA2). Le GlcCer est transformé en GM1 qui va potentialiser les récepteurs TrK et augmenter la plasticité axonale. La dénervation est retardée et la JNM stable.

Gène	5' – 3' (Forward)	3' – 5' (Reverse)
18S	TCTGATAAATGCACGCATCC	GCCATGCATGTCTAAGTACGC
AchR α	CCACAGACTCAGGGGAGAAG	AACGGTGGTGTGTGTTGATG
Atrogin-1	AGTGAGGACCGGCTACTGTG	GATCAAACGCTTGCGAATCT
Beclin-1	GCCTCTGAAACTGGACACGA	TAGCCTCTTCTCCTGGGTC
CathD	CAACGTGCTTCCGGTCTTTG	CTCATTGCCACCTCCAACCT
CathZ	GACCAGGCCGTTATCAACCA	TTCGCCCCATGAATTTCCGGA
Gfap	AGAAAACCGCATCACCATTC	TCACATCACCCACGTCCTTGT
Gnptab	AAGATTGGCCAGCCTACAC	TTTCTGGGGGAACGATCAGC
H2AC	CAACGACGAGGAGCTCAACAAG	GAAGTTTCCGAGATTCTGTTGC
H2AX	TCCTGCCAACATCCAGG	TCAGTACTCTGAGAGGCCTGC
H1H2BC	AACAAGCGCTCGACCATCA	GAATTCGCTACGGAGGCTTACT
Iba1	GAGCCAAAGCAGGGATTTGC	AATTGCTTGTGATCCCCTCCA
MuSK2	TTCAGCGGGACTGAGAAACT	TGTCTTCCACGCTCAGAATG
MyHC I	GCATCCCTAAAGGCAGGCTC	ACTCCGGAGGTAAGGAGCA
MyHC IIa	CGAAGCGAGGCACAAAATGT	TTGCTTGCAAAGGAACCTGGG
MyHC IIb	ACAGGACAGTGACAAAGAACG	GGTGAAGAGCCGAGAGGTTTC
MyHC II x/d	CAAGAGCCGGGACATTGGT	TGTTGCAAAGGCTCCAGGTC
P62	TCCAGCGATGACCTATGCAC	TCTCAATCAGTGTGCGGTCC
Pol2	GCTGGGAGACATAGCACCA	TTACTCCCCTGCATGGTCTC
Tbp	CCAATGACTCTATGACCCTA	CAGCCAAGATTCACGGTAGAT
Ulk 1	TACACACCTTCTCCCAAGTG	GAGGAACCGGGTCGTGG

Tableau supplémentaire 1 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR.

DISCUSSION

DISCUSSION

A. L'AMB, un potentialisateur des facteurs neurotrophiques ?

1. L'AMB préserve l'intégrité de l'axe moteur dans deux modèles de SLA

Depuis quelques années, des études précliniques et cliniques suggèrent que le métabolisme des glycosphingolipides est impliqué dans la physiopathologie de la SLA. En effet, nous avons mis en évidence, ainsi que d'autres équipes, une dérégulation de la voie du GlcCer ainsi qu'une dérégulation d'autres GSLs (par exemple, GM1) dans la moelle épinière des patients SLA et dans les modèles animaux (Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2015a, 2017, 2018). Nos travaux menés sur la moelle épinière lombaire de souris SLA *Sod1^{G86R}* montrent que l'activité enzymatique de GBA2 est fortement augmentée, et cela dès le stade pré-symptomatique. GBA2 est une enzyme non-lysosomale qui convertit le GlcCer en céramide au niveau du RE et de la membrane plasmique. GBA2 partage un lien étroit avec les fonctions motrices puisque certaines pathologies affectant le système moteur, comme la paraplégie spastique héréditaire (SPG46), sont caractérisées par la perte complète de fonction de l'enzyme GBA2 (Woeste and Wachten, 2017; Woeste et al., 2019). Dans un contexte de maladie de Niemann Pick de type C, l'inhibition de l'activité de GBA2, avec de l'AMP-DNM à forte dose ou du Miglustat, améliore le phénotype moteur comme par exemple, la coordination motrice (Marques et al., 2015; Wheeler et al., 2019). Pour contrecarrer l'augmentation de GBA2 retrouvée dans la moelle épinière des souris *Sod1^{G86R}*, nous avons utilisé une molécule capable de passer la BHE : l'AMB. En effet, en plus de son rôle de chaperon pharmacologique sur GBA1, une enzyme ayant la même fonction que GBA2 mais localisée au niveau du lysosome, l'AMB inhibe l'activité enzymatique de GBA2. Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence que l'AMB ralentit l'apparition des premiers symptômes moteurs de la maladie, préserve l'intégrité des unités motrices et prolonge considérablement la durée de vie des souris *Sod1^{G86R}*. Ces effets bénéfiques de l'AMB ont été retrouvés dans plusieurs de nos cohortes de souris *Sod1^{G86R}*. En parallèle, nous avons démontré que l'AMB stimule la plasticité axonale et la récupération motrice dans un modèle de compression du nerf sciatique. À l'appui de ces résultats *in vivo*, nous avons également montré que l'AMB favorise l'allongement du réseau de neurites et la formation de JNM dans un modèle *in vitro* d'unités motrices, basé sur la coculture de myoblastes et d'explants de moelle épinière (Bouscary et al., 2019). Afin de confirmer ces résultats, j'ai également testé les effets de l'AMB dans un second modèle de SLA : le modèle SLA-DFT *CHMP2B^{intron5}*. Etant donné la longue phase symptomatique de ce modèle, qui est difficilement compatible avec une étude de survie, je me suis concentrée sur les effets de l'AMB sur l'intégrité de l'axe moteur, le comportement moteur et cognitif ainsi que sur les voies lysosomales et autophagiques. Dans ce modèle, nous avons

à nouveau mis en évidence que l'AMB préserve la force musculaire ainsi que l'axe moteur tout en limitant la dénervation et la neurodégénérescence.

2. Les effets potentiels de l'AMB sur les facteurs neurotrophiques

Toutefois, le mécanisme d'action de l'AMB sur les unités motrices reste à définir. En effet, jusqu'ici, aucune donnée de la littérature n'avait montré ces propriétés neuroprotectrices de la molécule. Il est possible qu'en inhibant GBA2, l'AMB module l'ensemble de la voie des glycosphingolipides, qui sont des éléments importants dans la stabilisation des gaines de myéline et dans la transmission de l'influx nerveux (Campagna and Fallon, 2006; Marchand et al., 2002; Stetzkowski-Marden et al., 2006). La glycosylation du GlcCer peut mener à des métabolites complexes comme le ganglioside GM1. L'interaction de GM1 avec les neurotrophines est connue depuis déjà de nombreuses années. GM1 est capable de potentialiser les voies de signalisation des neurotrophines, notamment en interagissant avec les récepteurs TrkA et TrkB, et en augmentant leur activation induite par les facteurs neurotrophiques NGF et BDNF (Duchemin et al., 2002; Mutoh et al., 1995; Olsen and Færgeman, 2017; Rabin et al., 2002). De cette manière, GM1 joue un rôle fondamental dans le maintien de l'unité motrice. Il facilite ainsi la migration neuronale, l'arborisation dendritique et la croissance axonale (Di Biase et al., 2020). Des cas de patients SLA possédant des anticorps ciblant GM1 dans leur sérum ont également été répertoriés dans les années 1980 (Pestronk et al., 1988, 1989). Fait intéressant, les patients produisant des anticorps dirigés contre GM1 développent une maladie immunologique ressemblant à la SLA : la maladie de Guillain-Barré (Harschnitz et al., 2014). Chez les souris *Sod1^{G86R}*, les quantités de gangliosides au niveau de la JNM sont fortement réduites et un traitement au CBE, un inhibiteur de GBA1 et de GBA2, permet de reverser ce phénomène (Henriques et al., 2017). Ce qui démontre bien l'importance des gangliosides pour l'axe moteur. Ainsi, il est possible que l'inhibition pharmacologique de l'activité des GCases par l'AMB ou le CBE, préserve la distribution de glycosphingolipides membranaires au niveau des JNM et/ou de la moelle épinière, favorisant la conversion du GlcCer en glycosphingolipides plus complexes, notamment en ganglioside GM1.

Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'AMB est capable d'interagir, indirectement ou directement, avec les récepteurs Trk responsables de la croissance et de la survie des neurones. En modifiant les niveaux de GlcCer, l'AMB pourrait moduler les niveaux de gangliosides GM1 qui stabiliseraient à leur tour les récepteurs Trk, essentiels aux processus neurotrophiques/neuroprotecteurs ou encore les récepteurs à l'acétylcholine nécessaires à la bonne transmission du signal nerveux. Ces propriétés feraient de la molécule, un traitement potentiel pour ralentir le développement de la SLA, de la SLA-DFT mais également d'autres maladies neurodégénératives. Pour vérifier ces hypothèses, il pourrait

être intéressant d'étudier les 3 voies de signalisation en lien avec l'activation des récepteurs Trk : la voie de plasticité Ras/Raf/MEK/Erk, la voie de survie cellulaire PI3K/AKT et la voie de la phospholipase C qui peut par exemple, stimuler la plasticité synaptique. La mesure des niveaux de facteurs neurotrophiques pourrait ainsi être corrélée à l'activation des différentes voies.

Enfin, pour compléter nos résultats, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de GBA2, l'inhibiteur OM2, dans un modèle murin de compression nerveuse. Les résultats de cette étude indiquent clairement que le traitement OM2 améliore la récupération motrice et augmente le nombre de JNM innervées. Ce qui nous permet de confirmer l'importance de GBA2 pour l'axe moteur ainsi que pour la récupération motrice après compression nerveuse. Ces données renforcent les observations faites avec l'AMB. Ainsi il est possible que l'inhibition de GBA2, avec l'AMB ou l'OM2, permette de maintenir une distribution de gangliosides au niveau de la membrane cellulaire qui après transformation en gangliosides GM1, potentialise la plasticité axonale.

B. Les sphingolipides et l'AMB dans les processus lysosomal et autophagique

De nos jours, la littérature met en évidence les nombreux points communs entre les maladies neurodégénératives et les maladies à surcharge lysosomale (MSL). En effet, de plus en plus d'études montrent que dans la SLA et la DFT, comme dans la maladie de Parkinson (MP), la maladie de Gaucher (MG), certaines amyotrophies spinales ou encore la paraplégie spastique héréditaire (HSP), les processus endolysosomal et autophagique sont altérés (Boland et al., 2018). Dans les MSL, on retrouve une accumulation progressive de macromolécules, comme par exemple des sphingolipides à l'intérieur des lysosomes (Dodge, 2017). Impliqué dans le processus autophagique, le céramide est un lipide complexe situé au centre de la plupart des MSL et des MND. Le céramide est converti en GlcCer par l'enzyme UGCG et la dégradation du GlcCer s'effectue par l'enzyme lysosomale GBA1 et l'enzyme membranaire GBA2. La voie du GlcCer semble impliquée dans plusieurs pathologies neurodégénératives. Dans la SLA, on retrouve également une dérégulation de la voie du GlcCer aussi bien chez les patients que chez les souris. Nos travaux mettent en évidence une augmentation de l'activité de GBA2 dans la moelle épinière des souris *Sod1^{G86R}*.

Pour pallier l'augmentation de l'activité GBA2 retrouvée chez les souris SLA *Sod1^{G86R}*, nous avons utilisé l'AMB (Bouscary et al., 2019), un inhibiteur de GBA2 utilisé dans la MG et la MP pour son activité chaperonne sur GBA1. En effet, l'AMB permettrait d'assurer la bonne conformation de GBA1 tout en favorisant son adressage vers le lysosome et en augmentant son activité enzymatique (Ambrosi et al., 2015; Luan et al., 2013; Maegawa et al., 2009; McNeill et al., 2014; Siebert et al., 2014). Nos données

ainsi que celles de la littérature suggèrent donc que l'AMB a de nombreux effets sur la fonction lysosomale et sur l'autophagie. Dans une première partie, je présenterai l'implication des sphingolipides dans le système lysosomal/autophagique. Puis dans une seconde partie, je détaillerai sur les différents effets de l'AMB sur ces voies lysosomale et autophagique.

1. Les sphingolipides et le processus autophagique

Les lipides interviennent dans la stabilité de la membrane plasmique et sa fluidité, ainsi que dans de nombreuses voies de signalisation et dans divers processus comme celui de l'autophagie. Depuis quelques années, des études montrent des modifications du métabolisme lipidique dans la SLA et dans la DFT, et suggèrent leurs potentielles implications dans la physiopathologie de ces maladies. Dans la SLA comme dans la DFT, on retrouve de nombreuses perturbations des différentes classes de lipides comme celles des acides gras, des di/tri-glycérides, du cholestérol, ou encore celles des phospholipides et des sphingolipides (Ahmed et al., 2017; Henriques et al., 2015a, 2015b; Kim et al., 2018a, 2018b). Toutefois, d'un point de vue mécanistique, le rôle précis des sphingolipides dans la physiopathologie de la SLA et de la DFT doit encore être approfondi.

1.1. L'implication du céramide dans le tri des CMV

L'autophagie joue un rôle central dans la dégradation des protéines mal repliées pour empêcher leur agrégation. Dans la SLA et la DFT, l'altération de l'autophagie entraîne l'accumulation de protéines dans les cellules du SNC. Un grand nombre de sphingolipides intervient dans le processus autophagique et plus précisément au niveau lysosomal. Parmi ces sphingolipides, on retrouve le céramide et ses dérivés (comme la sphingosine, la sphingomyéline (SM) et la sphingosine-1-phosphate (S1P)). Ce sont des médiateurs bioactifs qui interviennent aussi dans de nombreuses autres voies (apoptose, adhésion, reconnaissance cellulaire, inflammation, etc.) (Hannun and Obeid, 2018). Le céramide est essentiellement synthétisé au niveau du RE mais peut être requis au niveau des lysosomes pour la régulation des niveaux de SM (Simonaro, 2016). Cependant, il peut aussi être nécessaire au niveau des corps multivésiculaires (CMV ou endosomes tardifs) qui sont destinés à être sécrétés dans le milieu extracellulaire : le céramide est donc impliqué dans le déclenchement et bourgeonnement des vésicules d'exosome (Trajkovic et al., 2008). En effet, le tri des CMV vers la membrane ou vers l'autophagosome ne serait pas uniquement dépendant de la machinerie ESCRT, mais également des niveaux de sphingolipides dans les RAFT lipidiques, formés à partir du céramide (Trajkovic et al., 2008). Dans la DFT, le céramide est montré comme un déclencheur des processus cellulaires pro-apoptotiques favorisant la neurodégénérescence et la neuroinflammation. Ainsi, des niveaux de céramide élevés sont en accord avec un fort degré d'inflammation cérébrale (de Wit et al.,

2019). Chez les patients DFT porteurs de la mutation *CHMP2B^{intron5}*, les neurones du cortex frontal présentent une accumulation de CMV contenant les protéines mutées (Han et al., 2012; Urwin et al., 2010). Il en est de même pour les mutations du gène *VCP*, impliquées dans la SLA et la DFT, qui provoquent des niveaux accrus de céramide dans le muscle (Llewellyn et al., 2014). Nous ne pouvons donc pas exclure l'hypothèse que dans la DFT, les accumulations de CMV peuvent être liés aux perturbations du métabolisme du céramide, bien que ces accumulations de CMV n'aient pour le moment été identifiées que dans le cas des mutations *CHMP2B* et *VCP*. De plus, chez la levure, la protéine *VPS4* est connue pour interagir avec la protéine *CHMP2B*. Cette interaction entraîne la scission des vésicules endosomales (Babst, 1997) ainsi que le démantèlement du complexe ESCRT-III où se situe la protéine *CHMP2B* (Babst, 1998). Une étude récente montre que la mutation *CHMP2B^{intron5}* entraîne un défaut du recrutement de *VPS4*, potentiellement à l'origine de l'altération du trafic des endosomes et de la fusion des lysosomes avec l'autophagosome (Urwin et al., 2010). Fait intéressant, chez les souris SLA *SOD1^{G93A}*, l'expression du gène *Vps4* est fortement diminuée dès le stade pré-symptomatique (Henriques et al., 2015c). Néanmoins, l'analyse de fibroblaste de patient a montré que la mutation *CHMP2B^{intron5}* n'endommage pas la formation des endosomes précoces (Urwin et al., 2010). Il serait donc intéressant d'étudier précisément *VPS4* chez les souris *CHMP2B^{intron5}* de notre laboratoire afin de mettre en évidence d'éventuels défauts de fusion des lysosomes avec l'autophagosome.

1.2. Les niveaux de céramide et l'autophagie

Bien que protecteur dans la plupart des cas, le processus autophagique peut devenir un acteur de la mort cellulaire lorsque les niveaux de céramide deviennent trop élevés. En effet, d'importants niveaux de céramide vont déclencher l'autophagie, induire l'apoptose en inhibant les transporteurs des nutriments (et donc l'absorption des nutriments) et la réponse mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), impliquée dans l'intégration des signaux de disponibilité des nutriments et de l'énergie cellulaire (Guenther and Edinger, 2009; Harvald et al., 2015). Limiter l'inhibition (induite par le céramide) des transporteurs des nutriments, ou augmenter les niveaux de nutriments par supplémentation de Pyruvate-Methyl, permet de reverser la toxicité du céramide et de réduire la mort cellulaire (Guenther et al., 2008). Dans les motoneurones des souris *SOD1^{G85R}* mutantes pré-symptomatiques, il a été suggéré une hyperactivité de l'autophagie associée à une diminution du complexe mTORC1 (Bandyopadhyay et al., 2014). En parallèle, les études du laboratoire montrent qu'un régime enrichi en lipides augmente la survie des souris *Sod1^{G86R}* (Dupuis et al., 2004) et que ces souris présentent des perturbations du métabolisme des glycosphingolipides (Henriques et al., 2015a, 2017). Il est donc possible d'envisager que les altérations du processus autophagique observées dans les modèles *SOD1*, soient associées à la perturbation des niveaux de céramide, et qu'un régime enrichi

en graisse limiterait la mort cellulaire en restabilisant les besoins énergétiques. De plus, une seconde étude montre qu'une alimentation enrichie en acide gras insaturés (Palmitoléate et oléate) est également neuroprotecteur et améliore l'autophagie chez les souris *SOD1^{G93A}* (Oliván et al., 2014). Il serait donc intéressant d'étudier l'autophagie chez les souris *Sod1^{G86R}* ainsi que la réponse mTORC1 après un régime enrichi en lipides.

La biogénèse des GSLs à partir du céramide est essentielle dans un contexte neurologique, où les gangliosides permettent le développement du système nerveux. En effet, chez la souris, la suppression conditionnelle cérébrale de UGCG (l'enzyme de synthèse du GlcCer à partir du céramide) après la naissance entraîne de graves anomalies neuronales (Jennemann et al., 2005). Toutefois, l'inhibition pharmacologique de UGCG est une thérapie qui a été envisagée pour la maladie de Gaucher (Lachmann and Platt, 2001) et de Niemann-Pick (type C) (Stein et al., 2012) et qui s'est révélée neuroprotectrice et efficace contre les troubles du stockage lysosomal dans les modèles de maladie de Sandhoff et de Tay-Sachs (Lachmann and Platt, 2001). L'inhibition de UGCG augmente également significativement le flux autophagique ainsi que le nombre de lysosomes et d'endosomes tardifs (CMV) dans les cultures primaires de neurones (Shen et al., 2014). Il est possible que cette réponse soit la conséquence d'un excès de céramide. Une étude semblable montre que diminuer les niveaux de GlcCer avec la Clozapine (un antipsychotique utilisé dans le traitement de la schizophrénie) stimule le processus autophagique et permet la clairance des agrégats protéiques (Hao et al., 2017). De manière étonnante, une étude menée dans un contexte d'emphysème pulmonaire montre que l'inhibition de UGCG peut aussi : supprimer la réponse mTORC1, empêcher la fusion du lysosome avec l'autophagosome, diminuer le flux autophagique et augmenter l'apoptose (Koike et al., 2019). Bien que cette étude n'ait pas été menée au niveau du système nerveux, elle témoigne de l'importance de la voie des GSLs sur l'autophagie.

2. Les effets de l'AMB sur les voies lysosomale et autophagique

2.1. Les effets de l'AMB sur la voie lysosomale

a. L'AMB et la voie lysosomale GBA1

D'un point de vue clinique, l'AMB est actuellement en cours d'évaluation dans la MG (NCT03950050 ; KCT0003218) et la MP (NCT0291436 ; NCT02941822) pour son « activité chaperonne » sur l'enzyme GBA1. La MG est une maladie génétique caractérisée par la perte de l'activité enzymatique de GBA1. GBA1 ne peut alors plus effectuer la dégradation lysosomale du GlcCer, ce qui engendre une accumulation toxique de GlcCer dans les cellules. L'utilisation de l'AMB dans le cadre de la MG est basée sur l'amélioration de la conformation de GBA1 et donc sur l'augmentation de son activité

enzymatique (Ambrosi et al., 2015; Luan et al., 2013; Maegawa et al., 2009; McNeill et al., 2014; Siebert et al., 2014). Ce sont ces effets que l'on appelle « effet chaperon ». L'une des caractéristiques pathologiques de la MP est l'accumulation et l'agrégation de l' α -synucléine dans la substance noire, le cortex cérébral et l'hippocampe (Schapira and Jenner, 2011). Les fonctions de l' α -synucléine ne sont pas encore clairement définies bien qu'il semble qu'elle intervienne dans le trafic vésiculaire synaptique (en stabilisant les complexes SNARE) et l'exocytose des neurotransmetteurs (Burré et al., 2018; Lashuel et al., 2013). Les mutations dans le gène *GBA1* sont également associées à un haut risque de développer une MP. En effet, 7 à 10 % des patients Parkinsoniens possèdent des mutations *GBA1*, et les individus porteurs de mutations *GBA1* présentent 20-30 fois plus de risque de développer la MP (Migdalska-Richards et al., 2016). C'est à partir de ces données que la communauté scientifique s'est penchée sur le lien entre les mutations *GBA1* et l' α -synucléine. Une activité réduite de *GBA1* favorise l'accumulation d' α -synucléine dans le cerveau des patients atteints de MP sporadique (Murphy et al., 2014). Les études les plus récentes menées sur des modèles *in vivo* et *in vitro* (murins et neurones murins/humains) de la MP montrent que l'augmentation en α -synucléine réduit les niveaux de *GBA1* tandis que la diminution de *GBA1* mène à une accumulation d' α -synucléine. L'augmentation des niveaux de *GBA1* par l'AMB stimule donc la clairance de l' α -synucléine (Mazzulli et al., 2016; McNeill et al., 2014; Migdalska-Richards et al., 2016; Sardi et al., 2011; Yang et al., 2020, 2017). Ainsi, l'utilisation de l'AMB dans le cadre de ces deux pathologies est basée sur le même effet : celui d'augmenter l'activité enzymatique de *GBA1*. Néanmoins, l'activité enzymatique *GBA1* n'est pas uniquement liée à l' α -synucléine. En effet, la cathepsine D (CathD), une protéase lysosomale activée par les céramides (Heinrich et al., 2000), est impliquée dans la dégradation de l' α -synucléine (Crabtree et al., 2014; Seveler et al., 2008). De surcroît, l'activité enzymatique de *GBA1* est essentielle pour que la CathD exerce sa fonction d'élimination de l' α -synucléine dans les neurones (McGlinchey and Lee, 2013). Il a également été démontré, dans des cerveaux de patients ou des modèles murins de MP, que les mutations *GBA1* peuvent entraîner des niveaux de CathD diminués et des agrégats protéiques toxiques d' α -synucléines. *In vitro*, l'utilisation d'AMB permet la clairance des agrégats d' α -synucléine en augmentant les niveaux de CathD (Yang et al., 2020), ce qui concorde avec nos résultats (qui montrent que l'AMB stimule la CathD chez les souris nTg et les souris *CHMP2B^{intron5}* traitées). Cette clairance des agrégats d' α -synucléine ne serait toutefois pas uniquement liée à sa dégradation par la CathD : des études *in vitro* ont montré que l'AMB stimule l'exocytose et la libération d'exosomes (Fois et al., 2015; Magalhaes et al., 2018). En effet, dans des lignées cellulaires murines et humaines de MP, la molécule est capable de diminuer les agrégats d' α -synucléine par voie exosomale (Magalhaes et al., 2018; Mazzulli et al., 2016; McNeill et al., 2014; Yang et al., 2017). Ces données expliqueraient donc également pourquoi après un traitement à l'AMB, on retrouve une diminution des agrégats P62 et CathD dans la moelle épinière des souris *CHMP2B^{intron5}*.

