

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

**INSERM U1118**

**THÈSE** présentée par :

**Aurore BRUNET**

soutenue le : **23 septembre 2021**

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

Discipline/ Spécialité : Neurosciences et Sciences de la Santé

**Évaluation de la contribution noradrénergique  
à l'hyperexcitabilité corticale  
dans des modèles murins  
de sclérose latérale amyotrophique**

**THÈSE dirigée par :**

**Dr. ROUAUX Caroline**

Chargée de Recherche, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Dr. BOURET Sébastien**

Directeur de Recherche, Université Pierre et Marie Curie

**Pr. PRADAT Pierre-François**

Professeur des Universités et Clinicien-Neurologue, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Dr. LIEBSCHER Sabine**

Group Leader, Ludwig-Maximilians Universität München

**Dr. GODIN Juliette**

Chargée de Recherche, Université de Strasbourg

**Pr. LARMET Yves**

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

"Science makes people reach selflessly for truth and objectivity;  
it teaches people to accept reality,  
with wonder and admiration,  
not to mention the deep awe and joy  
that the natural order of things brings to the true scientist."

Lise Meitner, a physicist who never lost her humanity

## Remerciements

La réalisation d'un projet, et surtout celle d'une thèse, est un travail d'équipe nécessitant l'implication de nombreuses personnes et le soutien de bien plus encore. Je tiens donc à remercier très sincèrement l'ensemble des personnes ayant contribué de près ou de loin à cette aventure.

En premier lieu, je souhaite remercier ma directrice de thèse, **Caroline Rouaux**. Merci de m'avoir offert une place dans cette superbe équipe, et cela dès mon master. J'ai beaucoup appris à ton contact, et en ressors grandie. Merci pour tes conseils, ta pédagogie, ta patience et pour m'avoir fait voir le verre à moitié plein lorsque j'avais tendance à le voir à moitié vide. Enfin merci de m'avoir confié ce beau projet qui me tient énormément à cœur.

Je remercie **Luc Dupuis**, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueillie dans cette merveilleuse unité de recherche. Merci pour ton apport scientifique sur mon projet, tes questions et remarques durant toute l'avancée de ma thèse. Merci pour le temps que tu m'as consacré et que tu continues d'accorder à tous les membres de ce laboratoire.

Je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse, **Sébastien Bouret**, **Pierre-François Pradat**, **Sabine Liebscher**, **Juliette Godin** et **Yves Larmet** pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également **Yannick Goumon** et **Virginie Andry**, mes collaborateurs. Votre implication a créé un tournant majeur dans l'évolution de mon projet de thèse. Merci pour le temps que vous m'avez consacré et votre accueil toujours chaleureux et bienveillant dans votre équipe. Merci aussi à **Romain Goutagny** et **Vincent Douchamps** pour leur contribution.

Je ne peux écrire de remerciements sans mentionner les nombreux membres actuels ou passés du laboratoire U1118. Je remercie **Fred**, **Marc**, **José**, **Salim** et **Matéi** pour leurs remarques tout au long de l'avancement de mon projet. Un grand merci à **Christine**, **Jelena**, **Matthieu** et **Jérôme**, anciens de la team Caro, partis vers de nouvelles aventures. Pour leur

aide précieuse durant ma thèse, merci à **Claudia** (et son rire communicatif) et **Annie**. Merci à **Sylvie** pour son écoute et à **Marco** pour son énergie et ses éternuements à en faire s'effondrer le bâtiment 3. Merci aussi à **Haoyi** et **Alizée** (Lolita l'incruste, reine incontestée des parties d'Esquissé).

Merci à la nouvelle génération, aux petits pioupiou, à la relève : Marguerite, Félicie, Simon mais aussi **Marion** et **Mike**. Merci à **Guiguite** et son enthousiasme débordant, son utilisation sans limite de superlatifs et sa bonne humeur communicative, à **Félicie** et sa maniaquerie (faisant passer la mienne pour une légère extravagance) et à **Simon** pour son dédain de tout ce qui n'est pas Américain. Un immense merci à **Raphaëlle** pour son soutien, ses conseils, sa relecture de mon manuscrit et ne jamais avoir usé de coups de nunchaku pour me booster. Merci à mes voisins de bureau et vieux sages, **Thibaut**, pour sa folie et la violence de ses multiples expérimentations capillaires, et **Imma** et sa capacité à pervertir chaque dialogue d'Harry Potter, deux verres de Gin To à la main. Merci à **Robin**, artiste incontesté en art de la pâte à sel et actionnaire majoritaire du Schluck N'Spiel, de m'avoir gracieusement offert sa place à l'unique bureau équipé d'une fenêtre à arrosage automatique. A mon acolyte, **Johan** : merci pour ton pessimisme légendaire (atténuant très largement le mien) et ton aide durant la seconde moitié de cette thèse, qui n'aurait pas été la même sans toi et ton sale caractère de râleur bien français.

Pour leur aide inestimable, je tiens à remercier très chaleureusement Margaux et Geoffrey. **Margaux**, ton enthousiasme, ta générosité, ton écoute et ton débit de parole record m'ont énormément aidé, sans compter ta grande implication et ton travail sur ce projet. **Geoffrey**, ta contribution à ce travail est immense. En plus d'un collègue investi, passionné et volontaire, j'ai aussi découvert une personne passionnante, ouverte d'esprit, toujours prête à aider et piquante de ses remarques les plus caustiques (pour mon plus grand divertissement !).

A mes collègues devenus amis, Gina, Stéphane, Alexandra et à mon ami devenu collègue, Cyril, je tiens à adresser un immense merci. **Gina**, tu m'as m'accueilli à bras ouverts, fait pleurer de rire, m'as vu craquer et m'as poussé à me redresser. Tes (beaucoup trop nombreux) déboires et ta ténacité, sans parler de ta bonté de cœur, ton oreille attentive, ta bonne humeur sans limite ont fait de toi mon pilier dans ce laboratoire. **Stéphane**, objet de mon amour à sens unique, je n'ai vu dans tes rejets que la preuve de ton attachement sincère.

Merci d'avoir toujours répondu « Bah mange si tu as faim » à mes « Stéphane, j'ai faim ! », « Elle va se taire, oui ?! » à mes longs monologues ou encore « Quoi encore ?! » à mes multiples « Stéphaaane, j'ai besoin d'aide... ». **Alexandra**, merci pour toutes ces heures de conversation à parler de tout (mais vraiment de tout), pour ta confiance, ton caractère bien trempé et la personne que tu es, vraie et sincère. **Cyril**, mon fellow Bichon, merci d'avoir été mon repère depuis notre arrivée dans ce laboratoire. Merci pour ton soutien, ta patience face à mes longues tirades et ton insupportable relativisme !

Parce que les nouvelles rencontres comptent, mais que les anciennes amitiés aussi, je tiens à remercier toutes les personnes m'ayant soutenu (et surtout supporté) toutes ces années et bien avant. Merci aux autres Bichons, compagnons de Master et mes futurs associés dans l'ouverture d'un Coco Bar : **Zélie**, le Charles Ingalls du coup de hache, la baby-sitter préférée de mes plantes vertes et psychothérapeute désignée volontaire, **Lucas**, mon Ch'ti Calimero préféré, et **Julia**, détentrice du record de surdosage de beurre salé. Merci aussi à **Juliette** et **Léa** de me tolérer depuis la Licence et toujours me réserver une place au Square. Parce que sans elle mon périple en terre Alsacienne n'aurait été qu'un rapide aller-retour, je remercie **Clara** (aka Bretzel) pour sa joie de vivre, sa bienveillance et sa précieuse amitié. A mes vieilles (très vieilles) amies, **Clarillouz** et **Janus**, merci d'avoir toujours été là pour moi, toujours.

Je tiens bien évidemment à remercier du fond du cœur ma famille, mon pilier sans qui je ne serais jamais arrivé jusqu'ici. Merci à **mes parents** de m'avoir accompagné sans jamais me diriger, de m'avoir soutenu de toutes les manières possibles, m'avoir tout donné et aimé, tout simplement. Merci à mon grand frère, **Jérémie**, d'être ce beau modèle de courage et de ténacité. Merci à eux et au reste de ma famille pour leur soutien et leur fierté. Merci à celles parties avant la fin de cette aventure, **Mamie** et **Tata Rité**, d'avoir toujours été un exemple de femmes fortes et généreuses.

Enfin, merci à toutes ces personnes qui, ces trois dernières années, m'ont demandé « Alors ça y est, t'as guéri Charcot ? », parce qu'aujourd'hui je peux enfin répondre « Pas encore, mais j'ai apporté ma pierre à l'édifice. ». Merci.



## Déclaration sur l'honneur *Declaration of Honour*

J'affirme être informé que le plagiat est une faute grave susceptible de mener à des sanctions administratives et disciplinaires pouvant aller jusqu'au renvoi de l'Université de Strasbourg et passible de poursuites devant les tribunaux de la République Française.

Je suis conscient(e) que l'absence de citation claire et transparente d'une source empruntée à un tiers (texte, idée, raisonnement ou autre création) est constitutive de plagiat.

Au vu de ce qui précède, **j'atteste sur l'honneur que le travail décrit dans mon manuscrit de thèse est un travail original et que je n'ai pas eu recours au plagiat ou à toute autre forme de fraude.**

*I affirm that I am aware that plagiarism is a serious misconduct that may lead to administrative and disciplinary sanctions up to dismissal from the University of Strasbourg and liable to prosecution in the courts of the French Republic.*

*I am aware that the absence of a clear and transparent citation of a source borrowed from a third party (text, idea, reasoning or other creation) is constitutive of plagiarism.*

*In view of the foregoing, **I hereby certify that the work described in my thesis manuscript is original work and that I have not resorted to plagiarism or any other form of fraud.***

**Nom Prénom : BRUNET Aurore**

**Ecole doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé - Strasbourg**

**Laboratoire : INSERM U1118**

**Date : 23/09/2021**

## Table des matières

Introduction.....	16
Chapitre I : La sclérose latérale amyotrophique .....	16
1. Historique et Définition clinique .....	16
1.1. Historique .....	16
1.2. Définition clinique .....	17
2. Symptômes.....	19
2.1. Symptômes moteurs .....	19
2.2. Symptômes non moteurs .....	20
2.2.1. Atteintes cognitives et comportementales.....	20
2.2.2. Troubles psychologiques.....	21
2.2.3. Troubles métaboliques et lipidiques .....	21
3. Epidémiologie.....	22
3.1. Incidence et Prévalence .....	22
3.2. Répartition géographique .....	23
3.3. Facteurs de risque .....	24
3.3.1. L'âge .....	24
3.3.2. Le sexe .....	25
3.3.3. L'environnement .....	26
3.3.4. La génétique .....	27
4. Génétique.....	28
4.1. Superoxyde dismutase 1 (SOD1).....	29
4.2. TAR DNA-binding protein 43 (TARDBP ou TDP-43).....	30
4.3. Fused in sarcoma (FUS) .....	31
4.4. Chromosome 9 Open Reading Frame 72 (C9ORF72).....	32
4.5. Autres gènes.....	34
5. Modèles de SLA.....	36
5.1. Modèles murins.....	37
5.1.1. Modèles <i>SOD1</i> .....	37
5.1.2. Modèles <i>FUS</i> .....	38

5.1.3.	Autres modèles murins .....	39
5.2.	Autres modèles animaux.....	40
5.3.	Modèles cellulaires.....	42
6.	Mécanismes physiopathologiques .....	43
6.1.	Métabolisme des ARN et Réparation de l'ADN.....	44
6.2.	Transport nucléocytoplasmique .....	47
6.3.	Homéostasie protéique.....	48
6.4.	Dysfonctionnement mitochondrial et Stress oxydatif .....	49
6.5.	Excitotoxicité glutamatergique et Excitabilité neuronale .....	49
6.6.	Autres mécanismes physiopathologiques .....	52
7.	Traitements .....	52
7.1.	Traitements symptomatiques .....	54
7.1.1.	Crampes.....	54
7.1.2.	Spasticité .....	55
7.1.3.	Douleurs .....	56
7.1.4.	Troubles psychologiques.....	56
7.2.	Autres approches thérapeutiques .....	57
Chapitre II : Contribution du cortex cérébral à la sclérose latérale amyotrophique .....		60
1.	Arguments en faveur d'une origine corticale de la SLA .....	60
1.1.	Le continuum SLA-DFT .....	61
1.2.	L'hypothèse de propagation corticofuge .....	62
1.3.	Les connexions neurones corticospinaux-motoneurones et les atteintes musculaires.....	65
1.4.	L'hyperexcitabilité corticale .....	67
1.4.1.	Etudes par stimulation magnétique transcrânienne.....	66
1.4.2.	Etudes de neuroimagerie.....	70
2.	Mécanismes proposés de propagation corticofuge.....	74
2.1.	Propagation de type prion vs Hyperexcitabilité corticale et excitotoxicité glutamatergique .....	74
2.2.	Apport des récentes études précliniques du laboratoire .....	75
3.	Altérations de la circuiterie corticale dans la SLA .....	78
Aurore BRUNET		7

3.1.	Circuiterie corticale .....	78
3.2.	Pertes de neurones corticaux.....	80
3.3.	Altérations de l'excitabilité des neurones corticaux.....	83
Chapitre III : Système noradrénergique et Cortex cérébral .....		88
1.	Les noyaux noradrénergiques .....	88
2.	Le locus coeruleus .....	90
2.1.	Composition cellulaire.....	90
2.2.	Afférences et Efférences .....	91
3.	Le système noradrénergique dans le cortex cérébral.....	92
3.1.	Projections noradrénergiques corticales .....	92
3.1.1.	Distribution dans les aires corticales.....	93
3.1.2.	Distribution dans les couches corticales .....	94
3.2.	Récepteurs adrénergiques .....	96
3.3.	Enzymes de dégradation de noradrénaline .....	97
4.	Fonctions du système noradrénergique .....	98
4.1.	Eveil .....	98
4.2.	Processus cognitifs .....	100
4.3.	Motricité.....	102
4.4.	Excitabilité corticale .....	103
5.	Implications pathologiques .....	106
5.1.	Troubles du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité .....	106
5.2.	Dépression et Anxiété .....	107
5.3.	Maladie d'Alzheimer .....	108
5.4.	Maladie de Parkinson.....	109
5.5.	Epilepsie .....	110
5.6.	Sclérose latérale amyotrophique ? .....	113
6.	Pharmacologie noradrénergique .....	115
6.1.	L-DOPS et Benserazide .....	115
6.2.	6-OHDA et DSP-4.....	116
6.3.	Inhibiteurs de COMT et MAO.....	117
6.4.	Inhibiteurs de transport de la noradrénaline.....	118

6.5. Agonistes et antagonistes de récepteurs adrénérgiques .....	119
6.5.1. Agonistes adrénérgiques.....	119
6.5.2. Antagonistes adrénérgiques.....	119
Revue – Le dysfonctionnement des circuits corticaux comme potentiel moteur de Sclérose Latérale Amyotrophique .....	123
Objectifs du travail de thèse .....	143
Résultats.....	147
I. Identification de gènes candidats impliqués dans l’excitabilité des neurones corticospinaux dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique .....	147
II. La réduction des niveaux de noradrénaline contribue à l’hyperexcitabilité corticale dans des modèles murins de sclérose latérale amyotrophique .....	178
Discussion.....	222
1. L’hyperexcitabilité corticale caractéristique des patients SLA est retrouvée dans des modèles murins de la maladie .....	222
2. Les altérations intrinsèques des neurones corticospinaux de souris <i>Sod1<sup>G86R</sup></i> .....	223
2.1. Les NCS surexpriment des gènes impliqués dans l’endo- et l’exocytose .....	224
2.2. Les NCS surexpriment des gènes impliqués dans le potentiel d’action.....	226
2.3. Les NCS surexpriment des gènes codant des récepteurs GABAergiques .....	227
3. Les altérations intrinsèques et extrinsèques du cortex cérébral de modèles murins de SLA .....	229
3.1. Altération de la transmission GABAergique dans le cortex cérébral ? .....	229
3.2. Altérations du système noradrénergique .....	231
4. La baisse de noradrénaline contribue à l’hyperexcitabilité corticale .....	236
4.1. Baisse de noradrénaline responsable d’une atteinte du système GABAergique ? .....	237
4.2. Implications de la réduction de récepteurs adrénérgiques $\alpha_2$ corticaux ?....	238
4.3. Implications de l’atteinte noradrénergique dans d’autres pathologies ? .....	240
4.4. Le système noradrénergique, une voie thérapeutique ?.....	242
Conclusions et Perspectives .....	245
Annexes .....	249

Marques et al. 2019 - Early alterations of RNA metabolism and slicing from adult corticospinal neurons in an ALS mouse model (bioRxiv) .....	249
Burg et al. 2020 – Absence of subcerebral projection neurons is beneficial in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis .....	301
Bibliographie .....	317

## Table des illustrations et tableaux

Figure 1 : Le système moteur.....	17
Figure 2 : Différentes formes de SLA et leurs symptômes.....	18
Figure 3 : Eléments suggérés comme facteurs de risque de SLA.....	24
Figure 4 : Répartition des formes familiales et sporadiques de SLA, et des gènes impliqués. 28	
Figure 5 : Mécanismes proposés de la pathologie C9ORF72 dans la SLA.....	33
Table 1 : Liste de gènes associés à la SLA.....	35
Figure 6 : Les souris Sod1G86R, un modèle murin de SLA.....	38
Figure 7 : Principaux mécanismes pathologiques proposés dans la SLA. ....	44
Figure 8 : Rôles physiologiques de TDP-43 et FUS dans le métabolisme de ARN.....	46
Figure 9 : Formation d'agrégats FUS au cours de la SLA. ....	47
Figure 10 : Altération des voies de dégradation des protéines. ....	48
Figure 11 : Excitotoxicité glutamatergique. ....	50
Figure 12 : Equipe multidisciplinaire recommandée dans la prise en charge de patients atteints de SLA.....	53
Table 2 : Prise en charge pharmacologiques et non pharmacologique des principaux symptômes de SLA. ....	54
Figure 13 : Hypothèse d'origine et propagation de la SLA.....	59
Figure 14 : Continuum génétique entre Sclérose Latérale Amyotrophique et Démence Frontotemporale. ....	62
Figure 15 : Hypothèse de propagation corticofuge de la pathologie TDP-43.....	63
Figure 16 : Tractus et voies altérés dans le cerveau de patients atteints de SLA. ....	64
Figure 17 : Influence du type de connexion synaptique neurone moteur à projection-motoneurone sur les symptômes de SLA.....	66
Figure 18 : L'hyperexcitabilité corticale des patients atteints de SLA mise en évidence par stimulation magnétique transcrânienne.....	68
Figure 19 : Démonstration de la contribution des neurones à projection corticofuge à la SLA. ....	77
Figure 20 : Distribution des populations de neurones excitateurs et interneurons inhibiteurs dans les différentes couches du cortex cérébral. ....	78

Figure 21 : Connectivité cellule-spécifique interneurone-neurone pyramidal et interneurone-interneurone dans le cortex cérébral.....	80
Figure 22 : Les altérations de densité, morphologie et excitabilité des neurones corticospinaux et interneurones inhibiteurs GABAergiques dans la SLA. (ci-contre) .....	82
Figure 23 : Altérations de l’excitabilité des neurones corticaux dans des modèles murins de SLA et bénéfices de leur rétablissement.....	86
Figure 24 : Principales afférences du cortex moteur chez l’humain et la souris. ....	87
Figure 25 : Origine, localisation et sites de projections des noyaux noradrénergiques chez la souris. ....	89
Figure 26 : Hétérogénéité de morphologie, composition moléculaire et de projection des neurones noradrénergiques du locus coeruleus. ....	91
Figure 27 : Afférences et efférences du locus coeruleus. ....	92
Figure 28 : Organisation des prolongements noradrénergiques dans le cortex cérébral de souris. ....	95
Figure 29 : Le cycle veille-sommeil.....	99
Figure 30 : Le modèle GANE.....	104
Table 3 : Liste d’études mettant en évidence des effets pro- et anti-convulsants d’agonistes et antagonistes de récepteurs adrénérgiques. ....	111
Figure 31 : Objectifs de thèse.....	144

## Abréviations

6-OHDA	6-hydroxydopamine
ADHD	Troubles du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité
ATXN2	Ataxin-2
B	Benserazide
BAC	Bacterial artificial chromosome
C9ORF72	Chromosome 9 Open Reading Frame 72
CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2b
COMT	Catechol-O-méthyltransférase
CR	Calretinin
CSP	Période de silence cortical
DBH	Dopamine $\beta$ -hydroxylase
DFT	Démence fronto-temporale
DSP-4	N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine
ECoG	Electrocorticographie
EEG	Electroencéphalographie
FUS	Fused in sarcoma
Gad1	Glutamate décarboxylase 1
HyperE	Hyperexcitabilité
HypoE	Hypoexcitabilité
ICF	Facilitation intracorticale
ICI	Inhibition intracorticale
IMC	Indice de masse corporelle
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
LC	Locus coeruleus
L-DOPS	L-threo-dihydroxyphenylserine
LICI	Inhibition intracorticale à long intervalle
MAO	Monoamine oxydase
MEG	Magnétoencéphalographie
MEP	Réponse motrice évoquée
NA	Noradrénaline

NCS	Neurones corticospinaux
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NPC	Neurones à projection calleuse
NPY	Neuropeptide Y
OPTN	Optineurin
PET	Tomographie par émission de positron
PTZ	Pentylènetétrazol
PV	Parvalbumine
REM	Sommeil paradoxal
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SICF	Facilitation à court intervalle
SICI	Inhibition intracorticale à court intervalle
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
Snc	Substance noire pars compacta
SOD1	Superoxyde dismutase 1
spTMS	Stimulation magnétique transcrânienne à impulsion unique
SQSTM1	Sequestosome-1 ou p62
SST	Somatostatine
TARDBP	TAR DNA-binding protein 43
TDP-43	TAR DNA-binding protein 43
TH	Tyrosine hydroxylase
TMS	Stimulation magnétique transcrânienne
TUBA4A	Tubulin $\alpha$ -4A chain
UBQLN2	Ubiquilin-2
VCP	Valosin Containing Protein
VIP	Vasoactive intestinal peptide

# Introduction

# Introduction

## Chapitre I : La sclérose latérale amyotrophique

### 1. Historique et Définition clinique

#### 1.1. Historique

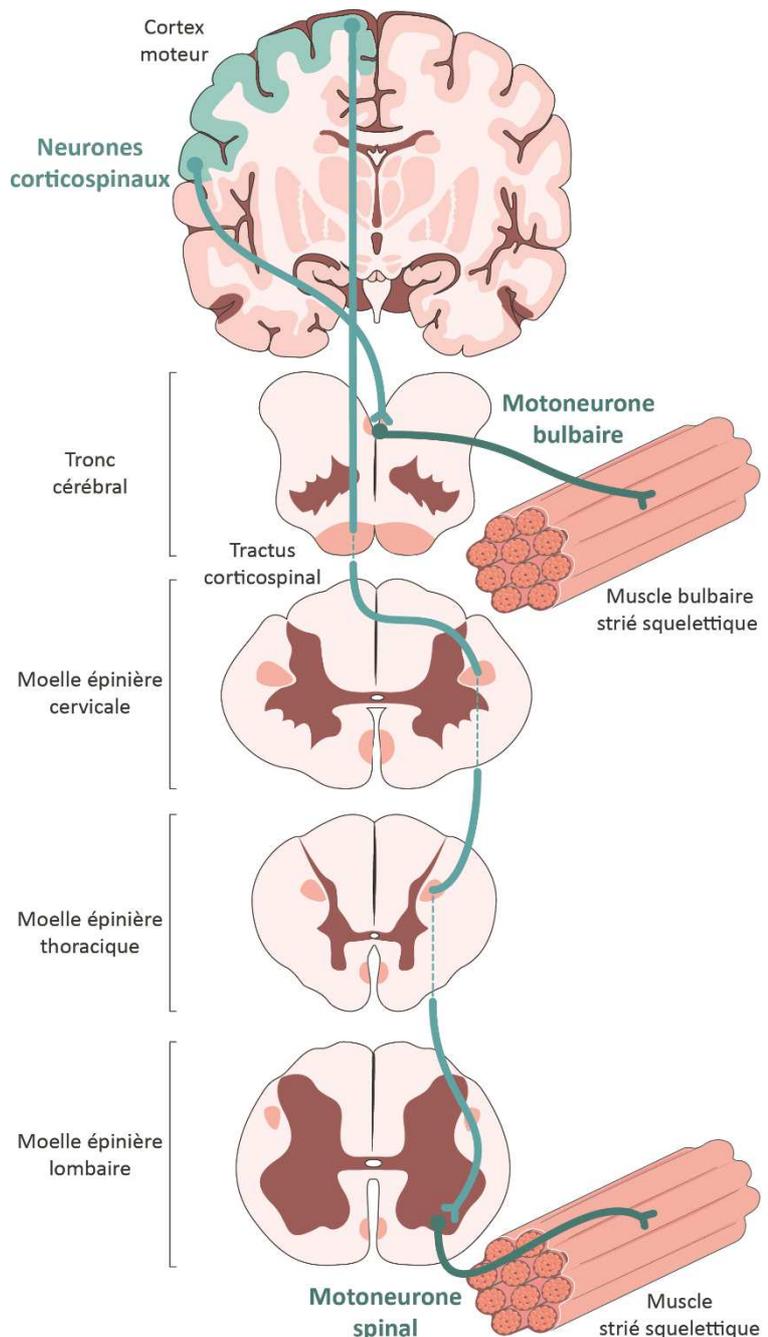
La sclérose latérale amyotrophique, ou SLA, est une maladie décrite pour la première fois par le célèbre neurologue français **Jean-Martin Charcot**. En 1865 il s'adresse à la Société Médicale des hôpitaux de Paris afin de présenter le cas d'une patiente présentant une atrophie et un ensemble de symptômes musculaires, sans atteinte de ses capacités intellectuelles ou sensorielles. Il note alors la présence de marques striées de couleur gris-brunâtre au niveau de la zone latérale de sa moelle épinière. C'est en 1869 qu'il diagnostique cette nouvelle pathologie pour la première fois et il faudra attendre 1874 pour qu'il introduise le terme **Sclérose Latérale Amyotrophique** (Goetz, 2000). Tandis que le terme «amyotrophique» fait référence à l'atrophie, la faiblesse et les fasciculations musculaires, «sclérose latérale» renvoie à la présence de ces marques brunâtres sur la colonne latérale de la moelle épinière. C'est dans cette région que se trouve le tractus corticospinal qui, en dégénérant, conduit à l'apparition d'une gliose induisant cette coloration de la moelle (Rowland and Shneider, 2001).