L'ensemble des données précédemment citées montre que les niveaux de CathD, de GBA1 et d' α -synucléine sont étroitement liés. Cependant, il existe d'autres gènes que *CHMP2B* associés à la DFT et à des perturbations lysosomales. C'est le cas notamment des mutations *PGRN*. Les neurones de souris déficientes en *Pgrn* montrent une diminution de l'activité de la CathD (Valdez et al., 2017). Cette diminution pourrait être à l'origine de la diminution de l'activité enzymatique de GBA1. En effet, la CathD intervient dans le clivage de la pro-saposine, la glycoprotéine précurseur de la saposine C, elle-même inductrice de GBA1 (Hiraiwa et al., 1997; Tamargo et al., 2012). Les neurones mutants *PGRN* issus d'iPSC de patients présentent une altération du processus de clivage de la pro-saposine en saposine C par la CathD, engendrant une réduction de l'activité de GBA1 associée à une accumulation de lipides et une augmentation des niveaux d' α -synucléine (Valdez et al., 2020). Des études semblent d'ailleurs montrer que l' α -synucléine pourrait piéger GBA1, diminuant encore davantage son activité enzymatique (Yap et al., 2013a). Encore une fois, l'AMB a un effet bénéfique sur ces altérations en stimulant le clivage de la pro-saposine en saposine C via la stimulation de la CathD. Cette stimulation a pour conséquence finale une augmentation de l'activation de GBA1 (Ambrosi et al., 2015). Les niveaux de saposine C sont aussi augmentés en présence d'AMB, limitant physiquement l'interaction entre l' α -synucléine et GBA1 (Yap et al., 2013b). L'étude transcriptomique du laboratoire menée sur la moelle épinière du modèle murin *CHMP2B^{intron5}* a révélé une induction du gène *CathD* (Waegaert et al., 2020). Nous retrouvons également cette augmentation dans notre étude chez les souris *CHMP2B^{intron5}*. Nous pouvons donc nous demander ce qu'il en est de l'activité enzymatique de GBA1 ou de son activatrice, la saposine C, dans ce modèle de SLA-DFT. Toutes ces données permettent de supposer que l'AMB stimule l'ensemble des protéines de la voie lysosomale en lien avec GBA1 ([figure 24](#)).

b. L'AMB, un stimulateur des voies lysosomales indépendantes du M6P

En parallèle, de nombreuses études montrent que l'AMB active le facteur *Transcription factor EB* (TFEB) en favorisant sa translocation du cytoplasme vers le noyau où il assure la transcription des gènes liés aux processus lysosomal et autophagique (Magalhaes et al., 2018; McNeill et al., 2014; Settembre et al., 2012). TFEB est aussi un régulateur l'exocytose puisqu'il favorise la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique (Medina et al., 2011; Settembre and Medina, 2015; Settembre et al., 2013). Par exemple TFEB induit la transcription de la prosaposine C, de la CathD mais aussi LIMP2, le transporteur des enzymes GBA1 et GBA2 du RE vers le lysosome ou la membrane (Palmieri et al., 2011). De plus, l'AMB augmente également fortement les niveaux de LIMP-2 (Ambrosi et al., 2015; Magalhaes et al., 2018). L'ensemble de ces données semble donc indiquer que l'AMB stimule les voies lysosomales par son effet sur TFEB.

Pourtant, les résultats de notre étude menée sur les souris *CHMP2B^{intron5}* laissent à penser que l'AMB ne stimule pas toutes les voies lysosomales. Parmi les MSL, les Mucopolidoses (de type II et de type III α/β) résultent en des mutations dans le gène *GNPTAB* (N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase). Nous avons montré dans la partie C des « RÉSULTATS » que l'expression du gène *Gnptab* est diminuée chez les souris nTg traitées à l'AMB. Ce gène code pour l'enzyme (GlcNAc)-1-phosphotransférase qui assure le transport des hydrolases acides de l'appareil de Golgi vers le lysosome (où elles exercent leurs fonctions) en leur ajoutant un groupement mannose-6-phosphate (M6P) (Flanagan-Steet et al., 2016; Velho et al., 2019). L'AMB pourrait donc avoir un effet inhibiteur direct sur l'expression de *Gnptab*. Aucune donnée ne témoigne d'une action potentielle de TFEB sur *Gnptab*. En parallèle, les souris *CHMP2B^{intron5}* véhicules présentent également des niveaux d'expression de *Gnptab* diminués. Cet effet est accentué chez les souris *CHMP2B^{intron5}* traitées à l'AMB. Une étude indique que l'enzyme (GlcNAc)-1-phosphotransférase agit comme un répresseur de l'expression de certaines cathepsines (Lei et al., 2015). Ainsi l'augmentation de l'expression de la *CathD* dans notre étude pourrait directement être liée à la diminution de *Gnptab* chez les souris nTg traitées à l'AMB ou chez les souris *CHMP2B^{intron5}* traitées ou non à l'AMB.

Il est important de noter que le transport des hydrolases acides peut différer et être dépendant, ou non, de la voie M6P. En effet, le transport de GBA1 et de la CathD vers le lysosome est indépendant de cette voie. Le transport de ces protéines est assuré respectivement par LIMP-2 et la Sortilin (Reczek et al., 2007). Il est donc possible que l'AMB stimule certaines voies lysosomales au détriment d'autres voies. Nos données sur l'expression de la *CathD* et *Gnptab* après un traitement à l'AMB associée aux données de la littérature sur la CathD et GBA1, permettent de suggérer que l'AMB stimule les voies indépendantes du M6P au détriment de la voie dépendante du M6P. Il serait intéressant de vérifier ces hypothèses en mesurant les niveaux et les activités enzymatiques des différentes voies après un traitement à l'AMB ([figure 24](#)).

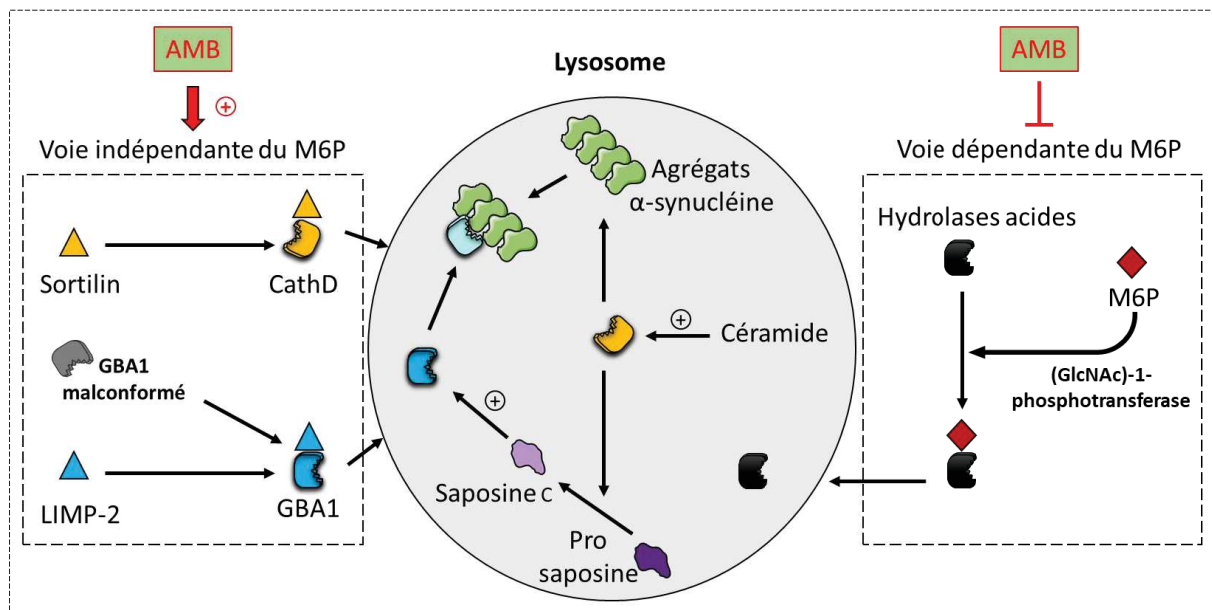


Figure 24 : Effets de l'AMB sur les voies dépendantes et indépendantes du mannose-6-phosphate.

Nos données suggèrent que l'AMB stimule le processus lysosomal indépendamment du mannose-6-phosphate (M6P) (image de gauche). L'AMB stimule les niveaux de CathD, LIMP2 et GBA1. CathD et GBA1 sont transportées jusqu'au lysosomes via les récepteurs LIMP-2 et Sortilin. L'AMB chaperonne GBA1 en assurant sa bonne conformation et en favorisant son adressage vers le lysosome. Dans le lysosome, la CathD est activée par le céramide et clive la prosaposine en saposine C, la protéine inductrice de GBA1. CathD est également capable de dégrader les agrégats d' α -synucléine. Les agrégats d' α -synucléine dans le lysosome piègent GBA1, limitant son activité enzymatique. En parallèle, l'AMB inhibe la voie dépendante du M6P en réprimant l'expression de *Gnptab* (image de droite).

2.2. Les effets de l'AMB sur l'autophagie

a. mTORC1 et le déclenchement de l'autophagie

Le complexe mTORC1 et AMPK (AMP-activated protein kinase) jouent des rôles opposés dans la régulation de l'autophagie (Alers et al., 2012; Young and Wang, 2018). En fonction des besoins de la cellule en nutriments, le céramide (et d'autres sphingolipides comme la S1P et la SMase acide) régule le complexe mTORC1 et l'enzyme AMPK. Dans des conditions suffisantes en nutriments, mTORC1 inhibe la protéine ULK1 pour empêcher l'autophagie. En effet, lors de l'initiation de l'autophagie, la protéine ULK1 s'associe à de nombreuses protéines pour former un énorme complexe nommé ULK1/2 (Alers et al., 2012). Dans des conditions de famine cellulaire, l'activation de l'AMPK par les céramides permet l'activation du complexe ULK1/2 nécessaire à l'initiation de la formation de l'autophagosome. Le complexe ULK1/2 phosphoryle ensuite le complexe VPS34 constitué entre autres de Beclin-1, qui permettra la croissance du phagophore. Dans ces conditions, Beclin-1 va se dissocier de BCL2 afin de se lier au complexe VPS4 (Harvald et al., 2015; Young and Wang, 2018). LC3-II s'ancre alors à l'autophagosome en formation et à P62 déjà lié aux protéines ubiquitinées destinées à la dégradation ([figure 25](#)). Bien que les auteurs de l'étude de Magalhaes et collaborateurs concluent sur une inhibition de l'autophagie par l'AMB, leurs résultats ouvrent à la discussion. En effet, les auteurs montrent que

l'AMB active TFEB et augmente les niveaux protéiques de LC3-II (Magalhaes et al., 2018). En parallèle, l'étude de Yang et collaborateurs (2017) conclue à une activation de la macroautophagie après un traitement à l'AMB qui se traduit par une augmentation de LC3-II et de P62 (Yang et al., 2017). Notre étude concernant les effets de l'AMB sur l'expression des gènes liés à l'autophagie (au niveau de la moelle épinière des souris *CHMP2B^{intron5}*) montre que le traitement permet de rétablir l'expression de *ULK1* à un niveau comparable à celui des souris nTg. Toutefois, l'expression de *Beclin-1* initialement diminuée chez les souris *CHMP2B^{intron5}* est accentuée en présence d'AMB. L'autophagie semble donc bloquée au niveau de la formation de l'autophagosome dans notre modèle. Cette hypothèse est en accord avec la diminution de l'expression de *P62* retrouvée après un traitement à l'AMB chez les souris *CHMP2B^{intron5}*. Néanmoins, nos résultats actuels ne permettent pas de conclure sur une inhibition ou une stimulation de l'autophagie par l'AMB. Des données complémentaires sont essentielles pour conclure précisément sur un effet.

Enfin, les voies de signalisation AMPK/mTORC1/ULK1 semblent directement liées aux mécanismes de dégénérescence. En effet, dans un modèle murin de vieillissement « accéléré » (par exposition chronique intense au D-galactose) (Cui et al., 2006), une étude montre que l'hyperactivation précoce de l'autophagie provoque à long terme une altération de celle-ci et une neurodégénérescence du cortex auditif. Les acteurs de l'autophagie (notamment *Beclin-1*, *BCL2* et *LC3*) sont ainsi fortement augmentés les premiers mois et fortement diminués quelques mois plus tard (Yuan et al., 2018). Au vu de nos résultats qui suggèrent une répression de l'autophagie chez les souris *CHMP2B^{intron5}* à l'âge de 21 mois (voir partie C des « RÉSULTATS »), nous pouvons envisager un phénomène semblable : une hyper-autophagie précoce qui devient défectueuse au cours du temps et qui serait à l'origine de la neurodégénérescence. L'analyse des voies de signalisation AMPK/mTORC1/ULK1 à un âge asymptotique, nous permettrait de confirmer s'il existe une altération de l'autophagie dans ce modèle.

b. Le facteur TFEB et l'autophagie

Au-delà de ces propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anesthésiques, il est montré que l'AMB s'accumule dans les corps lamellaires acides (qui sont des vésicules de pneumocytes comparables aux lysosomes) riches en Ca^{2+} des cellules pulmonaires. Cette accumulation conduirait à la libération de Ca^{2+} et à une exocytose accrue (Fois et al., 2015). L'AMB est donc un sécrétagogue qui provoque l'exocytose. L'étude récente de Magalhaes et collaborateurs confirme également les propriétés d'exocytose de l'AMB et démontre qu'elles sont associées à une augmentation du nombre de vésicules lysosomales et de CMV (Magalhaes et al., 2018).

D'autre part, la libération de Ca^{2+} lysosomale serait également impliquée dans l'activation indirecte de TFEB (Zhang et al., 2016). TFEB et mTORC1 sont fortement liés. L'activation de TFEB survient généralement après une diminution de l'apport en nutriments dans la cellule. La privation cellulaire en nutriments inhibe ainsi mTORC1 et active TFEB (Martina et al., 2012; Settembre and Medina, 2015; Settembre et al., 2012). La moelle épinière des souris *SOD1^{G93A}* présente une importante altération du processus autophagique, qui n'est plus capable d'assurer la dégradation des agrégats protéiques (Li et al., 2008; Morimoto et al., 2007). A un stage précoce de la maladie, les souris *SOD1^{G93A}* présentent une forte surexpression de *TFEB* qui diminue avec l'aggravation de la maladie. Il en est de même de l'expression de *Beclin-1*, dont les variations de niveau sont semblables à celles de *TFEB*. *In vitro*, la surexpression de *TFEB* promeut l'induction de l'autophagie (Chen et al., 2015). L'activation de TFEB est donc aussi associée à l'activation de l'autophagie, et plus précisément de la macroautophagie (donc qui fait intervenir un autophagosome). Nos résultats sur les souris *CHMP2B^{intron5}* montrent une diminution de *Beclin-1* chez les souris mutantes qui est fortement accentuée en présence d'AMB. La molécule n'a pas d'effet sur les souris nTg, ce qui laisse penser que cet effet est associé au mutant *CHMP2B^{intron5}*. L'autophagie chez ces animaux est donc probablement fortement réprimée et un traitement à l'AMB ne suffit pas à rétablir une autophagie fonctionnelle.

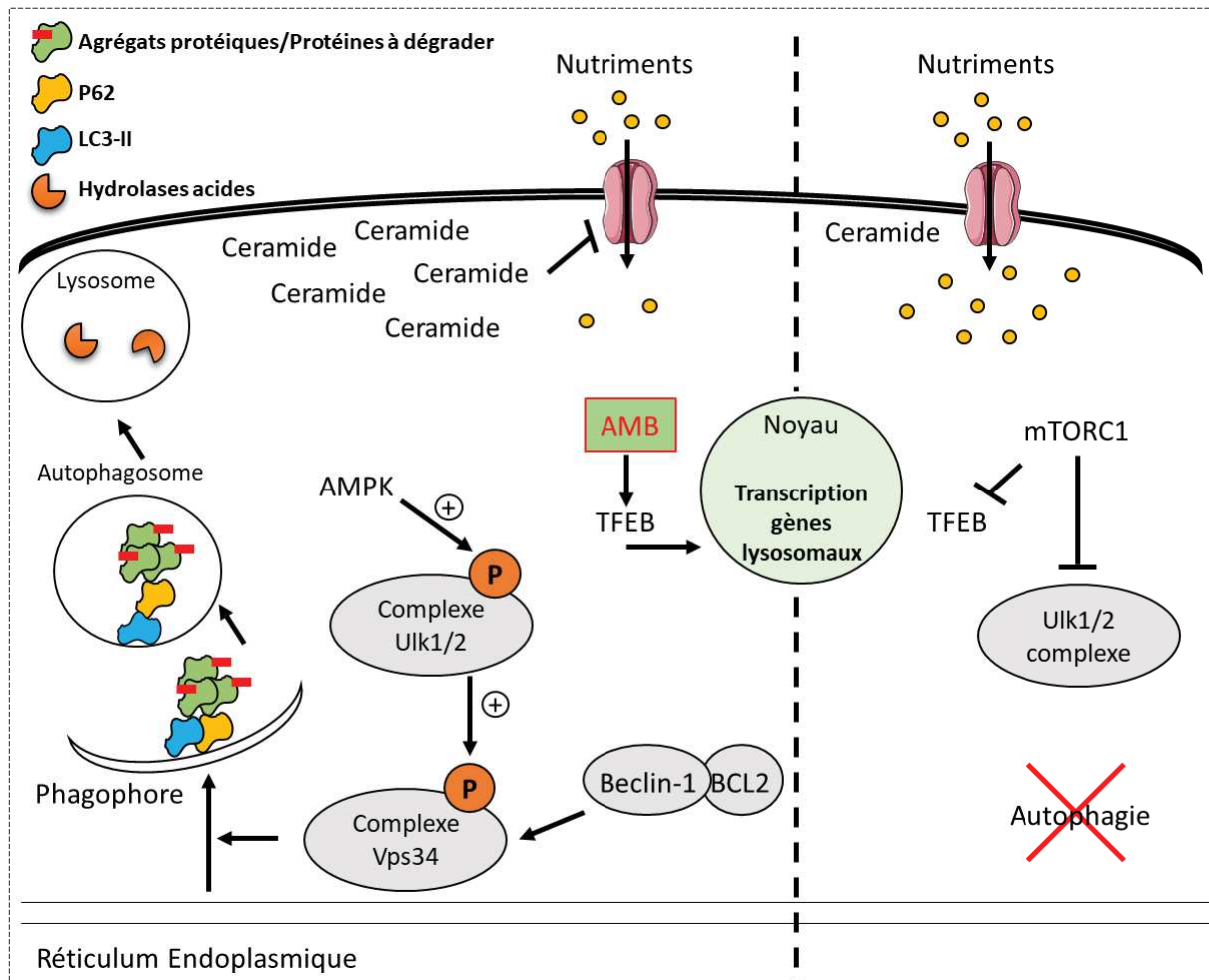


Figure 25 : Balance mTORC1/AMPK en fonction du statut nutritionnel de la cellule.

Dans des conditions pauvres en nutriments et/ou riche en céramides, l'enzyme AMPK phosphoryle le complexe ULK1/2 qui lui-même phosphoryle le complexe Vps34, constitué entre autres de Beclin-1. Pour que Beclin-1 intègre Vps34, BCL2 doit libérer Beclin-1. S'ensuit alors de la formation du phagophore lié à P62 lui-même lié aux protéines ubiquitinées à dégrader. LC3-II s'ancre également à l'autophagosome via P62. L'autophagosome se liera ensuite à un lysosome ou un CMV. Le contenu sera alors dégradé par voie lysosomale grâce aux hydrolases acides contenues dans les lysosomes (schéma de gauche). Dans des conditions riches en nutriments, le complexe mTORC1 inhibe le complexe ULK1/2, empêchant le processus autophagique de se mettre en place (schéma de droite). Des études montrent que le céramide est capable d'inhiber les transporteurs des nutriments et de réduire l'entrée des nutriments dans la cellule, provoquant une activation de AMPK, une suppression de l'activité de mTORC1 et une activation de l'autophagie (inspirée de Harvald et al., 2015). TFEB est un facteur de transcription qui s'active lorsque mTORC1 est inhibé. Sa translocation du cytoplasme vers le noyau lui permet d'induire la transcription des gènes lysosomaux. L'AMB, qui peut activer TFEB, pourrait permettre l'induction des voies lysosomale et autophagique.

2.3. Les effets de l'AMB sur la voie du GlcCer et l'autophagie

Au-delà du céramide, d'autres sphingolipides sont fortement dérégulés dans la SLA. La SLA n'est pas une maladie de surcharge avec accumulation toxique de sphingolipides. Cependant, les niveaux de sphingolipides sont fortement altérés chez les patients et les modèles murins SOD1 (Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2015a, 2017, 2018). La moelle épinière des patients présente également de fortes accumulations de GSLs, notamment de céramide (Dodge et al., 2015). Dans le modèle murin *Sod1^{G86R}*,

l'augmentation de l'expression du gène *Ugcg* et de l'enzyme UGCG est retrouvée dans le muscle. Cette augmentation est certainement une conséquence de la dénervation musculaire (Henriques et al., 2015a). Notre analyse combinant une étude de transcriptomique et de métabolomique sur des moelles épinières des souris *Sod1^{G86R}* montre une dérégulation du métabolisme des GSLs (Henriques et al., 2018 ; voir « publication 1 » de la partie « RESULTATS »). La voie du GlcCer est particulièrement impactée (Henriques et al., 2015a, 2017, 2018). Les données internes du laboratoire montrent que les niveaux tissulaires de GlcCer dans la moelle épinière des souris sont fortement diminués tandis qu'ils sont augmentés au niveau du muscle. Toutes ces données témoignent donc de l'importance de la voie du GlcCer dans la physiopathologie de la SLA.

<div style="text-align: center;"> GBA1 GBA2 Céramide $\xrightleftharpoons{\hspace{1cm}}$ Glucosylcéramide UGCG (GlcCer) </div>	Patients	Souris <i>Sod1^{G86R}</i>
Moelle épinière	↑ Céramide	↓ GlcCer
LCR	↑ GlcCer	ND
Muscle	↑ <i>UGCG</i>	↑ <i>UGCG</i> ; ↑ GlcCer

Tableau 3 : Changements métaboliques de la voie du GlcCer retrouvés chez les patients et les souris *Sod1^{G86R}*.
 ND : Non-déterminé ; *Italique = gène*.

Dans la moelle épinière des souris *SOD1^{G93A}* et *SOD1^{G85R}*, le flux autophagique est fortement élevé dès l'apparition des premiers symptômes de la maladie et la voie mTORC1 est diminuée (Bandyopadhyay et al., 2014; Li et al., 2008; Morimoto et al., 2007). Les marqueurs de l'autophagosome mature comme LC3-II et P62, montrent des niveaux très élevés à des stades précoces de la maladie et cela jusqu'à la mort des animaux (Bandyopadhyay et al., 2014; Li et al., 2008; Morimoto et al., 2007). Toutefois, à un stade très avancé de la maladie, bien que les niveaux de LC3-II et P62 restent augmentés, l'accumulation d'autophagosomes suggère que le flux autophagique est bloqué dans la moelle épinière des souris *SOD1^{G93A}* (Li et al., 2008). Les données de la littérature semblent donc montrer que plus la maladie progresse moins le flux autophagique est fonctionnel, bien qu'il soit hyperactif dès le stade pré-symptomatique. Nous pouvons envisager un phénomène semblable dans le modèle *Sod1^{G86R}*. Etant donné l'impact des niveaux de sphingolipides, et surtout de céramide, sur le déclenchement de l'autophagie et la réponse mTORC1, nous pouvons envisager que la perturbation des voies du GlcCer puisse impacter la balance Céramide/GlcCer et donc participer aux altérations du flux autophagique de ce modèle. Nos données non publiées montrent que le traitement à l'AMB permet de rétablir des niveaux de GlcCer équivalents à ceux des souris nTg dans la moelle épinière des souris à un stade

symptomatique (95 jours). En rééquilibrant la balance céramide/GlcCer via l'inhibition de GBA2, l'AMB pourrait donc rétablir une autophagie fonctionnelle. De manière intéressante, une étude montre que la stimulation de l'autophagie par la rapamycine, après un écrasement du nerf sciatique chez le rat, promeut la régénérescence des axones, leur remyélinisation et améliore aussi la récupération motrice. Tandis que l'inhibition de l'autophagie par du 3-méthyladenine retarde fortement ces phénomènes (Huang et al., 2016). Nous avons également vu que l'AMB a des effets bénéfiques sur la récupération de l'axe moteur après l'écrasement du nerf sciatique de souris nTg (Bouscary et al., 2019). Les effets bénéfiques de l'AMB pourraient donc être en partie liés à une augmentation du flux autophagique dans un contexte de neurodégénérescence.

C. Envisager l'AMB pour traiter la SLA et le syndrome SLA-DFT

Initialement utilisé pour les maladies des voies respiratoires, nous avons vu que l'AMB possédait des propriétés pouvant justifier son utilisation dans la SLA et la DFT. Actuellement en accès libre dans la plupart des pays de l'Union Européenne, ce médicament générique expectorant et mucolytique possède un profil d'innocuité favorable, même à fortes doses, et un risque d'effets secondaires extrêmement faible. Dans cette partie, j'argumenterai sur la possibilité d'un repositionnement de l'AMB pour traiter la SLA et le syndrome SLA-DFT.