Dans ses premières descriptions cliniques, Charcot caractérise la SLA par une atrophie musculaire progressive, la présence de contractions fibrillaires lors de cette période d'atrophie et la préservation de la « contractilité faradique » des muscles atteints. Il note aussi la rapidité d'évolution de la maladie ce qui, selon lui, la distingue d'autres amyotrophies primaires. Il observe une atteinte primaire et rapidement successive des 4 membres, suivi d'une atteinte bulbaire et du décès des patients dans les 3 ans suivant le diagnostic (Goetz, 2000).

## 1.2. Définition clinique

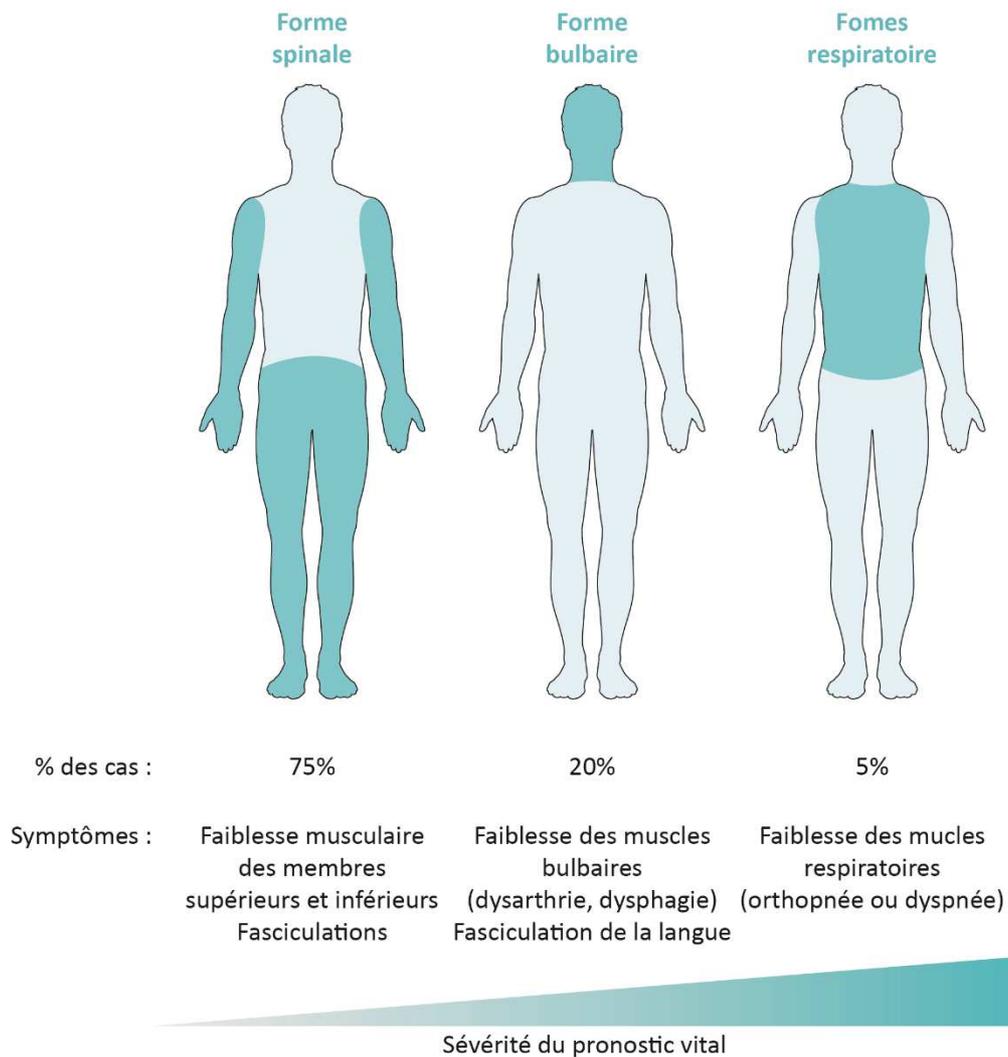
De nos jours, la SLA est décrite comme une **maladie neurodégénérative** caractérisée par l'atteinte conjointe de 2 populations de neurones : les **neurones corticospinaux**, localisés dans le cortex moteur et innervant le tronc cérébral et la moelle épinière, et les **motoneurones bulbaires et spinaux**, localisés respectivement dans le tronc cérébral et la moelle épinière et innervant les muscles striés squelettiques (**Figure 1**).

A ce jour encore incurable, la SLA se traduit par une paralysie progressive des patients et à leur décès 3 à 5 ans après le diagnostic, le plus souvent par insuffisance respiratoire.



### Figure 1 : Le système moteur.

Les neurones corticospinaux, localisés dans le cortex moteur, innervent le tronc cérébral et la moelle épinière. Localisés dans chacune de ces structures, les motoneurones bulbaires et spinaux innervent ensuite les muscles striés squelettiques. (Adaptation de (Brown and Al-Chalabi, 2017))



**Figure 2 : Différentes formes de SLA et leurs symptômes.**

La SLA peut se présenter sous 3 formes en fonction du site d'apparition des symptômes. La forme spinale, avec atteinte des muscles des membres, conduit à une faiblesse musculaire asymétrique. La forme bulbaire, avec atteinte des muscles de la tête et du cou, conduit à des troubles de déglutition et d'élocution. Enfin, la forme respiratoire atteint les muscles respiratoires et leur fonction, et représente la forme la plus sévère.

Différentes formes de la maladie existent dépendamment du site d'apparition des symptômes : les formes spinales, bulbaires et respiratoires (**Figure 2**). Les **formes spinales** représentent 75% des cas et touchent généralement des personnes d'environ 60 ans. Cette forme se caractérise par une faiblesse musculaire des membres supérieurs et inférieurs associée à une atrophie, des fasciculations (mouvements involontaires), une hyperréflexie et

hypertonie. Tandis que ces 2 derniers symptômes sont souvent associés à l'atteinte des neurones corticospinaux, les 3 premiers sont, quant à eux, reliés à l'atteinte des motoneurones. Les **formes bulbaires** représentent 20% des cas et se caractérisent par une faiblesse des muscles bulbaires accompagnée de dysarthrie (trouble d'articulation), dysphagie (trouble de déglutition) et de fasciculations de la langue. Enfin, les **formes respiratoires** sont les plus rares avec seulement 5% des cas, principalement masculins, et se caractérisent par une orthopnée ou dyspnée (difficulté respiratoire) (Swinnen and Robberecht, 2014).

Le site d'apparition des symptômes est utilisé comme paramètre de stratification en essai clinique du fait de son lien avec l'espérance de vie des patients. En effet, tandis que les patients atteints de formes spinales présentent le meilleur pronostic, ceux aux formes bulbaires ont une survie moyenne de 2 ans et une probabilité de survie à long-terme (> 10 ans) de seulement 3%. Enfin, les patients atteints de formes respiratoires présentent une survie moyenne de 1,4 ans et aucune de survie à long-terme (Swinnen and Robberecht, 2014).

## 2. Symptômes

### 2.1. Symptômes moteurs

La SLA fait partie d'un groupe de maladies neurodégénératives rares : les **maladies du motoneurone**. Ces dernières peuvent affecter uniquement les neurones corticospinaux, c'est le cas de la sclérose latérale primaire ou la paraplégie spastique héréditaire ; uniquement les motoneurones, comme dans la maladie de Kennedy ou l'amyotrophie spinale ; ou les deux, ce qui n'est observé que dans la SLA.

L'atteinte des neurones corticospinaux est associée à des symptômes tels que : l'**hyperréflexie** ; la présence du **réflexe de Babinski** (flexion dorsale du pied et un écartement

des orteils en réponse à une stimulation spécifique de la voute plantaire) ; une **faiblesse pyramidale** (faiblesse des extenseurs des membres supérieurs et des flexeurs des membres inférieurs) ; de la **spasticité** (contraction musculaire continue induisant une raideur du membre atteint) ; et des **clonus** (séries de contractions musculaires involontaires). Enfin, l'atteinte des neurones corticospinaux impliqués dans la motricité des muscles bulbaires induit des symptômes tels que la **dysarthrie** et la **dysphagie** (Morris, 2015).

L'atteinte des motoneurones, localisés dans la corne ventrale de la moelle épinière et innervant les muscles striés squelettiques, conduit, quant à elle, à des symptômes tels que : des **fasciculations**, une **faiblesse musculaire**, des **crampes** avec ou sans extensions, la **réduction ou absence de réflexes**, une **hypotonie** et une **atrophie musculaire** (Morris, 2015).

## 2.2. Symptômes non moteurs

### 2.2.1. Atteintes cognitives et comportementales

Bien que longtemps considérée comme une maladie purement motrice, la SLA est maintenant vue comme une **maladie multi-systémique**, pouvant affecter différentes fonctions. Les patients souffrant de SLA présentent ainsi des symptômes non moteurs tels que des **déficiences cognitives** dans environ 50% des cas, et cela à des niveaux légers (32%), modérés (13%) voire sévères (6%). 15% des patients remplissent également les critères diagnostiques d'une autre pathologie neurodégénérative : la **démence fronto-temporale** (DFT). En retour, 15% des patients DFT présentent des critères de SLA. La DFT se caractérise par une atteinte des lobes frontaux et temporaux, conduisant à des troubles comportementaux et une atteinte du langage. Il est maintenant clairement établi qu'un

**continuum clinique, génétique et physiopathologique** existe entre SLA et DFT (Ringholz et al., 2005; Rippon et al., 2006; Lillo and Hodges, 2009; Ling et al., 2013).

### 2.2.2. Troubles psychologiques

Les **troubles dépressifs** sont rapportés dans 11 à 75% des patients SLA selon les études. La prévalence de symptômes dépressifs, comme le sentiment de désespoir ou la préoccupation concernant la fin de vie, est donc plus importante chez ces derniers que dans la population générale. La présence de tels symptômes est corrélée à la progression de la maladie et la sévérité de l'atteinte motrice, et pourrait avoir un effet sur les performances cognitives (Averill et al., 2007; Jelsone-Swain et al., 2012). Plus de 33% des patients présentent des **troubles de l'anxiété**, et 75 à 83% un sentiment de **fatigue** (Kurt et al., 2007). Une étude longitudinale a montré que les patients souffrant de détresse psychologique (stress, dépression, désespoir, expression de colère) ont un risque de décès 2,24 fois plus élevé que les patients psychologiquement sains (McDonald et al., 1994). Cela souligne donc l'importance d'un suivi psychologique des patients dès le diagnostic et tout au long de la maladie.

### 2.2.3. Troubles métaboliques et lipidiques

La balance énergétique consiste en l'équilibre entre la consommation (prise alimentaire) et la dépense d'énergie (métabolisme et activité physique). L'**augmentation de la dépense énergétique** au repos chez les patients SLA favorise un déséquilibre de cette balance vers un **hypermétabolisme**.

Les patients sont souvent minces et présentent un **indice de masse corporelle normal à bas**. La dysphagie, induite par l'atteinte des muscles bulbaires, exacerbe la **perte de poids** des

patients qui, se développant au cours de la maladie, est négativement corrélée à la survie. La perte de poids est retrouvée de façon présymptomatique dans un modèle murin de SLA (les souris *TDP-43<sup>A315T</sup>*) (Esmaeili et al., 2013; Stallings et al., 2013). De même, le faible indice de masse corporelle peut être retrouvé avant l'apparition d'atteintes motrices chez les patients SLA (Huisman et al., 2015).

L'**hyperlipidémie** est définie comme un trouble du métabolisme de lipoprotéines induisant une élévation des niveaux sanguins de certaines formes de cholestérols et de triglycérides (Pedersen, 2019). Elle est retrouvée chez près d'un tiers des patients et est quant à elle positivement corrélée à la survie des patients (Desport et al., 1999; Dupuis et al., 2008, 2011). Il a d'ailleurs été montré qu'un **régime riche en calorie** permettait d'améliorer la durée de vie des patients à progression rapide (Ludolph et al., 2020).

### 3. Epidémiologie

#### 3.1. Incidence et Prévalence

D'un point de vue mondial, la SLA présente une **incidence** variant entre **0.42 et 2.76 nouveaux cas pour 100 000 personnes par an**, et une **prévalence** entre **1.57 et 9.62 personnes atteintes sur 100 000 personnes par an** (Xu et al., 2020). Les plus grands chiffres d'incidence et prévalence sont retrouvés en Europe de l'Ouest, et les plus bas en Asie du Sud où le nombre d'études est encore très limité (Xu et al., 2020). Cela fait de la SLA **la plus fréquente maladie du motoneurone adulte**, suivie de la maladie de Kennedy et de la Sclérose Latérale Primaire (Worms, 2001). Les nombreuses études épidémiologiques réalisées sur différentes populations tendent à montrer une variabilité de ces données d'incidence entre continents et ethnies. En effet, tandis que l'incidence estimée en Europe est d'environ 2,2/100

000/an, celle en Asie du Sud et de l'Est descend à 0,79-0,89/100 000/an (Logroscino and Piccininni, 2019). En France, 3 à 4 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque jour, et 6 000 personnes en sont atteintes chaque année (Couratier et al., 2016).

Depuis les années 60, l'incidence de la SLA n'a fait qu'augmenter, cela en raison du développement économique et de l'augmentation de la durée de vie de nombreuses populations (Xu et al., 2020). De récentes études tentent de prédire l'évolution épidémiologique de la SLA. D'ici 2040, la population Européenne subirait alors une augmentation de 20% des cas de SLA comparativement à 2015. A l'échelle mondiale, cette dernière serait de l'ordre de 69%, avec une augmentation plus marquée dans les pays en développement (Arthur et al., 2016; Gowland et al., 2019).

### 3.2. Répartition géographique

Comme mentionné précédemment en 3.1., les études épidémiologiques réalisées sur différentes populations géographiques montrent une variabilité des nombres de cas de SLA entre continents et en fonction de l'ethnie de la population analysée. Mais la répartition géographique de la SLA reste mal caractérisée. De nombreuses données épidémiologiques manquent pour des continents comme l'Afrique ou l'Amérique du Sud. De plus, le manque d'uniformité de collecte des données existantes complexifie l'étude de cette répartition géographique.

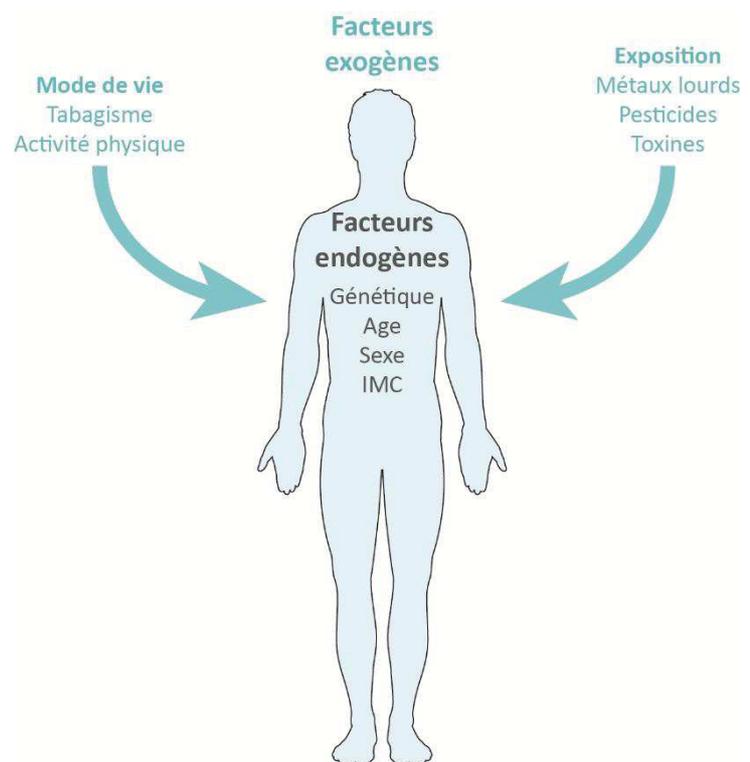
Certains clusters isolés de SLA ont cependant été mis en évidence. Les plus connus sont ceux observés sur l'île de Guam (Océan Pacifique) et dans la péninsule Kii (Japon). Celui de l'île de Guam a longtemps été attribué au fort taux de cyanotoxine présent dans l'alimentation locale, mais à ce jour, aucune étude n'a réussi à prouver cette hypothèse. Le cluster de la

péninsule de Kii, quant à lui, a été en partie attribué à une forte représentation, dans la population locale, de la mutation par expansions répétitives d'hexanucléotides dans le gène *C9ORF72* (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Couratier et al., 2016). La découverte de tels clusters a conduit à s'interroger sur l'existence de facteurs de risques endogènes et/ou exogènes (**Figure 3**).

### 3.3. Facteurs de risque

**Figure 3 : Eléments suggérés comme facteurs de risque de SLA.**

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



#### 3.3.1. L'âge

Comme dans de nombreuses maladies neurodégénératives, l'âge représente un facteur de risque. Mais contrairement à des pathologies comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, l'augmentation du risque en fonction de l'âge n'est pas aussi linéaire. Tandis que le risque de développer une SLA augmente avec l'âge jusqu'à 70-79 ans, au-delà le risque semble diminuer (Xu et al., 2020). Cependant, le risque d'erreur de diagnostic à cet âge plus

avancé doit être pris en considération. Les symptômes de patients plus âgés risquent davantage d'être considérés comme faisant partie du processus de vieillissement au lieu d'une atteinte neurologique pure (Al-Chalabi and Hardiman, 2013).

En plus de représenter un facteur de risque, l'âge des patients peut être corrélé à la survie de ces derniers. En effet, la majorité des patients développent leurs premiers symptômes entre 55 et 65 ans, mais des **formes juvéniles** existent. Dans ce cas, les premiers symptômes se déclarent avant 25 ans. Tandis que ces formes juvéniles progressent lentement (>10 ans), les personnes atteintes aux environs de 60 ans décèdent dans les 3 à 5 ans suivant le diagnostic. Les **formes tardives**, quant à elles, apparaissent après 75 ans et conduisent au décès des patients en quelques mois. De façon générale, seuls 5 à 10% des patients SLA survivent au-delà de 10 ans (Chiò et al., 2009; Pupillo et al., 2014; Swinnen and Robberecht, 2014).

### 3.3.2. Le sexe

Le sexe a longtemps été considéré comme un facteur de risque, avec des incidences et prévalences plus élevées chez l'homme (1,91 et 5,96 respectivement) que la femme (1,36 et 3,90) à l'échelle mondiale (Xu et al., 2020). Dans certaines zones comme en Afrique, un ratio homme/femme de 2,9 a même pu être observé (Luna et al., 2019). De récentes études, conduites dans différents pays d'Europe et d'Asie, ont mis en évidence des ratios compris entre 1 et 2. Dans la population européenne, le risque global de développer une SLA est de 1/350 chez l'homme, contre 1/400 chez la femme, avec un ratio de 1,3 en moyenne (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Couratier et al., 2016).

Ainsi, le sexe biologique pourrait représenter un facteur de risque et cela dépendamment de la zone géographique prise en compte. La variation de ce ratio entre régions pourrait également provenir de l'évolution du mode de vie des populations étudiées. Le mode de vie des femmes dans les pays développés ou en développement tend, en effet, à les exposer aux mêmes potentiels facteurs de risque que les hommes (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Couratier et al., 2016; Longinetti and Fang, 2019; Xu et al., 2020).

### 3.3.3. L'environnement

Le potentiel rôle environnemental comme facteur de risque de SLA est difficile à identifier. En effet, les différents aspects environnementaux, aussi appelés « **exposome** » sont particulièrement nombreux et évoluent avec le temps, rendant ainsi leur étude très compliquée. De plus, l'impact de bon nombre de facteurs est très souvent interconnecté à l'existence d'un fond génétique : en fonction de ce dernier, et donc dépendamment du patient, une même exposition environnementale ne conduira pas au même risque (Al-Chalabi and Hardiman, 2013).

Malgré la difficulté de ce type d'étude, quelques éléments ont fréquemment été mentionnés comme pouvant être considérés comme facteurs de risque. C'est le cas de : l'**activité physique** (patients souvent fins et athlétiques mais aucun lien établi (Huisman et al., 2013)), d'un **faible indice de masse corporelle** (associé au développement de SLA (Gallo et al., 2013)), du **tabagisme** (potentiellement plus important chez les femmes mais aucun lien établi (Weisskopf et al., 2004; Alonso et al., 2010; Al-Chalabi and Hardiman, 2013)), de l'**exposition aux métaux lourds** (l'exposition au plomb, mercure, aluminium, cadmium, manganèse et sélénium augmenterait le risque de développement de SLA (Vinceti et al., 2000; Sutedja et al.,

2009)) **aux pesticides et produits chimiques utilisés en agriculture** (McGuire et al., 1997; Park et al., 2005; Sutedja et al., 2009) ou encore à des **toxines** (exposition à la cyanotoxine,  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, dans l'alimentation de la population de l'île de Guam (Bradley and Mash, 2009; Al-Chalabi and Hardiman, 2013)).

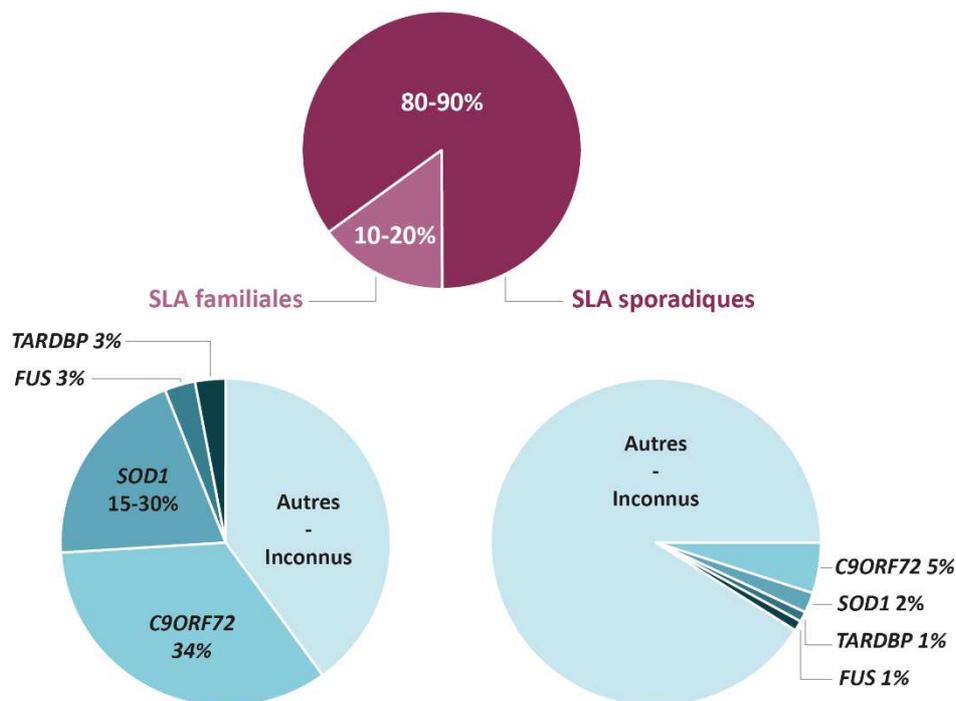
#### 3.3.4. La génétique

Il existe deux formes de SLA : les formes familiales et les formes sporadiques. Les **formes familiales** représentant 10% des cas de SLA. Dans ce cas, une mutation génétique, généralement dominante, est héritée et la présence d'antécédents familiaux de SLA est retrouvée. Dans une étude de 2010, Al-Chalabi et collaborateurs ont utilisé des données collectées chez des jumeaux afin d'étudier l'héritabilité de la SLA et ont montré que cette dernière s'élevait à plus de 60% (Al-Chalabi et al., 2010). La dernière étude en date d'épidémiologie génétique sur la SLA par méta-analyse montre l'identification de mutations génétiques connues dans 55.5% des cas familiaux Européens, contre 40.2 en Asie (Zou et al., 2017).

Les **formes sporadiques**, quant à elles, représentent 90% des cas. Dans ce cas, aucun antécédent familial n'est connu ou ne peut l'être. En effet, de nombreux cas de SLA sont classifiés comme sporadiques, faute d'information généalogique. L'identification de mutations génétiques est connue dans 7.4% des cas sporadiques Européens et seulement 2.9% en Asie (Zou et al., 2017).

#### 4. Génétique

Parmi l'ensemble des cas de SLA, 10 à 20% sont des formes familiales de SLA, et seules 40 à 55% de ces dernières peuvent être attribuées à des mutations génétiques identifiées (Zou et al., 2017; Mezzini et al., 2019) (**Figure 4**). C'est en 1993 que Rosen et collaborateurs identifient pour la première fois une mutation impliquée dans le développement de la SLA, sur le gène codant la superoxyde dismutase 1 (voir ci-dessous) (Rosen et al., 1993). Depuis ce sont plus de 25 gènes qui ont été associés à la maladie (Andersen and Al-Chalabi, 2011; Nguyen et al., 2018).



**Figure 4 : Répartition des formes familiales et sporadiques de SLA, et des gènes impliqués.** La SLA peut se présenter sous des formes familiales ou sporadiques. Les patients atteints de formes familiales présentent des antécédents familiaux connus de SLA et/ou une mutation dans un gène connu associé à la maladie. Les patients atteints de formes sporadiques ne présentent pas d'antécédents familiaux connus mais peuvent, dans certains cas, présenter des mutations dans des gènes connus.

#### 4.1. Superoxyde dismutase 1 (SOD1)

La première mutation associée au développement d'une SLA fut identifiée sur le gène codant la **superoxyde dismutase 1**, ou SOD1. Cette enzyme se lie au cuivre et au zinc pour former de très stables homodimères dans le cytosol des cellules, et l'espace intermembranaire des mitochondries. C'est là qu'elle catalyse la conversion d'anions superoxydes  $O_2^-$  toxiques en peroxyde d'hydrogène, qui peut alors être converti en eau (McCord and Fridovich, 1969). En 2017, 15 à 30% des SLA familiales en Europe et Asie respectivement, et seulement 1.5% des cas sporadiques, étaient attribués à des mutations dans le gène *SOD1* (Zou et al., 2017).

Aujourd'hui, plus de 185 mutations dans le gène *SOD1*, et liées à la SLA, ont été identifiées. Ces mutations, principalement de type faux-sens, ont un impact sur le phénotype observé : site d'apparition, progression, durée de vie des patients (Mejzini et al., 2019).

L'absence de *SOD1* chez la souris n'induisant aucun phénotype SLA, le mécanisme de toxicité de ces mutations *SOD1* proposé a donc été celui d'un gain de fonction délétère (Cleveland et al., 1995; Reaume et al., 1996). Les patients SLA présentent souvent des agrégats protéiques dans les neurones moteurs et d'autres types cellulaires du système nerveux. Il fut alors émis l'hypothèse d'une propagation de type prion d'agrégats de protéine SOD1 mutée (Ratovitski et al., 1999; Grad et al., 2017).

La présence de SOD1 mutée induit différents mécanismes neurotoxiques tels que cette formation d'agrégats mais aussi un dysfonctionnement mitochondrial, un stress oxydatif, un stress du réticulum endoplasmique, ou encore la perturbation du transport axonal (Hayashi et al., 2016).

#### 4.2. TAR DNA-binding protein 43 (TARDBP ou TDP-43)

Dès 1991, il fut mis en évidence la présence d'inclusions cytoplasmiques dans la moelle épinière de patients SLA. Ce n'est qu'en 2006 que l'on identifie la principale protéine constituant ces inclusions : **TAR DNA-binding protein 43**, ou **TDP-43** (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Depuis, et du fait de leur présence dans une grande majorité des cas de SLA, l'agrégation de TDP-43 ubiquitinée et phosphorylée dans le cerveau et la moelle épinière des patients est considérée comme marqueur de la maladie (Scotter et al., 2015).

TDP-43 est une protéine liant l'ADN et l'ARN et capable de passer du noyau au cytoplasme, ou inversement. TDP-43 agit comme régulateur de l'expression de gènes mais peut également intervenir dans l'épissage alternatif des ARN messagers, leur stabilité, transport ou encore traduction. Enfin, TDP-43 intervient également dans la formation de granules de stress et des complexes ARN/protéines capables de séquestrer des ARN messagers spécifiques afin d'empêcher leur traduction en condition de stress cellulaire (Ayala et al., 2008; Ratti and Buratti, 2016).

Les mutations du gène **TARDBP**, codant TDP-43, ont été montrées comme ayant un lien de causalité avec le développement de SLA. Tandis que 3% des cas de SLA familiales peuvent être attribués à des mutations dans ce gène, c'est le cas pour seulement moins de 1% des cas sporadiques (Zou et al., 2017). Aujourd'hui, plus de 48 mutations dans le gène **TARDBP** ont été associées à cette maladie. La majorité de ces mutations, de type faux-sens, sont localisées dans la partie C-terminale du transcrit. C'est cette région qui, en conditions physiologiques, interagit avec d'autres ribonucléoprotéines et intervient dans la régulation de l'épissage alternatif (Neumann et al., 2006; Mejzini et al., 2019).

Le mécanisme pathologique induit par les formes mutées de TDP-43 serait donc à la fois de type perte et gain de fonction. La protéine mutée ne remplit plus son rôle de régulateur d'expression et de l'épissage alternatif, et la formation d'agrégats protéiques conduit, quant à elle, à la formation d'inclusions et au dysfonctionnement cellulaire (Mejzini et al., 2019).

#### 4.3. Fused in sarcoma (FUS)

En 2009, un nouveau gène est identifié comme associé au développement de SLA : le gène codant la protéine liant l'ARN **Fused in sarcoma**, ou **FUS** (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). La mutation de *FUS* est plus particulièrement impliquée dans le développement de formes juvéniles de SLA, bien souvent très agressives (Zou et al., 2013; Hübers et al., 2015). Les mutations dans le gène *FUS* peuvent être attribuées pour environ 3% des SLA familiales, et moins de 1% des formes sporadiques (Zou et al., 2017).

Aujourd'hui, plus de 50 mutations de *Fus* ont été associées au développement de SLA, majoritairement de type faux-sens, mais aussi insertion, délétion, épissage alternatif et non-sens (Mejzini et al., 2019).

Tout comme TDP-43, FUS est une protéine liant l'ARN capable de passer du noyau au cytoplasme, et inversement. FUS joue également un rôle dans l'expression de gènes : transcription, épissage alternatif, transport et régulation de la traduction (Zinszner et al., 1997; Ratti and Buratti, 2016). FUS peut également interagir avec l'ADN et intervient dans le processus de réparation de l'ADN.

Le mécanisme pathologique de FUS impliquerait un gain de fonction toxique. En effet, les knock-out et knock-out spécifiques dans les neurones moteurs ne conduisent pas à des phénotypes de type SLA, ou une réduction de la survie. La surexpression de *FUS*, quant à elle,

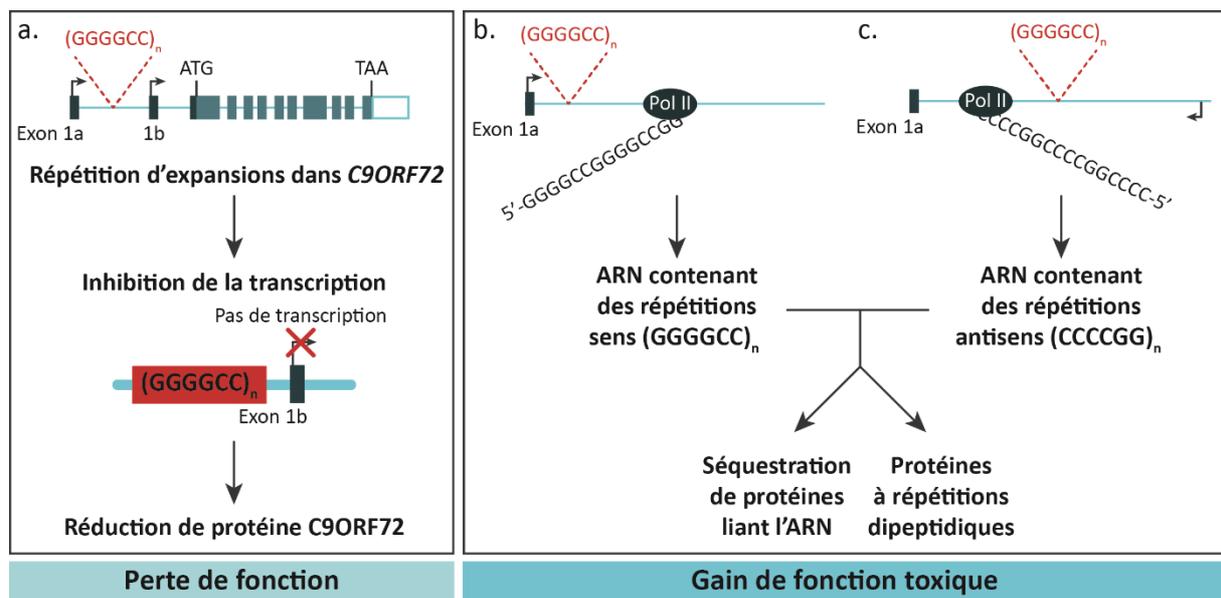
induit un fort phénotype moteur et la formation d'agrégats cytoplasmiques de FUS (Mitchell et al., 2013; Kino et al., 2015). Il a été montré, au sein du laboratoire, que la délocalisation de FUS dans le cytoplasme, par troncation de la séquence de localisation nucléaire du gène, conduisait à la formation de granules de stress suivi d'inclusions cytoplasmiques, une dégénérescence des motoneurones et un phénotype moteur (Souris *Fus<sup>+/<sup>ΔNLS</sup></sup>*) (Scekic-Zahirovic et al., 2016, 2017). Ainsi, l'accumulation cytoplasmique de FUS apparaît comme le seul événement nécessaire pour induire la perte des neurones moteurs (Shiihashi et al., 2016; Scekic-Zahirovic et al., 2017). Cependant, ce mécanisme autonome n'est pas le seul impliqué puisque la réversion de la mutation *Fus<sup>ΔNLS</sup>* dans les neurones moteurs n'empêche pas le développement de symptômes moteurs. Il semblerait donc que, dans ce modèle murin de SLA, l'association de mécanismes autonomes, dus à la mutation *Fus*, et non-autonomes contribuent à la pathologie motrice (Scekic-Zahirovic et al., 2017).

#### 4.4. Chromosome 9 Open Reading Frame 72 (C9ORF72)

C'est en 2011 que fut découverte la cause génétique la plus commune dans les cas européens de SLA : **l'expansion répétitive d'hexanucléotides dans la partie non-codante du gène C9ORF72**. Naturellement présentes, ces expansions, classiquement au nombre de 5 à 10, sont répétées par centaines voire milliers chez les patients SLA (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Bien qu'elle ne représente qu'une faible portion des cas de SLA en Asie, cette altération est observée dans environ 34% des cas familiaux et 5% des cas sporadiques de SLA en Europe (Zou et al., 2017).

Des mécanismes pathologiques des expansions dans *C9ORF72* ont été proposés (**Figure 5**). 1) La perte et/ou gain de fonction toxique des transcrits riches en G. Ces transcrits

conduiraient à la formation de structures secondaires GGGG très stables et interagissant de façon anormale avec de multiples protéines (Fratta et al., 2012). 2) La séquestration de protéines liant l'ARN clés dans des foyers d'ARN intranucléaires. 3) La présence de transcrits présentant ces répétitions conduirait à la production de dipeptides anormaux formant des inclusions neuronales (Ash et al., 2013). (Jiang and Cleveland, 2016)



**Figure 5 : Mécanismes proposés de la pathologie C9ORF72 dans la SLA.**

Il existe 3 principales hypothèses concernant le mécanisme pathologique des expansions GGGGCC dans C9ORF72 : Perte de fonction – la répétition d'expansion GGGGCC entre l'exon 1a et 1b du gène C9ORF72 conduirait à l'inhibition de la transcription du gène et donc une diminution de synthèse de sa protéine (a). Gain de fonction toxique – la transcription des expansions générerait des ARN contenant des répétitions sens (b) ou antisens (c) capables de séquestrer des protéines liant l'ARN ou d'entraîner la formation de protéines à répétition dipeptidiques. (Adaptation de (Jiang and Cleveland, 2016))

#### 4.5. Autres gènes

A la suite du développement et de l'utilisation de plus en plus fréquente du séquençage nouvelle génération dans les familles et groupes de patients SLA, de nombreuses mutations dans différents gènes ont été identifiées comme associées à la maladie. Des gènes tels que *ATXN2* (*Ataxin-2*), *CHMP2B* (*Charged multivesicular body protein 2b*), *UBQLN2* (*Ubiquilin-2*), *SQSTM1* (*Sequestosome-1 (p62)*) ou encore *TUBA4A* (*Tubulin  $\alpha$ -4A chain*) ont été associés à la SLA (Mejzini et al., 2019) (**Table 1**). Sur l'ensemble des cas familiaux de SLA, environ 50% sont attribués à des mutations dans ces gènes, ou certains encore non identifiés. Pour les cas sporadiques, ce pourcentage de cas pour lesquels aucune mutation connue n'a été identifiée s'élève à plus de 90% (Zou et al., 2017; Mejzini et al., 2019).

De façon générale, les gènes identifiés ont des rôles dans 3 principales catégories de mécanismes : 1) le **processing des ARN**, 2) l'**homéostasie des protéines** et 3) la **dynamique du cytosquelette** (Mejzini et al., 2019). Parmi ces gènes, répertoriés dans le tableau ci-dessous, on retrouve le gène *CHMP2B* (**Table 1**). Impliqué dans la SLA, la démence fronto-temporale et la SLA-DFT (mentionnés en 2.2.1.), ce gène a donné lieu à un modèle murin de SLA-DFT. Mis au point au sein du laboratoire, il récapitule des signes histologiques et comportementaux de ces 2 pathologies (Vernay et al., 2016).

Involved in	Gene	Protein	Functions include	References	
RNA processing	TARDBP	TAR DNA-Binding Protein, 43-Kd	Splicing regulation, RNA transport, miRNA biogenesis	Rutherford et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Neumann, 2009	
	FUS	Fused in sarcoma	Splicing regulation, RNA transport, maintenance of genomic integrity, miRNA processing	Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009	
	ANG	Angiogenin	RNA processing, neurite outgrowth, vascularisation, stress granule formation	Greenway et al., 2006; Wu et al., 2007	
	SETX	Senataxin	DNA/RNA metabolism and helicase activity	Chen et al., 2004; Hirano et al., 2011	
	MATR3	Matrin 3	RNA processing, chromatin organization	Johnson et al., 2014b	
	ATXN2	Ataxin 2	RNA processing (interacts with TDP-43), endocytosis, modulates mTOR signaling	Elden et al., 2010; Sproviero et al., 2016	
	TAF15	TATA-binding protein-associated factor 2N	transcription initiation; RNA polymerase II	Couthouis et al., 2011; Ticozzi et al., 2011	
	EWSR1	EWS RNA Binding Protein 1	RNA splicing, transcriptional repressor,	Couthouis et al., 2012	
	hnRNPa1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	mRNA processing, splicing, and transport	Kim et al., 2013; Naruse et al., 2018	
	hnRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	mRNA processing, splicing, and transport	Kim et al., 2013; Fifita et al., 2017	
	ELP3	Elongator complex protein 3	Protein synthesis, maturation of projection neurons	Simpson et al., 2009	
	Protein Trafficking and degradation	C9ORF72	Guanine nucleotide exchange C9orf72	Transcription, splicing regulation, endosomal trafficking, autophagy	DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011
		ALS2	Alsin	Endosomal dynamics and trafficking, neurite outgrowth	Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001
		VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	Vesicle trafficking	Nishimura et al., 2004; Sanhueza et al., 2013
CHMP2B		Charged multivesicular body protein 2b	Multivesicular body formation, protein trafficking to lysosomes	Parkinson et al., 2006; Cox et al., 2010	
FIG4		Polyphosphoinositide phosphatase	Endosomal trafficking to Golgi network, autophagy regulation	Chow et al., 2009; Osmanovic et al., 2017; Bertolin et al., 2018	
UBQLN2		Ubiquilin-2	Protein degradation via UPS	Deng et al., 2011; Gellera et al., 2013	
SQSTM1		Sequestosome-1 (p62)	Protein degradation via UPS and autophagy	Fecto et al., 2011; Rubino et al., 2012; Hirano et al., 2013	
SIGMAR1		Sigma non-opioid intracellular receptor 1	Lipid transport from ER, mitochondrial axonal transport, BDNF and EGF signaling	Luty et al., 2010; Al-Saif et al., 2011; Ullah et al., 2015	
OPTN		Optineurin	Golgi maintenance, membrane trafficking, exocytosis, autophagy	Maruyama et al., 2010; Tümer et al., 2012; Pottier et al., 2018	
VCP		Valosin Containing Protein	Protein degradation via UPS, autophagy, membrane fusion	Forman et al., 2006; Johnson et al., 2010	
TBK1	Tank Binding Kinase 1	Autophagy, innate immunity signaling	Borghero et al., 2015; Cirulli et al., 2015; Oakes et al., 2017		
Cytoskeletal and axonal dynamics	DCTN1	Dynactin subunit 1	Axonogenesis, microtubule anchoring, ER to Golgi transport, spindle formation, vesicle transport, cilia	Münch et al., 2004, 2005; Takahashi et al.,	
	PFN1	Profilin 1	Cytoskeletal signaling, regulates actin polymerization	Wu et al., 2012; Smith et al., 2015	
	SPG11	Spatacsin	Cytoskeletal stability, regulating synaptic vesicle transport	Orlacchio et al., 2010; Daoud et al., 2012	
	TUBA4A	Tubulin $\alpha$ -4A chain	Component of microtubules	Smith et al., 2014; Pensato et al., 2015	

(Continued)

**Table 1 : Liste de gènes associés à la SLA. (Mejzini et al., 2019)**

Involved in	Gene	Protein	Functions include	References
	NEFH	Neurofilament heavy polypeptide	Maintenance of neuronal caliber, intracellular transport	Figlewicz et al., 1994; Al-Chalabi et al., 1999
	PRPH	Peripherin	Cytoskeletal protein, neurite elongation, axonal regeneration	Gros-Louis et al., 2004; Leung et al., 2004; Corrado et al., 2011
	NEK1	NIMA (Never In Mitosis Gene A)-Related Kinase 1	Cilia formation, DNA-damage response, microtubule stability, neuronal morphology, axonal polarity	Brenner et al., 2016; Kenna et al., 2016; Nguyen et al., 2018; Shu et al., 2018
Mitochondria	CHCHD10	Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10	Mitochondrial protein, cristae morphology, oxidative phosphorylation	Bannwarth et al., 2014; Chaussonot et al., 2014; Johnson et al., 2014a
Other	C19ORF12	Protein C19orf12	Mitochondrial protein	Deschauer et al., 2012
	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Cytosolic Antioxidant	Rosen et al., 1993
	ERBB4	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4	Neuronal cell mitogenesis and differentiation	Takahashi et al., 2013
	SS18L1	Calcium-responsive transactivator	Neuron specific chromatin remodeling	Teyssou et al., 2014
	PNPLA6	Neuropathy target esterase	Regulation of neuronal membrane composition	Rainier et al., 2008
	PON1-3	Paraoxonase 1-3	Enzymatic breakdown of nerve toxins	Saeed et al., 2006; Wills et al., 2009; Ticozzi et al., 2010
	DAO	D-amino-acid oxidase	Regulates D-serine levels, N-methyl-D-aspartate receptor regulation	Mitchell et al., 2010; Morgan et al., 2017
	CHRNA3,4,B4	Neuronal acetylcholine receptor subunit $\alpha$ -3, $\alpha$ -4, $\beta$ -4	Cholinergic Neurotransmission	Sabatelli et al., 2009, 2012
Unknown	ALS3	ALS3	Disulfide redox protein	Hand et al., 2002
	ALS7	Unknown	Unknown	Sapp et al., 2003
	ALS6-21	Unknown	Unknown	Butterfield et al., 2009
	ALS-FTD	Unknown	Unknown	Dobson-Stone et al., 2013

**Table 1 (suite) : Liste de gènes associés à la SLA. (Mejzini et al., 2019)**

## 5. Modèles de SLA

L'étude des mécanismes impliqués dans la SLA se trouve confrontée à la difficulté d'obtenir des tissus et cellules de patients, et cela à différents stades de la maladie. C'est pourquoi de nombreux modèles ont été développés afin de pouvoir disséquer les mécanismes pathologiques et explorer de potentielles pistes thérapeutiques.

De façon générale, un **modèle** constitue un système expérimental simplifié d'un processus biologique plus complexe ne pouvant être directement étudié chez l'Homme. Un modèle permet d'étudier ce processus dans les conditions contrôlées d'un laboratoire et doit idéalement remplir 3 critères de validation : l'**homologie**, une même étiologie avec la

pathologie considérée ; l'**isomorphie**, une symptomatologie identique à celle retrouvée chez l'Homme ; et la **prédictivité**, une réponse aux traitements identique.