1. L'AMB contre la neuroinflammation

Lorsque les cellules neuronales sont endommagées, la microglie s'active et de nombreux médiateurs cytotoxiques et inflammatoires sont libérés. Ces facteurs affectent les autres neurones et les astrocytes environnants (Hanisch, 2002; Kreutzberg, 1996; Souza et al., 2016). Néanmoins, l'activation astrocytaire semble donc précéder l'activation microgliale puisque la suppression de la protéine mutée SOD1^{G85R} uniquement dans les astrocytes permet de retarder l'activation microgliale et de ralentir la progression de la maladie (Wang et al., 2011). De nos jours, aucune étude ne témoigne des effets de l'AMB sur la neuroinflammation dans un contexte de maladies neurodégénératives. Toutefois, au-delà de ses effets bénéfiques sur la composante motrice, l'AMB présente des effets positifs sur la neuroinflammation. Nos résultats sur le modèle de SLA-DFT *CHMP2B^{intron5}* suggèrent en effet que l'AMB limite sa mise en place. Il existe deux types de microglie : la microglie anti-inflammatoire M2, qui est plutôt protectrice et qui passe par la sécrétion de facteurs neurotrophiques tels que IGF1 et BDNF ; et la microglie pro-inflammatoire M1, qui est plutôt délétère en raison de la production de ROS, NO et de diverses cytokines comme TNF- α et des interleukines de type IL-6 et IL-1 β . Selon la littérature, en début de SLA, la microglie aurait un rôle de soutien et serait donc protectrice, et de type M2, alors qu'à un stade avancé de la maladie, la microglie changerait en un type M1 (Appel, 2011; Tang and Le,

2016). De plus, il est connu que l'AMB limite *in vitro* la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (Jang et al., 2003; Ottonello et al., 2003) et protège contre le stress oxydatif en dégradant les ROS qui sont toxiques pour les cellules (Felix et al., 1996; Lee et al., 2002). Bien que nous n'ayons pas analysé les effets de l'AMB sur la libération de cytokines et de ROS dans nos modèles *Sod1^{G86R}* et *CHMP2B^{intron5}*, nous pouvons supposer que la microglie des souris est donc encore à un stade M2. D'autant plus que nous montrons que l'expression du marqueur microgliale et des macrophages *Iba1* ainsi que l'expression de la *CathZ* ne sont pas induites en présence d'AMB. La *CathZ* est fortement exprimée dans le cerveau, notamment par les microglies et une réduction de son expression, associée à une réduction d'expression d'IL-1 β , est efficace pour réduire la neuroinflammation (Allan et al., 2017). Nous pouvons donc envisager que l'AMB retarde la neuroinflammation en agissant directement sur les microglies. Cette hypothèse va dans le sens d'une autre étude, menée dans un contexte d'hémorragie cérébrale, qui démontre que l'AMB favorise la survie neuronale en limitant le stress du RE des microglies (Jiang et al., 2020b).

Toutefois, même si nous montrons que l'AMB empêche l'induction de *Iba1*, il est essentiel de noter que ce marqueur n'est pas uniquement spécifique à la microglie. En effet, il est également exprimé par les macrophages. Il n'est donc pas impossible que l'AMB agisse préférentiellement sur l'une de ces deux populations. Par exemple, l'AMB empêche la sécrétion des facteurs pro-inflammatoires par les macrophages IL-1 β et TNF- α (Jang et al., 2003) mais étant donné *qu'Iba1* n'est pas induit après un traitement à l'AMB, nous pouvons aussi suggérer que la molécule limite l'activation des macrophages et leur infiltration dans la moelle épinière. Pour le confirmer, il faudrait analyser un marqueur spécifique des macrophages et/ou des microglies afin de vérifier que l'AMB a des effets semblables sur la microglie et les macrophages.

D'autre part, des études montrent que les souris *SOD1^{G37R}* qui n'expriment pas la protéine mutante SOD1 dans la microglie et les macrophages, ont une survie plus longue (Boillee et al., 2006) et que le remplacement d'une population microgliale exprimant la protéine SOD1 mutée par une population microgliale nTg, retarde la dégénérescence des MN et prolonge la survie des animaux (Beers et al., 2006). La microglie semble donc jouer un rôle fondamental dans la survie des animaux. Nous pouvons donc imaginer que la survie plus importante des souris *Sod1^{G86R}* après un traitement à l'AMB passe en partie par une action anti-inflammatoire. De cette manière, la microglie libérerait moins de facteurs nuisibles à la survie de MN. La neuroinflammation étant impliquée dans la physiopathologie d'un grand nombre de maladies neurodégénératives, l'utilisation de l'AMB dans ce contexte, comme dans un contexte SLA et/ou DFT mérite d'être davantage approfondi.

2. L'AMB contre les agrégats cytoplasmiques

L'AMB a premièrement été décrit comme étant une molécule qui améliore la clairance mucociliaire en augmentant les sécrétions de surfactant (Rogers, 2007). L'AMB serait un agent sécrétoire qui s'accumule dans les lysosomes riches en Ca^{2+} , provoquant l'exocytose de ces vésicules (Fois et al., 2015; Magalhaes et al., 2018). Cet effet de la molécule pourrait être intéressant dans le contexte de MSL puisque l'exocytose libère les cellules des accumulations protéiques et lipidiques qu'elles subissent (Samie and Xu, 2014). Nous avons vu plus haut que l'AMB est un activateur de TFEB, est un facteur de la biogénèse lysosomale mais aussi de l'exocytose (Medina et al., 2011; Settembre and Medina, 2015; Settembre et al., 2013). Dans les modèles de MSL, il est montré que l'induction de TFEB empêche le stockage lysosomal en stimulant la clairance cellulaire (Settembre et al., 2013; Spanpanato et al., 2013). En effet, TFEB régule la clairance cellulaire en agissant à la fois sur la régulation des enzymes lysosomales, l'acidification du lysosome (nécessaire au bon fonctionnement des hydrolases acides telles que la CathD et GBA1) et le nombre de lysosomes. TFEB régulerait également le nombre d'autophagosomes et leur fusion avec le lysosome. Enfin, TFEB faciliterait l'amarrage et la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique pour induire l'exocytose (Settembre et al., 2013). Les mécanismes d'exocytose de l'AMB pourraient donc passer par l'activation de ce facteur de transcription. D'autant plus que l'AMB est aussi efficace de deux manières dans la MP : en stimulant la CathD, protéine de dégradation de l' α -synucléine, mais également en agissant sur la clairance cellulaire en favorisant l'exocytose de l' α -synucléine (Magalhaes et al., 2018).

Dans notre étude sur les souris *CHMP2B^{intron5}*, nous observons après traitement à l'AMB, une diminution des agrégats P62 et CathD dans la moelle épinière lombaire. Ce phénomène pourrait donc être en lien avec une exocytose fortement augmentée qui permettrait d'alléger les cellules neuronales. Pour le confirmer, une analyse des niveaux de ces protéines est essentielle ; et bien que le traitement à l'AMB ne semble pas suffisant pour rétablir une autophagie fonctionnelle chez les *CHMP2B^{intron5}* (comme vu précédemment), l'AMB semble réduire efficacement la quantité d'agrégats cytoplasmiques. Son utilisation dans les maladies neurodégénératives comme la SLA et la DFT qui présentent ce type d'accumulation pourrait donc représenter un avantage fondamental.

3. Envisager l'AMB pour les patients SLA et SLA-DFT

3.1. L'AMB pour ralentir la maladie et allonger la survie des patients

Les propriétés de l'AMB développées précédemment font de cette molécule un excellent candidat médicament pour le traitement de la SLA et la DFT. Il faut toutefois prendre en compte qu'il existe des formes de SLA où les patients ne pourraient peut-être pas recevoir de l'AMB. En effet, selon le site

d'apparition de la maladie, les patients vont éprouver des difficultés à utiliser leurs muscles faciaux, ceux de la langue, du pharynx et du larynx (Chio et al., 2012; Swinnen and Robberecht, 2014). Si la molécule fluidifie les sécrétions, elle est aussi expectorante, c'est-à-dire qu'elle augmente l'expulsion du mucus des bronches ou de la trachée. Un patient SLA souffrant de forme bulbaire pourraient donc éprouver des difficultés à évacuer les sécrétions produites.

Toutefois nos travaux montrent de nombreux effets bénéfiques de la molécule sur plusieurs aspects de la pathologie. En effet, de plus en plus d'études suggèrent que la neuroinflammation joue un rôle crucial dans la pathogénèse de la SLA et de la DFT. Les études d'imagerie montrent la présence d'une activation microgliale généralisée dans les cerveaux des patients. Nos données associées à celles de la littérature suggèrent que l'AMB est bénéfique pour les souris en agissant sur la microglie et en retardant leur passage vers le stade M1. Toutefois, nous ne savons pas si ces effets positifs ne sont qu'une conséquence d'un ralentissement général de la pathologie ou un effet direct de l'AMB sur la neuroinflammation. En parallèle, nous montrons que l'AMB diminue la quantité d'agrégats cytoplasmiques. Enfin, l'aspect le plus prometteur est que l'AMB ralentit la progression de la maladie en préservant l'axe moteur dans deux modèles murins de SLA différents. De plus, au-delà de préserver l'axe moteur, la molécule est capable de favoriser la plasticité axonale *in vitro* et d'engendrer une réinnervation musculaire dans des modèles *in vivo* de dénervation. Toutes ces données permettent d'envisager que l'utilisation de l'AMB pourrait représenter un sérieux avantage, d'une part pour stimuler la réinnervation musculaire des patients, d'une autre pour prolonger leur survie.

3.2. L'AMB pour améliorer les altérations comportementales de la DFT

Les résultats bénéfiques de l'AMB sur la composante motrice nous ont poussé à tester la molécule sur un autre modèle de SLA. En effet, nous avons souhaité déterminer si l'AMB pouvait agir sur la composante comportementale en lien avec le continuum SLA-DFT. De nombreuses données montrent que 15 à 20% des SLA évoluent en DFT et qu'environ 15% des DFT évoluent en SLA (Nguyen et al., 2018). Le modèle murin *CHMP2B^{intron5}* récapitule les troubles liés au syndrome SLA-DFT en présentant à la fois des altérations comportementales (diminution de l'anxiété et de l'interaction sociale, désinhibition *etc.*), et motrices (perte de force musculaire, dénervation, *etc.*). Concernant les atteintes comportementales, nos résultats présentés en partie C des « RESULTATS » suggèrent que l'AMB modère la progression des symptômes comportementaux. Ces résultats sont en accord avec l'un des essais cliniques récent qui met en évidence les effets bénéfiques de la molécule sur les manifestations neurologiques des patients atteints de la MG (Narita et al., 2016). Autre fait, certaines mutations associées à la DFT, notamment les mutations *PGRN*, sont associées à des défaillances enzymatiques de GBA1 associées à des altérations enzymatiques de la CathD (Valdez et al., 2017). Dans le cadre de ces

mutations DFT, l'utilisation de l'AMB se justifierait par ses effets stimulateurs sur ces deux enzymes. Il est donc possible d'envisager l'AMB dans le cadre d'atteintes cognitives retrouvées dans la DFT.

3.3. L'AMB, une molécule prometteuse ?

Il faut néanmoins insister sur le fait que même si la communauté scientifique utilise des modèles animaux les plus représentatifs possibles de la maladie humaine, il existe malheureusement beaucoup de traitements initialement prometteurs qui n'aboutissent pas, pour cause d'inefficacité chez l'Homme lors des premiers essais cliniques. C'est effectivement le cas de l'un traitement pour la MG, basé sur la thérapie chaperonne, qui a échoué il y a quelques années. En effet, la molécule d'Isofagomine (nom du traitement « Afegostat ») était aussi capable de restaurer la conformation et d'améliorer l'activité de GBA1 (Steet et al., 2007, 2006). Malheureusement, bien que les patients aient montré une augmentation de l'activité GBA1, la réduction significative des symptômes n'a pas clairement été démontrée. Le traitement à l'Afegostat n'étant pas concluant dans la maladie de Gaucher, la molécule a cessé d'être produite. Ce qui différencie l'AMB de l'Isofagomine dans cette pathologie, c'est que pour le moment, l'AMB s'est montré capable de réduire la surcharge lysosomale mais également les symptômes moteurs et les atteintes neurologiques des patients (Narita et al., 2016). L'AMB pourrait donc présenter des bénéfices que d'autres molécules n'ont pas, en agissant sur plusieurs composantes à la fois : la neuroinflammation, les agrégats cytoplasmiques, la préservation de l'axe moteur ainsi que la plasticité axonale. Les premiers résultats sur la MP démontrant l'innocuité de la maladie et son passage dans le système nerveux central (Mullin et al., 2020), ne font que renforcer l'idée que l'AMB pourrait se révéler être un candidat médicament efficace dans le traitement de la SLA et de la SLA-DFT.

CONCLUSION

CONCLUSION

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence des effets bénéfiques de l'AMB qui étaient jusqu'ici inconnus dans un contexte de SLA.

Concernant le modèle *Sod1^{G86R}*, nous avons montré que l'AMB permet le maintien de la force musculaire, un maintien du nombre de MN fonctionnel plus élevé, des JNM mieux innervées, et une survie des animaux prolongée. *In vitro*, nous avons montré que l'AMB stimule la pousse axonale et la formation des JNM. Après compression du nerf sciatique, l'AMB améliore la récupération motrice et la réinnervation musculaire des souris. En parallèle, nous avons voulu confirmer que GBA2 est une cible d'intérêt dans la SLA. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de GBA2. Nos résultats montrent que cibler GBA2 permet une meilleure récupération motrice des animaux nTg après un compression du nerf sciatique. Ces données confirment que les effets observés avec l'AMB peuvent passer, au moins en partie, par l'inhibition de GBA2. L'ensemble des effets bénéfiques de l'AMB sur l'axe moteur pourrait être la conséquence d'une stimulation des facteurs neurotrophiques à travers la modulation des glycosphingolipides.

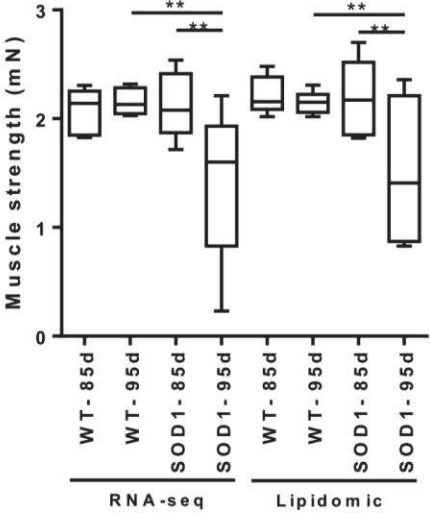
Chez les souris *CHMP2B^{intron5}*, nous avons montré que l'AMB ralentit l'apparition des symptômes moteurs d'un second modèle murin de SLA indépendant du gène *SOD1*. Nous avons également montré que l'AMB limite la progression des altérations comportementales associées à la DFT. Afin de comprendre les mécanismes de l'AMB, nous avons analysé ses effets sur les voies lysosomales et autophagiques. Nos résultats suggèrent que l'AMB stimule l'adressage des protéines vers le lysosome lorsqu'elles sont indépendantes de la voie M6P. Nos résultats actuels ne permettent pas de conclure si l'AMB stimule ou inhibe l'autophagie. Toutefois, la molécule ne permet pas de rétablir une autophagie fonctionnelle dans le modèle *CHMP2B^{intron5}*. Enfin, l'AMB semble également ralentir la progression de la neuroinflammation en limitant l'activation microgliale, aspect important de la maladie qui mériterait d'être approfondi.

Dans l'ensemble, mes travaux ont mis en évidence les propriétés neuroprotectrices de l'AMB dans des modèles de SLA et de DFT qui étaient jusqu'ici, inconnues. Associés aux données de la littérature, ces résultats prometteurs permettent d'envisager un repositionnement médicamenteux de l'AMB dans le traitement de la SLA.

ANNEXES

ANNEXES

A. Données supplémentaires de la publication 1



Supplementary Figure 1. Loss of muscle strength in SOD1^{G86R} at 85 and 95 days of age

Loss of muscle strength at 95 days of age in the two cohorts of SOD1^{G86R} mice used for the transcriptomic and metabolomic analysis. Box plot shows median, 10th and 90th percentiles, and the maximal and minimal value. **, p-value<0.01.

	Forward	Reverse
HexB	ggg-tgg-tcc-aaa-gac-tgc-ct	gac-act-agg-gac-acc-agg-g
Asah1	agg-acg-tac-tga-gac-ccg-aa	gac-aag-agg-cct-tga-gcc-tt
Cerk	tgg-tct-tgc-tgg-ctt-caa-gat-t	atg-agg-gga-ggc-cat-agt-ctg
Glb1	ttc-cgg-ata-ccc-cgc-ttc-ta	gaa-gtt-caa-ggg-cac-gta-ca
Arsb1	aca-cgc-cga-gga-ttc-gat-ac	caa-aga-ct-aat-cgg-cgc-ac
Sgpl1	atg-tgg-atg-ctt-gtc-tgg-gg	gtc-aca-cct-ttc-acc-cgg-aa
Tram111	gat-atg-gtc-tcc-tgc-gtg-gg	gag-gaa-cgc-gat-cga-cat-ct
Mettl14	gag-gga-cgt-gaa-agt-ctc-cg	ccc-gcc-aaa-atg-aaa-ctc-ca
Cd180	tgt-ccc-aag-tga-aga-aac-tgt-ca	aaa-gct-cag-tga-acc-ccc-ag
Calca	gct-cac-cag-gaa-ggc-atc-at	cat-gcc-tgg-tac-agg-agg-aa
Slc15a3	agg-agt-gtg-tag-agg-agg-tgg	gtc-ccc-ggt-taa-ctg-cct-tt
Runx1	ttc-gca-gag-cgg-tga-aag-aa	tgc-tgt-ctg-aag-cca-tcg-tt
Rwdd3	tga-aac-cca-gct-cct-cca-aa	aca-acc-aac-tac-agg-gtc-ct
Prss12	cct-ggg-gcg-aac-ata-act-gt	tcc-tcc-tgc-cag-tct-gat-ga
18S	tct-gat-aaa-tgc-acg-cat-cc	gcc-atg-cat-gtc-taa-gta-cgc
TBP	cca-atg-act-cct-atg-acc-cct-a	cag-cca-aga-ttc-acg-gta-gat
pol2	gct-ggg-aga-cat-agg-acc-a	tta-ctc-ccc-tgc-atg-gtc-tc

Supp. Table 1: List of primers used for qPCR validation

Supp Table 2. Integrated pathway analysis of spinal transcriptomic and lipidomic data of SOD1G86R mice, using Reactom database.

Pathway name	Source	Overlapping genes	Genes	Overlapping metabolites	Metabolite	p-value	q-value
Immune System	Reactome	238	/	4	Ceramide (3)	0,0001	4,36E-32
					Cholesterol ester (2)		
					Phosphatidylethanolamine (4)		
					Phosphatidylcholine (17)		
Signal Transduction	Reactome	181	/	7	Phosphatidylethanolamine (4)	0,0001	2,66E-05
					Cholesterol ester (2)		
					Phosphatidylcholine (17)		
					Ceramide (3)		
					Anandamide (1)		
					Sphingosine (1)		
					Sphingomyelin (5)		
Glycosphingolipid metabolism	Reactome	7	Glb1;Hexa; Hexb;Ctsa; Asah1;CerK; Arsb	4	Ceramide (3)	0,0001	0,00029
					Glucosylceramide (4)		
					Sphingosine (1)		
					Sphingomyelin (5)		
					Ceramide (3)		
Sphingolipid metabolism	Reactome	8	Glb1;Hexa; Hexb; Ctsa; Asah1;CerK; Sgpl1;Arsb	5	Glucosylceramide (4)	0,0001	0,00059
					Sphingosine (1)		
					Sphingomyelin (5)		
					Phosphatidylcholine (17)		
					Ceramide (3)		

Given are the metabolic pathways identified as significantly dysregulated in a joint inter-omic analysis performed with IMPaLA.

The analysis was performed with the 751 genes and 293 lipid metabolites significantly dysregulated.

The table shows the pathways, the source of the database, number and identity of genes and metabolites dysregulated per pathway, and p-value and q-value (false discovery rate) for each pathway.

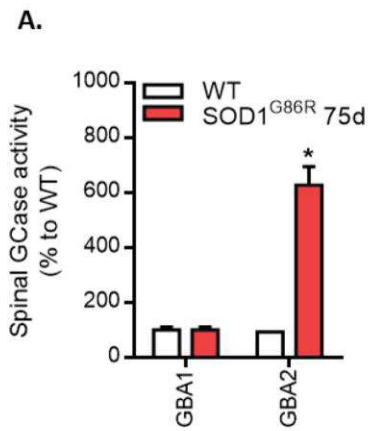
Supp Table 3. Compounds active on sphingolipid signalling pathways.

Target	Drug	Interaction	Investigated in ALS		Outcomes	FDA approved	Sources	References
			ALS	No				
CTSD	Insulin human	n/a	No	No		Yes	DrugBank	n/a
S1pr3	Pyrimethamine	n/a	Clinical	Clinical	Reduces SOD1 protein	Yes	GuideToPharmacology	(Lange et al., 2017) (Lange et al., 2013)
S1pr3	Pyridostigmine	n/a	No	No	n/a	Yes	GuideToPharmacology	n/a
S1pr3	Pyrilamine	n/a	No	No	n/a	Yes	GuideToPharmacology	n/a
S1pr3	Montelukast	n/a	No	No	n/a	Yes	GuideToPharmacology	n/a
S1pr3	Fingolimod phosphate	n/a	Preclinical Clinical	Preclinical Clinical	Beneficial in SOD1 mice Phase 2a	No	GuideToPharmacology	(Potenza et al., 2016) NCT01786174 *
Tnfrsfla	Pentoxifylline	antibody	Clinical	Clinical	Increase death risk	Yes	TTD	(Meininger et al., 2006)
Tnfrsfla	Adalimumab	antibody	No	No	n/a	Yes	TTD	n/a
Tnfrsfla	Certolizumab pegol	antibody	No	No	n/a	Yes	TTD	n/a
Tnfrsfla	Etanercept	antibody	No	No	n/a	Yes	TTD	n/a
Tnfrsfla	Golimumab	antibody	No	No	n/a	Yes	TTD	n/a
Tnfrsfla	Infliximab	antibody	No	No	n/a	Yes	TTD	n/a
Tnfrsfla	Pirfenidone	inhibitor	No	No	n/a	Yes	TTD	n/a
Tnfrsfla	Celastrol	n/a	Preclinical	Preclinical	Beneficial in SOD1 mice	No	TTD	(Kiaei et al., 2005)
Tnfrsfla	Lenalidomide	inhibitor	Preclinical	Preclinical	Beneficial in SOD1 mice	Yes	TTD	(Kiaei et al., 2006) (Neymotin et al., 2009)
Tnfrsfla	Thalidomide	inhibitor	Preclinical Clinical	Preclinical Clinical	Beneficial in SOD1 No benefit	Yes	TTD	(Kiaei et al., 2006) (Stommel et al., 2009)

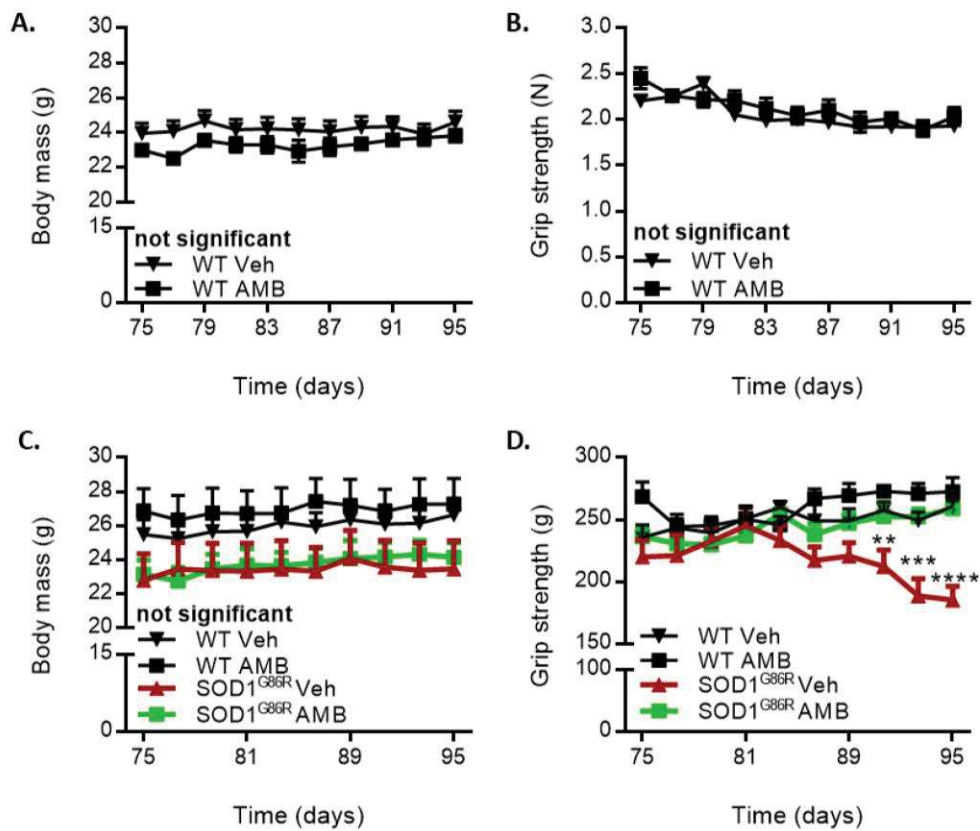
* NCT01786174 refers to the ID provided by clinicaltrials.gov

Given is the result of a DGtdb analysis with the genes coding for proteins involved in the signalling pathway of sphingolipids, and found dysregulated in SOD1 G86R mice.