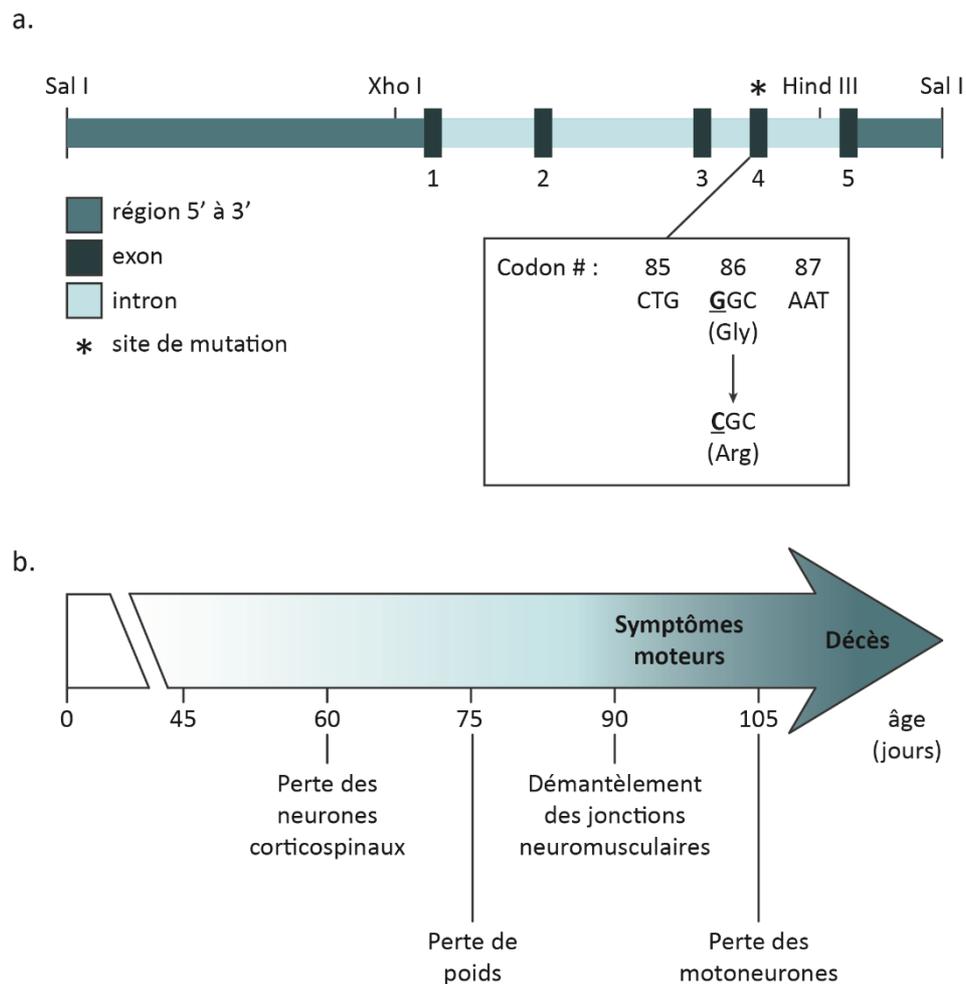
Une grande majorité des gènes humains possèdent un homologue murin et la manipulation du génome murin est maintenant devenue courante. A ce jour la surexpression de gènes mutés reste souvent nécessaire pour qu'un phénotype SLA se développe durant la courte durée de vie d'un rongeur, modèle de choix en biologie (Lutz, 2018).

## 5.1. Modèles murins

### 5.1.1. Modèles *SOD1*

La découverte de l'implication du gène *SOD1* dans la SLA en 1993 a donné lieu au premier modèle de la maladie : les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Gurney et al., 1994). De nombreux autres modèles transgéniques présentant des mutations dans le gène *SOD1* humain ont ensuite vu le jour (Wong et al., 1995; Bruijn et al., 1997). En 1995, Ripps et collaborateurs mettent au point un modèle de souris surexprimant une forme mutée inactive du gène murin *Sod1* : les **souris *Sod1<sup>G86R</sup>*** (**Figure 6**). Le gène muté présente une substitution en position 86 d'une glycine par une arginine et, étant inactif, ne conduit pas à la toxicité de la surexpression du gène humain retrouvée chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*. Les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* présentent un démantèlement des jonctions neuromusculaires et développent leurs premiers symptômes moteurs dès 90 jours. Comme chez les patients, ces derniers sont rapidement suivis du décès des souris aux alentours de 110-115 jours (Ripps et al., 1995). Au sein du laboratoire il a été mis en évidence une perte des motoneurones à environ 105 jours (Rouaux et al., 2007). La perte de poids classiquement retrouvée chez les patients SLA est également mise en évidence chez ces souris dès 75 jours (Dupuis et al., 2004). Enfin, en 2021, Marques et collaborateurs

ont montré la perte des neurones corticospinaux et cela avant même la perte de poids des souris (Marques et al., 2021).



**Figure 6 : Les souris Sod1G86R, un modèle murin de SLA.**

**a.** Mutagenèse du gène murin Sod1 par substitution d'une glycine par une arginine en position 86 de l'exon 4. **b.** Déroulement temporel des souris Sod1G86R. La dégénérescence des neurones corticospinaux débute dès 60 jours, suivi du début de la perte de poids à 75 jours. Le démantèlement des jonctions neuromusculaires et les premiers symptômes moteurs apparaissent à 90 jours, suivi de la dégénérescence des motoneurones à 105 jours. Le décès survient entre 110 et 115 jours. (Adaptation de (Ripps et al., 1995))

### 5.1.2. Modèles *FUS*

Depuis la découverte de l'implication du gène *FUS* dans la SLA en 2009, une douzaine de modèles murins ont vu le jour : perte de fonction, surexpression, knock-in ou encore Cre-inductible (Nolan et al., 2016). Les modèles basés sur la perte de fonction de *FUS* ont souvent

été montré comme non-viables. En effet, les souris knock-out présentent une forte mortalité post-natale, des problèmes développementaux ou encore des défauts de réparation de l'ADN (Hicks et al., 2000; Kuroda et al., 2000; Kino et al., 2015). En 2013, Mitchell et collaborateur étudient des souris surexprimant le gène *FUS* sauvage humain. Ces dernières présentent alors une perte de poids, des déficits moteurs avec paralysie progressive, diminution de la force musculaire et de la locomotion, une atrophie musculaire et une dénervation, conduisant à leur décès dans les 12 semaines (Mitchell et al., 2013). Mais ce modèle présente une forte toxicité de la protéine FUS sauvage, un mécanisme non retrouvé chez les patients. En 2016 et 2017, au sein du laboratoire, Jelena Scekcic-Zahirovic et collaborateurs ont étudié les **souris *Fus*<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>**. Ces souris knock-in hétérozygotes expriment une copie du gène *Fus* muté avec ablation de l'exon 15 codant la séquence de localisation nucléaire (NLS) permettant à la protéine de passer du cytoplasme au noyau. Ces souris présentent donc une délocalisation partielle de FUS dans le cytoplasme, avec un phénotype moteur dès 10 mois (Scekcic-Zahirovic et al., 2016, 2017). Les mutations dans le gène *FUS* sont non seulement liées à la SLA mais aussi à la démence fronto-temporale. Il a, par ailleurs, récemment été mis en évidence des troubles comportementaux comme la désinhibition sociale chez ces souris (Scekcic-Zahirovic et al., 2020).

### 5.1.3. Autres modèles murins

D'autres modèles murins, basés sur des mutations dans des gènes comme *TARDBP*, *C9ORF72* ou encore *CHMP2B* ont également été développés.

Comme dans le cas des knock-out (KO) *FUS*, les KO *TARDBP* homozygotes ne sont pas viables. Seuls les hétérozygotes survivent et montrent de légers troubles moteurs. Les KO

conditionnels, quant à eux, présentent une perte des motoneurones sans récapituler un véritable phénotype SLA (Kraemer et al., 2010).

Différentes équipes ont mis au point des modèles murins basés sur la perte de fonction de *C9ORF72* sans phénotype moteur (Koppers et al., 2015). De multiples laboratoires comme ceux de Baloh et Ranum, ou encore Brown et Lagier-Tourenne/Cleveland ont étudié des lignées transgéniques BAC (bacterial artificial chromosome) contenant des répétitions d'expansion dans *C9ORF72* humain. Celle développée par le laboratoire de Laura Ranum a montré une perte de motoneurones et neurones corticospinaux avec paralysie des membres postérieurs suivie du décès des animaux. Mais ce phénotype est retrouvé de façon assez hétérogène, dépendamment de l'âge, du sexe ou du fond génétique de l'individu (O'Rourke et al., 2015; Peters et al., 2015; Jiang et al., 2016; Liu et al., 2016; Batra and Lee, 2017).

En 2016, au sein du laboratoire, Aurélia Vernay et collaborateurs génèrent le **modèle murin *CHMP2B<sup>intron5</sup>***. Ce dernier présente une mutation dans la partie C-terminale du gène *CHMP2B* humain, région dans laquelle sont retrouvées des mutations associées à la SLA mais aussi la DFT. La surexpression de ce gène muté induit alors une dénervation et des altérations motrices progressives, associées à des troubles comportementaux (Vernay et al., 2016).

## 5.2. Autres modèles animaux

En dehors des rongeurs, peu de mammifères sont utilisés dans l'étude de la SLA. Certaines études ont utilisé le ouistiti (*Callithrix jacchus*) afin d'étudier la faisabilité d'un silencing de *SOD1* dans la moelle épinière de ces derniers, ou encore le macaque crabier (*Macaca fascicularis*) pour le développement d'un modèle primate de SLA avec une surexpression de *TARDBP* (Uchida et al., 2012).

Des poissons, et plus spécifiquement des **poissons zèbres** (*Danio rerio*) sont utilisés dans l'étude de la SLA. Il existe des poissons zèbres modélisant la maladie et basés sur des mutations dans des gènes comme SOD1. Les poissons *Sod1<sup>G93R</sup>* présentent, par exemple, une hyperexcitabilité des motoneurones (Benedetti et al., 2016), également retrouvée dans des modèles murins de SLA (Leroy et al., 2014; Martínez-Silva et al., 2018). La **drosophile** (*Drosophila melanogaster*), ou mouche du vinaigre, dans laquelle la manipulation et l'étude génétique sont facilitées et le **nématode** *Caenorhabditis elegans*, très utilisé dans les études de génétique, sont également utilisés dans la recherche sur la SLA.

Les poissons zèbres, drosophiles et nématodes ont notamment été utilisés dans l'étude des mutations *SOD1* (Watson et al., 2008; Bahadorani et al., 2013; Da Costa et al., 2014; Cornaglia et al., 2016; Şahin et al., 2017), *TARDBP* (Liachko et al., 2010; Vaccaro et al., 2012, 2013; Hewamadduma et al., 2013; Chang et al., 2014; Cragnez et al., 2015; Baldwin et al., 2016), *FUS* (Bosco et al., 2010; Murakami et al., 2012; Vaccaro et al., 2012; Armstrong and Drapeau, 2013; Jäckel et al., 2015; Baldwin et al., 2016; Blokhuis et al., 2016) ou *C9ORF72* (Ciura et al., 2013; Therrien et al., 2013; Mizielinska et al., 2014; Zhang et al., 2015; Wang et al., 2016; Rudich et al., 2017; Swinnen et al., 2018).

Ainsi, de multiples modèles animaux peuvent être utilisés dans l'étude de la SLA (Van Damme et al., 2017; Gois et al., 2020). Des organismes tels que *C. elegans*, le poisson zèbre et la drosophile permettent notamment un screening génétique et des études sur des nombres plus importants d'individus à moindre coût que dans les modèles murins. Les études sur des primates, bien plus rares, permettent souvent d'évaluer la transposabilité des approches développées sur des modèles murins à des organismes plus complexes et proches de l'Homme.

### 5.3. Modèles cellulaires

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées dans l'étude de la fonction des gènes associés à la SLA et la toxicité de la surexpression de leur forme sauvage ou mutée. Des lignées comme les **cellules SH-SY5Y** (Jaiswal et al., 2009; Nonaka et al., 2013; Bajc Česnik et al., 2020), **PC12** (Chou et al., 2005; Nozaki et al., 2021) ou encore **NSC-34** (Barber et al., 2009; Pinto et al., 2017; Gyawali and Kang, 2021) présentant des ressemblances avec les motoneurones, ont été et sont encore utilisées notamment pour l'étude des mécanismes physiopathologiques de mutations génétiques associées à la SLA. En dehors des lignées cellulaires de type motoneurones, certaines lignées comme les **C2C12** permettent l'étude des cellules musculaires dans la SLA (Tokutake et al., 2015 p.12). En plus de ces lignées cellulaires, des **cultures primaires de motoneurones** (Chang and Martin, 2016), mais aussi de **neurones corticaux embryonnaires** (Marcuzzo et al., 2019), issus de modèles murins de SLA ont été développées, permettant, par exemple, de mettre en évidence une hyperexcitabilité des neurones corticaux de souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Marcuzzo et al., 2019).

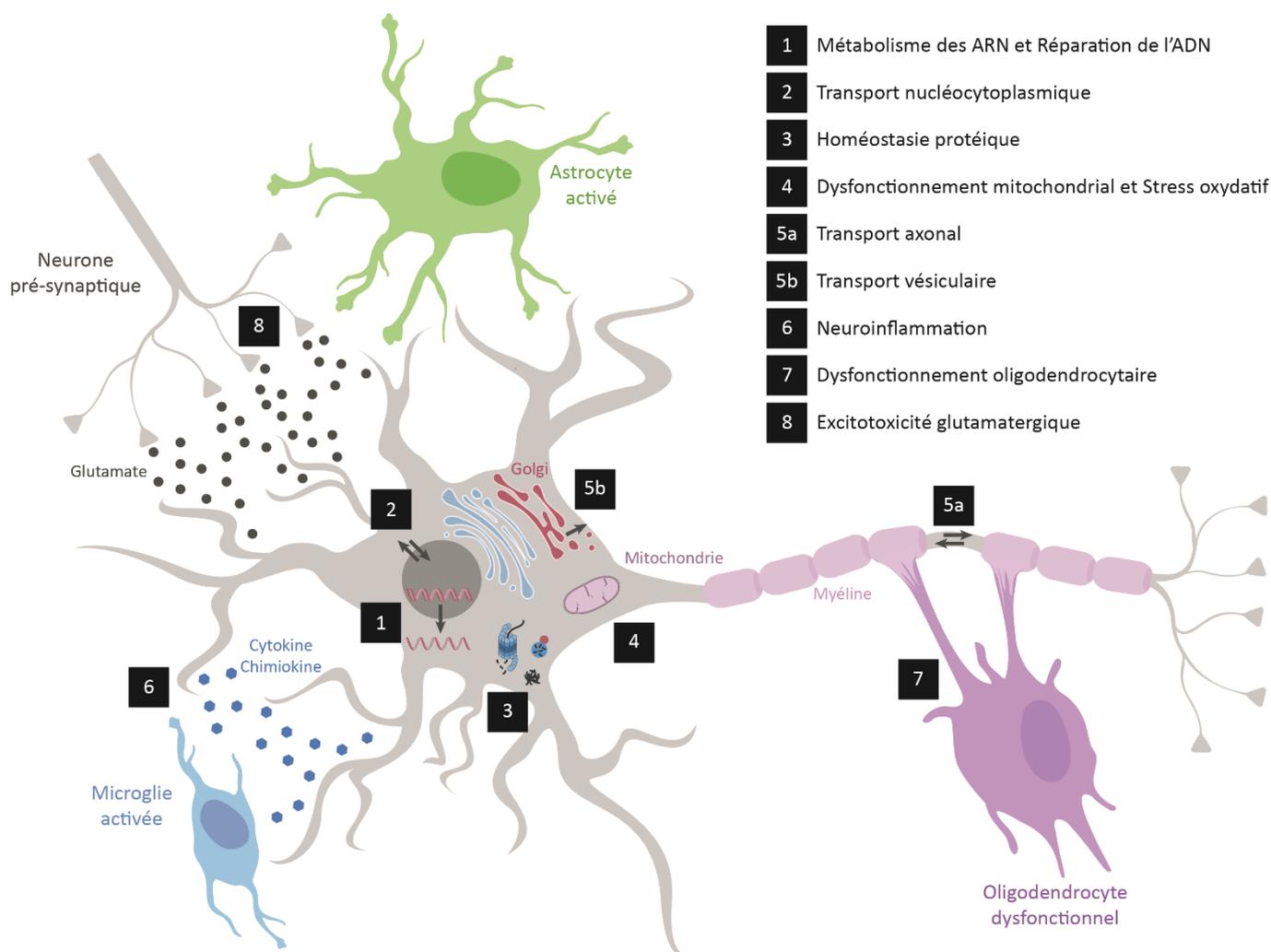
Les **cellules souches pluripotentes induites** (iPSC) constituent un modèle d'étude non seulement des formes familiales mais aussi des formes sporadiques de SLA. Cette technologie, développée par Takahashi et Yamanaka chez la souris puis chez l'Homme (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007), permet à partir d'une cellule différenciée, comme un fibroblaste, de générer une cellule pluripotente. Différents protocoles permettent de générer des motoneurones issus de iPSC (Dimos et al., 2008; Sances et al., 2016) et d'étudier les mécanismes pathologiques ou bien de tester de potentiels agents thérapeutiques (Fujimori et al., 2018). A l'heure actuelle, aucun protocole permettant la génération de neurones

corticospinaux n'a été trouvé mais seulement la génération d'une population de différents neurones excitateurs (Sances et al., 2016).

Malheureusement, ces modèles très simplifiés ne récapitulent pas la complexité de la maladie. Ainsi, les co-cultures de multiples types cellulaires et surtout le développement de modèles de mini-cerveau humains pourraient permettre d'étudier l'implication de différentes interactions cellulaires sur la physiopathologie de la SLA et d'autres maladies neurodégénératives (Tan et al., 2021).

## 6. Mécanismes physiopathologiques

L'étude des mécanismes physiopathologiques a principalement été conduite sur les motoneurones, délaissant ainsi l'étude de ces derniers dans les neurones corticospinaux. De multiples facteurs ont été mis en évidence, et il est probable que ce soit l'association de ces différents mécanismes qui soit à l'origine de la pathologie, plutôt qu'un seul et unique événement (Mejzini et al., 2019) (**Figure 7**).



**Figure 7 : Principaux mécanismes pathologiques proposés dans la SLA.**

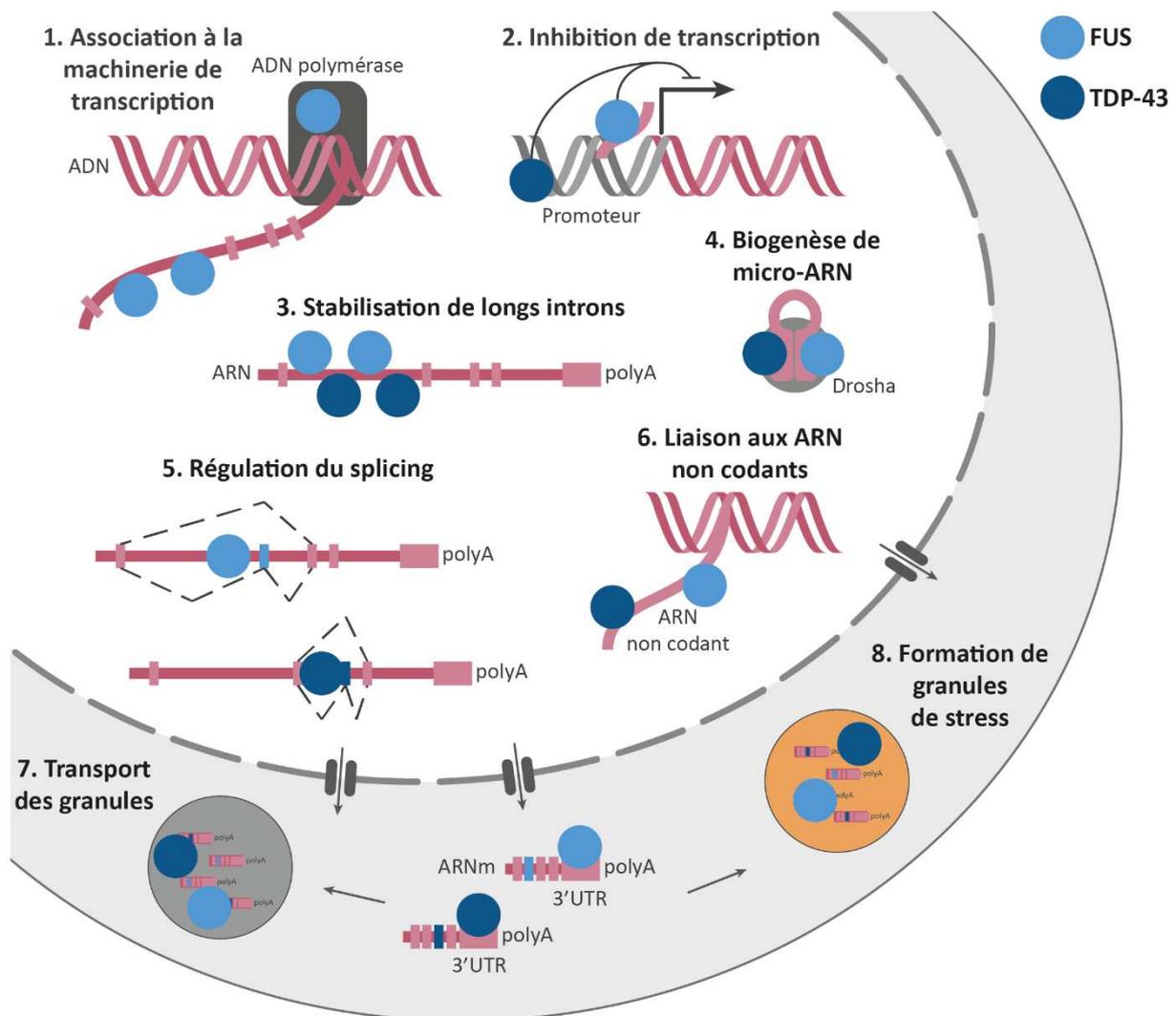
Différents mécanismes ont été montrés comme altérés, et suggérés comme pathologiques, dans la SLA. C'est le cas de l'altération du métabolisme des ARN et de la réparation de l'ADN (1), du transport nucléocytoplasmique (2), de l'homéostasie protéique (3), du fonctionnement mitochondrial (stress oxydatif) (4), du transport axonal et vésiculaire (5a,b), de la microglie (6) et des oligodendrocytes (7) ou encore d'une excitotoxicité glutamatergique (8). (Adaptation de (Mejzini et al., 2019)

### 6.1. Métabolisme des ARN et Réparation de l'ADN

La découverte de l'implication de mutations dans des gènes tels que *FUS* ou *TARDBP* dans la SLA a conduit à l'étude du métabolisme des ARN dans ce contexte pathologique. Ces protéines liant l'ARN sont impliquées dans une multitude de mécanismes et pourraient être séquestrées par les expansions répétitives d'hexanucléotides de *C9ORF72* (Lee et al., 2013; Cooper-Knock et al., 2014).

En condition physiologique, FUS participe à la transcription de l'ADN. FUS et TDP-43 sont, tous deux, capables de se lier aux longs introns afin de permettre leur stabilisation et un maintien de leurs niveaux. Ils sont capables d'inhiber la transcription de certains gènes en se liant aux promoteurs. Ces protéines peuvent également se lier aux ARN non codants mais aussi former un complexe avec Drosha, impliqué dans la biogenèse de micro-ARN. FUS et TDP-43 participent aussi à l'épissage alternatif d'ARN de >950 ou >370 ribonucléotides respectivement. Une fois dans le cytoplasme, FUS et TDP-43 interagissent avec les ARN messagers (ARNm) et permettent leur transport dans des granules avant leur traduction. En condition de stress cellulaire, l'association de ces protéines aux ARNm conduit à la formation de granules de stress où les ARNm seront alors séquestrés et leur traduction empêchée (Ling et al., 2013) (**Figure 8**).

FUS et TDP-43 jouent également un rôle dans la prévention des dommages ou la réparation de l'ADN. Fus, par exemple, serait impliqué dans le mécanisme de réparation par recombinaison homologue et la jonction d'extrémités non homologues. D'autre part, plusieurs gènes mis en cause dans la SLA joueraient un rôle dans ces processus. C'est le cas de TAF15, SETX ou encore EWSR1 (Mastrocola et al., 2013; Wang et al., 2013; Hill et al., 2016; Mezzini et al., 2019) (**Figure 8**).



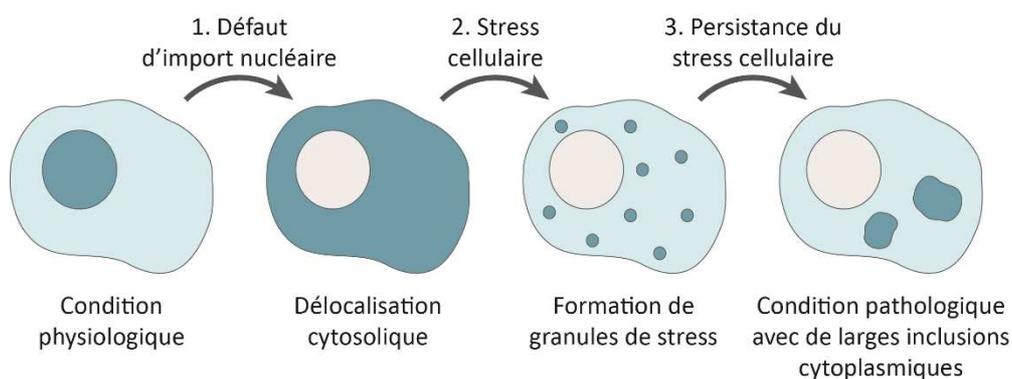
**Figure 8 : Rôles physiologiques de TDP-43 et FUS dans le métabolisme de ARN.**

Dans le noyau, FUS participe à la machinerie de transcription et se dépose sur les longs introns du transcrits généré (1). TDP-43 et FUS s'associent directement ou via un ARN non codant à des promoteurs pour inhiber la transcription de certains gènes (2). TDP-43 et FUS permettent la stabilisation des longs introns en s'y fixant (3). Ils se lient au complexe Drosha et participent à la biogénèse des micro-ARN (4). FUS et TDP-43 régulent le splicing des ARN de >950 ou >370 ribonucléotides respectivement (5), et peuvent se lier aux ARN non codants (6). Dans le cytoplasme, FUS et TDP-43 se lient à la région 3'UTR des ARNm avant d'être incorporés dans les granules de transport (7) ou les granules de stress (8), dans lesquelles ils forment des complexes avec des ARNm et d'autres protéines liant l'ARN. (Adaptation de (Ling et al., 2013))

## 6.2. Transport nucléocytoplasmique

Le fonctionnement de FUS et TDP-43 passe donc en grande partie par leur capacité à traverser la membrane nucléocytoplasmique afin de remplir leurs différentes fonctions nucléaires et cytoplasmiques.