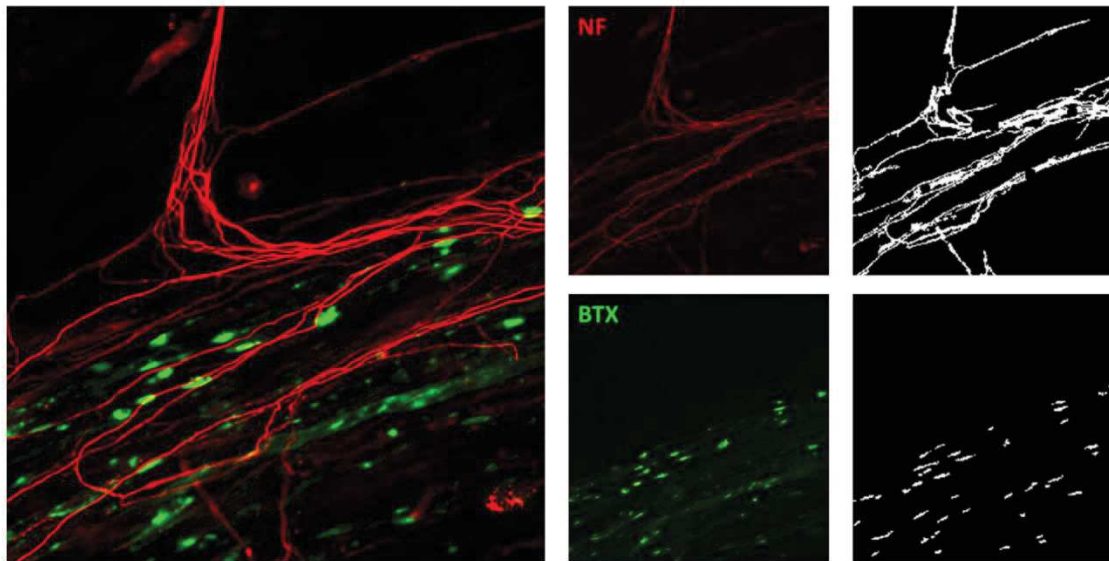
B. Données supplémentaires de la publication 2



Supplementary figure 1. Tissue GBA1 and GBA2 activities in presymptomatic SOD1^{G86R} mice. (A) Basal GCase activity in spinal cord SOD1^{G86R} and WT mice at 75d (n=3/group, *p<0,05).

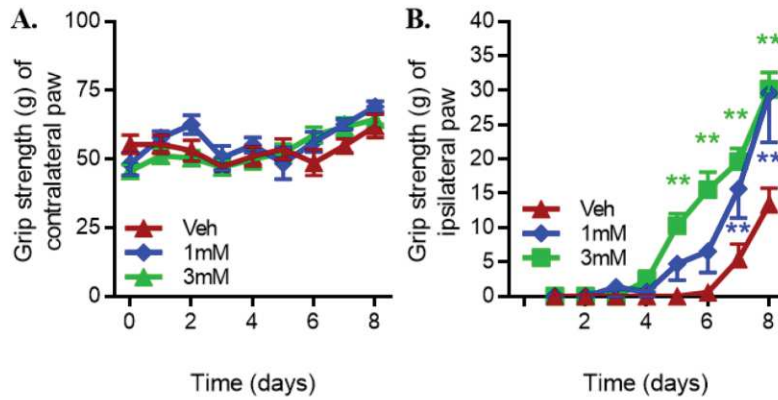


Supplementary figure 2. AMB improves motor functions and delays disease onset in pre-symptomatic SOD1^{G86R} mice. (A) Body mass evolution in WT mice after AMB treatment (not significant, n=7-8/group). **(B)** Muscle strength evolution in WT mice after AMB treatment (not significant, n=7-8/group). **(C)** Body mass evolution in other cohort of SOD1^{G86R} mice and WT mice (not significant, n=5/group). **(D)** Muscle strength evolution in other cohort of SOD1^{G86R} mice and WT mice (SOD1^{G86R} Veh vs AMB, **p<0,01; ***p<0,001, n=5/group)



Supplementary figure 3. Computer-assisted analysis of neurite network and NMJs, visualized by the clusterization of nAChRs.

Example of signal segmentation from a picture of a co-culture of spinal explant and human myoblasts (left). Neurofilament is shown in red and nAChRs clusters are shown in green. The segmentation of the neurite network (upper right panel) or the segmentation of the NMJs (lower right panel) is automatically performed by the software (MetaXpress, Molecular Device).



Supplementary figure 4. AMB improves in vivo axonal plasticity and nerve regeneration after sciatic nerve crush study in an other non-transgenic mice. (A) Muscle strength of contralateral hind paws (n=7-10/group, not significant). **(B)** Muscle strength of ipsilateral hind paws (n=7-10/group, **p<0,0001, green stars: AMB 3mM versus vehicle; blue stars: AMB 1mM versus vehicle).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., Hamada, C., Tanaka, M., Akimoto, M., Nakamura, K., et al. (2017a). 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.
- Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., Hamada, C., Tanaka, M., Akimoto, M., Nakamura, K., et al. (2017b). 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.
- Agosta, F., Chiò, A., Cosottini, M., De Stefano, N., Falini, A., Mascalchi, M., Rocca, M.A., Silani, V., Tedeschi, G., and Filippi, M. (2010). The Present and the Future of Neuroimaging in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* *31*, 1769–1777.
- Ahmad, S.T., Sweeney, S.T., Lee, J.-A., Sweeney, N.T., and Gao, F.-B. (2009). Genetic screen identifies serpin5 as a regulator of the toll pathway and CHMP2B toxicity associated with frontotemporal dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 12168–12173.
- Ahmed, R.M., MacMillan, M., Bartley, L., Halliday, G.M., Kiernan, M.C., Hodges, J.R., and Piguet, O. (2014). Systemic metabolism in frontotemporal dementia. *Neurology* *83*, 1812–1818.
- Ahmed, R.M., Caga, J., Devenney, E., Hsieh, S., Bartley, L., Highton-Williamson, E., Ramsey, E., Zoing, M., Halliday, G.M., Piguet, O., et al. (2016a). Cognition and eating behavior in amyotrophic lateral sclerosis: effect on survival. *J Neurol* *263*, 1593–1603.
- Ahmed, R.M., Irish, M., Piguet, O., Halliday, G.M., Ittner, L.M., Farooqi, S., Hodges, J.R., and Kiernan, M.C. (2016b). Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: distinct and overlapping changes in eating behaviour and metabolism. *The Lancet Neurology* *15*, 332–342.
- Ahmed, R.M., Irish, M., Henning, E., Dermody, N., Bartley, L., Kiernan, M.C., Piguet, O., Farooqi, S., and Hodges, J.R. (2016c). Assessment of Eating Behavior Disturbance and Associated Neural Networks in Frontotemporal Dementia. *JAMA Neurol* *73*, 282.
- Ahmed, R.M., Highton-Williamson, E., Caga, J., Thornton, N., Ramsey, E., Zoing, M., Kim, W.S., Halliday, G.M., Piguet, O., Hodges, J.R., et al. (2017). Lipid Metabolism and Survival Across the Frontotemporal Dementia-Amyotrophic Lateral Sclerosis Spectrum: Relationships to Eating Behavior and Cognition. *JAD* *61*, 773–783.
- Al-Chalabi, A., and Hardiman, O. (2013). The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* *9*, 617–628.
- Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Chandran, S., Chio, A., Corcia, P., Couratier, P., Danielsson, O., de Carvalho, M., Desnuelle, C., Grehl, T., et al. (2017). July 2017 ENCALs statement on edaravone. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* *18*, 471–474.
- Alers, S., Loffler, A.S., Wesselborg, S., and Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Molecular and Cellular Biology* *32*, 2–11.
- Alexianu, M.E., Kozovska, M., and Appel, S.H. (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* *57*, 1282–1289.
- Allan, E.R.O., Campden, R.I., Ewanchuk, B.W., Taylor, P., Balce, D.R., McKenna, N.T., Greene, C.J., Warren, A.L., Reinheckel, T., and Yates, R.M. (2017). A role for cathepsin Z in neuroinflammation provides mechanistic support for an epigenetic risk factor in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* *14*, 103.
- Allen, J.A., Halverson-Tamboli, R.A., and Rasenick, M.M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* *8*, 128–140.
- Alshikho, M.J., Zürcher, N.R., Loggia, M.L., Cernasov, P., Reynolds, B., Pijanowski, O., Chonde, D.B., Izquierdo Garcia, D., Mainero, C., Catana, C., et al. (2018). Integrated magnetic resonance imaging and [¹¹C]-PBR28 positron emission tomographic imaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* *83*, 1186–1197.
- Ambrosi, G., Ghezzi, C., Zangaglia, R., Levandis, G., Pacchetti, C., and Blandini, F. (2015). Amroxol-induced rescue of defective glucocerebrosidase is associated with increased LIMP-2 and saposin C levels in GBA1 mutant Parkinson's disease cells. *Neurobiology of Disease* *82*, 235–242.
- Andersen, P.M. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep* *6*, 37–46.
- Appel, S.H. (2011). The Microglial-Motoneuron dialogue in ALS. *5*.
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., et al. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar

- degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351, 602–611.
- Arakawa, T., Ejima, D., Kita, Y., and Tsumoto, K. (2006). Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1764, 1677–1687.
- Armon, C. (2009). Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. 6.
- Arnold, A., Edgren, D.C., and Palladino, V.S. (1953). Amyotrophic lateral sclerosis; fifty cases observed on Guam. *J. Nerv. Ment. Dis.* 117, 135–139.
- Arrant, A.E., Roth, J.R., Boyle, N.R., Kashyap, S.N., Hoffmann, M.Q., Murchison, C.F., Ramos, E.M., Nana, A.L., Spina, S., Grinberg, L.T., et al. (2019). Impaired β -glucocerebrosidase activity and processing in frontotemporal dementia due to progranulin mutations. *Acta Neuropathol Commun* 7, 218.
- Atkin, J.D., Scott, R.L., West, J.M., Lopes, E., Quah, A.K.J., and Cheema, S.S. (2005). Properties of slow- and fast-twitch muscle fibres in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscular Disorders* 15, 377–388.
- Atkin, J.D., Farg, M.A., Walker, A.K., McLean, C., Tomas, D., and Horne, M.K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 30, 400–407.
- Aureli, M., Loberto, N., Lanteri, P., Chigorno, V., Prinetti, A., and Sonnino, S. (2011). Cell surface sphingolipid glycohydrolases in neuronal differentiation and aging in culture: Neuronal plasma membrane sphingolipid glycohydrolases. *Journal of Neurochemistry* 116, 891–899.
- Aureli, M., Gritti, A., Bassi, R., Loberto, N., Ricca, A., Chigorno, V., Prinetti, A., and Sonnino, S. (2012). Plasma Membrane-Associated Glycohydrolases Along Differentiation of Murine Neural Stem Cells. *Neurochem Res* 37, 1344–1354.
- Aureli, M., Samarani, M., Murdica, V., Mauri, L., Loberto, N., Bassi, R., Prinetti, A., and Sonnino, S. (2014). Gangliosides and Cell Surface Ganglioside Glycohydrolases in the Nervous System. In *Glycobiology of the Nervous System*, R.K. Yu, and C.-L. Schengrund, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 223–244.
- Ayers, J.I., Fromholt, S., Koch, M., DeBosier, A., McMahon, B., Xu, G., and Borchelt, D.R. (2014). Experimental transmissibility of mutant SOD1 motor neuron disease. *Acta Neuropathol* 128, 791–803.
- Babst, M. (1997). Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *The EMBO Journal* 16, 1820–1831.
- Babst, M. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *The EMBO Journal* 17, 2982–2993.
- Bachis, A., Rabin, S.J., Fiacco, M., and Mocchetti, I. (2002). Gangliosides prevent excitotoxicity through activation of TrkB receptor. *Neurotox Res* 4, 225–234.
- Bandyopadhyay, U., Nagy, M., Fenton, W.A., and Horwich, A.L. (2014). Absence of lipofuscin in motor neurons of SOD1-linked ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 11055–11060.
- Barmada, S.J., Serio, A., Arjun, A., Bilican, B., Daub, A., Ando, D.M., Tsvetkov, A., Pleiss, M., Li, X., Peisach, D., et al. (2014). Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. *Nat Chem Biol* 10, 677–685.
- Barrett, M.J., Giraldo, P., Capablo, J.L., Alfonso, P., Irun, P., Garcia-Rodriguez, B., Pocovi, M., and Pastores, G.M. (2013). Greater risk of parkinsonism associated with non-N370S GBA1 mutations. *J Inherit Metab Dis* 36, 575–580.
- Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiological Reviews* 81, 871–927.
- Baumer, D., Hilton, D., Paine, S.M.L., Turner, M.R., Lowe, J., Talbot, K., and Ansorge, O. (2010). Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations. *Neurology* 75, 611–618.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A.A., Siklos, L., McKercher, S.R., and Appel, S.H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 16021–16026.
- Beers, D.R., Zhao, W., Liao, B., Kano, O., Wang, J., Huang, A., Appel, S.H., and Henkel, J.S. (2011). Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 25, 1025–1035.
- Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Bouron, A., Sadoul, R., and Goldberg, Y. (2010). CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *Journal of Cell Science* 123, 2943–2954.

- Benajiba, L., Le Ber, I., Camuzat, A., Lacoste, M., Thomas-Anterion, C., Couratier, P., Legallic, S., Salachas, F., Hannequin, D., Decousus, M., et al. (2009). *TARDBP* mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol*. *65*, 470–473.
- Bendikov-Bar, I., Ron, I., Filocamo, M., and Horowitz, M. (2011). Characterization of the ERAD process of the L444P mutant glucocerebrosidase variant. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* *46*, 4–10.
- Bennett, C.F., Krainer, A.R., and Cleveland, D.W. (2019). Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* *42*, 385–406.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N. Engl. J. Med.* *330*, 585–591.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., Delumeau, J.C., Bejuit, R., Truffinet, P., and Meininger, V. (2002). A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology* *249*, 609–615.
- Berlowitz, D.J., Howard, M.E., Fiore, J.F., Vander Hoorn, S., O'Donoghue, F.J., Westlake, J., Smith, A., Beer, F., Mathers, S., and Talman, P. (2016). Identifying who will benefit from non-invasive ventilation in amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease in a clinical cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *87*, 280–286.
- Beutler, E., and Gelbart, T. (1996). Glucocerebrosidase (Gaucher disease). *7*.
- Beutler, E., Beutler, L., and West, C. (2004). Mutations in the gene encoding cytosolic β -glucosidase in Gaucher disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* *144*, 65–68.
- Biegstraaten, M., Mengel, E., Maródi, L., Petakov, M., Niederau, C., Giraldo, P., Hughes, D., Mrcic, M., Mehta, A., Hollak, C.E.M., et al. (2010). Peripheral neuropathy in adult type 1 Gaucher disease: a 2-year prospective observational study. *Brain* *133*, 2909–2919.
- Blair, I.P., Williams, K.L., Warraich, S.T., Durnall, J.C., Thoeng, A.D., Manavis, J., Blumbergs, P.C., Vucic, S., Kiernan, M.C., and Nicholson, G.A. (2010). FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* *81*, 639–645.
- Blanz, J., and Saftig, P. (2016). Parkinson's disease: acid-glucocerebrosidase activity and alpha-synuclein clearance. *J. Neurochem.* *139*, 198–215.
- Blanz, J., Zunke, F., Markmann, S., Damme, M., Bräulke, T., Saftig, P., and Schwake, M. (2015). Mannose 6-phosphate-independent Lysosomal Sorting of LIMP-2: Mannose 6-phosphate-independent Lysosomal Sorting of LIMP-2. *Traffic* *16*, 1127–1136.
- Blasco, H., Corcia, P., Pradat, P.-F., Bocca, C., Gordon, P.H., Veyrat-Durebex, C., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Moreau, C., Devos, D., et al. (2013). Metabolomics in Cerebrospinal Fluid of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Untargeted Approach via High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* *12*, 3746–3754.
- Blasco, H., Veyrat-Durebex, C., Bocca, C., Patin, F., Vourc'h, P., Kouassi Nzoughe, J., Lenaers, G., Andres, C.R., Simard, G., Corcia, P., et al. (2017). Lipidomics Reveals Cerebrospinal-Fluid Signatures of ALS. *Sci Rep* *7*, 17652.
- Blasco, H., Patin, F., Descat, A., Garçon, G., Corcia, P., Gelé, P., Lenglet, T., Bede, P., Meininger, V., Devos, D., et al. (2018). A pharmaco-metabolomics approach in a clinical trial of ALS: Identification of predictive markers of progression. *PLoS ONE* *13*, e0198116.
- Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. *Science* *312*, 1389–1392.
- Boland, B., Yu, W.H., Corti, O., Mollereau, B., Henriques, A., Bezard, E., Pastores, G.M., Rubinsztein, D.C., Nixon, R.A., Duchon, M.R., et al. (2018). Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov* *17*, 660–688.
- Boot, R.G., Verhoek, M., Donker-Koopman, W., Strijland, A., van Marle, J., Overkleeft, H.S., Wennekes, T., and Aerts, J.M.F.G. (2007). Identification of the Non-lysosomal Glucosylceramidase as β -Glucosidase 2. *J. Biol. Chem.* *282*, 1305–1312.
- Borrioni, B., Bonvicini, C., Alberici, A., Buratti, E., Agosti, C., Archetti, S., Papetti, A., Stuani, C., Di Luca, M., Gennarelli, M., et al. (2009). Mutation within *TARDBP* leads to Frontotemporal Dementia without motor neuron disease. *Hum. Mutat.* *30*, E974–E983.
- Bose, J.K., Wang, I.-F., Hung, L., Tarn, W.-Y., and Shen, C.-K.J. (2008). TDP-43 Overexpression Enhances Exon 7 Inclusion during the Survival of Motor Neuron Pre-mRNA Splicing. *J. Biol. Chem.* *283*, 28852–28859.

- Bossù, P., Salani, F., Alberici, A., Archetti, S., Bellelli, G., Galimberti, D., Scarpini, E., Spalletta, G., Caltagirone, C., Padovani, A., et al. (2011). Loss of function mutations in the progranulin gene are related to pro-inflammatory cytokine dysregulation in frontotemporal lobar degeneration patients. *J Neuroinflammation* 8, 65.
- Bourke, S.C., Tomlinson, M., Williams, T.L., Bullock, R.E., Shaw, P.J., and Gibson, G.J. (2006). Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. 8.
- Bouscary, A., Quessada, C., Mosbach, A., Callizot, N., Spedding, M., Loeffler, J.-P., and Henriques, A. (2019). Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Functions and Extends Survival in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Pharmacol.* 10, 883.
- Bouteloup, C., Desport, J.-C., Clavelou, P., Guy, N., Derumeaux-Burel, H., Ferrier, A., and Couratier, P. (2009). Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J Neurol* 256, 1236–1242.
- Boxer, A.L., Knopman, D.S., Kaufer, D.I., Grossman, M., Onyike, C., Graf-Radford, N., Mendez, M., Kerwin, D., Lerner, A., Wu, C.-K., et al. (2013). Memantine in patients with frontotemporal lobar degeneration: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* 12, 149–156.
- Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., et al. (2013). Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 215–290.
- Bristol, L.A., and Rothstein, J.D. (1996). Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann Neurol.* 39, 676–679.
- Brooks, B.R. (1994). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial “Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis” workshop contributors. *J. Neurol. Sci.* 124 Suppl, 96–107.
- Brooks, D.A. (2007). Getting into the fold. *Nat Chem Biol* 3, 84–85.
- de Brouwer, G., Fick, A., Harvey, B.H., and Wolmarans, D.W. (2019). A critical inquiry into marble-burying as a preclinical screening paradigm of relevance for anxiety and obsessive–compulsive disorder: Mapping the way forward. *Cogn Affect Behav Neurosci* 19, 1–39.
- Brujin, L.I. (1998). Aggregation and Motor Neuron Toxicity of an ALS-Linked SOD1 Mutant Independent from Wild-Type SOD1. *Science* 281, 1851–1854.
- Brujin, L.I., Miller, T.M., and Cleveland, D.W. (2004). UNRAVELING THE MECHANISMS INVOLVED IN MOTOR NEURON DEGENERATION IN ALS. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 723–749.
- Burke, D.G., Rahim, A.A., Waddington, S.N., Karlsson, S., Enquist, I., Bhatia, K., Mehta, A., Vellodi, A., and Heales, S. (2013). Erratum to: Increased glucocerebrosidase (GBA) 2 activity in GBA1 deficient mice brains and in Gaucher leucocytes. *J Inherit Metab Dis* 36, 1089–1089.
- Burré, J., Sharma, M., and Südhof, T.C. (2018). Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8, a024091.
- Byrne, M.C., Ledeen, R.W., Roisen, F.J., Yorke, G., and Sclafani, J.R. (1983). Ganglioside-Induced Neuritogenesis: Verification That Gangliosides Are the Active Agents, and Comparison of Molecular Species. *J Neurochem* 41, 1214–1222.
- Cagnin, A., Rossor, M., Sampson, E.L., MacKinnon, T., and Banati, R.B. (2004). In vivo detection of microglial activation in frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 56, 894–897.
- Cai, H. (2005). Loss of ALS2 Function Is Insufficient to Trigger Motor Neuron Degeneration in Knock-Out Mice But Predisposes Neurons to Oxidative Stress. *Journal of Neuroscience* 25, 7567–7574.
- Cairns, N.J., and Ghoshal, N. (2010). FUS: A new actor on the frontotemporal lobar degeneration stage. *Neurology* 74, 354–356.
- Campagna, J.A., and Fallon, J. (2006). Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* 138, 123–132.
- Campden, R.I., and Zhang, Y. (2019). The role of lysosomal cysteine cathepsins in NLRP3 inflammasome activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 670, 32–42.
- Canto, M.C.D., and Gurney, M.E. (1997). A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica* 93, 537–550.

- Cedarbaum, J.M., Stambler, N., Malta, E., Fuller, C., Hilt, D., Thurmond, B., and Nakanishi, A. (1999). The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *Journal of the Neurological Sciences* 169, 13–21.
- Chakrabarti, A., Chen, A.W., and Varner, J.D. (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 2777–2793.
- Chance, P.F., Rabin, B.A., Ryan, S.G., Ding, Y., Scavina, M., Crain, B., Griffin, J.W., and Cornblath, D.R. (1998). Linkage of the Gene for an Autosomal Dominant Form of Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis to Chromosome 9q34. *Am. J. Hum. Genet.* 8.
- Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., Tian, G., Ilieva, H., Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Wong, P.C., and Lin, C.G. (2008). Messenger RNA Oxidation Occurs Early in Disease Pathogenesis and Promotes Motor Neuron Degeneration in ALS. *PLoS ONE* 3, e2849.
- Chassefeyre, R., Martinez-Hernandez, J., Bertaso, F., Bouquier, N., Blot, B., Laporte, M., Fraboulet, S., Coute, Y., Devoy, A., Isaacs, A.M., et al. (2015). Regulation of Postsynaptic Function by the Dementia-Related ESCRT-III Subunit CHMP2B. *Journal of Neuroscience* 35, 3155–3173.
- Chattopadhyay, M., Durazo, A., Sohn, S.H., Strong, C.D., Gralla, E.B., Whitelegge, J.P., and Valentine, J.S. (2008). Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 18663–18668.
- Chen, Y., Liu, H., Guan, Y., Wang, Q., Zhou, F., Jie, L., Ju, J., Pu, L., Du, H., and Wang, X. (2015). The altered autophagy mediated by TFEb in animal and cell models of amyotrophic lateral sclerosis. 14.
- Chen, Y.-Z., Bennett, C.L., Huynh, H.M., Blair, I.P., Puls, I., Irobi, J., Dierick, I., Abel, A., Kennerson, M.L., Rabin, B.A., et al. (2004). DNA/RNA Helicase Gene Mutations in a Form of Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS4). *The American Journal of Human Genetics* 74, 1128–1135.
- Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R.J., and Schnaar, R.L. (2000). A Functional Role for Complex Gangliosides: Motor Deficits in GM2/GD2 Synthase Knockout Mice. *Experimental Neurology* 166, 227–234.
- Childers, W., Fan, R., Martinez, R., Colussi, D.J., Melenski, E., Liu, Y., Gordon, J., Abou-Gharbia, M., and Jacobson, M.A. (2020). Novel compounds that reverse the disease phenotype in Type 2 Gaucher disease patient-derived cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 30, 126806.
- Chio, A. (2005). Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 128, 472–476.
- Chio, A., Calvo, A., Moglia, C., Mazzini, L., Mora, G., and PARALS study group (2011). Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 82, 740–746.
- Chio, A., Borghero, G., Restagno, G., Mora, G., Drepper, C., Traynor, B.J., Sendtner, M., Brunetti, M., Ossola, I., Calvo, A., et al. (2012). Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72. *Brain* 135, 784–793.
- Chiò, A., Logroscino, G., Traynor, B.J., Collins, J., Simeone, J.C., Goldstein, L.A., and White, L.A. (2013). Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. *Neuroepidemiology* 41, 118–130.
- Cipolat Mis, M.S., Brajkovic, S., Frattini, E., Di Fonzo, A., and Corti, S. (2016). Autophagy in motor neuron disease: Key pathogenetic mechanisms and therapeutic targets. *Molecular and Cellular Neuroscience* 72, 84–90.
- Citterio, A., Arnoldi, A., Panzeri, E., D’Angelo, M.G., Filosto, M., Dilena, R., Arrigoni, F., Castelli, M., Maghini, C., Germiniasi, C., et al. (2014). Mutations in CYP2U1, DDHD2 and GBA2 genes are rare causes of complicated forms of hereditary spastic paraparesis. *J Neurol* 261, 373–381.
- Clayton, E.L., Mizielińska, S., Edgar, J.R., Nielsen, T.T., Marshall, S., Norona, F.E., Robbins, M., Damirji, H., Holm, I.E., Johannsen, P., et al. (2015). Frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutation is characterised by neuronal lysosomal storage pathology. *Acta Neuropathol* 130, 511–523.
- Clayton, E.L., Mancuso, R., Nielsen, T.T., Mizielińska, S., Holmes, H., Powell, N., Norona, F., Overgaard Larsen, J., Milioto, C., Wilson, K.M., et al. (2017). Early microgliosis precedes neuronal loss and behavioural impairment in mice with a frontotemporal dementia-causing CHMP2B mutation. *Hum. Mol. Genet.* ddx003.
- Clayton, E.L., Milioto, C., Muralidharan, B., Norona, F.E., Edgar, J.R., Soriano, A., Jafar-nejad, P., Rigo, F., Collinge, J., and Isaacs, A.M. (2018). Frontotemporal dementia causative CHMP2B impairs neuronal endolysosomal traffic-rescue by *TMEM106B* knockdown. *Brain* 141, 3428–3442.
- Cole, R.N., Ghazanfari, N., Ngo, S.T., Gervásio, O.L., Reddel, S.W., and Phillips, W.D. (2010). Patient autoantibodies deplete postsynaptic muscle-specific kinase leading to disassembly of the ACh receptor scaffold and