De multiples études ont mis en évidence une altération du transport nucléocytoplasmique dans la SLA, et cela dans des cas issus de différentes mutations. En effet, des études sur des SLA-DFT induites par *C9ORF72* ont montré de telles altérations. De plus, des mutations dans la séquence de localisation nucléaire de gènes comme *FUS* ou *hnRNPA1*, également mis en cause dans la SLA, ont été mises en évidence (**Figure 9**). Enfin, il est globalement reconnu que l'agrégation de protéines comme TDP-43 dans le compartiment cytoplasmique, typiquement retrouvée dans la SLA, affecte le transport nucléocytoplasmique d'ARN et protéines (Dormann et al., 2010; Woerner et al., 2016; Kim and Taylor, 2017; Shi et al., 2017).



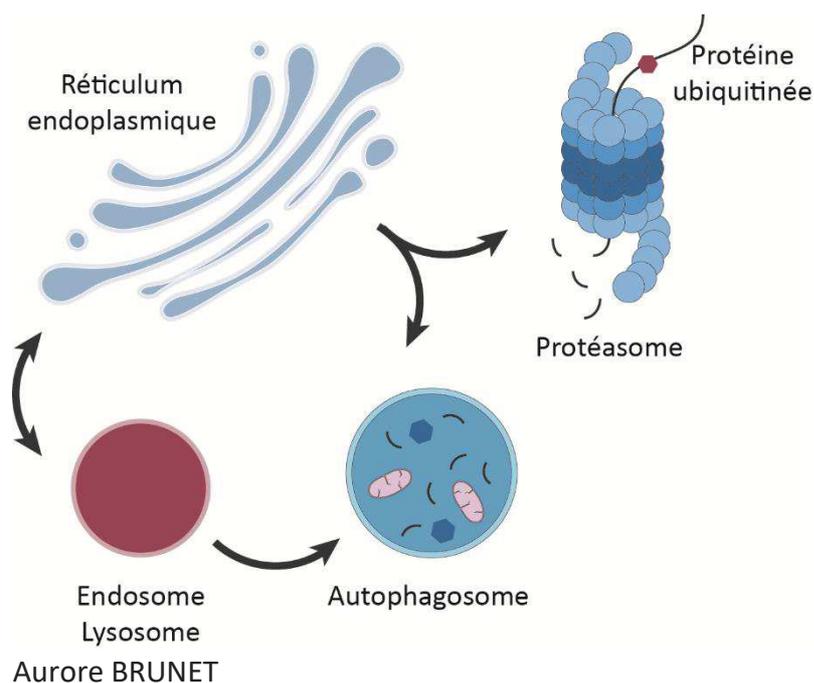
**Figure 9 : Formation d'agrégats FUS au cours de la SLA.**

La couleur bleue foncée représente la distribution de FUS. Suite à un défaut du transport nucléocytoplasmique, FUS est délocalisé dans le cytosol (1). En réponse à un stress cellulaire, FUS se regroupe en granules de stress (2) puis en inclusions cytoplasmiques pathologiques (3). (Adaptation de (Dormann et al., 2010))

### 6.3. Homéostasie protéique

Comme mentionné en 4., les mutations dans les principaux gènes associés à la SLA donnent lieu à la formation d'agrégats protéiques de type SOD1, C9ORF72, TDP-43 ou encore FUS (Watanabe et al., 2001; Pasinelli et al., 2004; Neumann et al., 2006; Ash et al., 2013; Mori et al., 2013). L'accumulation de protéines anormales a été mise en cause dans différentes pathologies (Alzheimer, Parkinson ou encore Huntington), mais la question de la formation, du rôle et de la toxicité de tels agrégats dans la SLA reste à élucider.

Les 2 principales voies de dégradation protéique ont été montrées comme altérées dans la SLA : l'autophagie et le système protéasome-ubiquitine. Tandis que l'**autophagie** consiste en la dégradation et le recyclage de protéines et organelles par des processus intracellulaires, le **système protéasome-ubiquitine** consiste en l'ubiquitination de protéines qui sont ensuite reconnues puis détruites par le protéasome (**Figure 10**). De multiples gènes associés à la SLA codent des protéines impliquées dans l'un et/ou l'autre de ces processus : *C9ORF72*, *CHMP2B*, *OPTN*, *SQSTM1*, *VCP* ou encore *UBQLN2* (Majcher et al., 2015; Ying and Yue, 2016; Nassif et al., 2017; Mezzini et al., 2019).



**Figure 10 : Altération des voies de dégradation des protéines.**

L'autophagie et le système protéasome-ubiquitine sont altérés dans la SLA. (Adaptation de (Taylor et al., 2016))

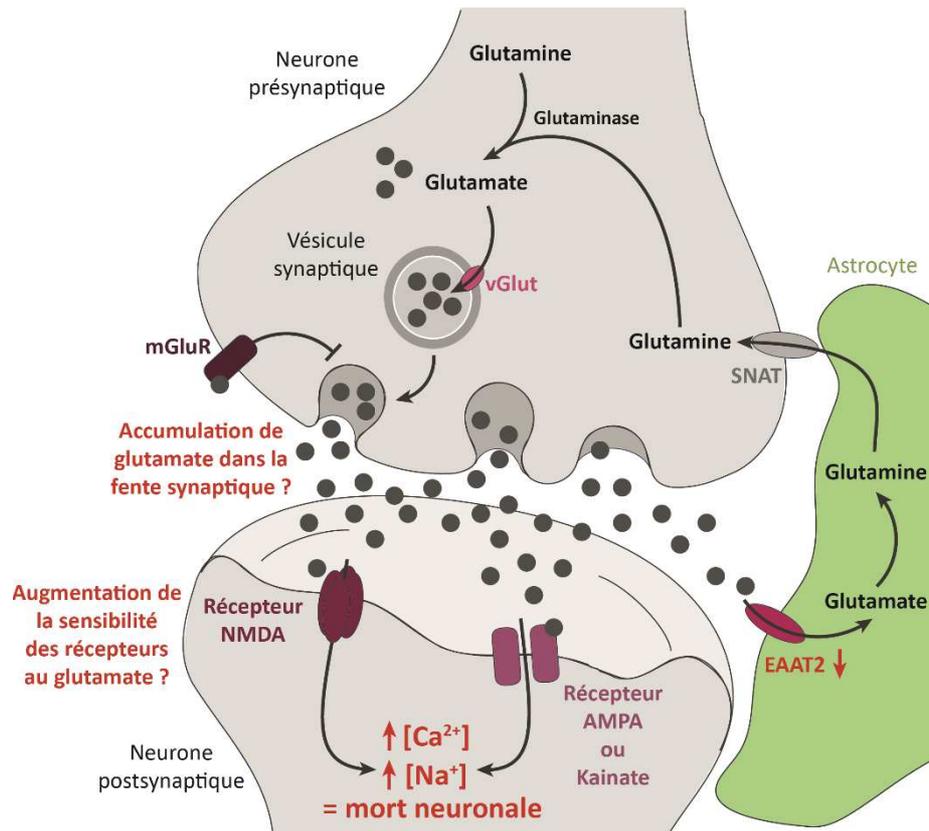
#### 6.4. Dysfonctionnement mitochondrial et Stress oxydatif

La SOD1 est une enzyme anti-oxydative retrouvée dans le cytosol. La découverte de son implication dans certains cas de SLA a amené à se questionner sur un potentiel rôle du stress oxydatif dans la pathologie. Ce dernier intervient lorsque la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme  $O_2^-$ ,  $O_2^+$ ,  $H_2O_2$  ou encore  $O_3$ , dépasse les capacités antioxydantes de la cellule. En 2011, Shibata et collaborateurs mettent en évidence des dommages oxydatifs dans la moelle épinière de patients SLA (Sasaki et al., 2001; Shibata et al., 2001).

La présence, non régulée, de ROS peut induire des dommages aux macromolécules telles que l'ADN, les protéines ou les phospholipides. C'est pourquoi il a été émis l'hypothèse que le stress oxydatif pourrait être à l'origine d'altération de l'ARN (Vance et al., 2013; Cohen et al., 2015). D'autres auteurs suggèrent quant à eux l'hypothèse inverse : que le dysfonctionnement des ARN pourrait conduire au stress oxydatif et aux dommages mitochondriaux (Pickles et al., 2016).

#### 6.5. Excitotoxicité glutamatergique et Excitabilité neuronale

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur. Une fois libéré dans la fente synaptique il active des récepteurs glutamatergiques pré- et post-synaptiques. Mais une suractivation de ces récepteurs est délétère pour la survie des neurones. L'**excitotoxicité glutamatergique** consiste en une surstimulation de ces récepteurs et à l'altération voire la dégénérescence des neurones les exprimant. En effet, une augmentation de l'excitabilité neuronale de façon prolongée conduit à une élévation des niveaux intracellulaires de calcium pouvant alors entraîner un stress du réticulum endoplasmique et des altérations mitochondriales (Cutsem et al., 2005; King et al., 2016) (**Figure 11**).



**Figure 11 : Excitotoxicité glutamatergique.**

La libération du glutamate dans la fente synaptique conduit à l'activation des récepteurs NMDA, AMPA ou Kainate, et à l'influx de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  dans le neurone post-synaptique. Une accumulation de glutamate dans la fente, ou une augmentation de la sensibilité du neurone post-synaptique au glutamate, conduit à une surstimulation des récepteurs. L'augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  qui en découle conduit à la mort de la cellule. Dans la SLA, les astrocytes présentent une réduction de l'expression de leur transporteur du glutamate EAAT2, impliqués dans le recyclage du glutamate.

L'un des arguments en faveur de la pathogénicité de l'excitotoxicité glutamatergique dans la SLA tient au fait que le **Riluzole**, actuellement seul médicament autorisé dans le traitement de la maladie en Europe, est un anti-glutamatergique. En effet, ce dernier, prolongeant l'espérance de vie des patients de 3 mois (Miller et al., 2012), agirait en augmentant la recapture et inhibant la libération du glutamate (Wang et al., 2004; Fumagalli et al., 2008).

Une augmentation des niveaux de glutamate dans le liquide céphalorachidien, en corrélation avec l'intensité de l'atteinte spinale observée (Spreux-Varoquaux et al., 2002), et une réduction de l'expression du principal transporteur astrocytaire de glutamate (EAAT2) dans le cortex et la moelle épinière ont été mis en évidence chez des patients SLA (Rothstein et al., 1995; Fray et al., 1998; Sasaki et al., 2000), supportant ainsi l'hypothèse d'une excitotoxicité glutamatergique au niveau des motoneurones. Concernant l'excitabilité de ces derniers dans le modèle murin *SOD1<sup>G93A</sup>*, il a été montré des résultats variables entre ceux innervant les fibres à contraction rapide (Type F) ou lente (Type S). Tandis que les motoneurones de type F, plus susceptibles à la dégénérescence dans la SLA, ne semblent pas affectés, ceux de type S, montrent une hyperexcitabilité (Delestrée et al., 2014; Leroy et al., 2014; Martínez-Silva et al., 2018). Dans leur revue sur la complexité de la circuiterie motrice et ses altérations dans la SLA, Gunes et collaborateurs suggèrent que l'altération de l'excitabilité de ces motoneurones, dépendrait non seulement de leur type (F ou S), mais évoluerait aussi en fonction du stade de la pathologie (Gunes et al., 2020).

Au niveau cortical, et dans des modèles murins *SOD1* et *TDP-43* de SLA, une hyperexcitabilité des neurones à projection subcérébrale de la couche V, dont font partie les neurones corticospinaux, (Zhang et al., 2016a; Kim et al., 2017b; Khademullah et al., 2020), une hyperactivité des interneurones somatostatine+ et une hypoactivité des interneurones parvalbumine+ (Zhang et al., 2016a) ont été mises en évidence. L'ensemble de ces données pourraient supporter l'hypothèse d'une altération de la circuiterie corticale responsable d'une excitotoxicité glutamatergique sur les motoneurones spinaux et leur dégénérescence.

## 6.6. Autres mécanismes physiopathologiques

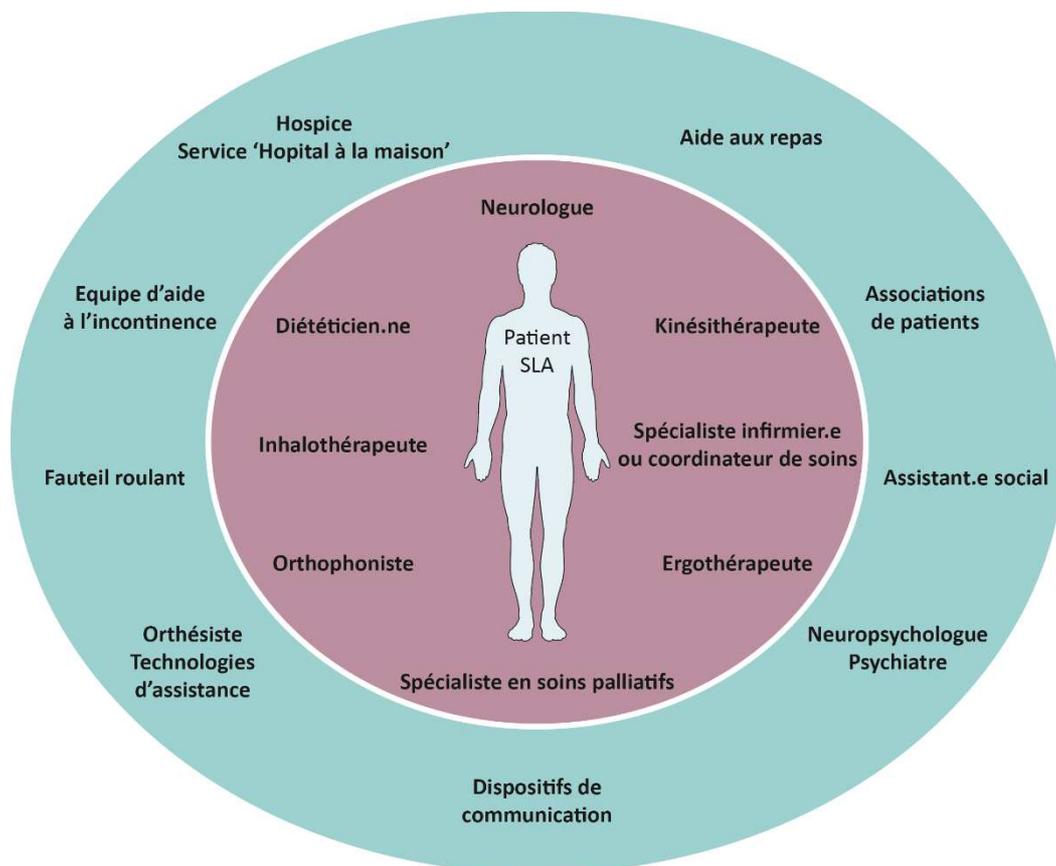
D'autres mécanismes ont été proposés comme participant à la physiopathologie de la SLA, c'est le cas d'une **altération du transport axonal** (accumulation de neurofilaments, organelles et vésicules chez des patients SLA (Hirano et al., 1984; Corbo and Hays, 1992; Rouleau et al., 1996; Sasaki and Iwata, 1996)), du **transport vésiculaire** (accumulation de protéines et dysfonctionnement de l'appareil de Golgi (Gonatas et al., 1992, 2006; Mourelatos et al., 1994; Fujita and Okamoto, 2005; van Dis et al., 2014)), d'une **neuroinflammation** (activation de la microglie dans le cerveau des patients SLA (Turner et al., 2004; Beers et al., 2011; Corcia et al., 2012; Gravel et al., 2016; Geloso et al., 2017)) ou encore d'un **dysfonctionnement oligodendrocytaire** (réduction de transporteurs de lactates ; perte oligodendrocytaire dans la moelle épinière de souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Lee et al., 2012; Kang et al., 2013)).

## 7. Traitements

La dramatique progression de la SLA et ses conséquences sur la qualité de vie des patients et de leur entourage accentue le cruel besoin de traitement de la pathologie. A l'heure actuelle, seul le Riluzole, n'offrant que 3 mois d'espérance de vie supplémentaire, est autorisé en Europe (Miller et al., 2012). Aux Etats-Unis, depuis 2017, l'Edavarone est autorisé dans le traitement de la SLA. Agissant comme agent anti-oxydant, il ralentirait le déclin fonctionnel des patients, et préserverait les fonctions respiratoires, sans preuve d'un potentiel prolongement de la durée de vie à ce jour (Writing Group and Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group, 2017).

En l'absence de véritable traitement curatif, un ensemble d'approches thérapeutiques sont mises en place afin de maximiser les capacités physiques des patients, et leur qualité de vie. Ces approches varient en fonction du stade de la maladie. Dans le cas des formes spinales par exemple, cela va de la kinésithérapie et du traitement symptomatique, à des processus plus lourds tels que la mise sous ventilateur et l'alimentation par tube gastrique.

Les patients nécessitent donc le suivi d'un groupement de spécialistes multidisciplinaires (**Figure 12**). Il a même été montré un bénéfice de cette approche multidisciplinaire sur la survie des patients, indépendamment de la ventilation, gastrostomie et du traitement au Riluzole (Chiò et al., 2006; Aridegbe et al., 2013; Rooney et al., 2015).



**Figure 12 : Equipe multidisciplinaire recommandée dans la prise en charge de patients atteints de SLA.**

La prise en charge des patients SLA nécessite le travail de différents spécialistes médicaux (rose), mais aussi de nombreux autres spécialistes et services (bleu). (Adaptation de (Hobson and McDermott, 2016))

## 7.1. Traitements symptomatiques

A la suite du diagnostic, quand les premières étapes du développement de la maladie, les équipes médicales se concentrent sur 3 aspects : la maximisation des fonctions motrices, l'aide à l'indépendance et le traitement des symptômes. Ces symptômes comprennent, en grande majorité, des crampes, de la spasticité et des douleurs (**Table 2**).

Problème	Traitements pharmacologiques	Stratégies non pharmacologiques
Crampes	Quinine Levetiracetam Mexiletine	Kinésithérapie Exercices physiques
Spasticité	Baclofène Dantrolène Tizanidine Benzodiazépine	Kinésithérapie Exercices d'étirement Hydrothérapie Cryothérapie
Douleur	Opioides	-
Labilité émotionnelle Dépression	Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine Amitriptyline	Psychothérapie
Anxiété	Benzodiazépine	Psychothérapie
Fatigue	Modafinil	-
Détresse respiratoire	-	Ventilation non invasive Toux

**Table 2 : Prise en charge pharmacologiques et non pharmacologique des principaux symptômes de SLA.**

(Adaptation de (Hobson and McDermott, 2016))

### 7.1.1. Crampes

Dans le cas des **crampes**, peu de traitements ont réellement fait leurs preuves. Aux Etats-Unis et au Royaume-Uni, la **Quinine** est le traitement le plus souvent utilisé tandis qu'en Europe, l'utilisation de **Levetiracetam** est recommandée. Utilisé dans le traitement de l'épilepsie, Levetiracetam inhiberait les canaux calciques présynaptiques et réduirait ainsi la libération de neurotransmetteurs (Vogl et al., 2012). Enfin, de faibles doses de **Mexiletine**, un

bloqueur de canaux sodiques voltage-dépendants, permettrait de réduire la fréquence des crampes (Hobson and McDermott, 2016; Weiss et al., 2016) (**Table 2**). En plus de ces traitements médicamenteux, il est recommandé d'associer un **suivi kinésithérapique** ainsi que la réalisation d'exercices physiques (Hobson and McDermott, 2016) (**Table 2**).

### 7.1.2. Spasticité

La **spasticité** fait partie du syndrome pyramidal et se caractérise par une augmentation du réflexe ostéotendineux provenant d'une hyperactivité des fibres afférentes (Lance, 1980). Les complications de la spasticité incluent des contractions, et la formation d'escarres lorsqu'associée à une immobilité des patients.

Certains traitements médicamenteux peuvent être prescrits, mais peu présentent de réelles preuves d'efficacité. Ces traitements incluent le **Baclofène** et le **Dantrolène**, des relaxants musculaires, la **Tizanidine**, un agoniste des récepteurs adrénergiques  $\alpha_2$ , ou encore une benzodiazépine comme le **Diazepam**, un psychotrope (**Table 2**). La kinésithérapie, et notamment les exercices d'étirement peuvent être bénéfiques. L'hydro- et la cryothérapie sont également parfois appliquées (Drory et al., 2001; Hobson and McDermott, 2016) (**Table 2**). Chez des patients spastiques, l'hydrothérapie a été associée à une réduction de la prise de traitement médicamenteux (Baclofène) (Kesiktas et al., 2004), et la cryothérapie à une réduction du degré de spasticité (Garcia et al., 2019). Ainsi, ces études supportent l'effet bénéfique de ces approches sur la spasticité et l'intérêt de leur application dans les stratégies thérapeutiques mises en place pour les patients SLA.

### 7.1.3. Douleurs

La combinaison des crampes, des potentiels escarres et de l'immobilité conduit à des **douleurs**, plus particulièrement au niveau des membres, du tronc et du cou. Ainsi, ces dernières deviennent de plus en plus fréquentes au cours de la progression de la pathologie, affectant le quotidien des patients. Mais le traitement de la douleur est un processus complexe qui nécessite une évaluation à la fois de la cause mais aussi du degré d'intensité de cette dernière. L'utilisation d'**opioïdes**, n'affectant pas la durée de vie des patients, est souvent appliquée (Oliver et al., 2010; Hobson and McDermott, 2016) (**Table 2**).

### 7.1.4. Troubles psychologiques

Comme mentionné en 2.1.2., une grande majorité des patients SLA présentent des **troubles dépressifs**, de l'**anxiété** ou encore de la **fatigue** (Kurt et al., 2007). Un **suivi psychologique** est donc primordial durant la totalité de la maladie. Certains traitements médicamenteux peuvent également être appliqués. C'est le cas des **inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine**, ou encore l'**Amitriptyline**, classiquement utilisés comme traitements antidépresseurs. Pour les troubles de l'anxiété, des **Benzodiazépines** peuvent être prescrites. Enfin, pour ce qui est de l'état de fatigue, peu de traitements sont classiquement appliqués, mais une petite étude a montré que la **Modafinil** pourrait avoir un léger impact bénéfique chez les patients (Rabkin et al., 2009; Hobson and McDermott, 2016) (**Table 2**).

## 7.2. Autres approches thérapeutiques

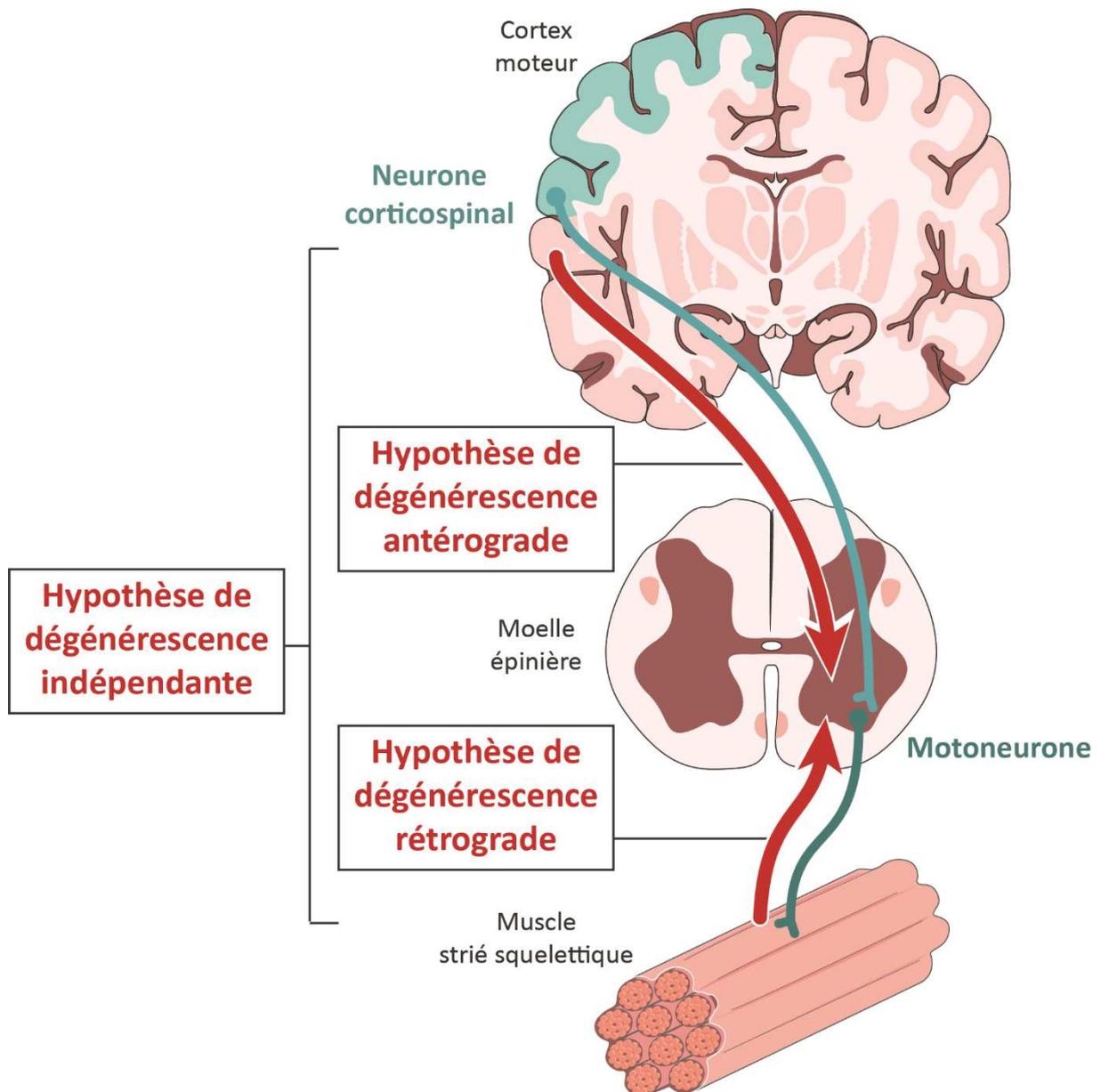
En plus des symptômes moteurs, psychologiques et de la douleur, les patients doivent faire face à de nombreuses autres difficultés impactant leur qualité de vie. C'est le cas des difficultés de déglutition et nutrition, de respiration et de communication.

Face aux troubles de déglutition, les patients peuvent bénéficier d'exercices tentant d'améliorer cette dernière ainsi que la toux, dans le but de limiter les risques de fausse route (Plowman, 2015). La progression de la maladie conduit à la nécessité de mise en place d'un **tube gastrique** permettant la prise alimentaire mais aussi médicamenteuse (Stavroulakis et al., 2016). Au niveau nutritif, il a été montré qu'un **régime riche en calorie** permettait d'améliorer la survie, bien que ce type d'approche nécessite une mise en place précoce dans la progression de la maladie (Desport et al., 2001; Jawaid et al., 2010; Genton et al., 2011; Marin et al., 2011; Paganoni et al., 2011; Ludolph et al., 2020).

La principale cause de décès chez les patients atteints de SLA est l'**insuffisance respiratoire**. La mise en place d'un système de **ventilation non invasif** permet d'améliorer la survie d'environ 7 mois, et la qualité de vie des patients. Mais l'utilisation de ce type de dispositif nécessite le traitement de légers symptômes tels que les sécrétions oropharyngées et la xérostomie (bouche sèche) (Bourke et al., 2006). L'augmentation des sécrétions oropharyngées et respiratoires, et la progression de l'atteinte des muscles respiratoires rend bien souvent la ventilation non-invasive insuffisante. La réalisation d'une **ventilation par trachéotomie** devient alors nécessaire, et conduit à l'incapacité de communication verbale (Spataro et al., 2012).

Différentes approches d'**aide à la communication** peuvent être mises en place et peuvent consister en l'utilisation d'un tableau ou d'un microphone, puis de logiciels spécialisés

dans la reconnaissance des mouvements oculaires associés à un ordinateur ou une tablette  
(Hobson and McDermott, 2016).



**Figure 13 : Hypothèse d'origine et propagation de la SLA.**

Trois hypothèses s'opposent concernant le site d'origine et la propagation de la dégénérescence dans la SLA. Hypothèse antérograde : initiation de la dégénérescence dans les neurones corticospinaux et le cortex cérébral puis une propagation antérograde aux motoneurones. Hypothèse rétrograde : initiation de la dégénérescence dans la partie distale des motoneurones et le muscle puis une propagation rétrograde aux neurones corticospinaux. Hypothèse indépendante : dégénérescence indépendante des deux populations neuronales.

## Chapitre II : Contribution du cortex cérébral à la sclérose latérale amyotrophique

### 1. Arguments en faveur d'une origine corticale de la SLA

Après avoir décrit pour la première fois la SLA, Jean-Martin Charcot sort en 1886 son œuvre complète. En abordant le sujet des atrophies musculaires progressives, et de la SLA, il est le premier à suggérer une **origine corticale de la pathologie**. En effet, l'utilisation des termes « sclérose latérale amyotrophique » fait référence à la dégénérescence du tractus corticospinal, contenant les neurones corticospinaux et présent dans la partie latérale de la moelle épinière (« sclérose latérale »), conduisant à une dégénérescence des motoneurones et la dénervation musculaire (« amyotrophique ») (Charcot, 1886). Cette hypothèse suggérerait donc que l'atteinte primaire du cortex cérébral, et des neurones corticospinaux, se propagerait aux motoneurones puis finalement aux muscles de façon antérograde : c'est l'**hypothèse de dégénérescence antérograde** (Charcot, 1886; Eisen et al., 1992) (**Figure 13**).

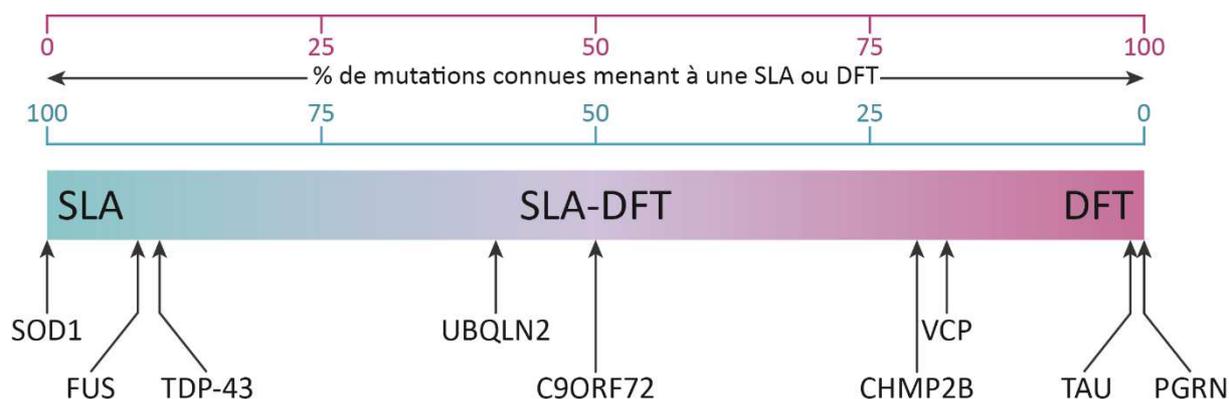
Par la suite, différentes hypothèses ont émergé pour tenter d'identifier le site potentiel d'origine de la SLA, et son sens de propagation. Dans les années 90, Chou et Norris, puis Williamson et Cleveland, proposent une **hypothèse de dégénérescence rétrograde**. Suivant cette dernière, l'atteinte primaire se situerait au niveau des muscles et remonterait par les motoneurones jusqu'au cortex et aux neurones corticospinaux (Chou and Norris, 1993; Williamson and Cleveland, 1999) (**Figure 13**). Parallèlement, Kiernan et Hudson, mais aussi Pamphlett, proposent une **hypothèse de dégénérescence indépendante** dans laquelle l'atteinte des neurones corticospinaux, et celle des motoneurones se feraient indépendamment l'une de l'autre (Kiernan and Hudson, 1991; Pamphlett et al., 1995) (**Figure 13**).

Récemment, différents arguments génétiques, cliniques et histopathologiques sont venus soutenir l'hypothèse initiale émise par Charcot d'une dégénérescence antérograde ayant pour origine le cortex cérébral. Nous allons revenir sur ces arguments dans la suite de cette partie.

### 1.1. Le continuum SLA-DFT

De nombreux gènes ont été mis en cause dans le développement de la SLA, parmi eux *SOD1*, mais aussi *FUS* et *TARDBP*. C'est l'étude de ces différentes causes génétiques qui ont permis la mise en évidence d'un continuum génétique entre la SLA et une autre maladie neurodégénérative : la démence fronto-temporale (DFT) (Van Langenhove et al., 2012; Ling et al., 2013) (**Figure 14**). Il a été mis en évidence qu'environ 15% des patients SLA développent une DFT, et inversement (Lomen-Hoerth et al., 2002; Lillo and Hodges, 2009). La DFT est caractérisée par une dégénérescence des lobes frontaux et temporaux du cortex cérébral. Ainsi, en plus d'un lien génétique, ces 2 pathologies présentent l'une comme l'autre des atteintes corticales. SLA et DFT sont également caractérisées par la formation d'inclusions cytoplasmiques toxiques (Neumann et al., 2006; Ling et al., 2013). Les agrégats TDP-43 sont retrouvés dans la SLA et la DFT : ils représentent 97% des inclusions retrouvés dans la SLA, et 45% dans la DFT (Ling et al., 2013).

Il est donc intéressant de noter que la SLA et la DFT présentent des liens génétiques, cliniques et histopathologiques dans des contextes pathologiques où le cortex cérébral, et son atteinte, représente également un dénominateur commun.

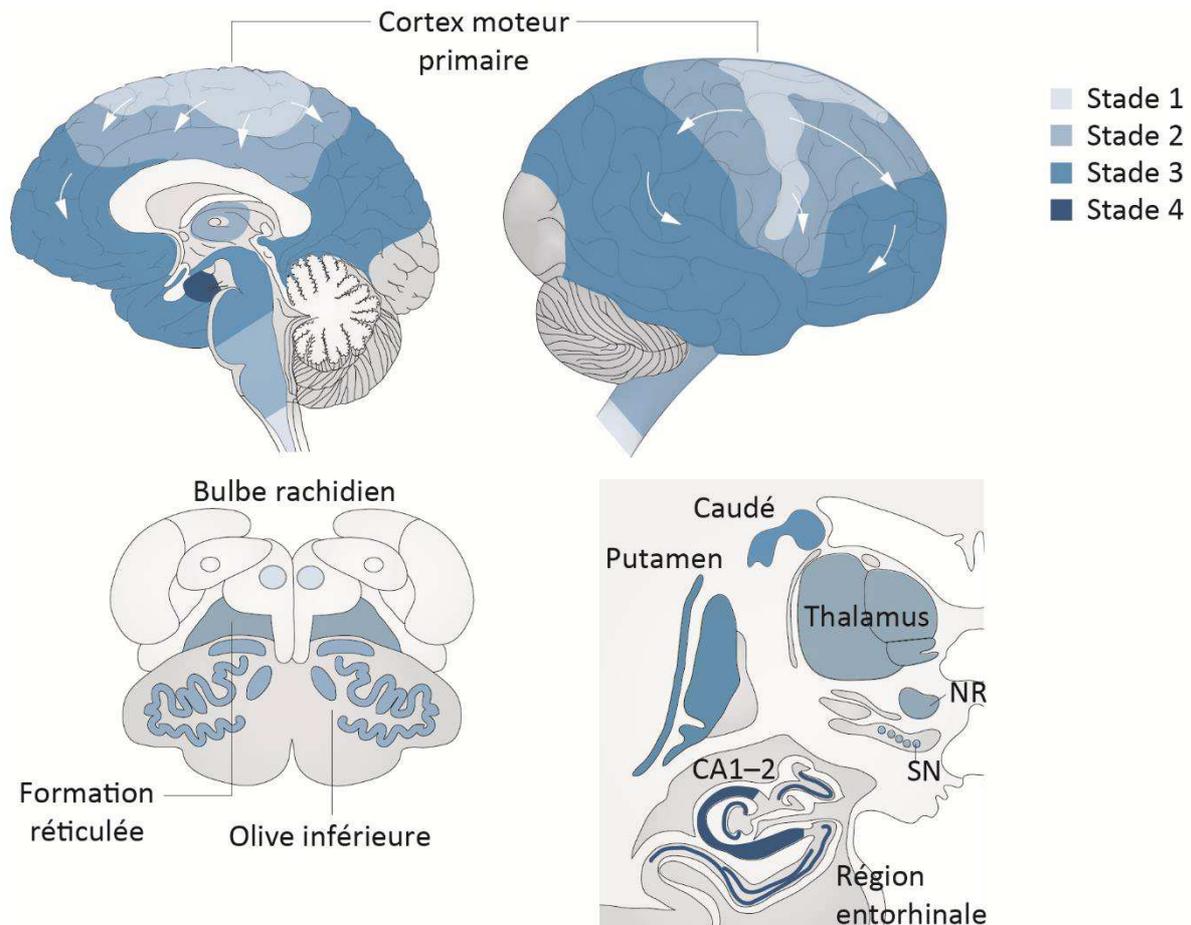


**Figure 14 : Continuum génétique entre Sclérose Latérale Amyotrophique et Démence Fronto-Temporale.**

Représentation du continuum génétique entre SLA et DFT, représentées aux deux extrêmes du spectre des symptômes cliniques de SLA (bleu) et DFT (rose). Les principaux gènes connus comme impliqués dans la SLA ou DFT sont représentés en fonction du ratio de mutations connues donnant l'une ou l'autre des pathologies. (Adaptation de (Ling et al., 2013))

## 1.2. L'hypothèse de propagation corticofuge

L'étude des inclusions cytoplasmiques TDP-43 a apporté un argument clé en faveur d'une origine corticale de la SLA. En 2013, Brettschneider et Braak examinent ces inclusions sur des tissus post-mortem de patients (Braak et al., 2013; Brettschneider et al., 2013). Ils s'intéressent à la fréquence à laquelle ces agrégats sont retrouvés dans les différentes régions du cerveau. Cela leur permet alors de suggérer des stades de progression de la pathologie TDP-43. La région premièrement touchée par ces agrégats serait donc le cortex moteur, suivi des zones corticales voisines, puis plus distantes associées à certaines structures sous-corticales (Braak et al., 2013; Brettschneider et al., 2013) (**Figure 15**).

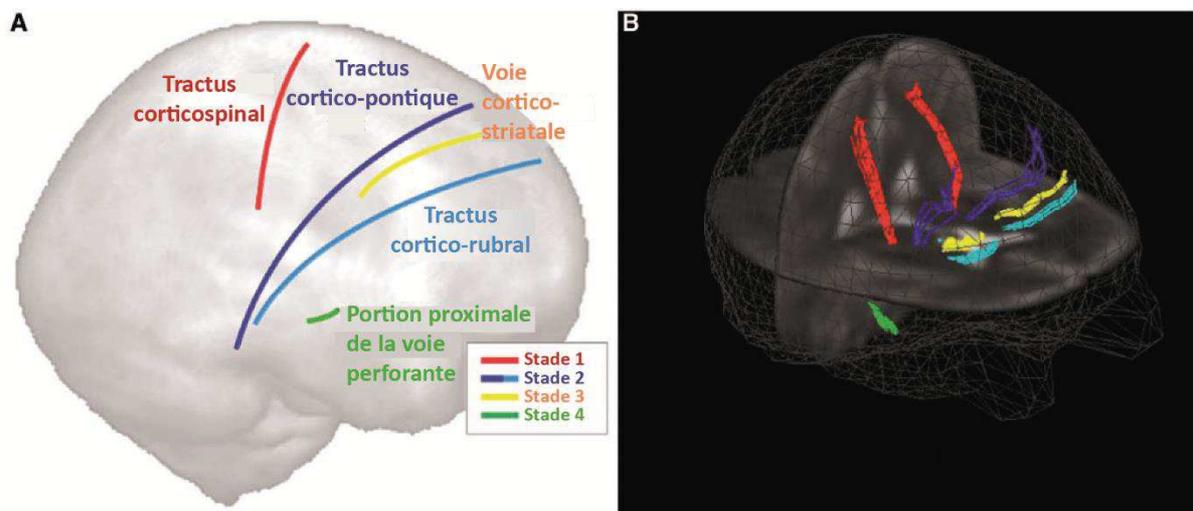


**Figure 15 : Hypothèse de propagation corticofuge de la pathologie TDP-43.**

Après étude post-mortem d'agrégats TDP-43 de patients SLA, Braak et collaborateurs proposent une hypothèse de propagation corticofuge de la pathologie TDP-43 en 4 stades. (1) Grandes cellules pyramidales de la couche V du cortex moteur et neurones à projection dont les neurones corticospinaux ; motoneurones bulbaires et spinaux. (2) Cortex prémoteur et aires préfrontales adjacentes ; thalamus, substance noire (SN) ; partie parvocellulaire du noyau rouge (NR) ; olive inférieure ; formation réticulée. (3) Cortex préfrontal et aires sensorielles post-centrales ; neurones à projection du striatum. (4) Lobes temporaux et cortex entorhinal incluant la formation hippocampique (CA1-2). (Adaptation de (Braak et al., 2013))

Pour valider cette hypothèse, Kassubek et collaborateurs utilisent l'imagerie par tenseur de diffusion sur patients vivants de manière longitudinale (Kassubek et al., 2014). Cette approche, basée sur l'imagerie à résonance magnétique, permet la visualisation des tractus neuronaux de substance blanche. (Smith et al., 2006) et notamment des différents tractus corticofuges (**Figure 16**). Le premier tractus affecté dans la SLA est le tractus corticospinal,

suivi du cortico-rubral et du cortico-pontique. Surviennent ensuite des atteintes dans la voie cortico-striatale et enfin dans la portion proximale de la voie perforante de la formation hippocampique (Kassubek et al., 2014). Ces travaux d'imagerie en tenseur de diffusion démontrent bien l'atteinte primaire du cortex moteur, comme suggérée par l'analyse de la pathologie TDP-43 en post-mortem, et l'implication successive et ordonnée des autres aires corticales.



**Figure 16 : Tractus et voies altérés dans le cerveau de patients atteints de SLA.**

(A) Représentation schématique de tractus et voies altérés et les différents stades de propagation. (B) Image tri-dimensionnelle du tractus corticospinal (rouge) (stade 1), cortico-pontique (bleu foncé) et cortico-rubral (bleu clair) (stade 2), de la voie cortico-striatale (jaune) (stade 3) et de la portion proximale de la voie perforante de la formation hippocampique. (Adaptation de (Kassubek et al., 2014))

Enfin, une récente étude, utilisant l'imagerie à résonance magnétique associée à la modélisation informatique des réseaux, a réussi à prédire les futures atteintes cérébrales en se basant sur les altérations précoces de la substance blanche (Meier et al., 2020). Les prédictions de ces modélisations concernant la propagation de la pathologie dans les différentes zones de substance blanche suivent les stades proposés par Brettschneider et collaborateurs en 2013, et donc une propagation corticofuge (Brettschneider et al., 2013;

Meier et al., 2020). Cette étude, ainsi que celles mentionnées précédemment, permettent donc de supporter l'hypothèse d'une **propagation spatio-temporelle de la maladie, depuis le cortex moteur, le long des tractus** de substance blanche.

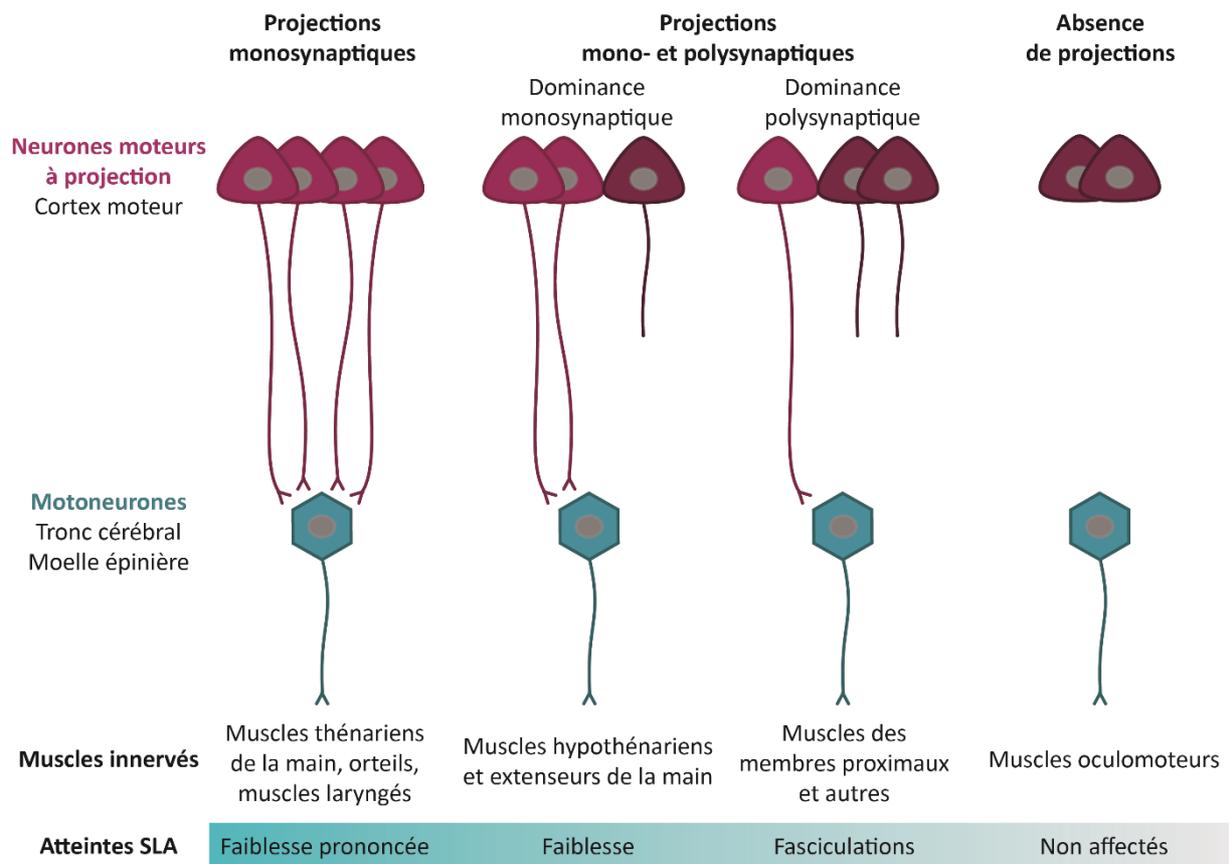
### 1.3. Les connexions neurones corticospinaux-motoneurones et les atteintes musculaires

C'est il y a plus de 60 ans qu'ont été mises en évidence pour la première fois des connexions monosynaptiques entre neurones corticaux à projection et motoneurones bulbaires et spinaux. En parallèle de ces dernières, on trouve aussi des connexions polysynaptiques, davantage présentes chez l'Homme que le rongeur (Lemon, 2008; Isa et al., 2013).

Tandis que les neurones corticospinaux innervent de multiples motoneurones, ces derniers reçoivent et intègrent les informations de plusieurs neurones corticaux à projection. Chacun contrôle ensuite différents groupes de muscles. L'ensemble des motoneurones est sous le contrôle direct ou indirect des neurones corticospinaux, à l'exception de ceux innervant les muscles oculaires et les sphincters (de Noordhout et al., 1999). Il existe une **corrélacion entre la proportion de neurones corticospinaux innervant les motoneurones de façon directe, et le niveau d'altération des muscles innervés par ces derniers** (Eisen et al., 2017) (**Figure 17**). En effet, tandis que les muscles recevant de nombreuses connexions directes des neurones corticospinaux (muscles des mains, du larynx, des orteils) sont particulièrement atteints chez les patients SLA, ceux indirectement connectés sont moins affectés (Eisen et al., 2017). Enfin, les muscles indépendants des tractus corticospinaux et

bulbaires (muscles oculaires et sphincters) sont, eux, préservés dans la SLA (Okamoto et al., 1993; Carvalho et al., 1995; Eisen et al., 2017).