- myasthenia gravis in mice: Actions of MuSK autoantibodies in experimental myasthenia gravis. *The Journal of Physiology* 588, 3217–3229.
- Coon, E.A., Sorenson, E.J., Whitwell, J.L., Knopman, D.S., and Josephs, K.A. (2011). Predicting survival in frontotemporal dementia with motor neuron disease. *Neurology* 76, 1886–1892.
- Corcia, P., Tauber, C., Vercoillie, J., Arlicot, N., Prunier, C., Praline, J., Nicolas, G., Venel, Y., Hommet, C., Baulieu, J.-L., et al. (2012). Molecular Imaging of Microglial Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* 7, e52941.
- Couratier, P., Corcia, P., Lautrette, G., Nicol, M., Preux, P.-M., and Marin, B. (2016). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Revue Neurologique* 172, 37–45.
- Coutinho, M.F., Prata, M.J., and Alves, S. (2012). A shortcut to the lysosome: The mannose-6-phosphate-independent pathway. *Molecular Genetics and Metabolism* 107, 257–266.
- Cox, P.A., and Sacks, O.W. (2002). Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 58, 956–959.
- Cox, L.E., Ferraiuolo, L., Goodall, E.F., Heath, P.R., Higginbottom, A., Mortiboys, H., Hollinger, H.C., Hartley, J.A., Brockington, A., Burness, C.E., et al. (2010). Mutations in CHMP2B in Lower Motor Neuron Predominant Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *PLoS ONE* 5, e9872.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., and Bergman, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 5074–5078.
- Coyle-Gilchrist, I.T.S., Dick, K.M., Patterson, K., Vázquez Rodríguez, P., Wehmann, E., Wilcox, A., Lansdall, C.J., Dawson, K.E., Wiggins, J., Mead, S., et al. (2016). Prevalence, characteristics, and survival of frontotemporal lobar degeneration syndromes. *Neurology* 86, 1736–1743.
- Crabtree, D., Dodson, M., Ouyang, X., Boyer-Guittaut, M., Liang, Q., Ballestas, M.E., Fineberg, N., and Zhang, J. (2014). Over-expression of an inactive mutant cathepsin D increases endogenous alpha-synuclein and cathepsin B activity in SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 128, 950–961.
- Cudkovicz, M.E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.E., Chin, W., Geller, B., Hayden, D.L., Schoenfeld, D.A., Hosler, B.A., Horvitz, H.R., and Brown, R.H. (1997). Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 41, 210–221.
- Cui, X., Zuo, P., Zhang, Q., Li, X., Hu, Y., Long, J., Packer, L., and Liu, J. (2006). Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: Protective effects of R- α -lipoic acid. *J. Neurosci. Res.* 84, 647–654.
- Cutler, R.G., Pedersen, W.A., Camandola, S., Rothstein, J.D., and Mattson, M.P. (2002). Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 52, 448–457.
- Czarnecki, K., Kumar, N., and Josephs, K.A. (2008). Parkinsonism and tardive antecollis in frontotemporal dementia - increased sensitivity to newer antipsychotics?: Parkinsonism and tardive antecollis in frontotemporal dementia. *European Journal of Neurology* 15, 199–201.
- Da Silva, J.S., Hasegawa, T., Miyagi, T., Dotti, C.G., and Abad-Rodriguez, J. (2005). Asymmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. *Nat Neurosci* 8, 606–615.
- Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1995). Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.* 676, 25–40.
- D'Angelo, G., Capasso, S., Sticco, L., and Russo, D. (2013a). Glycosphingolipids: synthesis and functions. *FEBS J* 280, 6338–6353.
- D'Angelo, G., Uemura, T., Chuang, C.-C., Polishchuk, E., Santoro, M., Ohvo-Rekilä, H., Sato, T., Di Tullio, G., Varriale, A., D'Auria, S., et al. (2013b). Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi. *Nature* 501, 116–120.
- Dastsooz, H., Alipour, M., Mohammadi, S., Kamgarpour, F., Dehghanian, F., and Fardaei, M. (2018). Identification of mutations in HEXA and HEXB in Sandhoff and Tay-Sachs diseases: a new large deletion caused by Alu elements in HEXA. *Hum Genome Var* 5, 18003.
- Deforges, S., Branchu, J., Biondi, O., Grondard, C., Pariset, C., Lécolle, S., Lopes, P., Vidal, P.-P., Chanoine, C., and Charbonnier, F. (2009). Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Motoneuron activation and neuroprotection in ALS mice. *The Journal of Physiology* 587, 3561–3572.

- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256.
- Dekker, N., Voorn-Brouwer, T., Verhoek, M., Wennekes, T., Narayan, R.S., Speijer, D., Hollak, C.E.M., Overkleeft, H.S., Boot, R.G., and Aerts, J.M.F.G. (2011). The cytosolic β -glucosidase GBA3 does not influence type 1 Gaucher disease manifestation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 46, 19–26.
- Delezie, J., Weihrauch, M., Maier, G., Tejero, R., Ham, D.J., Gill, J.F., Karrer-Cardel, B., Rüegg, M.A., Tabares, L., and Handschin, C. (2019). BDNF is a mediator of glycolytic fiber-type specification in mouse skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 16111–16120.
- Deng, H.-X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.-Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P., et al. (1993). Amyotrophic Lateral Sclerosis and Structural Defects in Cu,Zn Superoxide Dismutase. 261, 6.
- Dentel, C., Palamiuc, L., Henriques, A., Lannes, B., Spreux-Varoquaux, O., Gutknecht, L., René, F., Echaniz-Laguna, A., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Lesch, K.P., et al. (2013). Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* 136, 483–493.
- Derave, W., Van Den Bosch, L., Lemmens, G., Eijnde, B.O., Robberecht, W., and Hespel, P. (2003). Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. *Neurobiology of Disease* 13, 264–272.
- Desport, J.C., Preux, P.M., Truong, T.C., Vallat, J.M., Sautereau, D., and Couratier, P. (1999). Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. *Neurology* 53, 1059–1059.
- Desport, J.C., Preux, P.M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J.M., Beaufrère, B., and Couratier, P. (2001). Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74, 328–334.
- Desseille, C., Deforges, S., Biondi, O., Houdebine, L., D’amico, D., Lamazière, A., Caradeuc, C., Bertho, G., Bruneteau, G., Weill, L., et al. (2017). Specific Physical Exercise Improves Energetic Metabolism in the Skeletal Muscle of Amyotrophic-Lateral- Sclerosis Mice. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 332.
- DeVos, S.L., and Miller, T.M. (2013). Antisense Oligonucleotides: Treating Neurodegeneration at the Level of RNA. *Neurotherapeutics* 10, 486–497.
- Di Biase, E., Lunghi, G., Fazzari, M., Maggioni, M., Pomè, D.Y., Valsecchi, M., Samarani, M., Fato, P., Ciampa, M.G., Prioni, S., et al. (2020). Gangliosides in the differentiation process of primary neurons: the specific role of GM1-oligosaccharide. *Glycoconj J* 37, 329–343.
- Distad, B.J., Meekins, G.D., Liou, L.L., Weiss, M.D., Carter, G.T., and Miller, R.G. (2008). Drug Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* 19, 633–651.
- Dixit, P.V., Sahu, R., and Mishra, D.K. (2020). Marble-burying behavior test as a murine model of compulsive-like behavior. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 102, 106676.
- Dobson, R. (2002). An exceptional man. *BMJ* 324, 1478–1478.
- Dodge, J.C. (2017). Lipid Involvement in Neurodegenerative Diseases of the Motor System: Insights from Lysosomal Storage Diseases. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 356.
- Dodge, J.C., Treleaven, C.M., Pacheco, J., Cooper, S., Bao, C., Abraham, M., Cromwell, M., Sardi, S.P., Chuang, W.-L., Sidman, R.L., et al. (2015). Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 8100–8105.
- Dorst, J., Kühnlein, P., Hendrich, C., Kassubek, J., Sperfeld, A.D., and Ludolph, A.C. (2011). Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 258, 613–617.
- Dorst, J., Cypionka, J., and Ludolph, A.C. (2013). High-caloric food supplements in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: A prospective interventional study. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 14, 533–536.
- Dorst, J., Ludolph, A.C., and Huebers, A. (2018). Disease-modifying and symptomatic treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 11, 175628561773473.
- Douville, R., Liu, J., Rothstein, J., and Nath, A. (2011). Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 69, 141–151.
- Duchemin, A.-M., Ren, Q., Mo, L., Neff, N.H., and Hadjiconstantinou, M. (2002). GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain: GM1 activates Trk and Erk in brain. *Journal of Neurochemistry* 81, 696–707.

- Duclert, A., and Changeux, J.P. (1995). Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiological Reviews* 75, 339–368.
- Dupuis, L., de Tapia, M., René, F., Lutz-Bucher, B., Gordon, J.W., Mercken, L., Pradier, L., and Loeffler, J.-P. (2000). Differential Screening of Mutated SOD1 Transgenic Mice Reveals Early Up-Regulation of a Fast Axonal Transport Component in Spinal Cord Motor Neurons. *Neurobiology of Disease* 7, 274–285.
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.-L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Pradat, P.-F., Lacomblez, L., Seihlan, D., Prinjha, R., Walsh, F.S., et al. (2002). Nogo Provides a Molecular Marker for Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiology of Disease* 10, 358–365.
- Dupuis, L., Scala, F., Rene, F., Tapia, M., Oudart, H., Pradat, P.-F., Meininger, V., and Loeffler, J.-P. (2003). Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB j.* 17, 1–19.
- Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., de Aguilar, J.-L.G., and Loeffler, J.-P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 11159–11164.
- Dupuis, L., Corcia, P., and Fergani, A. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. 6.
- Dupuis, L., Pradat, P.-F., Ludolph, A.C., and Loeffler, J.-P. (2011). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology* 10, 75–82.
- Dvir, H., Harel, M., McCarthy, A.A., Toker, L., Silman, I., Futerman, A.H., and Sussman, J.L. (2003). X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep* 4, 704–709.
- van Echten-Deckert, G., and Herget, T. (2006). Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 1978–1994.
- Ekberg, J., Jayamanne, A., Vaughan, C.W., Aslan, S., Thomas, L., Mould, J., Drinkwater, R., Baker, M.D., Abrahamsen, B., Wood, J.N., et al. (2006). O-conotoxin MrVIB selectively blocks Nav1.8 sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 17030–17035.
- El Oussini, H., Scekcic-Zahirovic, J., Vercruyssen, P., Marques, C., Dirrig-Grosch, S., Dieterlé, S., Picchiarelli, G., Sinniger, J., Rouaux, C., and Dupuis, L. (2017). Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis: Serotonin Neurons in ALS. *Ann Neurol.* 82, 444–456.
- Erkkinen, M.G., Kim, M.-O., and Geschwind, M.D. (2018). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a033118.
- van Es, M.A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R.J., Veldink, J.H., and van den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 390, 2084–2098.
- Evers, B.M., Rodriguez-Navas, C., Tesla, R.J., Prange-Kiel, J., Wasser, C.R., Yoo, K.S., McDonald, J., Cenik, B., Ravenscroft, T.A., Plattner, F., et al. (2017). Lipidomic and Transcriptomic Basis of Lysosomal Dysfunction in Progranulin Deficiency. *Cell Reports* 20, 2565–2574.
- Fan, J.-Q. (2003). A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends in Pharmacological Sciences* 24, 355–360.
- Farg, M.A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J.M., Yang, S., Atkinson, R.A.K., Levina, V., Halloran, M.A., Gleeson, P.A., Blair, I.P., Soo, K.Y., et al. (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Human Molecular Genetics* 23, 3579–3595.
- Faroongsarng, D., Rojpiulstit, M., Kasiwong, S., and Phadoongsombat, N. (2004). Ambroxol Lozenge Bioavailability. *Clin Drug Invest* 8.
- Fasano, C., Hiol, A., Miolan, J.-P., and Niel, J.-P. (2006). Les sphingolipides : vecteurs d'agents pathogènes et cause de maladies génétiques. *Med Sci (Paris)* 22, 411–415.
- Felix, K., Pairet, M., and Zimmermann, R. (1996). The antioxidative activity of the mucoregulatory agents: Ambroxol, bromhexine and N-acetyl-L-cysteine. A pulse radiolysis study. *Life Sciences* 59, 1141–1147.
- Ferreira, A., Busciglio, J., Landa, C., and Caceres, A. (1990). Ganglioside-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of high-molecular-weight MAP-2. *J. Neurosci.* 10, 293–302.
- Figlewicz, D.A., Garruto, R.M., Krizus, A., Yanagihara, R., and Rouleau, G.A. (1994). The Cu/Zn superoxide dismutase gene in ALS and parkinsonism-dementia of Guam. *Neuroreport* 5, 557–560.
- Filiano, A.J., Martens, L.H., Young, A.H., Warmus, B.A., Zhou, P., Diaz-Ramirez, G., Jiao, J., Zhang, Z., Huang, E.J., Gao, F.-B., et al. (2013). Dissociation of Frontotemporal Dementia-Related Deficits and Neuroinflammation in Progranulin Haploinsufficient Mice. *Journal of Neuroscience* 33, 5352–5361.

- Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerød, L., Fisher, E.M.C., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H., and Simonsen, A. (2007). Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *Journal of Cell Biology* 179, 485–500.
- Finger, E.C. (2016). Frontotemporal Dementias. *Continuum (Minneapolis)* 22, 464–489.
- Fischer, J., Pschorn, U., Vix, J.-M., Peil, H., Aicher, B., Müller, A., and de Mey, C. (2002). Efficacy and tolerability of ambroxol hydrochloride lozenges in sore throat. Randomised, double-blind, placebo-controlled trials regarding the local anaesthetic properties. *Arzneimittelforschung* 52, 256–263.
- Fishman, P.H. (1982). Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J. Membr. Biol.* 69, 85–97.
- Fitzgerald, K.C., O'Reilly, É.J., Falcone, G.J., McCullough, M.L., Park, Y., Kolonel, L.N., and Ascherio, A. (2014). Dietary ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid Intake and Risk for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol* 71, 1102.
- Flanagan-Steet, H., Matheny, C., Petrey, A., Parker, J., and Steet, R. (2016). Enzyme-specific differences in mannose phosphorylation between GlcNAc-1-phosphotransferase α and γ subunit deficient zebrafish support cathepsin proteases as early mediators of mucopolysaccharidosis pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1860, 1845–1853.
- Fois, G., Hobi, N., Felder, E., Ziegler, A., Miklavc, P., Walther, P., Radermacher, P., Haller, T., and Dietl, P. (2015). A new role for an old drug: Ambroxol triggers lysosomal exocytosis via pH-dependent Ca^{2+} release from acidic Ca^{2+} stores. *Cell Calcium* 58, 628–637.
- Forman, M.S. (2005). Transgenic Mouse Model of Tau Pathology in Astrocytes Leading to Nervous System Degeneration. *Journal of Neuroscience* 25, 3539–3550.
- Fukumoto, S., Mutoh, T., Hasegawa, T., Miyazaki, H., Okada, M., Goto, G., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K. (2000). *GD3* Synthase Gene Expression in PC12 Cells Results in the Continuous Activation of TrkA and ERK1/2 and Enhanced Proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 5832–5838.
- Funalot, B., Desport, J.-C., Sturtz, F., Camu, W., and Couratier, P. (2009). High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10, 113–117.
- Furukawa, K., Ohmi, Y., Ohkawa, Y., Tajima, O., and Furukawa, K. (2014). Glycosphingolipids in the regulation of the nervous system. *Adv Neurobiol* 9, 307–320.
- Furuya, S., Ono, K., and Hirabayashi, Y. (1995). Sphingolipid biosynthesis is necessary for dendrite growth and survival of cerebellar Purkinje cells in culture. *J. Neurochem.* 65, 1551–1561.
- Futerman, A.H., Sussman, J.L., Horowitz, M., Silman, I., and Zimran, A. (2004). New directions in the treatment of Gaucher disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 25, 147–151.
- Gaida, W., Klinder, K., Arndt, K., and Weiser, T. (2005). Ambroxol, a Nav1.8-preferring Na^{+} channel blocker, effectively suppresses pain symptoms in animal models of chronic, neuropathic and inflammatory pain. *Neuropharmacology* 49, 1220–1227.
- Gargiulo, S., Anzilotti, S., Coda, A.R.D., Gramanzini, M., Greco, A., Panico, M., Vinciguerra, A., Zannetti, A., Vicidomini, C., Dollé, F., et al. (2016). Imaging of brain TSPO expression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis with 18F-DPA-714 and micro-PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 43, 1348–1359.
- Garruto, R.M., Gajdusek, D.C., and Chen, K.-M. (1981). Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia among Filipino migrants to Guam. *Ann Neurol* 10, 341–350.
- Gascon, E., Lynch, K., Ruan, H., Almeida, S., Verheyden, J.M., Seeley, W.W., Dickson, D.W., Petrucelli, L., Sun, D., Jiao, J., et al. (2014). Alterations in microRNA-124 and AMPA receptors contribute to social behavioral deficits in frontotemporal dementia. *Nat Med* 20, 1444–1451.
- Ghanim, Guillot-Noel, L., Pasquier, F., Jornea, L., Deramecourt, V., Dubois, B., Ber, I., and Brice, A. (2010). CHMP2B mutations are rare in French families with frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol* 257, 2032–2036.
- Ghazi-Noori, S., Froud, K.E., Mizielińska, S., Powell, C., Smidak, M., Fernandez de Marco, M., O'Malley, C., Farmer, M., Parkinson, N., Fisher, E.M.C., et al. (2012). Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain* 135, 819–832.
- Ghoshal, N., Dearborn, J.T., Wozniak, D.F., and Cairns, N.J. (2012). Core features of frontotemporal dementia recapitulated in progranulin knockout mice. *Neurobiology of Disease* 45, 395–408.
- Gibbs, B.F., Wolff, H.H., and Grabbe, C. (1999). Effects of free radical scavengers on histamine release from human basophils stimulated by immunological and non-immunological secretagogues. *Inflammation Research* 48, 13–14.
- Gijssels, I., Van Langenhove, T., van der Zee, J., Slegers, K., Philtjens, S., Kleinberger, G., Janssens, J., Bettens, K., Van Cauwenbergh, C., Pereson, S., et al. (2012). A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-

- Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *The Lancet Neurology* 11, 54–65.
- Gillissen, A., Schirling, B., Jaworska, M., Bartling, A., Rasche, K., and Schultze-Werninghaus, G. (1997). Oxidant scavenger function of ambroxol in vitro: a comparison with N-acetylcysteine. 10.
- Gil-Navarro, S., Lomeña, F., Cot, A., Lladó, A., Montagut, N., Castellví, M., Bosch, B., Rami, L., Antonell, A., Balasa, M., et al. (2013). Decreased striatal dopamine transporter uptake in the non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia. *Eur J Neurol* n/a-n/a.
- Golimstok, A., Cámpora, N., Rojas, J.I., Fernandez, M.C., Elizondo, C., Soriano, E., and Cristiano, E. (2014). Cardiovascular risk factors and frontotemporal dementia: a case–control study. *Transl Neurodegener* 3, 13.
- Gonzalez Garay, A.G., Reveiz, L., Velasco Hidalgo, L., and Solis Galicia, C. (2014). Ambroxol for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Gonzalez-Carmona, M.A., Sandhoff, R., Tacke, F., Vogt, A., Weber, S., Canbay, A.E., Rogler, G., Sauerbruch, T., Lammert, F., and Yildiz, Y. (2012). Beta-glucosidase 2 knockout mice with increased glucosylceramide show impaired liver regeneration. *Liver Int* 32, 1354–1362.
- Gordon, T., Tyreman, N., Li, S., Putman, C.T., and Hegedus, J. (2010). Functional over-load saves motor units in the SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 37, 412–422.
- Gorno-Tempini, M.L., Dronkers, N.F., Rankin, K.P., Ogar, J.M., Phengrasamy, L., Rosen, H.J., Johnson, J.K., Weiner, M.W., and Miller, B.L. (2004). Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 55, 335–346.
- Gorno-Tempini, M.L., Brambati, S.M., Ginex, V., Ogar, J., Dronkers, N.F., Marcone, A., Perani, D., Garibotto, V., Cappa, S.F., and Miller, B.L. (2008). The logopenic/phonological variant of primary progressive aphasia. *Neurology* 71, 1227–1234.
- Gorno-Tempini, M.L., Hillis, A.E., Weintraub, S., Kertesz, A., Mendez, M., Cappa, S.F., Ogar, J.M., Rohrer, J.D., Black, S., Boeve, B.F., et al. (2011). Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 76, 1006–1014.
- Grange, J.M., and Snell, N.J.C. (1996). Activity of bromhexine and ambroxol, semi-synthetic derivatives of vasicine from the Indian shrub *Adhatoda vasica*, against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 50, 49–53.
- Greenwood, D.I. (2013). Nutrition Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nutr Clin Pract* 28, 392–399.
- Gresham, L.S., Molgaard, C.A., Golbeck, A.L., and Smith, R. (1986). Amyotrophic lateral sclerosis and occupational heavy metal exposure: a case-control study. *Neuroepidemiology* 5, 29–38.
- Groeneveld, G.J., Van Kan, H.J.M., Kalmijn, S., Veldink, J.H., Guchelaar, H.-J., Wokke, J.H.J., and Van den Berg, L.H. (2003). Riluzole serum concentrations in patients with ALS: Associations with side effects and symptoms. *Neurology* 61, 1141–1143.
- Gros-Louis, F., Kriz, J., Kabashi, E., McDearmid, J., Millicamps, S., Urushitani, M., Lin, L., Dion, P., Zhu, Q., Drapeau, P., et al. (2008). *Als2* mRNA splicing variants detected in KO mice rescue severe motor dysfunction phenotype in *Als2* knock-down zebrafish. *Human Molecular Genetics* 17, 2691–2702.
- Grundström, E., Lindholm, D., Johansson, A., Blennow, K., and Askmark, H. (2000). GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 11, 1781–1783.
- Gubbay, S.S., Kahana, E., Zilber, N., Cooper, G., Pintov, S., and Leibowitz, Y. (1985). Amyotrophic lateral sclerosis. A study of its presentation and prognosis. *J. Neurol.* 232, 295–300.
- Guenther, G.G., and Edinger, A.L. (2009). A new take on ceramide: Starving cells by cutting off the nutrient supply. *Cell Cycle* 8, 1122–1126.
- Guenther, G.G., Peralta, E.R., Rosales, K.R., Wong, S.Y., Siskind, L.J., and Edinger, A.L. (2008). Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 17402–17407.
- Gulbins, E., Palmada, M., Reichel, M., Lüth, A., Böhmer, C., Amato, D., Müller, C.P., Tischbirek, C.H., Groemer, T.W., Tabatabai, G., et al. (2013). Acid sphingomyelinase–ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nat Med* 19, 934–938.
- Guo, H. (2003). Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Human Molecular Genetics* 12, 2519–2532.