Ainsi, cette corrélation entre la proportion de synapses neurone corticospinal-motoneurone, et les atteintes motrices suggèrent une contribution des neurones corticospinaux dans la dégénérescence des motoneurones et la dénervation motrice (Eisen et al., 2017).



**Figure 17 : Influence du type de connexion synaptique neurone moteur à projection-motoneurone sur les symptômes de SLA.**

Les motoneurones du tronc cérébral et de la moelle épinière reçoivent des projections directes (monosynaptiques) et/ou indirectes (polysynaptiques) de neurones moteurs à projection du cortex moteur. Les muscles recevant des connexions directes sont plus affectés dans la SLA que ceux recevant des connexions indirectes. Ceux ne recevant pas de connexion des neurones moteurs à projection, eux, ne sont pas affectés. (Adaptation de (Eisen et al., 2017))

#### 1.4. L'hyperexcitabilité corticale

En 1991, une étude portant sur des patients atteints de différents troubles moteurs et pathologies, y compris SLA, utilise la **stimulation magnétique transcrânienne** à impulsion unique (spTMS). Leur permettant l'accès aux changements d'excitabilité corticale, cette technique met en évidence, et cela pour la première fois, une hyperexcitabilité du cortex moteur des patients SLA (Caramia et al., 1991).

Depuis cette étude, l'**hyperexcitabilité corticale** est considérée comme un élément classiquement retrouvé dans la maladie, et cela de façon très précoce.

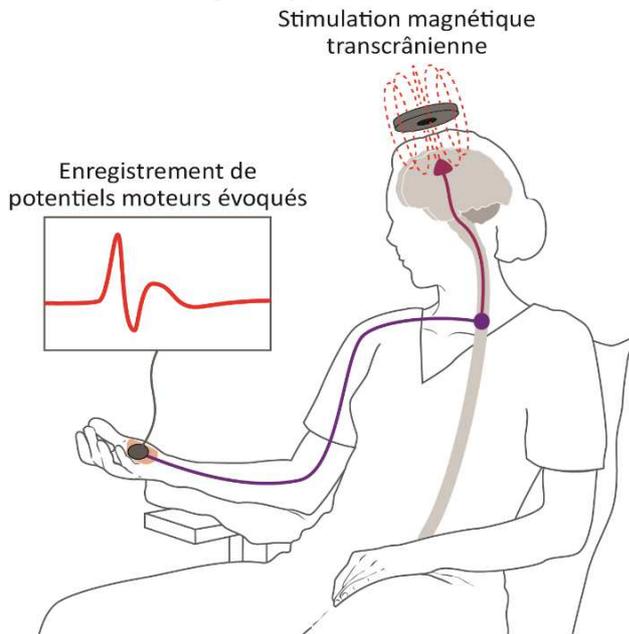
##### 1.4.1. Études par stimulation magnétique transcrânienne

- *La stimulation magnétique transcrânienne (TMS)*

La stimulation magnétique transcrânienne (TMS) consiste en l'application d'une impulsion magnétique à l'aide d'une bobine sur le crâne, au-dessus du cortex moteur. Se basant sur le principe de la loi de Lenz-Faraday, la variation rapide du flux magnétique génère un champ électrique. Ce dernier, rencontrant les neurones présents dans le champ magnétique, induit alors leur dépolarisation. La réponse à cette stimulation peut ensuite être mesurée au niveau d'un muscle de la main à l'aide d'une électrode de surface (**Figure 18**). La force du champ magnétique, est impactée par les tissus, les os et méninges. Tandis que cela n'empêche pas l'activation des réseaux corticaux, le courant électrique généré n'impacte que très peu les structures sous-corticales (Klomjai et al., 2015).

- *L'hyperexcitabilité corticale des patients SLA montrée par TMS*

**Figure 18 : L'hyperexcitabilité corticale des patients atteints de SLA mise en évidence par stimulation magnétique transcrânienne.**

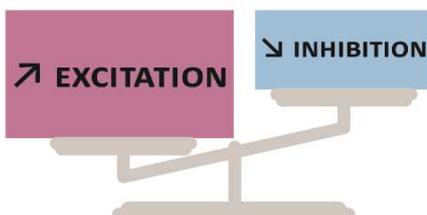


La stimulation magnétique transcrânienne consiste en l'application d'un champ magnétique au-dessus du cortex moteur, et à l'enregistrement de potentiels évoqués moteurs dans un muscle de la main. Cette approche a mis en évidence une réduction des paramètres associés à l'inhibition corticale, et une augmentation des paramètres d'excitation corticale chez les patients SLA.

Dans leur étude de 1991, Caramia et collaborateurs évaluent l'excitabilité du cortex moteur via spTMS chez des patients atteints de sclérose en plaque, ataxie spinocérébelleuse, sclérose latérale primaire, métastases cérébrales mais aussi de SLA (Caramia et al., 1991). Ils montrent une corrélation entre les symptômes moteurs, tels que l'hyper-réflexie, la spasticité et la faiblesse musculaire, et le temps de conduction motrice ainsi que le seuil d'intensité de stimulation nécessaire à la génération d'une réponse motrice évoquée (MEP). Chez les patients SLA, ce

Stimulation magnétique transcrânienne	
Patient SLA vs Sujet sain	
<b>PARAMÈTRES EXCITATEURS</b>	
↗ Facilitation intracorticale (ICF)	
↗ Courte facilitation intracorticale (SICF)	
<b>PARAMÈTRES INHIBITEURS</b>	
↘ Courte inhibition intracorticale (SICI)	
↘ Inhibition intracorticale à long interval (LICI)	
↘ Période de silence cortical(CSP)	

**HYPEREXCITABILITÉ  
CORTICALE**



seuil de MEP est réduit, suggérant ainsi une hyperexcitabilité du cortex (Caramia et al., 1991).

En 1997, une étude centrée sur les patients SLA montre que ce seuil de MEP est affecté dans le cas de muscles dont les motoneurones ne sont pas encore dégénérés (Mills and Nithi, 1997). Dans les muscles dont les motoneurones sont, eux, déjà altérés, le seuil ne se trouve plus affecté. Ainsi, il est suggéré que cette réduction précoce du seuil cortico-moteur pourrait illustrer une excitabilité anormale des neurones moteurs conduisant à leur dégénérescence (Mills and Nithi, 1997).

La technique de spTMS a ensuite permis de montrer une corrélation entre le seuil cortical et la durée de la maladie. En effet, plus le seuil cortical est bas, plus la durée de vie des patients sera courte, suggérant ainsi un **impact négatif de l'hyperexcitabilité corticale sur la survie des patients** (Eisen et al., 1993). Une étude portant sur l'application de spTMS avec enregistrement au niveau des muscles crâniens, et non de la main, a permis de montrer des altérations d'excitabilité corticale chez les patients SLA, et cela même sans symptômes bulbaires (Desiato et al., 2002).

L'utilisation de stimulation magnétique transcrânienne par pulsations appareillées conventionnelles permet de mieux comprendre et étudier les composants de l'excitabilité corticale. Cette approche de TMS consiste à appliquer 2 stimuli, l'un de conditionnement et l'autre de test, de façon successive. Cela permet l'accès à 2 mesures : **l'inhibition et la facilitation intracorticale** (ICI et ICF respectivement) (Kujirai et al., 1993; Nakamura et al., 1997). Le travail de l'équipe du Professeur Kiernan a ensuite permis la découverte de nombreux autres paramètres de TMS tels que **l'inhibition intracorticale à court ou long intervalle** (SICI et LICI respectivement), **la facilitation à court intervalle** (SICF), **la durée de la période de silence cortical** (CSP) ou encore **l'index d'excitation**.

Les 2 biomarqueurs principaux de l'hyperexcitabilité corticale, retrouvée chez les patients atteints de SLA familiale ou sporadique, sont une baisse, voire une absence, de SICI associé à une augmentation de l'ICF (Vucic et al., 2008; Rossini et al., 2015; Vucic and Kiernan, 2017; Van den Bos et al., 2018b) (**Figure 18**). Cette hyperexcitabilité corticale est même retrouvée de façon **pré-symptomatique** chez les patients porteurs d'une mutation *SOD1*, caractéristique non retrouvée chez les porteurs de mutations dans *FUS* ou *C9ORF72* (Vucic and Kiernan, 2006; Blair et al., 2010; Menon et al., 2015a, 2015b; Geevasinga et al., 2016). Dans leur étude sur des sujets asymptomatiques porteurs d'une mutation *SOD1*, Vucic et collaborateurs ont mis en évidence cette hyperexcitabilité **3 à 6 mois avant les premiers symptômes moteurs** (Vucic et al., 2008). Enfin, la baisse de SICI a, par ailleurs, été montré comme **négativement corrélée à la survie des patients**, soulignant une fois encore l'importance de l'hyperexcitabilité corticale dans la pathologie (Shibuya et al., 2016).

Tandis que le SICI reflèterait l'action du GABA sur les récepteurs GABA<sub>A</sub>, l'ICF reflèterait, quant à elle, l'activité glutamatergique (Chen et al., 1998; Di Lazzaro et al., 2012, 2013). Ainsi, le dysfonctionnement des composants excitateurs et inhibiteurs induirait une augmentation de l'excitation associée à une baisse de l'inhibition corticale, et donc à l'hyperexcitabilité corticale retrouvée chez les patients (Nihei et al., 1993; Ziemann et al., 1996; Zanette et al., 2002; Karandreas et al., 2007).

De façon très intéressante, une récente étude de Vucic et Kiernan a mis en évidence un lien entre l'hyperexcitabilité corticale et l'évolution clinique de la SLA (Dharmadasa et al., 2020). Les auteurs montrent une altération du fonctionnement cortical restreinte à la zone correspondant à l'atteinte clinique puis à un stade plus avancé de la maladie, lorsque les atteintes motrices sont plus étendue, l'altération est retrouvée dans l'ensemble du cortex

moteur (Dharmadasa et al., 2020). Ils retrouvent la baisse de SICI chez les patients présentant une forme spinale ou bulbaire de la SLA. De façon intéressante, les auteurs montrent une baisse significativement plus marquée du SICI chez les patients à forme bulbaire qu'à forme spinale. Ces patients bulbaires, présentent également un score d'atteinte des neurones corticospinaux plus important, suggérant un lien entre le niveau d'atteinte clinique et l'altération du fonctionnement cortical (Dharmadasa et al., 2020). Ainsi, cette étude s'ajoute à un ensemble de données de TMS qui souligne le potentiel rôle physiopathologique du cortex cérébral et de son altération dans la SLA et son hétérogénéité.

#### 1.4.2. Études de neuroimagerie

De nombreuses études utilisant l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, par la suite confirmées par d'autres approches, ont mis en évidence une **hyperconnectivité du cerveau des patients SLA** comparativement aux contrôles.

- *Imagerie par résonance magnétique*

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) a permis la mise en évidence l'atrophie du cortex moteur des patients SLA (Bede et al., 2013). Plus tard, une étude longitudinale sur des patients SLA a utilisée l'IRM fonctionnelle (IRMf) durant différentes tâches (Schulthess et al., 2016). Dans les 2 conditions étudiées, que ce soit la réalisation ou la visualisation d'une tâche motrice, les patients SLA montrent une plus grande connectivité fonctionnelle dans le cortex prémoteur que les contrôles. Les auteurs ont également pu mettre en évidence une progression temporelle de cette hyper-connectivité dans des régions voisines comme le cortex frontal et le gyrus post-central. Une propagation également mise en évidence depuis

les régions motrices, puis le tronc cérébral, les zones ventrales et hippocampiques successivement (Schulthess et al., 2016). Les auteurs expliquent que cette hyper-connectivité du cortex des patients SLA pourrait 1) être le résultat d'une perte de contrôle inhibiteur (Douaud et al., 2011) ou 2) refléter un mécanisme compensatoire comme cela a pu être montré en cas de lésion cérébrale, où le recrutement d'autres structures serait mis en place afin de contrecarrer une perte neuronale jusqu'à épuisement des neurones persistants (Hillary et al., 2015) (Schulthess et al., 2016).

Différentes études utilisant l'IRMf ont, par ailleurs, montré une corrélation négative entre l'altération de connectivité, et les fonctions motrices, la progression et la durée de la maladie, suggérant une fois encore la pathogénicité des altérations du fonctionnement cortical dans la SLA (Lulé et al., 2007; Douaud et al., 2011; Schulthess et al., 2016).

En plus d'être présentes chez les patients au stade symptomatique, ces altérations de connectivité ont également été retrouvée chez des porteurs de mutation *SOD1* ou *C9ORF72*, asymptomatiques, soulignant ainsi la précocité de ces atteintes (Menke et al., 2016).

- *Tomographie par émission de positron (PET)*

La tomographie par émission de positron (PET) est une technique d'imagerie basée sur la visualisation de la liaison de radiomarqueurs à leur cible. Le traceur radioactif [<sup>11</sup>C]flumazenil, un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>, permettra, par exemple d'évaluer la densité de tels récepteurs dans le cerveau de sujets. En 2000, une étude utilisant ce radiomarqueur montre une réduction du volume de distribution de flumazenil dans le cortex préfrontal, moteur et prémoteur de patients SLA (Lloyd et al., 2000). La réduction de distribution de cette molécule suggère alors une perte de récepteurs GABAergiques

inhibiteurs et ainsi une perte d'inhibition corticale, clairement établie quelques années plus tard par TMS (Lloyd et al., 2000; Vucic and Kiernan, 2006).

- *Électro- et Magnéto-encéphalographie*

D'autres études employant l'électroencéphalographie (EEG) ou la magnétoencéphalographie (MEG) ont respectivement mis en évidence une augmentation des différentes oscillations, notamment alpha, dans les régions frontales et centrales (Iyer et al., 2015), et une désynchronisation des oscillations bêta du cortex moteur de patients SLA (Proudfoot et al., 2017). Les auteurs de l'étude par EEG suggèrent que l'augmentation des oscillations alpha pourrait traduire d'une perte de contrôle inhibiteur, d'une hyper-plasticité du réseau neuronal en réponse à son atteinte, ou encore d'un mécanisme compensatoire mis en place suite à la perte neuronale corticale (Iyer et al., 2015). Les auteurs de l'étude par MEG, eux, suggèrent que la désynchronisation des oscillations bêta pourrait traduire ou contribuer à la dégénérescence excitotoxique des microcircuits corticaux, et cela en raison de la corrélation entre cette désynchronisation et la vitesse de progression de la maladie (Proudfoot et al., 2017).

L'ensemble de ces études sur le fonctionnement et l'excitabilité du cortex cérébral dans la SLA montrent, non seulement une atteinte anatomique du cortex moteur des patients, mais aussi et surtout une hyper-connectivité et hyperexcitabilité corticale. En plus d'être présente chez les patients sporadiques et familiaux, aux formes bulbaires et spinales, l'hyperexcitabilité corticale peut être retrouvée de façon présymptomatique, soulignant la précocité de cette atteinte. Enfin, la corrélation négative entre cette altération du fonctionnement cortical et la

survie des patients, montre le possible rôle clé du cortex cérébral dans la pathologie de la SLA, et l'importance de comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'hyperexcitabilité corticale.

## 2. Mécanismes proposés de propagation corticofuge

### 2.1. Propagation de type prion vs Hyperexcitabilité corticale et excitotoxicité glutamatergique

Que ce soit Jean Martin Charcot dès sa première description de la sclérose latérale amyotrophique, Braak et Brettschneider suggérant une propagation corticofuge après analyse d'inclusions TDP-43 et des tractus corticofuges, ou encore Eisen, Kiernan, Vucic et d'autres après démonstration d'une hyperexcitabilité corticale précoce, négativement corrélée à l'atteinte clinique et à la survie des patients ; tous pointent du doigt le cortex moteur comme site d'origine et de propagation de la maladie.

Concernant le mécanisme impliqué dans cette propagation du cortex moteur vers ses cibles, deux écoles de pensées existent :

- 1) Braak et Brettschneider, après leurs travaux sur les inclusions TDP-43 dans les tissus post-mortem de patients, émettent cette hypothèse de propagation corticofuge et suggèrent que cette dernière se ferait par la dissémination monosynaptique de protéines TDP-43 mal repliées (Braak et al., 2013; Brettschneider et al., 2013). Ainsi, ils proposent un **mécanisme de propagation de type prion**. Ce mécanisme consiste en la présence de protéines capables de former des fibrilles de type amyloïdes, une capacité retrouvée dans la SLA pour TDP-43, mais aussi SOD1, FUS et les répétitions de dipeptides associées à C9ORF72 (McAlary et al., 2019). Mais l'altération de l'arrangement de ces protéines doit encore être directement

liée à une pathogénicité ce qui, à l'heure actuelle, n'a pas encore pu être mis en évidence (McAlary et al., 2019).

2) A la suite de la mise en évidence de l'hyperexcitabilité corticale, et en accord avec une propagation corticofuge, Eisen et Kiernan publient une revue dans laquelle ils suggèrent que ce **dysfonctionnement cortical induirait une excitotoxicité glutamatergique depuis les neurones corticospinaux à leurs cibles**, les motoneurones bulbaires et spinaux conduisant à leur dégénérescence (Eisen et al., 2017). Cette hypothèse se base sur les travaux (détaillés dans le chapitre I, 6.5.) ayant mis en évidence une hyperexcitabilité de certains motoneurones (Delestrée et al., 2014; Leroy et al., 2014; Martínez-Silva et al., 2018), une augmentation des niveaux de glutamate dans le liquide céphalorachidien corrélée à l'intensité de l'atteinte spinale des patients (Spreux-Varoquaux et al., 2002), et la réduction des transporteurs astrocytaires de glutamate (Rothstein et al., 1995; Fray et al., 1998; Sasaki et al., 2000). L'ensemble de ces données suggèrent l'existence d'une excitotoxicité glutamatergique dans la moelle épinière des patients. Cette dernière pourrait provenir de l'hyperexcitabilité des neurones corticospinaux (Zhang et al., 2016a; Kim et al., 2017b; Khademullah et al., 2020) persistants dans un contexte d'hyperexcitabilité corticale.

## 2.2. Apport des récentes études précliniques du laboratoire

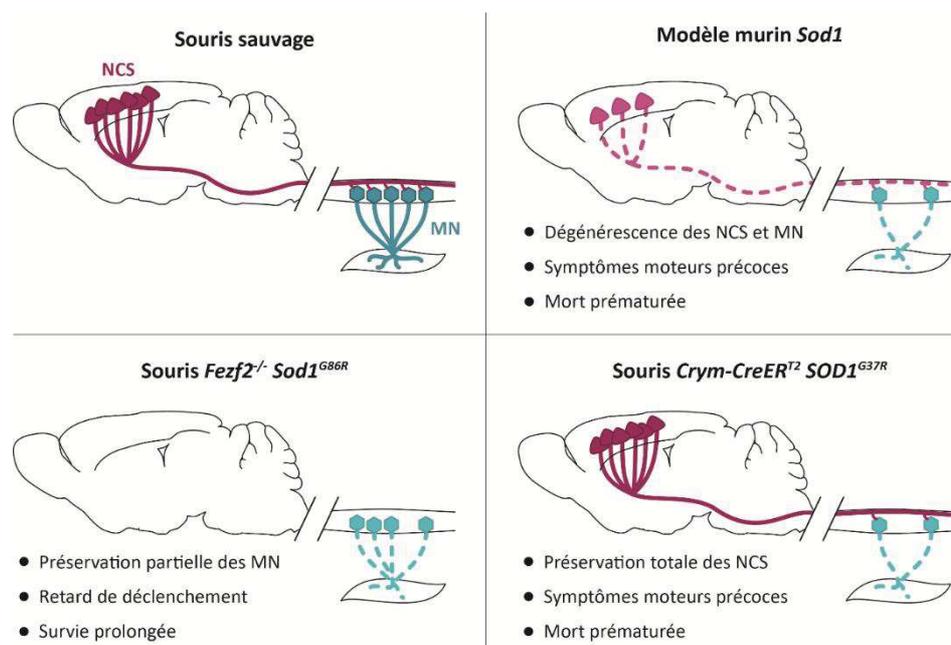
Afin de tester l'hypothèse de propagation corticofuge, au laboratoire, Thibaut Burg a étudié l'impact de l'absence de neurones corticospinaux chez des souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, modèle de SLA. Ses travaux suggèrent alors un rôle toxique des neurones corticaux à projection dans le déclenchement et la progression de la maladie. En croisant des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* avec des knock-

out du gène *Fezf2*, un facteur de transcription essentiel à la génération des neurones à projection subcérébrale dont font partie les neurones corticospinaux, il a développé un modèle murin qui surexprime de manière ubiquitaire un mutant du gène *Sod1* (condition suffisante pour induire un phénotype SLA) mais dépourvu de neurones corticospinaux. L'absence de neurones corticospinaux et autres neurones à projection subcérébrale se traduit par un retard de déclenchement des premiers symptômes, une réduction de la perte de poids et des altérations motrices, et une augmentation de la survie (Burg et al., 2020a). Ainsi, l'absence de neurones corticospinaux présentant une surexpression du transgène *Sod1<sup>G86R</sup>* pourrait être bénéfique, et leur présence au contraire néfaste pour leurs cibles et notamment les motoneurones (Burg et al., 2020a). Ces résultats supportent donc une propagation corticofuge de la maladie pour laquelle deux écoles de pensées s'opposent : la propagation 1) de type prion, par transmission de protéines mal repliées (Braak et al., 2013), ou 2) par une altération de l'excitabilité neuronale conduisant à une excitotoxicité glutamatergique altérant les cibles spinales (Vucic and Kiernan, 2017).

Une autre étude du laboratoire s'est justement penchée sur l'hypothèse d'une propagation de type prion dans le modèle murin *SOD1<sup>G37R</sup>*. Jelena Scekcic-Zahirovic et collaborateurs ont étudié les conséquences de l'ablation du transgène dans les neurones à projection subcérébrale de ce modèle. Cela a permis de montrer qu'une telle ablation permettait de maintenir la survie des neurones corticospinaux, sans sauver les motoneurones, retarder le déclenchement ou améliorer la survie. Ainsi, il semblerait que la toxicité des neurones corticospinaux ne passe pas par la transmission à leurs cibles d'agrégats SOD1 mutées, tel que cela pourrait l'être en cas de propagation de type prion (Scekcic-Zahirovic et al., 2021b). De plus, dans leurs études, Thibaut Burg et collaborateurs n'ont mis en évidence

aucune différence de densités d'agrégats, de type p62, chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* dépourvues de neurones à projection subcérébrale, comparativement aux souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (Burg et al., 2020a).

Ces deux études récentes réalisées au sein de notre laboratoire tendent à réfuter l'hypothèse d'une propagation corticofuge de type prion (Burg et al., 2020a; Scekic-Zahirovic et al., 2021b), suggérant plutôt l'implication d'une altération de l'excitabilité neuronale et de l'activité des neurones à projection subcérébrale, comprenant les neurones corticospinaux, dans l'altération de leurs cibles spinales. De telles altérations pourraient être le résultat d'un désordre d'excitabilité du cortex cérébral dans son ensemble (Eisen et al., 2017; Burg et al., 2020a; Scekic-Zahirovic et al., 2021b).