- Gurney, M., Pu, H., Chiu, A., Dal Canto, M., Polchow, C., Alexander, D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y., Deng, H., et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775.
- Hadjiconstantinou, M., and Neff, N.H. (1998a). GM1 and the Aged Brain. *Annals NY Acad Sci* 845, 225–231.
- Hadjiconstantinou, M., and Neff, N.H. (1998b). GM1 Ganglioside: In Vivo and In Vitro Trophic Actions on Central Neurotransmitter Systems. *Journal of Neurochemistry* 70, 1335–1345.
- Hafner, A., Glavan, G., Obermajer, N., Živin, M., Schliebs, R., and Kos, J. (2013). Neuroprotective role of γ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging Cell* 12, 604–614.
- Hall, E.D., Oostveen, J.A., and Gurney, M.E. (1998). Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. 8.
- Hammer, M.B., Eleuch-Fayache, G., Schottlaender, L.V., Nehdi, H., Gibbs, J.R., Arepalli, S.K., Chong, S.B., Hernandez, D.G., Sailer, A., Liu, G., et al. (2013). Mutations in GBA2 Cause Autosomal-Recessive Cerebellar Ataxia with Spasticity. *The American Journal of Human Genetics* 92, 245–251.
- Han, J.-H., Ryu, H.-H., Jun, M.-H., Jang, D.-J., and Lee, J.-A. (2012). The functional analysis of the CHMP2B missense mutation associated with neurodegenerative diseases in the endo-lysosomal pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 421, 544–549.
- Hanisch, U.-K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140–155.
- Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 175–191.
- Hao, L., Ben-David, O., Babb, S.M., Futerman, A.H., Cohen, B.M., and Buttner, E.A. (2017). Clozapine Modulates Glucosylceramide, Clears Aggregated Proteins, and Enhances ATG8/LC3 in *Caenorhabditis elegans*. *Neuropsychopharmacol* 42, 951–962.
- Harciarek, M., and Cosentino, S. (2013). Language, executive function and social cognition in the diagnosis of frontotemporal dementia syndromes. *International Review of Psychiatry* 25, 178–196.
- Harel, R., and Futerman, A. (1993). Inhibition of Sphingolipid Synthesis Affects Axonal Outgrowth in Cultured Hippocampal Neurons. 6.
- Harschnitz, O., Jongbloed, B.A., Franssen, H., Straver, D.C.G., van der Pol, W.L., and van den Berg, L.H. (2014). MMN: From Immunological Cross-Talk to Conduction Block. *J Clin Immunol* 34, 112–119.
- Harvald, E.B., Olsen, A.S.B., and Færgeman, N.J. (2015). Autophagy in the light of sphingolipid metabolism. *Apoptosis* 20, 658–670.
- Hayashi, Y., and Ito, M. (2016). Klotho-Related Protein KLRP. In *Vitamins & Hormones*, (Elsevier), pp. 1–16.
- Hegedus, J., Putman, C.T., and Gordon, T. (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 28, 154–164.
- Hegedus, J., Putman, C.T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1^{G93A} transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Motor units in mouse ALS. *The Journal of Physiology* 586, 3337–3351.
- Heinrich, M., Wickel, M., Winoto-Morbach, S., Schneider-Brachert, W., Weber, T., Brunner, J., Saftig, P., Peters, C., Krönke, M., and Schütze, S. (2000). Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Adv. Exp. Med. Biol.* 477, 305–315.
- Henkel, J.S., Beers, D.R., Zhao, W., and Appel, S.H. (2009). Microglia in ALS: The Good, The Bad, and The Resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 389–398.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D. (2011). The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* 21, 77–91.
- Henriques, A., Pitzer, C., and Schneider, A. (2010). Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: where do we stand? *Front. Neurosci.*
- Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D.A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., D'Ambra, E., Huebecker, M., Hussain, G., Boursier-Neyret, C., Echaniz-Laguna, A., et al. (2015a). Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. *Hum. Mol. Genet.* 24, 7390–7405.
- Henriques, A., Blasco, H., Fleury, M.-C., Corcia, P., Echaniz-Laguna, A., Robelin, L., Rudolf, G., Lequeu, T., Bergaentzle, M., Gachet, C., et al. (2015b). Blood Cell Palmitoleate-Palmitate Ratio Is an Independent Prognostic Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* 10, e0131512.
- Henriques, A., Kastner, S., Chatzikonstantinou, E., Pitzer, C., Plaas, C., Kirsch, F., Wafzig, O., Krüger, C., Spoelgen, R., Gonzalez De Aguilar, J.-L., et al. (2015c). Gene expression changes in spinal motoneurons of the SOD1^{G93A} transgenic model for ALS after treatment with G-CSF. *Front. Cell. Neurosci.* 8.

- Henriques, A., Huebeker, M., Blasco, H., Keime, C., Andres, C.R., Corcia, P., Priestman, D.A., Platt, F.M., Spedding, M., and Loeffler, J.-P. (2017). Inhibition of β -Glucocerebrosidase Activity Preserves Motor Unit Integrity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Rep* 7, 5235.
- Henriques, A., Croixmarie, V., Bouscary, A., Mosbach, A., Keime, C., Boursier-Neyret, C., Walter, B., Spedding, M., and Loeffler, J.-P. (2018). Sphingolipid Metabolism Is Dysregulated at Transcriptomic and Metabolic Levels in the Spinal Cord of an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 433.
- Herrmann, N., Black, S.E., Chow, T., Cappell, J., Tang-Wai, D.F., and Lanctôt, K.L. (2012). Serotonergic Function and Treatment of Behavioral and Psychological Symptoms of Frontotemporal Dementia. *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 20, 789–797.
- Hetz, C., Chevet, E., and Oakes, S.A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol* 17, 829–838.
- Higgins, C.M., Jung, C., and Xu, Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neuroscience* 14.
- Hiraiwa, M., Martin, B.M., Kishimoto, Y., Conner, G.E., Tsuji, S., and O'Brien, J.S. (1997). Lysosomal Proteolysis of Prosaposin, the Precursor of Saposins (Sphingolipid Activator Proteins): Its Mechanism and Inhibition by Ganglioside. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 341, 17–24.
- Hogan, D.B., Jetté, N., Fiest, K.M., Roberts, J.I., Pearson, D., Smith, E.E., Roach, P., Kirk, A., Pringsheim, T., and Maxwell, C.J. (2016). The Prevalence and Incidence of Frontotemporal Dementia: a Systematic Review. *Can. J. Neurol. Sci.* 43, S96–S109.
- Holm, I.E., Englund, E., Mackenzie, I.R.A., Johannsen, P., and Isaacs, A.M. (2007). A Reassessment of the Neuropathology of Frontotemporal Dementia Linked to Chromosome 3: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66, 884–891.
- Horowitz, M., Elstein, D., Zimran, A., and Goker-Alpan, O. (2016). New Directions in Gaucher Disease. *Human Mutation* 37, 1121–1136.
- Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., et al. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 1604–1609.
- Huang, H., Chen, L., Zhang, H., Li, S., Liu, P., Zhao, T., and Li, C. (2016). Autophagy Promotes Peripheral Nerve Regeneration and Motor Recovery Following Sciatic Nerve Crush Injury in Rats. *J Mol Neurosci* 58, 416–423.
- Huisman, M.H.B., de Jong, S.W., van Doormaal, P.T.C., Weinreich, S.S., Schelhaas, H.J., van der Kooi, A.J., de Visser, M., Veldink, J.H., and van den Berg, L.H. (2011). Population based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis using capture-recapture methodology. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 82, 1165–1170.
- Hull, J.D., and Lyon, R.A. (2018). In vitro pharmacology of ambroxol: Potential serotonergic sites of action. *Life Sciences* 197, 67–72.
- Ingre, C., Roos, P., Kamel, F., Piehl, F., and Fang, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *CLEP* 181.
- Ishay, Y., Zimran, A., Szer, J., Dinur, T., Ilan, Y., and Arkadir, D. (2018). Combined beta-glucosylceramide and ambroxol hydrochloride in patients with Gaucher related Parkinson disease: From clinical observations to drug development. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 68, 117–120.
- Ito, Y., Yamada, M., Tanaka, H., Aida, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H., and Hara, H. (2009). Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiology of Disease* 36, 470–476.
- Ivankovic, D., Chau, K.-Y., Schapira, A.H.V., and Gegg, M.E. (2016). Mitochondrial and lysosomal biogenesis are activated following PINK1/parkin-mediated mitophagy. *J. Neurochem.* 136, 388–402.
- Jang, Y.Y., Song, J.H., Shin, Y.K., Han, E.S., and Lee, C.S. (2003). Depressant Effects of Ambroxol and Erdosteine on Cytokine Synthesis, Granule Enzyme Release, and Free Radical Production in Rat Alveolar Macrophages Activated by Lipopolysaccharide. *Pharmacol Toxicol* 92, 173–179.
- Jarvis, M.F., Honore, P., Shieh, C.-C., Chapman, M., Joshi, S., Zhang, X.-F., Kort, M., Carroll, W., Marron, B., Atkinson, R., et al. (2007). A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. 6.
- Jennemann, R., Sandhoff, R., Wang, S., Kiss, E., Gretz, N., Zuliani, C., Martin-Villalba, A., Jager, R., Schorle, H., Kenzelmann, M., et al. (2005). Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 12459–12464.

- Jésus, P., Fayemendy, P., Nicol, M., Lautrette, G., Sourisseau, H., Preux, P.-M., Desport, J.-C., Marin, B., and Couratier, P. (2018). Hypermetabolism is a deleterious prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 25, 97–104.
- Ji, A.-L., Zhang, X., Chen, W.-W., and Huang, W.-J. (2017). Genetics insight into the amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum. *J Med Genet* 54, 145–154.
- Jiang, W., Yi, M., Maegawa, G.H.B., and Zhang, H. (2020a). Ambroxol improves skeletal and hematological manifestations on a child with Gaucher disease. *J Hum Genet* 65, 345–349.
- Jiang, X., Zhang, J., Kou, B., Zhang, C., Zhong, J., Fang, X., Huang, X., Zhang, X., Xie, F., Hu, Q., et al. (2020b). Ambroxol Improves Neuronal Survival and Reduces White Matter Damage through Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress in Microglia after Intracerebral Hemorrhage. *BioMed Research International* 2020, 1–12.
- Johnston, M., Earll, L., Giles, M., Mcclenahan, R., Stevens, D., and Morrison, V. (1999). Mood as a predictor of disability and survival in patients newly diagnosed with ALS/MND. *British Journal of Health Psychology* 4, 127–136.
- Jokela, M., Huovinen, S., Raheem, O., Lindfors, M., Palmio, J., Penttilä, S., and Udd, B. (2016). Distinct Muscle Biopsy Findings in Genetically Defined Adult-Onset Motor Neuron Disorders. *PLoS ONE* 11, e0151376.
- Joyce, N.C., and Carter, G.T. (2013). Electrodiagnosis in Persons With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PM&R* 5, S89–S95.
- Jung, C., Higgins, C.M.J., and Xu, Z. (2002). Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: Mitochondrial ETC dysfunction in ALS transgenic mice. *Journal of Neurochemistry* 83, 535–545.
- Kabashi, E., Lin, L., Tradewell, M.L., Dion, P.A., Bercier, V., Bourgouin, P., Rochefort, D., Bel Hadj, S., Durham, H.D., Velde, C.V., et al. (2010). Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Human Molecular Genetics* 19, 671–683.
- Kaida, K., Sonoo, M., Ogawa, G., Kamakura, K., Ueda-Sada, M., Arita, M., Motoyoshi, K., and Kusunoki, S. (2008). GM1/GalNAc-GD1a complex: A target for pure motor Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 71, 1683–1690.
- Kalkonde, Y.V., Jawaid, A., Qureshi, S.U., Shirani, P., Wheaton, M., Pinto-Patarroyo, G.P., and Schulz, P.E. (2012). Medical and environmental risk factors associated with frontotemporal dementia: A case-control study in a veteran population. *Alzheimer's & Dementia* 8, 204–210.
- Kanfer, J.N., Legler, G., Sullivan, J., Raghavan, S.S., and Mumford, R.A. (1975). The Gaucher mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 85–90.
- Kersaitis, C., Halliday, G.M., and Kril, J.J. (2004). Regional and cellular pathology in frontotemporal dementia: relationship to stage of disease in cases with and without Pick bodies. *Acta Neuropathol* 108, 515–523.
- Kim, W.S., He, Y., Phan, K., Ahmed, R.M., Rye, K.-A., Pigué, O., Hodges, J.R., and Halliday, G.M. (2018a). Altered High Density Lipoprotein Composition in Behavioral Variant Frontotemporal Dementia. *Front. Neurosci.* 12, 847.
- Kim, W.S., Jary, E., Pickford, R., He, Y., Ahmed, R.M., Pigué, O., Hodges, J.R., and Halliday, G.M. (2018b). Lipidomics Analysis of Behavioral Variant Frontotemporal Dementia: A Scope for Biomarker Development. *Front. Neurol.* 9, 104.
- Kim, Y.K., Jang, Y.Y., Han, E.S., and Lee, C.S. (2002). Depressant Effect of Ambroxol on Stimulated Functional Responses and Cell Death in Rat Alveolar Macrophages Exposed to Silica in Vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 629–637.
- Kim, Y.-M., Yum, M.-S., Heo, S.H., Kim, T., Jin, H.K., Bae, J., Seo, G.H., Oh, A., Yoon, H.M., Lim, H.T., et al. (2020). Pharmacologic properties of high-dose ambroxol in four patients with Gaucher disease and myoclonic epilepsy. *J Med Genet* 57, 124–131.
- Kiyokawa, E., Baba, T., Otsuka, N., Makino, A., Ohno, S., and Kobayashi, T. (2005). Spatial and Functional Heterogeneity of Sphingolipid-rich Membrane Domains. *J. Biol. Chem.* 280, 24072–24084.
- Koerner, D.R. (1952). Amyotrophic lateral sclerosis on Guam. *Ann. Intern. Med.* 37, 1204–1220.
- Koike, K., Berdyshev, E.V., Mikosz, A.M., Bronova, I.A., Bronoff, A.S., Jung, J.P., Beatman, E.L., Ni, K., Cao, D., Scruggs, A.K., et al. (2019). Role of Glucosylceramide in Lung Endothelial Cell Fate and Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 200, 1113–1125.
- Körschen, H.G., Yildiz, Y., Raju, D.N., Schonauer, S., Bönigk, W., Jansen, V., Kremmer, E., Kaupp, U.B., and Wachten, D. (2013). The Non-lysosomal β -Glucosidase GBA2 Is a Non-integral Membrane-associated Protein at the Endoplasmic Reticulum (ER) and Golgi. *J. Biol. Chem.* 288, 3381–3393.

- Kortte, K.B., and Rogalski, E.J. (2013). Behavioural interventions for enhancing life participation in behavioural variant frontotemporal dementia and primary progressive aphasia. *International Review of Psychiatry* 25, 237–245.
- Kovacs, G.G., Murrell, J.R., Horvath, S., Haraszti, L., Majtenyi, K., Molnar, M.J., Budka, H., Ghetti, B., and Spina, S. (2009). TARDBP variation associated with frontotemporal dementia, supranuclear gaze palsy, and chorea. *Mov. Disord.* 24, 1842–1847.
- Kracun, I., Rosner, H., Drnovsek, V., Vukelic, Z., Cosovic, C., Trbojevic-Cepe, M., and Kubat, M. (1992). Gangliosides in the human brain development and aging. *Neurochemistry International* 20, 421–431.
- Krarup, C. (2011). Lower motor neuron involvement examined by quantitative electromyography in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurophysiology* 122, 414–422.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences* 19, 312–318.
- Kriz, J., Nguyen, M.D., and Julien, J.-P. (2002). Minocycline Slows Disease Progression in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiology of Disease* 10, 268–278.
- Kurashige, T., Takahashi, T., Yamazaki, Y., Hiji, M., Izumi, Y., Yamawaki, T., and Matsumoto, M. (2013). Localization of CHMP2B-immunoreactivity in the brainstem of Lewy body disease: CHMP2B immunoreactivity in synucleinopathy. *Neuropathology* 33, 237–245.
- Kurland, L.T. (1988). Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin. *11*, 4.
- Kuwabara, S., and Yuki, N. (2013). Axonal Guillain-Barré syndrome: concepts and controversies. *The Lancet Neurology* 12, 1180–1188.
- Kwiatkowski, T.J., Bosco, D.A., LeClerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., et al. (2009). Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 323, 1205–1208.
- Lachmann, R.H., and Platt, F.M. (2001). Substrate reduction therapy for glycosphingolipid storage disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 10, 455–466.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2010). TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics* 19, R46–R64.
- Lai, J., Gold, M.S., Kim, C.-S., Bian, D., Ossipov, M.H., Hunter, J.C., and Porreca, F. (2002). Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8: *Pain* 95, 143–152.
- Laird, F.M., Farah, M.H., Ackerley, S., Hoke, A., Maragakis, N., Rothstein, J.D., Griffin, J., Price, D.L., Martin, L.J., and Wong, P.C. (2008). Motor Neuron Disease Occurring in a Mutant Dynactin Mouse Model Is Characterized by Defects in Vesicular Trafficking. *Journal of Neuroscience* 28, 1997–2005.
- Lashuel, H.A., Overk, C.R., Oueslati, A., and Masliah, E. (2013). The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci* 14, 38–48.
- Lattante, S., Ciura, S., Rouleau, G.A., and Kabashi, E. (2015). Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD). *Trends in Genetics* 31, 263–273.
- Lebert, F., Stekke, W., Hasenbroekx, C., and Pasquier, F. (2004). Frontotemporal Dementia: A Randomised, Controlled Trial with Trazodone. *Dement Geriatr Cogn Disord* 17, 355–359.
- Ledeer, R., and Wu, G. (2018). Gangliosides of the Nervous System. In *Gangliosides*, S. Sonnino, and A. Prinetti, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 19–55.
- Lee, C.S., Jang, Y.Y., Song, J.S., Song, J.H., and Han, E.S. (2002). Ambroxol Inhibits Peroxynitrite-Induced Damage of α 1-Antitrypsin and Free Radical Production in Activated Phagocytic Cells. *Pharmacol Toxicol* 91, 140–149.
- Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.-B. (2007). ESCRT-III Dysfunction Causes Autophagosome Accumulation and Neurodegeneration. *Current Biology* 17, 1561–1567.
- Lei, Y., Iwashita, M., Choi, J., Aikawa, M., and Aikawa, E. (2015). N-acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase Suppresses Lysosomal Hydrolases in Dysfunctional Osteoclasts: A Potential Mechanism for Vascular Calcification. *JCDD* 2, 31–47.
- Lepore, A.C., Rauck, B., Dejea, C., Pardo, A.C., Rao, M.S., Rothstein, J.D., and Maragakis, N.J. (2008). Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat Neurosci* 11, 1294–1301.
- Li, Y.R., and Trush, M. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *ROS* 1.

- Li, L., Zhang, X., and Le, W. (2008). Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy* 4, 290–293.
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D.R., Henkel, J.S., and Appel, S.H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental Neurology* 237, 147–152.
- Lieberman, R.L., Wustman, B.A., Huertas, P., Powe, A.C., Pine, C.W., Khanna, R., Schlossmacher, M.G., Ringe, D., and Petsko, G.A. (2007). Structure of acid β -glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. *Nat Chem Biol* 3, 101–107.
- Lin, C.-L.G., Bristol, L.A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L., and Rothstein, J.D. (1998). Aberrant RNA Processing in a Neurodegenerative Disease: the Cause for Absent EAAT2, a Glutamate Transporter, in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron* 20, 589–602.
- Ling, S.-C., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2013). Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* 79, 416–438.
- Lino, M.M., Schneider, C., and Caroni, P. (2002). Accumulation of SOD1 Mutants in Postnatal Motoneurons Does Not Cause Motoneuron Pathology or Motoneuron Disease. *J. Neurosci.* 22, 4825–4832.
- Liu, J., and Wang, F. (2017). Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front. Immunol.* 8, 1005.
- Llewellyn, K.J., Nalbandian, A., Jung, K.-M., Nguyen, C., Avanesian, A., Mozaffar, T., Piomelli, D., and Kimonis, V.E. (2014). Lipid-enriched diet rescues lethality and slows down progression in a murine model of VCP-associated disease. *Human Molecular Genetics* 23, 1333–1344.
- Lloyd, C.M., Richardson, M.P., Brooks, D.J., Al-Chalabi, A., and Leigh, P.N. (2000). Extramotor involvement in ALS: PET studies with the GABA_A ligand [¹¹C]flumazenil. *Brain* 123, 2289–2296.
- Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chio, A., Mitchell, D., Swingler, R.J., Millul, A., Benn, E., Beghi, E., and for EURALS (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 81, 385–390.
- Lopez, P.H., and Schnaar, R.L. (2009). Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Current Opinion in Structural Biology* 19, 549–557.
- Luan, Z., Li, L., Higaki, K., Nanba, E., Suzuki, Y., and Ohno, K. (2013). The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice. *Brain and Development* 35, 317–322.
- Ludolph, A., Drory, V., Hardiman, O., Nakano, I., Ravits, J., Robberecht, W., Shefner, J., and for The WFN Research Group On ALS/MND (2015). A revision of the El Escorial criteria - 2015. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 16, 291–292.
- Ludolph, A.C., Dorst, J., Dreyhaupt, J., Weishaupt, J.H., Kassubek, J., Weiland, U., Meyer, T., Petri, S., Hermann, A., Emmer, A., et al. (2020). Effect of High-Caloric Nutrition on Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* 87, 206–216.
- Mackenzie, I.R., Rademakers, R., and Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology* 9, 995–1007.
- Mackenzie, I.R.A., Bigio, E.H., Ince, P.G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N.J., Kwong, L.K., Forman, M.S., Ravits, J., Stewart, H., et al. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 61, 427–434.
- Mackenzie, I.R.A., Neumann, M., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G.G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I.E., et al. (2009). Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations. *Acta Neuropathol* 117, 15–18.
- Maegawa, G.H.B., Tropak, M.B., Buttner, J.D., Rigat, B.A., Fuller, M., Pandit, D., Tang, L., Kornhaber, G.J., Hamuro, Y., Clarke, J.T.R., et al. (2009). Identification and Characterization of Ambroxol as an Enzyme Enhancement Agent for Gaucher Disease. *J. Biol. Chem.* 284, 23502–23516.
- Magalhaes, J., Gegg, M.E., Migdalska-Richards, A., and Schapira, A.H. (2018). Effects of ambroxol on the autophagy-lysosome pathway and mitochondria in primary cortical neurons. *Sci Rep* 8, 1385.
- Magrané, J., and Manfredi, G. (2009). Mitochondrial Function, Morphology, and Axonal Transport in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling* 11, 1615–1626.
- Mahoney, D.J., Rodriguez, C., Devries, M., Yasuda, N., and Tarnopolsky, M.A. (2004). Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 29, 656–662.

- Malek, A.M., Barchowsky, A., Bowser, R., Youk, A., and Talbott, E.O. (2012). Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis of epidemiological studies. *Environmental Research* 117, 112–119.
- Malerba, M., and Ragnoli, B. (2008). Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4, 1119–1129.
- Marchand, S., Devillers-Thiéry, A., Pons, S., Changeux, J.-P., and Cartaud, J. (2002). Rapsyn Escorts the Nicotinic Acetylcholine Receptor Along the Exocytic Pathway via Association with Lipid Rafts. *J. Neurosci.* 22, 8891–8901.
- Marin, B., Desport, J.C., Kajeu, P., Jesus, P., Nicolaud, B., Nicol, M., Preux, P.M., and Couratier, P. (2011). Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 82, 628–634.
- Mariosa, D., Kamel, F., Bellocco, R., Ye, W., and Fang, F. (2015). Association between diabetes and amyotrophic lateral sclerosis in Sweden. *Eur J Neurol* 22, 1436–1442.
- Marques, A.R.A., Aten, J., Ottenhoff, R., van Roomen, C.P.A.A., Herrera Moro, D., Claessen, N., Vinueza Veloz, M.F., Zhou, K., Lin, Z., Mirzaian, M., et al. (2015). Reducing GBA2 Activity Ameliorates Neuropathology in Niemann-Pick Type C Mice. *PLoS ONE* 10, e0135889.
- Martin, E., Schüle, R., Smets, K., Rastetter, A., Boukhris, A., Loureiro, J.L., Gonzalez, M.A., Mundwiller, E., Deconinck, T., Wessner, M., et al. (2013). Loss of Function of Glucocerebrosidase GBA2 Is Responsible for Motor Neuron Defects in Hereditary Spastic Paraplegia. *The American Journal of Human Genetics* 92, 238–244.
- Martin, J.A., Craft, D.K., Su, J.H., Kim, R.C., and Cotman, C.W. (2001). Astrocytes degenerate in frontotemporal dementia: possible relation to hypoperfusion. *Neurobiology of Aging* 22, 195–207.
- Martina, J.A., Chen, Y., Gucek, M., and Puertollano, R. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* 8, 903–914.
- Matern, H., Boermans, H., Lottspeich, F., and Matern, S. (2001). Molecular cloning and expression of human bile acid beta-glucosidase. *J. Biol. Chem.* 276, 37929–37933.
- Mazzulli, J.R., Zunke, F., Tsunemi, T., Toker, N.J., Jeon, S., Burbulla, L.F., Patnaik, S., Sidransky, E., Maragan, J.J., Sue, C.M., et al. (2016). Activation of β -Glucocerebrosidase Reduces Pathological β -Synuclein and Restores Lysosomal Function in Parkinson's Patient Midbrain Neurons. *Journal of Neuroscience* 36, 7693–7706.
- McCauley, M.E., and Baloh, R.H. (2019). Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol* 137, 715–730.
- McGlinchey, R.P., and Lee, J.C. (2013). Emerging insights into the mechanistic link between α -synuclein and glucocerebrosidase in Parkinson's disease. *Biochemical Society Transactions* 41, 1509–1512.
- McNeill, A., Magalhaes, J., Shen, C., Chau, K.-Y., Hughes, D., Mehta, A., Foltynie, T., Cooper, J.M., Abramov, A.Y., Gegg, M., et al. (2014). Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain* 137, 1481–1495.
- Medina, D.L., Fraldi, A., Bouche, V., Annunziata, F., Mansueto, G., Spampanato, C., Puri, C., Pignata, A., Martina, J.A., Sardiello, M., et al. (2011). Transcriptional Activation of Lysosomal Exocytosis Promotes Cellular Clearance. *Developmental Cell* 21, 421–430.
- van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112–124.
- Meeter, L.H., Kaat, L.D., Rohrer, J.D., and van Swieten, J.C. (2017). Imaging and fluid biomarkers in frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurol* 13, 406–419.
- Mercy, L., Hodges, J.R., Dawson, K., Barker, R.A., and Brayne, C. (2008). Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom. *Neurology* 71, 1496–1499.
- Migdalska-Richards, A., Daly, L., Bezdard, E., and Schapira, A.H.V. (2016). Ambroxol effects in glucocerebrosidase and α -synuclein transgenic mice: Ambroxol in Transgenic Mice. *Ann Neurol.* 80, 766–775.
- Migdalska-Richards, A., Ko, W.K.D., Li, Q., Bezdard, E., and Schapira, A.H.V. (2017). Oral ambroxol increases brain glucocerebrosidase activity in a nonhuman primate. *Synapse* 71, e21967.
- Millecamps, S., Salachas, F., Cazeneuve, C., Gordon, P., Bricka, B., Camuzat, A., Guillot-Noel, L., Russaouen, O., Bruneteau, G., Pradat, P.-F., et al. (2010). SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *Journal of Medical Genetics* 47, 554–560.
- Millecamps, S., Boillée, S., Le Ber, I., Seilhean, D., Teyssou, E., Giraudeau, M., Moigneu, C., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Corcia, P., et al. (2012). Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in *C9ORF72* and patients with mutations in other ALS-related genes. *J Med Genet* 49, 258–263.

- Miller, R.G., Bouchard, J.P., Duquette, P., Eisen, A., Gelinas, D., Harati, Y., Munsat, T.L., Powe, L., Rothstein, J., Salzman, P., et al. (1996). Clinical trials of riluzole in patients with ALS. *Neurology* 47, 86S-92S.
- Miller, R.G., Mitchell, J.D., and Moore, D.H. (2012). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Miller, T.M., Pestronk, A., David, W., Rothstein, J., Simpson, E., Appel, S.H., Andres, P.L., Mahoney, K., Allred, P., Alexander, K., et al. (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.
- Mishra, A., and Krishnamurthy, S. (2020). Neurorestorative effects of sub-chronic administration of ambroxol in rodent model of Parkinson's disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393, 429–444.
- Mistry, P.K., Liu, J., Sun, L., Chuang, W.-L., Yuen, T., Yang, R., Lu, P., Zhang, K., Li, J., Keutzer, J., et al. (2014). Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 4934–4939.
- Mitchell, J.D., and Borasio, G.D. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis. *369*, 11.
- Mitsui, J., Mizuta, I., Toyoda, A., Ashida, R., Takahashi, Y., Goto, J., Fukuda, Y., Date, H., Iwata, A., Yamamoto, M., et al. (2009). Mutations for Gaucher Disease Confer High Susceptibility to Parkinson Disease. *Arch Neurol* 66.
- Morimoto, N., Nagai, M., Ohta, Y., Miyazaki, K., Kurata, T., Morimoto, M., Murakami, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Kamiya, T., et al. (2007). Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Research* 1167, 112–117.
- Morotz, G.M., De Vos, K.J., Vagnoni, A., Ackerley, S., Shaw, C.E., and Miller, C.C.J. (2012). Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant VAPBP56S perturbs calcium homeostasis to disrupt axonal transport of mitochondria. *Human Molecular Genetics* 21, 1979–1988.
- Morrison, B.M., Janssen, W.G., Gordon, J.W., and Morrison, J.H. (1998). Time course of neuropathology in the spinal cord of G86R superoxide dismutase transgenic mice. *14*.
- Mullin, S., Hughes, D., Mehta, A., and Schapira, A.H.V. (2019). Neurological effects of glucocerebrosidase gene mutations. *Eur J Neurol* 26, 388.
- Mullin, S., Smith, L., Lee, K., D'Souza, G., Woodgate, P., Elflein, J., Hällqvist, J., Toffoli, M., Streeter, A., Hosking, J., et al. (2020). Ambroxol for the Treatment of Patients With Parkinson Disease With and Without Glucocerebrosidase Gene Mutations: A Nonrandomized, Noncontrolled Trial. *JAMA Neurol* 77, 427.
- Münch, C., O'Brien, J., and Bertolotti, A. (2011). Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 3548–3553.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., and Sacks, O.W. (2004). Occurrence of beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand* 110, 267–269.
- Murphy, K.E., Gysbers, A.M., Abbott, S.K., Tayebi, N., Kim, W.S., Sidransky, E., Cooper, A., Garner, B., and Halliday, G.M. (2014). Reduced glucocerebrosidase is associated with increased α -synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain* 137, 834–848.
- Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M., and Fujiki, N. (1995). Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 5087–5091.
- Mutoh, T., Hamano, T., Yano, S., Koga, H., Yamamoto, H., Furukawa, K., and Ledeen, R.W. (2002). Stable Transfection of GM1 Synthase Gene into GM1-Deficient NG108-15 Cells, CR-72 Cells, Rescues the Responsiveness of TRK-Neurotrophin Receptor to Its Ligand, NGF. *6*.
- Nabizadeh, A., Amani, B., Kadivar, M., Toroski, M., Asl, A.A., Bayazidi, Y., Mojahedian, M., and Davari, M. (2018). The Clinical Efficacy of Imiglucerase versus Eliglustat in Patients with Gaucher's Disease Type 1: A Systematic Review. *J Res Pharm Pract* 7, 171–177.
- Nakanishi, H. (2003). Neuronal and microglial cathepsins in aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews* 2, 367–381.
- Narita, A., Shirai, K., Itamura, S., Matsuda, A., Ishihara, A., Matsushita, K., Fukuda, C., Kubota, N., Takayama, R., Shigematsu, H., et al. (2016). Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. *Ann Clin Transl Neurol* 3, 200–215.
- Nelson, L.M., McGuire, V., Longstreth, W.T., and Matkin, C. (2000). Population-Based Case-Control Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Western Washington State. I. Cigarette Smoking and Alcohol Consumption. *American Journal of Epidemiology* 151, 156–163.
- Nepali, K., Sharma, S., Ojha, R., and Dhar, K.L. (2013). Vasicine and structurally related quinazolines. *Med Chem Res* 22, 1–15.

- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., et al. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* *314*, 130–133.
- Nguyen, D.K.H., Thombre, R., and Wang, J. (2019). Autophagy as a common pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* *697*, 34–48.
- Nguyen, H.P., Van Broeckhoven, C., and van der Zee, J. (2018). ALS Genes in the Genomic Era and their Implications for FTD. *Trends in Genetics* *34*, 404–423.
- Nowak, D., Pietras, T., Antczak, A., Król, M., and Piasecka, G. (1993). Ambroxol inhibits endotoxin-induced lipid peroxidation in mice. *Pol J Pharmacol* *45*, 317–322.
- Nowak, D., Antczak, A., Król, M., Bialasiewicz, P., and Pietras, T. (1994). Antioxidant properties of ambroxol. *Free Radical Biology and Medicine* *16*, 517–522.
- Nowak, D., Pierscinski, G., and Drzewoski, J. (1995). Ambroxol inhibits doxorubicin-induced lipid peroxidation in heart of mice. *Free Radic. Biol. Med.* *19*, 659–663.
- Nussinov, R., and Tsai, C.-J. (2012). The Different Ways through Which Specificity Works in Orthosteric and Allosteric Drugs. *6*.
- Obermajer, N., Doljak, B., Jamnik, P., Fonović, U.P., and Kos, J. (2009). Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *41*, 1685–1696.
- Ohmi, Y., Tajima, O., Ohkawa, Y., Mori, A., Sugiura, Y., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2009). Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues. *PNAS* *106*, 22405–22410.
- Oliván, S., Martínez-Beamonte, R., Calvo, A.C., Surra, J.C., Manzano, R., Arnal, C., Osta, R., and Osada, J. (2014). Extra virgin olive oil intake delays the development of amyotrophic lateral sclerosis associated with reduced reticulum stress and autophagy in muscle of SOD1G93A mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* *25*, 885–892.
- Olsen, A.S.B., and Færgeman, N.J. (2017). Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biol.* *7*, 170069.
- Olszewska, D.A., Lonergan, R., Fallon, E.M., and Lynch, T. (2016). Genetics of Frontotemporal Dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep* *16*, 107.
- Onyike, C.U. (2011). What Is the Life Expectancy in Frontotemporal Lobar Degeneration? *Neuroepidemiology* *37*, 166–167.
- Onyike, C.U., and Diehl-Schmid, J. (2013). The epidemiology of frontotemporal dementia. *International Review of Psychiatry* *25*, 130–137.
- O'Regan, G., deSouza, R.-M., Balestrino, R., and Schapira, A.H. (2017). Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *JPD* *7*, 411–422.
- O'Reilly, É.J., Wang, H., Weisskopf, M.G., Fitzgerald, K.C., Falcone, G., McCullough, M.L., Thun, M., Park, Y., Kolonel, L.N., and Ascherio, A. (2013). Premorbid body mass index and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* *14*, 205–211.
- Ottonello, L., Arduino, N., Bertolotto, M., Dapino, P., Mancini, M., and Dallegri, F. (2003). *In vitro* inhibition of human neutrophil histotoxicity by ambroxol: evidence for a multistep mechanism. *British Journal of Pharmacology* *140*, 736–742.
- Paganoni, S., Deng, J., Jaffa, M., Cudkowicz, M.E., and Wills, A.-M. (2011). Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* *44*, 20–24.
- Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S.T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J., et al. (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol Med* *7*, 526–546.
- Palmano, K., Rowan, A., Guillermo, R., Guan, J., and McJarrow, P. (2015). The Role of Gangliosides in Neurodevelopment. *Nutrients* *7*, 3891–3913.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., and Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human Molecular Genetics* *20*, 3852–3866.
- Pan, B., Fromholt, S.E., Hess, E.J., Crawford, T.O., Griffin, J.W., Sheikh, K.A., and Schnaar, R.L. (2005). Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS

- and PNS: Neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Experimental Neurology* 195, 208–217.
- Pan, X., De Britto Pará De Aragão, C., Velasco-Martin, J.P., Priestman, D.A., Wu, H.Y., Takahashi, K., Yamaguchi, K., Sturiale, L., Garozzo, D., Platt, F.M., et al. (2017). Neuraminidases 3 and 4 regulate neuronal function by catabolizing brain gangliosides. *FASEB j.* 31, 3467–3483.
- Papadeas, S.T., Kraig, S.E., O'Banion, C., Lepore, A.C., and Maragakis, N.J. (2011). Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 17803–17808.
- Parenti, G., Andria, G., and Valenzano, K.J. (2015). Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. *Molecular Therapy* 23, 1138–1148.
- Parkinson, N., Ince, P.G., Smith, M.O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P.M., Morrison, K.E., Pall, H.S., Hardiman, O., Collinge, J., et al. (2006). ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 67, 1074–1077.
- Pasinelli, P., Houseweart, M.K., Brown, R.H., and Cleveland, D.W. (2000). Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13901–13906.
- Pasinelli, P., Belford, M.E., Lennon, N., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., Trotti, D., and Brown, R.H. (2004). Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated SOD1 Mutant Proteins Bind and Aggregate with Bcl-2 in Spinal Cord Mitochondria. *Neuron* 43, 19–30.
- Pesiridis, G.S., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2009). Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics* 18, R156–R162.
- Pestronk, A., Adams, R.N., Clawson, L., Cornblath, D., Kuncl, R.W., Griffin, D., and Drachman, D.B. (1988). Serum antibodies to GM1 ganglioside in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 38, 1457–1461.
- Pestronk, A., Adams, R.N., Cornblath, D., Kuncl, R.W., Drachman, D.B., and Rn, L.C. (1989). Patterns of serum IgM antibodies to GM1 and GD1a gangliosides in amyotrophic lateral sclerosis: GM1 and GD1a Antibodies in ALS. *Ann Neurol.* 25, 98–102.
- Peter, R.S., Rosenbohm, A., Dupuis, L., Brehme, T., Kassubek, J., Rothenbacher, D., Nagel, G., and Ludolph, A.C. (2017). Life course body mass index and risk and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: results from the ALS registry Swabia. *Eur J Epidemiol* 32, 901–908.
- Pijnenburg, Y.A.L., Sampson, E.L., Harvey, R.J., Fox, N.C., and Rossor, M.N. (2003). Vulnerability to neuroleptic side effects in frontotemporal lobar degeneration. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 18, 67–72.
- Pinheiro-Dardis, C.M., Erbereli, B.T., Gigo-Benato, D., Castro, P.A.T.S., and Russo, T.L. (2017). Electrical stimulation delays reinnervation in denervated rat muscle: ES and Reinnervation. *Muscle Nerve* 56, E108–E118.
- Pišlar, A.H., Zidar, N., Kikelj, D., and Kos, J. (2014). Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology* 82, 121–131.
- Pitto, M., Mutoh, T., Kuriyama, M., Ferraretto, A., Palestini, P., and Masserini, M. (1998). Influence of endogenous GM1 ganglioside on TrkB activity, in cultured neurons. *FEBS Letters* 4.
- Pointron, P., Callizot, N., and Piguet, P. (2008). Theoretical Considerations on Animal Models. In *Biovalley Monographs*, P. Pointron, and P. Piguet, eds. (Basel: KARGER), pp. 1–10.
- Pose, M., Cetkovich, M., Gleichgerrcht, E., Ibáñez, A., Torralva, T., and Manes, F. (2013). The overlap of symptomatic dimensions between frontotemporal dementia and several psychiatric disorders that appear in late adulthood. *International Review of Psychiatry* 25, 159–167.
- Posse de Chaves, E., and Sipione, S. (2010). Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Letters* 584, 1748–1759.
- Pradat, P.-F., Bruneteau, G., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Dupuis, L., Jokic, N., Salachas, F., Le Forestier, N., Echaniz-Laguna, A., Dubourg, O., Hauw, J.-J., et al. (2007). Muscle Nogo-a expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. *Ann Neurol.* 62, 15–20.
- Pradat, P.-F., Bruneteau, G., Gordon, P.H., Dupuis, L., Bonnefont-Rousselot, D., Simon, D., Salachas, F., Corcia, P., Frochot, V., Lacorte, J.-M., et al. (2010). Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 11, 166–171.
- Pradat, P.-F., Dubourg, O., de Tapia, M., di Scala, F., Dupuis, L., Lenglet, T., Bruneteau, G., Salachas, F., Lacomblez, L., Corvol, J.-C., et al. (2012). Muscle Gene Expression Is a Marker of Amyotrophic Lateral Sclerosis Severity. *Neurodegener Dis* 9, 38–52.

- Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K., and Rouleau, G.A. (2001). Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase 1 in Transgenic Mice Does Not Lead to Motor Impairment. *J. Neurosci.* *21*, 3369–3374.
- Prinetti, A., Loberto, N., Chigorno, V., and Sonnino, S. (2009). Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1788*, 184–193.
- Procter, A.W., Qurne, M., and Francis, P.T. (1999). Neurochemical Features of Frontotemporal Dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* *10*, 80–84.
- Prodan, C.I., Monnot, M., and Ross, E.D. (2009). Behavioural abnormalities associated with rapid deterioration of language functions in semantic dementia respond to sertraline. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* *80*, 1416–1417.
- Pupillo, E., Messina, P., Giussani, G., Logroscino, G., Zoccolella, S., Chiò, A., Calvo, A., Corbo, M., Lunetta, C., Marin, B., et al. (2014a). Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: A European population-based case-control study: Physical Activity in ALS. *Ann Neurol.* *75*, 708–716.
- Pupillo, E., Messina, P., Logroscino, G., Beghi, E., and the SLALOM Group (2014b). Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: A population-based study: Long-Term Survival in ALS. *Ann Neurol.* *75*, 287–297.
- Rabin, S.J., and Mocchetti, I. (1995). GM1 Ganglioside Activates the High-Affinity Nerve Growth Factor Receptor *trkA*. *Journal of Neurochemistry* *65*, 347–354.
- Rabin, S.J., Bachis, A., and Mocchetti, I. (2002). Gangliosides Activate Trk Receptors by Inducing the Release of Neurotrophins. *J. Biol. Chem.* *277*, 49466–49472.
- Radford, H., Moreno, J.A., Verity, N., Halliday, M., and Mallucci, G.R. (2015). PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol* *130*, 633–642.
- Rascovsky, K., Hodges, J.R., Knopman, D., Mendez, M.F., Kramer, J.H., Neuhaus, J., van Swieten, J.C., Seelaar, H., Dopper, E.G.P., Onyike, C.U., et al. (2011). Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* *134*, 2456–2477.
- Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K., and Hodges, J.R. (2002). CME The prevalence of frontotemporal dementia. *8*.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., et al. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* *13*, 43–47.
- Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T., and Saftig, P. (2007). LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase. *Cell* *131*, 770–783.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., et al. (2011). A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* *72*, 257–268.
- Renton, A.E., Chiò, A., and Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* *17*, 17–23.
- Ribeiro-Resende, V.T., Gomes, T.A., de Lima, S., Nascimento-Lima, M., Bargas-Rega, M., Santiago, M.F., Reis, R.A. de M., and de Mello, F.G. (2014). Mice Lacking GD3 Synthase Display Morphological Abnormalities in the Sciatic Nerve and Neuronal Disturbances during Peripheral Nerve Regeneration. *PLoS ONE* *9*, e108919.
- Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., Morrison, J.H., and Gordon, J.W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *92*, 689–693.
- Robelin, L., and Gonzalez De Aguilar, J.L. (2014). Blood Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Myth or Reality? *BioMed Research International* *2014*, 1–11.
- da Rocha, A.J., Oliveira, A.S.B., Fonseca, R.B., Maia, A.C.M., Buainain, R.P., and Lederman, H.M. (2004). Detection of corticospinal tract compromise in amyotrophic lateral sclerosis with brain MR imaging: relevance of the T1-weighted spin-echo magnetization transfer contrast sequence. *AJNR Am J Neuroradiol* *25*, 1509–1515.
- Rockenstein, E., Clarke, J., Viel, C., Panarello, N., Treleaven, C.M., Kim, C., Spencer, B., Adame, A., Park, H., Dodge, J.C., et al. (2016). Glucocerebrosidase modulates cognitive and motor activities in murine models of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* *ddw124*.
- Rogers, D.F. (2007). Mucoactive Agents for Airway Mucus Hypersecretory Diseases. *RESPIRATORY CARE* *52*, 22.
- Roisen, F., Bartfeld, H., Nagele, R., and Yorke, G. (1981). Ganglioside stimulation of axonal sprouting in vitro. *Science* *214*, 577–578.

- Rojpibulstit, M., Kasiwong, S., Juthong, S., Phadoongsombat, N., and Faroongsarng, D. (2003). Ambroxol lozenges bioavailability : an open-label, two-way crossover study of the comparative bioavailability of ambroxol lozenges and commercial tablets in healthy thai volunteers. *Clin Drug Investig* 23, 273–280.
- Roselli, F., and Caroni, P. (2014). Modeling Neuronal Vulnerability in ALS. *Neuron* 83, 758–760.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O’Regan, J.P., and Deng, H.X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Rosso, S.M. (2003). Medical and environmental risk factors for sporadic frontotemporal dementia: a retrospective case-control study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 74, 1574–1576.
- Rothstein, J.D. (2017). Edaravone: A new drug approved for ALS. *Cell* 171, 725.
- Rotunno, M.S., and Bosco, D.A. (2013). An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* 7.
- Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Menger, Y., Boutillier, A.-L., and Loeffler, J.-P. (2007). Sodium Valproate Exerts Neuroprotective Effects In Vivo through CREB-Binding Protein-Dependent Mechanisms But Does Not Improve Survival in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Journal of Neuroscience* 27, 5535–5545.
- Rowland, L.P., and Shneider, N.A. (2001). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 13.
- Rusten, T.E., and Simonsen, A. (2008). ESCRT functions in autophagy and associated disease. *Cell Cycle* 7, 1166–1172.
- Saccon, R.A., Bunton-Stasyshyn, R.K.A., Fisher, E.M.C., and Fratta, P. (2013). Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain* 136, 2342–2358.
- Samie, M.A., and Xu, H. (2014). Lysosomal exocytosis and lipid storage disorders. *J. Lipid Res.* 55, 995–1009.
- Sanchez-Martinez, A., Beavan, M., Gegg, M.E., Chau, K.-Y., Whitworth, A.J., and Schapira, A.H.V. (2016). Parkinson disease-linked GBA mutation effects reversed by molecular chaperones in human cell and fly models. *Sci Rep* 6, 31380.
- Sandhoff, K., Harzer, K., Wässle, W., and Jatzkewitz, H. (1971). ENZYME ALTERATIONS AND LIPID STORAGE IN THREE VARIANTS OF TAY-SACHS DISEASE. *J Neurochem* 18, 2469–2489.
- Sandhoff, R., Schulze, H., and Sandhoff, K. (2018). Ganglioside Metabolism in Health and Disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 1–62.
- Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2, 791–805.
- Sardi, S.P., Clarke, J., Kinnecom, C., Tamsett, T.J., Li, L., Stanek, L.M., Passini, M.A., Grabowski, G.A., Schlossmacher, M.G., Sidman, R.L., et al. (2011). CNS expression of glucocerebrosidase corrects -synuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 12101–12106.
- Sasaki, S., and Iwata, M. (2007). Mitochondrial Alterations in the Spinal Cord of Patients With Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66, 10–16.
- Saxena, S., Cabuy, E., and Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 12, 627–636.
- Scaricamazza, S., Salvatori, I., Giacobuzzo, G., Loeffler, J.P., Renè, F., Rosina, M., Quessada, C., Proietti, D., Heil, C., Rossi, S., et al. (2020). Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-SOD1G93A Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target. *IScience* 23, 101087.
- Schaeren-Wiemers, N., Van Der Bijl, P., and Schwab, M.E. (2002). The UDP-Galactose:Ceramide Galactosyltransferase: Expression Pattern in Oligodendrocytes and Schwann Cells During Myelination and Substrate Preference for Hydroxyceramide. *Journal of Neurochemistry* 65, 2267–2278.
- Schapira, A.H.V. (2015). Glucocerebrosidase and Parkinson disease: Recent advances. *Molecular and Cellular Neuroscience* 66, 37–42.
- Schapira, A.H., and Jenner, P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson’s disease. *Mov. Disord.* 26, 1049–1055.
- Schmitt, F., Hussain, G., Dupuis, L., Loeffler, J.-P., and Henriques, A. (2014). A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Schnaar, R.L. (2010). Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Letters* 584, 1741–1747.

- Schnaar, R.L., Gerardy-Schahn, R., and Hildebrandt, H. (2014). Sialic Acids in the Brain: Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease, and Regeneration. *Physiological Reviews* 94, 461–518.
- Schofield, E. (2003). Severity of gliosis in Pick's disease and frontotemporal lobar degeneration: tau-positive glia differentiate these disorders. *Brain* 126, 827–840.
- Schonauer, S., Körschen, H.G., Penno, A., Rennhack, A., Breiden, B., Sandhoff, K., Gutbrod, K., Dörmann, P., Raju, D.N., Haberkant, P., et al. (2017). Identification of a feedback loop involving β -glucosidase 2 and its product sphingosine sheds light on the molecular mechanisms in Gaucher disease. *J. Biol. Chem.* 292, 6177–6189.
- Schroeter, M.L., Raczka, K., Neumann, J., and Yves von Cramon, D. (2007). Towards a nosology for frontotemporal lobar degenerations—A meta-analysis involving 267 subjects. *NeuroImage* 36, 497–510.
- Schutz, A., Gund, H.-J., Pschorn, U., Aicher, B., Peil, H., Müller, A., Mey, C., and Gillissen, A. (2011). Local Anaesthetic Properties of Ambroxol Hydrochloride Lozenges in View of Sore Throat. *Arzneimittelforschung* 52, 194–199.
- Schwarz, A., Rapaport, E., Hirschberg, K., and Futerman, A.H. (1995). A regulatory role for sphingolipids in neuronal growth. Inhibition of sphingolipid synthesis and degradation have opposite effects on axonal branching. *J. Biol. Chem.* 270, 10990–10998.
- Segler-Stahl, K., Webster, J.C., and Brunngraber, E.G. (1983). Changes in the concentration and composition of human brain gangliosides with aging. *Gerontology* 29, 161–168.
- Sellier, C., Campanari, M., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynel, I., Oulad-Abdelghani, M., Ruffenach, F., Page, A., Ciura, S., Kabashi, E., et al. (2016). Loss of C9 ORF 72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *EMBO J* 35, 1276–1297.
- Senda, J., Kato, S., Kaga, T., Ito, M., Atsuta, N., Nakamura, T., Watanabe, H., Tanaka, F., Naganawa, S., and Sobue, G. (2011). Progressive and widespread brain damage in ALS: MRI voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging study. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 12, 59–69.
- Settembre, C., and Medina, D.L. (2015). TFEB and the CLEAR network. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 45–62.
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., et al. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB: Self-regulation of the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal* 31, 1095–1108.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 283–296.
- Severina, I.S., Bussygina, O.G., Pyatakova, N.V., Khropov, Y.V., and Krasnoperov, R.A. (2000). Ambroxol as an inhibitor of nitric oxide-dependent activation of soluble guanylate cyclase. *European Journal of Pharmacology* 407, 61–64.
- Sevlever, D., Jiang, P., and Yen, S.-H.C. (2008). Cathepsin D Is the Main Lysosomal Enzyme Involved in the Degradation of α -Synuclein and Generation of Its Carboxy-Terminally Truncated Species [†]. *Biochemistry* 47, 9678–9687.
- Shachar, T., Bianco, C.L., Recchia, A., Wiessner, C., Raas-Rothschild, A., and Futerman, A.H. (2011). Lysosomal storage disorders and Parkinson's disease: Gaucher disease and beyond. *Mov. Disord.* 26, 1593–1604.
- Shanmuganathan, M., and Britz-McKibbin, P. (2011). Inhibitor screening of pharmacological chaperones for lysosomal β -glucocerebrosidase by capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem* 399, 2843–2853.
- Sharp, P.S., Dick, J.R.T., and 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.
- Shen, W., Henry, A.G., Paumier, K.L., Li, L., Mou, K., Dunlop, J., Berger, Z., and Hirst, W.D. (2014). Inhibition of glucosylceramide synthase stimulates autophagy flux in neurons. *J. Neurochem.* 129, 884–894.
- Sidransky, E., and Lopez, G. (2012). The link between the GBA gene and parkinsonism. *The Lancet Neurology* 11, 986–998.
- Sidransky, E., Nalls, M.A., Aasly, J.O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E.R., Bar-Shira, A., Berg, D., Bras, J., Brice, A., et al. (2009). Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 361, 1651–1661.
- Siebert, M., Sidransky, E., and Westbroek, W. (2014). Glucocerebrosidase is shaking up the synucleinopathies. *Brain* 137, 1304–1322.
- Silveira, C.R.A., MacKinley, J., Coleman, K., Li, Z., Finger, E., Bartha, R., Morrow, S.A., Wells, J., Borrie, M., Tirona, R.G., et al. (2019). Ambroxol as a novel disease-modifying treatment for Parkinson's disease dementia: protocol for a single-centre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Neurol* 19, 20.

- Simonaro, C.M. (2016). Lysosomes, Lysosomal Storage Diseases, and Inflammation. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening* 4, 232640981665046.
- Simpson, E.P., Henry, Y.K., Henkel, J.S., Smith, R.G., and Appel, S.H. (2004a). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 62, 1758–1765.
- Simpson, M.A., Cross, H., Proukakis, C., Priestman, D.A., Neville, D.C.A., Reinkensmeier, G., Wang, H., Wiznitzer, M., Gurtz, K., Verganelaki, A., et al. (2004b). Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat Genet* 36, 1225–1229.
- Sjogren, M. (2004). Increased intrathecal inflammatory activity in frontotemporal dementia: pathophysiological implications. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 75, 1107–1111.
- Skibinski, G., Parkinson, N.J., Brown, J.M., Chakrabarti, L., Lloyd, S.L., Hummerich, H., Nielsen, J.E., Hodges, J.R., Spillantini, M.G., Thusgaard, T., et al. (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 37, 806–808.
- Soo, K.Y., Sultana, J., King, A., Atkinson, R., Warraich, S.T., Sundaramoorthy, V., Blair, I., Farg, M.A., and Atkin, J.D. (2015). ALS-associated mutant FUS inhibits macroautophagy which is restored by overexpression of Rab1. *Cell Death Discovery* 1, 15030.
- Souza, P.V.S. de, Pinto, W.B.V. de R., Rezende Filho, F.M., and Oliveira, A.S.B. (2016). Far beyond the motor neuron: the role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 74, 849–854.
- Spampanato, C., Feeney, E., Li, L., Cardone, M., Lim, J., Annunziata, F., Zare, H., Polishchuk, R., Puertollano, R., Parenti, G., et al. (2013). Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Mol Med* 5, 691–706.
- Spataro, R., Bono, V., Marchese, S., and La Bella, V. (2012). Tracheostomy mechanical ventilation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Clinical features and survival analysis. *Journal of the Neurological Sciences* 323, 66–70.
- Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A.C., and Robertson, R.C. (1987). Guam Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism- Dementia Linked to a Plant Excitant Neurotoxin. 237, 6.
- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., et al. (2008). TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 319, 1668–1672.
- Steet, R., Chung, S., Lee, W.-S., Pine, C.W., Do, H., and Kornfeld, S. (2007). Selective action of the iminosugar isofagomine, a pharmacological chaperone for mutant forms of acid- β -glucosidase. *Biochemical Pharmacology* 73, 1376–1383.
- Steet, R.A., Chung, S., Wustman, B., Powe, A., Do, H., and Kornfeld, S.A. (2006). The iminosugar isofagomine increases the activity of N370S mutant acid β -glucosidase in Gaucher fibroblasts by several mechanisms. *MEDICAL SCIENCES* 6.
- Stein, V.M., Crooks, A., Ding, W., Prociuk, M., O'Donnell, P., Bryan, C., Sikora, T., Dingemans, J., Vanier, M.T., Walkley, S.U., et al. (2012). Miglustat Improves Purkinje Cell Survival and Alters Microglial Phenotype in Feline Niemann-Pick Disease Type C. *J Neuropathol Exp Neurol* 71, 434–448.
- Stetzowski-Marden, F., Gaus, K., Recouvreur, M., Cartaud, A., and Cartaud, J. (2006). Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J. Lipid Res.* 47, 2121–2133.
- Steyn, F.J., Ioannides, Z.A., van Eijk, R.P.A., Heggie, S., Thorpe, K.A., Ceslis, A., Heshmat, S., Henders, A.K., Wray, N.R., van den Berg, L.H., et al. (2018). Hypermetabolism in ALS is associated with greater functional decline and shorter survival. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89, 1016–1023.
- Stichel, C.C., and Luebbert, H. (2007). Inflammatory processes in the aging mouse brain: Participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiology of Aging* 28, 1507–1521.
- Stojkowska, I., Krainc, D., and Mazzulli, J.R. (2018). Molecular mechanisms of α -synuclein and GBA1 in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 373, 51–60.
- Strong, M.J., Volkening, K., Hammond, R., Yang, W., Strong, W., Leystra-Lantz, C., and Shoesmith, C. (2007). TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Molecular and Cellular Neuroscience* 35, 320–327.
- Su, J.H., Nichol, K.E., Sitch, T., Sheu, P., Chubb, C., Miller, B.L., Tomaselli, K.J., Kim, R.C., and Cotman, C.W. (2000). DNA Damage and Activated Caspase-3 Expression in Neurons and Astrocytes: Evidence for Apoptosis in Frontotemporal Dementia. *Experimental Neurology* 163, 9–19.

- Sultana, S., Reichbauer, J., Schüle, R., Mochel, F., Synofzik, M., and van der Spoel, A.C. (2015). Lack of enzyme activity in GBA2 mutants associated with hereditary spastic paraplegia/cerebellar ataxia (SPG46). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 465, 35–40.
- Sunico, C.R., Domínguez, G., García-Verdugo, J.M., Osta, R., Montero, F., and Moreno-López, B. (2011). Reduction in the Motoneuron Inhibitory/Excitatory Synaptic Ratio in an Early-Symptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Inhibitory Loss and Excitatory Gain in ALS. *Brain Pathology* 21, 1–15.
- Swinnen, B., and Robberecht, W. (2014). The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10, 661–670.
- Tamargo, R.J., Velayati, A., Goldin, E., and Sidransky, E. (2012). The role of saposin C in Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 106, 257–263.
- Tamiji, J., and Crawford, D.A. (2010). The Neurobiology of Lipid Metabolism in Autism Spectrum Disorders. *Neurosignals* 18, 98–112.
- Tan, C.-F., Eguchi, H., Tagawa, A., Onodera, O., Iwasaki, T., Tsujino, A., Nishizawa, M., Kakita, A., and Takahashi, H. (2007). TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol* 113, 535–542.
- Tang, Y., and Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53, 1181–1194.
- Taylor, J.P., Brown, R.H., and Cleveland, D.W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 539, 197–206.
- Thompson, S.A., Patterson, K., and Hodges, J.R. (2003). Left/right asymmetry of atrophy in semantic dementia: Behavioral-cognitive implications. *Neurology* 61, 1196–1203.
- Ticozzi, N., Vance, C., LeClerc, A.L., Keagle, P., Glass, J.D., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Silani, V., Bosco, D.A., Shaw, C.E., et al. (2011). Mutational analysis reveals the FUS homolog TAF15 as a candidate gene for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Med. Genet.* 156, 285–290.
- Tortelli, R., Ruggieri, M., Cortese, R., D’Errico, E., Capozzo, R., Leo, A., Mastrapasqua, M., Zoccolella, S., Leante, R., Livrea, P., et al. (2012). Elevated cerebrospinal fluid neurofilament light levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a possible marker of disease severity and progression. *Eur J Neurol* 19, 1561–1567.
- Tracey, T.J., Steyn, F.J., Wolvetang, E.J., and Ngo, S.T. (2018). Neuronal Lipid Metabolism: Multiple Pathways Driving Functional Outcomes in Health and Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 10.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* 319, 1244–1247.
- Tsai, R.M., and Boxer, A.L. (2016). Therapy and clinical trials in frontotemporal dementia: past, present, and future. *J. Neurochem.* 138, 211–221.
- Turnbull, J. (2018). Is edaravone harmful? (A placebo is not a control). *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 19, 477–482.
- Turner, M.R., Parton, M.J., and Leigh, P.N. (2001). Clinical Trials in ALS: An Overview. *Semin Neurol* 21, 167–176.
- Turner, M.R., Cagnin, A., Turkheimer, F.E., Miller, C.C.J., Shaw, C.E., Brooks, D.J., Leigh, P.N., and Banati, R.B. (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiology of Disease* 15, 601–609.
- Turner, M.R., Goldacre, R., Ramagopalan, S., Talbot, K., and Goldacre, M.J. (2013). Autoimmune disease preceding amyotrophic lateral sclerosis: An epidemiologic study. *Neurology* 81, 1222–1225.
- Turner, M.R., Al-Chalabi, A., Chio, A., Hardiman, O., Kiernan, M.C., Rohrer, J.D., Rowe, J., Seeley, W., and Talbot, K. (2017). Genetic screening in sporadic ALS and FTD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 1042–1044.
- Urwin, H., Ghazi-Noori, S., Collinge, J., and Isaacs, A. (2009). The role of CHMP2B in frontotemporal dementia. *Biochemical Society Transactions* 37, 208–212.
- Urwin, H., Authier, A., Nielsen, J.E., Metcalf, D., Powell, C., Froud, K., Malcolm, D.S., Holm, I., Johannsen, P., Brown, J., et al. (2010). Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Human Molecular Genetics* 19, 2228–2238.
- Valdez, C., Wong, Y.C., Schwake, M., Bu, G., Wszolek, Z.K., and Krainc, D. (2017). Progranulin-mediated deficiency of cathepsin D results in FTD and NCL-like phenotypes in neurons derived from FTD patients. *Human Molecular Genetics* 26, 4861–4872.
- Valdez, C., Ysselstein, D., Young, T.J., Zheng, J., and Krainc, D. (2020). Progranulin mutations result in impaired processing of prosaposin and reduced glucocerebrosidase activity. *Human Molecular Genetics* 29, 716–726.

- Valentine, J.S., Doucette, P.A., and Zittin Potter, S. (2005). COPPER-ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE AND AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 563–593.
- Van Langenhove, T., van der Zee, J., Slegers, K., Engelborghs, S., Vandenberghe, R., Gijssels, I., Van den Broeck, M., Mattheijssens, M., Peeters, K., De Deyn, P.P., et al. (2010). Genetic contribution of FUS to frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 74, 366–371.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., et al. (2009). Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science* 323, 1208–1211.
- Vardi, A., Zigdon, H., Meshcheriakova, A., Klein, A.D., Yaacobi, C., Eilam, R., Kenwood, B.M., Rahim, A.A., Massaro, G., Merrill, A.H., et al. (2016). Delineating pathological pathways in a chemically induced mouse model of Gaucher disease: Characterization of a chemically induced model of Gaucher disease. *J. Pathol.* 239, 496–509.
- Velho, R.V., Harms, F.L., Danyukova, T., Ludwig, N.F., Friez, M.J., Cathey, S.S., Filocamo, M., Tappino, B., Güneş, N., Tüysüz, B., et al. (2019). The lysosomal storage disorders mucopolisaccharidosis type II, type III alpha/beta, and type III gamma: Update on *GNPTAB* and *GNPTG* mutations. *Human Mutation* humu.23748.
- Vercruyse, P., Vieau, D., Blum, D., Petersén, Å., and Dupuis, L. (2018). Hypothalamic Alterations in Neurodegenerative Diseases and Their Relation to Abnormal Energy Metabolism. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 2.
- Vernay, A., Therreau, L., Blot, B., Risson, V., Dirrig-Grosch, S., Waegaert, R., Lequeu, T., Sellal, F., Schaeffer, L., Sadoul, R., et al. (2016). A transgenic mouse expressing CHMP2B^{intron5} mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum. Mol. Genet.* 25, 3341–3360.
- Verstraete, E., Veldink, J.H., Hendrikse, J., Schelhaas, H.J., van den Heuvel, M.P., and van den Berg, L.H. (2012). Structural MRI reveals cortical thinning in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83, 383–388.
- Vesper, H., Schmelz, E.-M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V., and Merrill, A.H. (1999). Sphingolipids in Food and the Emerging Importance of Sphingolipids to Nutrition. *The Journal of Nutrition* 129, 1239–1250.
- Vinceti, M., Bonvicini, F., Rothman, K.J., Vescovi, L., and Wang, F. (2010). The relation between amyotrophic lateral sclerosis and inorganic selenium in drinking water: a population-based case-control study. *Environ Health* 9, 77.
- Votsi, C., Zamba-Papanicolaou, E., Middleton, L.T., Pantzaris, M., and Christodoulou, K. (2014). A Novel *GBA2* Gene Missense Mutation in Spastic Ataxia: Novel *GBA2* Gene Mutation. *Annals of Human Genetics* 78, 13–22.
- Vucic, S., and Rutkove, S.B. (2018). Neurophysiological biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: Current Opinion in *Neurology* 31, 640–647.
- Waegaert, R., Dirrig-Grosch, S., Parisot, F., Keime, C., Henriques, A., Loeffler, J.-P., and René, F. (2020). Longitudinal transcriptomic analysis of altered pathways in a CHMP2Bintron5-based model of ALS-FTD. *Neurobiology of Disease* 136, 104710.
- Waibel, S., Reuter, A., Malessa, S., Blaugrund, E., and Ludolph, Albert C. (2004). Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. *J Neurol* 251.
- Walden, C.M., Sandhoff, R., Chuang, C.-C., Yildiz, Y., Butters, T.D., Dwek, R.A., Platt, F.M., and van der Spoel, A.C. (2007). Accumulation of Glucosylceramide in Murine Testis, Caused by Inhibition of β -Glucosidase 2: IMPLICATIONS FOR SPERMATOGENESIS. *J. Biol. Chem.* 282, 32655–32664.
- Wang, J., Cheng, A., Wakade, C., and Yu, R.K. (2014). Ganglioside GD3 Is Required for Neurogenesis and Long-Term Maintenance of Neural Stem Cells in the Postnatal Mouse Brain. *J. Neurosci.* 34, 13790–13800.
- Wang, L., Gutmann, D.H., and Roos, R.P. (2011). Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Human Molecular Genetics* 20, 286–293.
- Warren, J.D., Rohrer, J.D., and Rossor, M.N. (2013). Frontotemporal dementia. *BMJ* 347, f4827–f4827.
- Webster, C.P., Smith, E.F., Bauer, C.S., Moller, A., Hautbergue, G.M., Ferraiuolo, L., Myszczyńska, M.A., Higginbottom, A., Walsh, M.J., Whitworth, A.J., et al. (2016). The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK 1 complex to regulate initiation of autophagy. *EMBO J* 35, 1656–1676.
- van Weely, S., Brandsma, M., Strijland, A., Tager, J.M., and Aerts, J.M. (1993). Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1181, 55–62.

- Wei, Y. (2014). Autophagic induction of amyotrophic lateral sclerosis-linked Cu/Zn superoxide dismutase 1 G93A mutant in NSC34 cells. *Neural Regen Res* 9, 16.
- Weiser, T. (2006). Comparison of the effects of four Na⁺ channel analgesics on TTX-resistant Na⁺ currents in rat sensory neurons and recombinant Nav1.2 channels. *Neuroscience Letters* 395, 179–184.
- Weiser, T. (2008). Ambroxol: A CNS Drug? *CNS Drug Reviews* 14, 17–24.
- Weiser, T., and Wilson, N. (2002). Inhibition of Tetrodotoxin (TTX)-Resistant and TTX-Sensitive Neuronal Na⁺ Channels by the Secretolytic Ambroxol. 6.
- Wendt, W., Zhu, X.-R., Lübbert, H., and Stichel, C.C. (2007). Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Experimental Neurology* 204, 525–540.
- Wennekes, T., van den Berg, R.J.B.H.N., Boot, R.G., van der Marel, G.A., Overkleeft, H.S., and Aerts, J.M.F.G. (2009). Glycosphingolipids-Nature, Function, and Pharmacological Modulation. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 8848–8869.
- Westeneng, H.-J., Al-Chalabi, A., Hardiman, O., Debray, T.P., and van den Berg, L.H. (2018). The life expectancy of Stephen Hawking, according to the ENCALs model. *The Lancet Neurology* 17, 662–663.
- Wheeler, S., Haberkant, P., Bhardwaj, M., Tongue, P., Ferraz, M.J., Halter, D., Sprong, H., Schmid, R., Aerts, J.M.F.G., Sullo, N., et al. (2019). Cytosolic glucosylceramide regulates endolysosomal function in Niemann-Pick type C disease. *Neurobiology of Disease* 127, 242–252.
- Wijesekera, L.C., and Leigh, P.N. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 4, 3.
- Wiktorska, J.A., Lewinski, A., Stuss, M., Nowak, D., Pietras, T., and Sewerynek, E. (2010). Effects of certain antioxidants on lipid peroxidation process in lung homogenates of L thyroxine-receiving rats. *Neuro Endocrinol. Lett.* 31, 137–146.
- Wills, A.-M., Hubbard, J., Macklin, E.A., Glass, J., Tandan, R., Simpson, E.P., Brooks, B., Gelinias, D., Mitsumoto, H., Mozaffar, T., et al. (2014). Hypercaloric enteral nutrition in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet* 383, 2065–2072.
- de Wit, N.M., den Hoedt, S., Martinez-Martinez, P., Rozemuller, A.J., Mulder, M.T., and de Vries, H.E. (2019). Astrocytic ceramide as possible indicator of neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 16, 48.
- Woeste, M.A., and Wachten, D. (2017). The Enigmatic Role of GBA2 in Controlling Locomotor Function. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 386.
- Woeste, M.A., Stern, S., Raju, D.N., Grahn, E., Dittmann, D., Gutbrod, K., Dörmann, P., Hansen, J.N., Schonauer, S., Marx, C.E., et al. (2019). Species-specific differences in nonlysosomal glucosylceramidase GBA2 function underlie locomotor dysfunction arising from loss-of-function mutations. *J. Biol. Chem.* 294, 3853–3871.
- Wolf, J., Safer, A., Wöhrle, J.C., Palm, F., Nix, W.A., Maschke, M., and Grau, A.J. (2014). Factors predicting one-year mortality in amyotrophic lateral sclerosis patients - data from a population-based registry. *BMC Neurol* 14, 197.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14, 1105–1116.
- Woolley, J.D., Gorno-Tempini, M.-L., Seeley, W.W., Rankin, K., Lee, S.S., Matthews, B.R., and Miller, B.L. (2007). Binge eating is associated with right orbitofrontal-insular-striatal atrophy in frontotemporal dementia. *Neurology* 69, 1424–1433.
- Worms, P.M. (2001). The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *Journal of the Neurological Sciences* 191, 3–9.
- Wu, G., Xie, X., Lu, Z.-H., and Ledeen, R.W. (2009). Sodium-calcium exchanger complexed with GM1 ganglioside in nuclear membrane transfers calcium from nucleoplasm to endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 10829–10834.
- Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E.A., Garcia, M.L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O.R., Cleveland, D.W., and Goldstein, L.S.B. (2008). Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 7594–7599.
- Yamashita, T., Wu, Y.-P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J.M., Dupree, J.L., Geyer, R., Sandhoff, K., and Proia, R.L. (2005). Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 2725–2730.
- Yang, S., Gegg, M., Chau, D., and Schapira, A. (2020). Glucocerebrosidase activity, cathepsin D and monomeric α -synuclein interactions in a stem cell derived neuronal model of a PD associated GBA1 mutation. *Neurobiology of Disease* 134, 104620.

- Yang, S.-Y., Beavan, M., Chau, K.-Y., Taanman, J.-W., and Schapira, A.H.V. (2017). A Human Neural Crest Stem Cell-Derived Dopaminergic Neuronal Model Recapitulates Biochemical Abnormalities in GBA1 Mutation Carriers. *Stem Cell Reports* 8, 728–742.
- Yang, Y.-G., Song, L.-X., Jiang, N., Xu, X.-T., Di, X.-H., and Zhang, M. (2015). Pharmacokinetics of ambroxol and clenbuterol tablets in healthy Chinese volunteers. 7.
- Yap, T.L., Velayati, A., Sidransky, E., and Lee, J.C. (2013a). Membrane-bound α -synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity. *Molecular Genetics and Metabolism* 108, 56–64.
- Yap, T.L., Gruschus, J.M., Velayati, A., Sidransky, E., and Lee, J.C. (2013b). Saposin C Protects Glucocerebrosidase against α -Synuclein Inhibition. *Biochemistry* 52, 7161–7163.
- Yildiz, Y., Matern, H., Thompson, B., Allegood, J.C., Warren, R.L., Ramirez, D.M.O., Hammer, R.E., Hamra, F.K., Matern, S., and Russell, D.W. (2006). Mutation of β -glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J. Clin. Invest.* 116, 2985–2994.
- Yildiz, Y., Hoffmann, P., vom Dahl, S., Breiden, B., Sandhoff, R., Niederau, C., Horwitz, M., Karlsson, S., Filocamo, M., Elstein, D., et al. (2013). Functional and genetic characterization of the non-lysosomal glucosylceramidase 2 as a modifier for Gaucher disease. *Orphanet J Rare Dis* 8, 151.
- Yin, F., Banerjee, R., Thomas, B., Zhou, P., Qian, L., Jia, T., Ma, X., Ma, Y., Iadecola, C., Beal, M.F., et al. (2010). Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 117–128.
- Yoshimura, N., Seki, S., Novakovic, S.D., Tzoumaka, E., Erickson, V.L., Erickson, K.A., Chancellor, M.B., and de Groat, W.C. (2001). The Involvement of the Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channel Na_v 1.8 (PN3/SNS) in a Rat Model of Visceral Pain. *J. Neurosci.* 21, 8690–8696.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron* 53, 337–351.
- Young, M.M., and Wang, H.-G. (2018). Sphingolipids as Regulators of Autophagy and Endocytic Trafficking. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 27–60.
- Yowler, B.C., Kensinger, R.D., and Schengrund, C.-L. (2002). Botulinum Neurotoxin A Activity Is Dependent upon the Presence of Specific Gangliosides in Neuroblastoma Cells Expressing Synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* 277, 32815–32819.
- Yu, R.K., Macala, L.J., Taki, T., Weinfeld, H.M., and Yu, F.S. (1988). Developmental Changes in Ganglioside Composition and Synthesis in Embryonic Rat Brain. *J Neurochem* 50, 1825–1829.
- Yu, R.K., Nakatani, Y., and Yanagisawa, M. (2009). The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J. Lipid Res.* 50, S440–S445.
- Yu, R.K., Tsai, Y.-T., and Ariga, T. (2012). Functional Roles of Gangliosides in Neurodevelopment: An Overview of Recent Advances. *Neurochem Res* 37, 1230–1244.
- Yuan, J., Zhao, X., Hu, Y., Sun, H., Gong, G., Huang, X., Chen, X., Xia, M., Sun, C., Huang, Q., et al. (2018). Autophagy regulates the degeneration of the auditory cortex through the AMPK-mTOR-ULK1 signaling pathway. *Int J Mol Med.*
- van der Zee, J., Urwin, H., Engelborghs, S., Bruyland, M., Vandenberghe, R., Dermaut, B., De Pooter, T., Peeters, K., Santens, P., De Deyn, P.P., et al. (2008). CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Human Molecular Genetics* 17, 313–322.
- Zhang, F., Ström, A.-L., Fukada, K., Lee, S., Hayward, L.J., and Zhu, H. (2007). Interaction between Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)-linked SOD1 Mutants and the Dynein Complex. *J. Biol. Chem.* 282, 16691–16699.
- Zhang, X., Cheng, X., Yu, L., Yang, J., Calvo, R., Patnaik, S., Hu, X., Gao, Q., Yang, M., Lawas, M., et al. (2016). MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nat Commun* 7, 12109.
- Zoccollella, S., Beghi, E., Palagano, G., Fraddosio, A., Guerra, V., Samarelli, V., Lepore, V., Simone, I.L., Lamberti, P., Serlenga, L., et al. (2007). Riluzole and amyotrophic lateral sclerosis survival: a population-based study in southern Italy: Riluzole and ALS survival in Puglia. *European Journal of Neurology* 14, 262–268.

Modulation des sphingolipides comme piste thérapeutique dans la Sclérose Latérale Amyotrophique

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative qui présente des perturbations du métabolisme énergétique. Nos travaux mettent en évidence que le métabolisme des glycosphingolipides (GSLs) est fortement affecté dans cette pathologie. La Démence Fronto-temporale (DFT) et la SLA partagent un même continuum clinique, génétique et histopathologique. L'objectif de ma thèse a été de déterminer l'impact d'une modulation des GSLs grâce à une approche pharmacologique, l'ambroxol hydrochloride (AMB), sur le modèle SLA *Sod1^{G86R}* et le modèle SLA-DFT *CHMP2B^{intron5}*. J'ai pu ainsi montrer que le traitement à l'AMB a des effets bénéfiques sur la composante motrice de ces deux modèles ainsi que sur la durée de vie des souris *Sod1^{G86R}*, tout en limitant les altérations comportementales des souris *CHMP2B^{intron5}*. A long-terme, l'AMB pourrait ainsi être envisagé comme étant un candidat médicament pour la SLA.

Mots clés : GSLs, SLA, DFT, AMB, SOD1, CHMP2B

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease with defects in energy metabolism. Our work shows that the metabolism of glycosphingolipids (GSLs) is strongly affected in this pathology. Fronto-temporal Dementia (FTD) and ALS share a common clinical, genetic and histopathological continuum. The aim of my thesis objective was to determine the effect of ambroxol (AMB), a pharmacological modulator of GSLs, on the ALS *Sod1^{G86R}* model and the ALS-FTD *CHMP2B^{intron5}* model. I demonstrated that AMB treatment has beneficial effects on the motor functions of these two models as well as on the lifespan of *Sod1^{G86R}* mice, while limiting the behavioral alterations of *CHMP2B^{intron5}* model. In the long term, AMB could be considered as a potential drug candidate for ALS.

Key words: GSLs, ALS, FTD, AMB, SOD1, CHMP2B