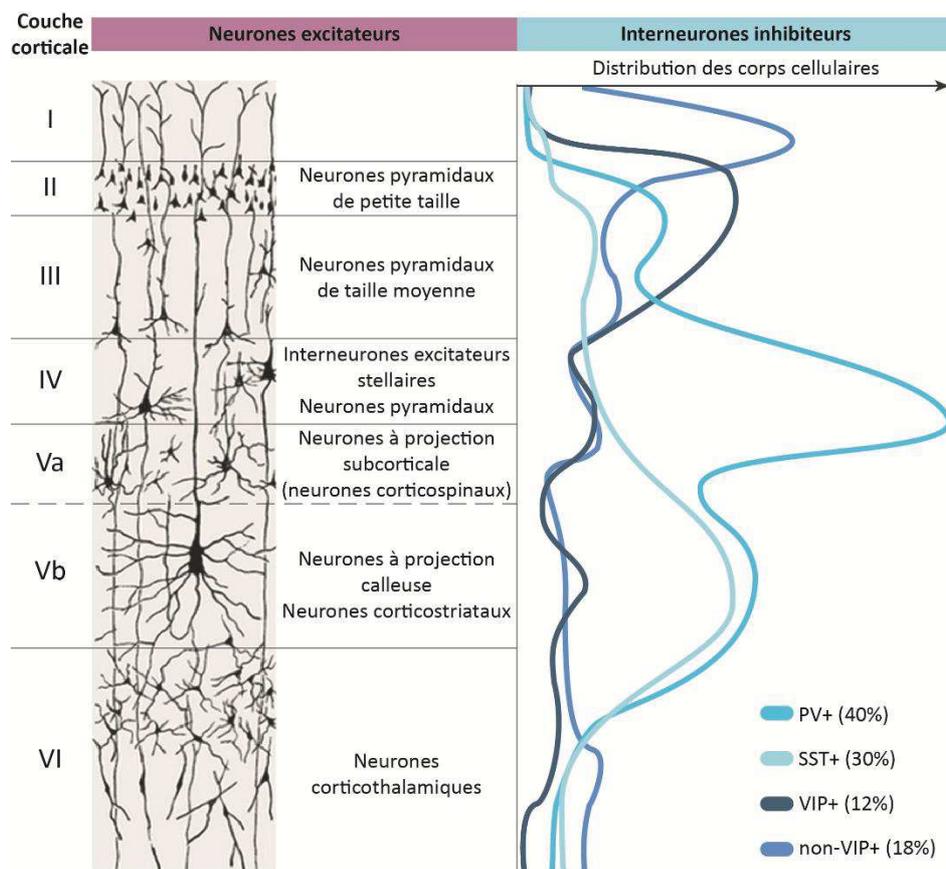


**Figure 19 : Démonstration de la contribution des neurones à projection corticofuge à la SLA.** Représentation du système nerveux central de souris et ses neurones corticospinaux (NCS)/neurones à projection corticofuge (NPC) et motoneurones spinaux (MN). Tandis que les souris sauvages présentent des NCS et MN (haut gauche), les modèles murins exprimant une forme mutée de *Sod1* présentent une dégénérescence de ces deux populations neuronales (haut droit). L'ablation génétique des NCS/NPC protège les MN, retarde le déclenchement de la maladie et augmente la survie des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (Burg et al., 2020b)(bas gauche). L'ablation génétique sélective du transgène *SOD1<sup>G37R</sup>* des NCS/NCP préserve les NCS sans améliorer la survie des MN ou la progression de la maladie (Scekic-Zahirovic et al., 2021b)(bas droit). (Adaptation de (Scekic-Zahirovic et al., 2021b))

### 3. Altérations de la circuiterie corticale dans la SLA

#### 3.1. Circuiterie corticale

Le cortex cérébral est composé d'une grande diversité de **neurones excitateurs** (80% des neurones corticaux chez la souris), **interneurones** (20% des neurones)(Figure 20) et de **cellules gliales** (astrocytes, microglie, oligodendrocytes) (Lodato and Arlotta, 2015; Astick and Vanderhaeghen, 2018) répartis en **6 couches corticales** numérotées de I (la plus superficielle) à VI (la plus profonde).



**Figure 20 : Distribution des populations de neurones excitateurs et interneurones inhibiteurs dans les différentes couches du cortex cérébral.**

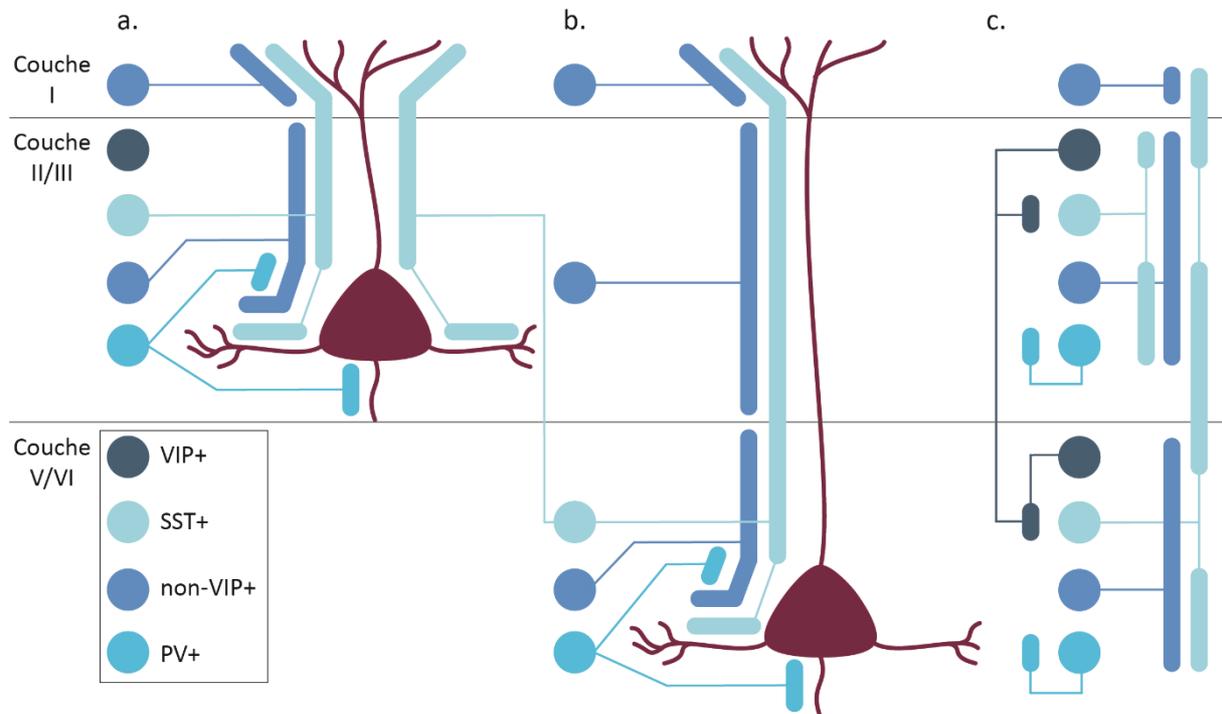
Le cortex cérébral est composé de 6 couches corticales numérotées de I à VI, de la plus superficielle à la plus profonde. 80% des neurones corticaux sont excitateurs (rose), et 20% des interneurones inhibiteurs (bleu). Les interneurones GABAergiques sont classiquement classés en 4 catégories dépendamment de marqueurs moléculaires : les parvalbumine (PV), somatostatine (SST), vasoactive intestinal peptide (VIP) et non-VIP positifs, représentant respectivement 40, 30, 12 et 18% des interneurones inhibiteurs corticaux. (Adaptation de (Tremblay et al., 2016))

Les neurones excitateurs, majoritairement pyramidaux, présentent une large dendrite apicale, plus ou moins longue, pouvant traverser plusieurs couches corticales. La couche VI contient les **neurones cortico-thalamiques** (Kandel et al., 2012; Purves et al., 2019)(Lefort et al., 2009), la V, des **neurones cortico-striataux**, **neurones à projection calleuse** et **neurones à projection subcorticale** qui comprennent les **neurones corticospinaux** (Kandel et al., 2012; Purves et al., 2019)(Rivara et al., 2003; Mitchell and Macklis, 2005; Lefort et al., 2009), la IV les **interneurones excitateurs de forme stellaire** (Lübke et al., 2000; Swadlow, 2003; Cowan and Stricker, 2004; Staiger et al., 2004; Zhuang et al., 2013) et les couches II/III contiennent des **neurones cortico-corticaux** dont des neurones à projection calleuse. La couche I, elle, est pauvre en cellules et contient principalement les dendrites apicales des neurones pyramidaux des couches II/III, V et VI (Lefort et al., 2009). (**Figure 20**)

Les interneurones GABAergiques sont classiquement regroupés en 3 catégories (Tremblay et al., 2016). Bien que la stratégie de classification des interneurones reste encore débattue, pouvant se baser sur leur morphologie, leurs marqueurs moléculaires ou encore leur profil électrophysiologique, la classification selon des marqueurs moléculaires reste la plus courante. On retrouve alors des **interneurones** positifs à la **parvalbumine (PV+)** (40%, couches II/III à VI), à la **somatostatine (SST+)** (30%, couches II/III à VI) ou au récepteur sérotoninergique 5HT<sub>3a</sub> dans lesquels on retrouve 2 sous-catégories : les interneurones positifs au **peptide vasoactif intestinal (VIP+)**(12%, couches II/III à VI) ou les interneurones **non-VIP+** (18%, couches I et II) (Xu et al., 2010; Rudy et al., 2011; Tremblay et al., 2016)(**Figure 20**).

En plus d'une grande diversité de morphologies, de marqueurs moléculaires et de profils électrophysiologiques, les interneurones inhibiteurs présentent une connectivité complexe

aussi bien avec les neurones excitateurs que les autres interneurons. Ces connexions interneurons-neurones excitateurs à projection et interneurone-interneurone sont schématisés en **Figure 21**.



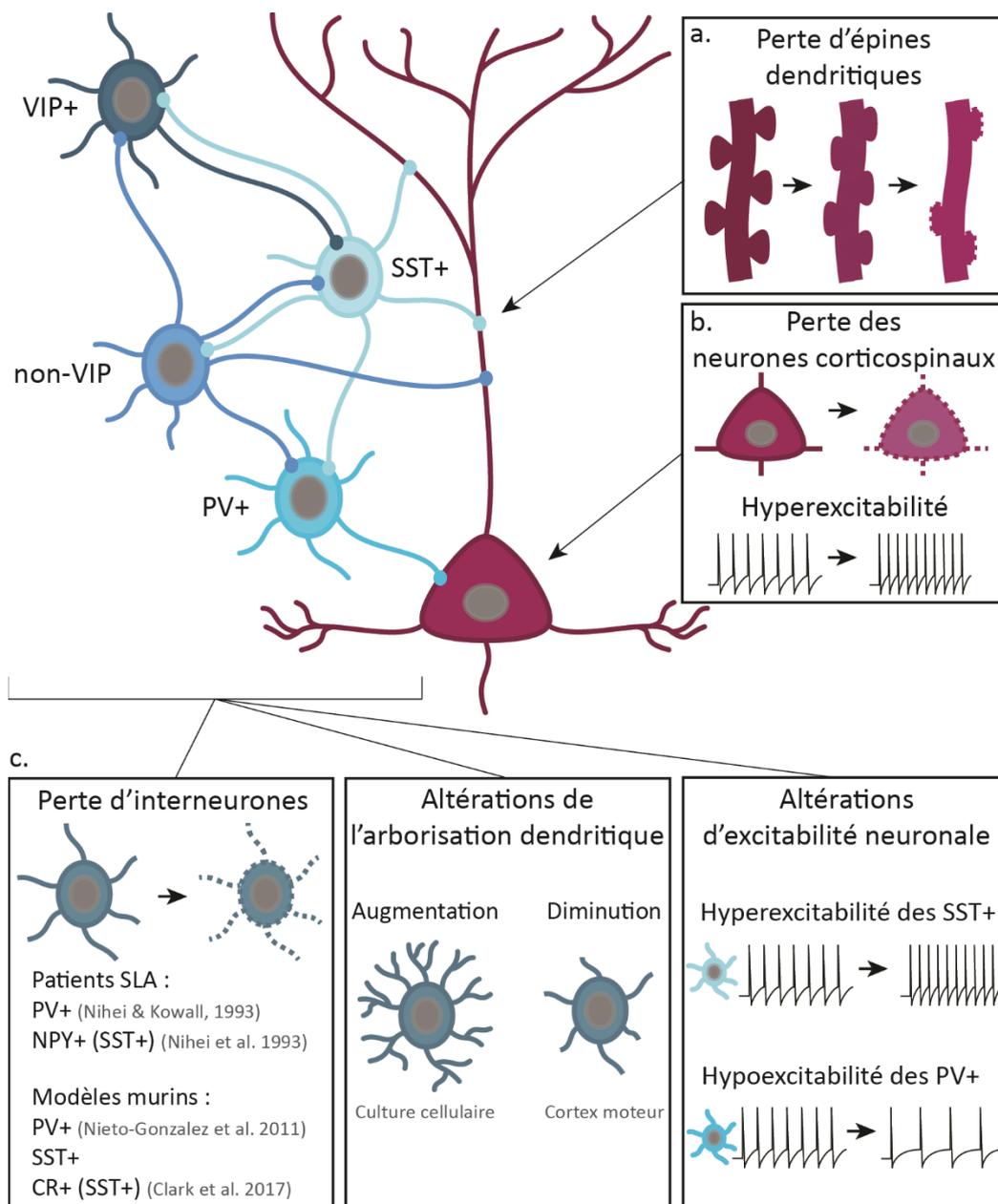
**Figure 21 : Connectivité cellule-spécifique interneurone-neurone pyramidal et interneurone-interneurone dans le cortex cérébral.**

Représentation des principales connexions des différents sous-types d'interneurons inhibiteurs (bleu) sur les neurones pyramidaux excitateurs (rose) des couches II/III (a) et V/VI (b), et entre interneurons (c). (Adaptation de (Tremblay et al., 2016))

### 3.2. Pertes de neurones corticaux

La perte caractéristique de neurones corticospinaux, et plus particulièrement de cellules de Betz (sous-population de neurones corticospinaux, facilement reconnaissables par leur grand corps cellulaire (Rivara et al., 2003)), chez les patients SLA a été premièrement décrite par Charcot en 1869. Des études histopathologiques sur tissus post-mortem de patients ont mis en évidence la perte de **50 à 60%** des cellules de Betz (Hammer et al., 1979; Murayama et

al., 1992; Nihei et al., 1993; Tsuchiya et al., 2002)(Figure 22), une évaluation qui pourrait être très largement sous-estimée du fait d'un manque de marqueur spécifique de l'ensemble des neurones corticospinaux (Marques et al., 2021). Les cellules de Betz persistantes présentent une **réduction de leur arborisation dendritique** et de la **densité d'épines dendritiques** et des inclusions cytoplasmiques (TDP-43+ voire SOD1 ou FUS+ ; ubiquitine et neurofilaments phosphorylés) (Hammer et al., 1979; Murayama et al., 1992; Nihei et al., 1993; Tsuchiya et al., 2002; Brettschneider et al., 2013; Ling et al., 2013)(Figure 22).



**Figure 22 : Les altérations de densité, morphologie et excitabilité des neurones corticospinaux et interneurons inhibiteurs GABAergiques dans la SLA. (ci-contre)**

Dans la SLA, les neurones corticospinaux présentent une perte d'épines dendritiques (a), une réduction de leur densité et une hyperexcitabilité neuronale (b). Les études sur les interneurons GABAergiques montrent une perte neuronale de certains sous-populations, une altération de l'arborisation dendritique et d'excitabilité neuronale (c).

Notre laboratoire a pu mettre en évidence cette perte des neurones corticospinaux et de leurs axones chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* dès 75 jours, débutant dans la partie la plus caudale du cortex moteur et de façon somatotopique (Marques et al., 2021). Initialement démontrée chez les souris *SOD1<sup>G93A G1H</sup>* (Zang and Cheema, 2002), cette perte fut également retrouvée dans les modèles *SOD1<sup>G93A</sup>* (Ozdinler et al., 2011), *SOD1<sup>G37R</sup>* floxées (Scekic-Zahirovic et al., 2021b) ou encore *TDP-43<sup>A315T</sup>* (Handley et al., 2017) (Gunes et al., 2020; Marques et al., 2021).

Les résultats concernant la densité des populations d'interneurones inhibiteurs GABAergiques sont assez contradictoires, aussi bien chez les patients que dans les différents modèles de SLA. Se basant sur les marqueurs moléculaires, d'interneurones, certaines études ont pu mettre en avant des pertes neuronales. En effet, des études de Nihei et collaborateurs sur des tissus de patients SLA ont pu montrer une perte significative d'interneurones **PV+** dans le cortex moteur (Nihei et al., 1993). Dans le cortex frontal, ils ont également pu montrer une perte d'interneurones positifs au **neuropeptide Y** (NPY)(sous-catégorie d'interneurones SST+)(Nihei and Kowall, 1993).

Plus nombreuses, les données dans les modèles murins de SLA montrent des variations de densité des différentes populations d'interneurones, dépendamment de leur type, du stade de la maladie mais aussi du modèle d'étude : une perte pré-symptomatique d'interneurones **PV+** et **SST+** (souris Wobbler, modèle de SLA spontanée)(Nieto-Gonzalez et

al., 2011), une perte symptomatique des interneurons positifs à la **calrétinine** (CR) (sous-catégorie d'interneurones SST+ et non-VIP+)(Chung et al., 2005; Clark et al., 2017) et un maintien des VIP+(Ozdinler et al., 2011; Clark et al., 2017)(souris *SOD1<sup>G93A</sup>*)(**Figure 22**).

Tandis que la mise en culture d'interneurones GABAergiques issus de souris *SOD1<sup>G93A</sup>* montre une **altération de leur arborisation dendritique** dans le sens d'une augmentation, ceux issus du cortex moteur de ce même modèle présentent une réduction de cette dernière et cela dès le stade symptomatique (Clark et al., 2017, 2018)(**Figure 22**).

### 3.3. Altérations de l'excitabilité des neurones corticaux

Dans l'hypothèse d'une propagation de type prion, comme dans celle associant l'hyperexcitabilité corticale à une excitotoxicité glutamatergique sur les cibles des neurones corticospinaux, ces deux mécanismes placent les neurones corticospinaux au centre de la pathologie SLA et de sa propagation.

Les neurones corticospinaux projettent leur axone le long du tractus corticospinal jusqu'à la moelle épinière. Dans la moelle, les projections de ces neurones rentrent en contact direct avec les motoneurons, ou bien avec des interneurons (Olivares-Moreno et al., 2017). Comme détaillé en 1.3., il a été mis en évidence une corrélation entre la proportion de neurones corticospinaux innervant les motoneurons de façon directe, et le niveau d'altération des muscles innervés par ces derniers (Eisen et al., 2017), supportant un potentiel rôle pathogénique des neurones corticospinaux.

Dans le cortex moteur, l'activité des neurones corticospinaux, localisés dans la couche Vb, est sous le contrôle de différentes populations d'interneurones, et notamment des interneurons PV+ (Tremblay et al., 2016; Gunes et al., 2020). L'excitabilité des neurones

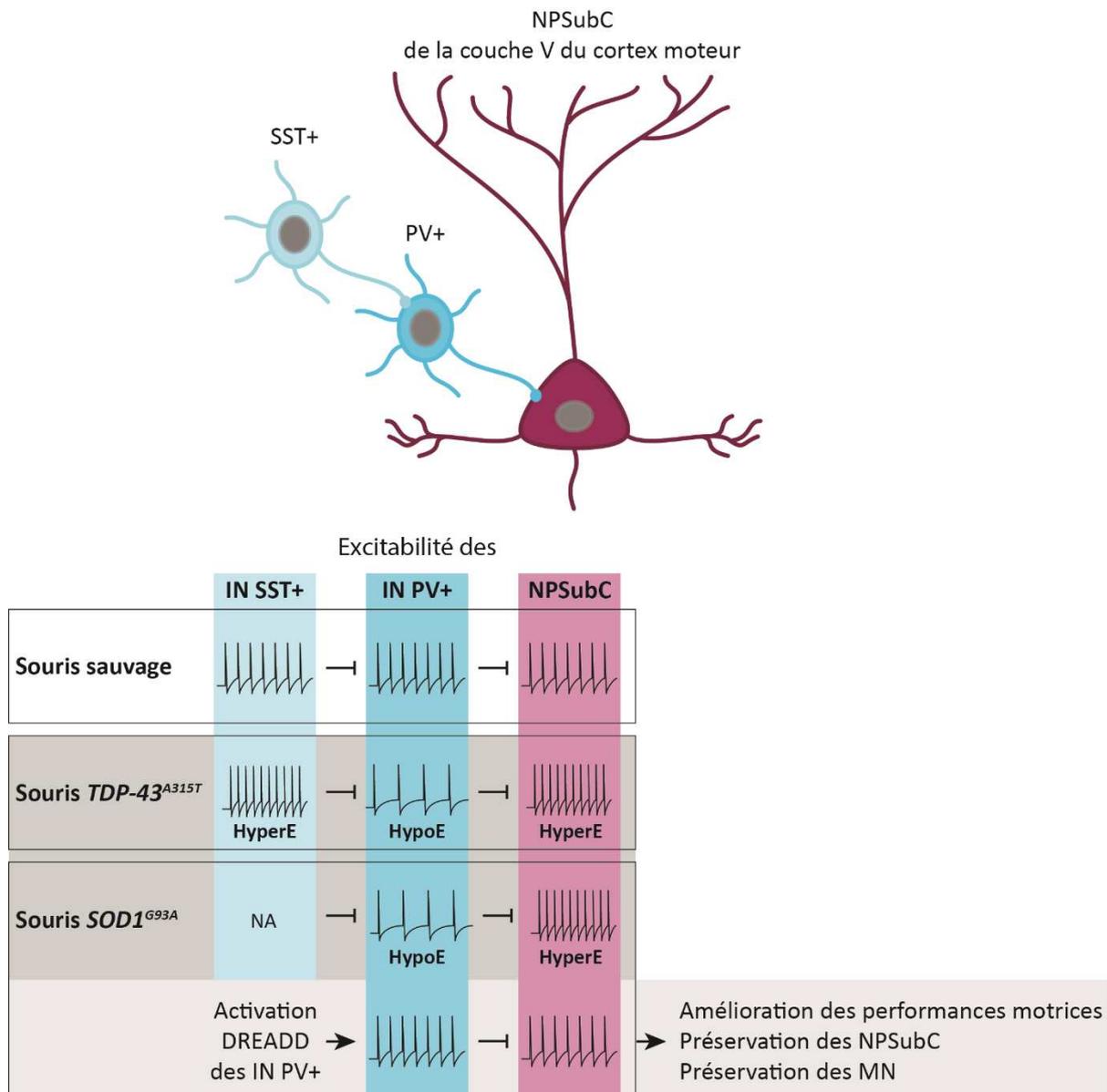
corticospinaux, mais aussi celle de populations d'interneurones a été montré comme altérée dans différents modèles de SLA. On retrouve notamment une **hyperexcitabilité des neurones pyramidaux à projection des couches V** (Pieri et al., 2009; Fogarty et al., 2016; Saba et al., 2016a; Zhang et al., 2016a; Kim et al., 2017b; Khademullah et al., 2020)(**Figure 22**). Les **interneurones PV+** ont été identifiés comme **hypoactifs** (Zhang et al., 2016a; Khademullah et al., 2020), et les **SST+**, principaux interneurones corticaux après les PV+, présentent, eux, une **hyperexcitabilité** (Zhang et al., 2016a)(Khademullah et al., 2020)(**Figure 22**). Ainsi, non seulement les neurones corticospinaux, potentiellement impliqués dans la pathogénicité de la SLA, présentent une hyperexcitabilité, mais les interneurones, en charge de réguler leur activité, présentent eux aussi des altérations d'excitabilité.

Dans leur très récente étude, Khademullah et collaborateurs mettent en évidence l'hyperexcitabilité des neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur et l'hypoactivité des interneurones PV+ dans le modèle murin *SOD1<sup>G93A</sup>* (Khademullah et al., 2020). Les auteurs montrent que l'activation des interneurones PV+, et l'augmentation de leur activité de décharge, est associée à une baisse de l'excitabilité des neurones corticospinaux retournant au niveau des contrôles (Khademullah et al., 2020). L'induction de l'activation chronique des interneurones PV+ chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* par DREADD a montré une amélioration significative de la performance motrice sur différents tests moteurs. Chez ces souris, les neurones pyramidaux de la couche V, mais aussi les motoneurones spinaux, sont alors préservés (Khademullah et al., 2020)(**Figure 23**). Ainsi, cette étude a permis de mettre en lumière un lien entre le rétablissement de l'excitabilité de neurones corticaux, notamment

celle des neurones corticospinaux, et l'amélioration des performances motrices dans un modèle murin de SLA.

L'étude de Zhang et collaborateurs a mis en évidence un lien entre l'hyperexcitabilité des interneurons SST+, et l'hypoactivité des PV+ dans le modèle murin *TDP-43<sup>A315T</sup>* (Zhang et al., 2016a). Dans leur étude, les auteurs retrouvent l'hyperexcitabilité des neurones pyramidaux de la couche V et l'hypoactivité des interneurons PV+. Mais ils montrent également une hyperexcitabilité des interneurons SST+, et que cette dernière est associée à l'hyperexcitabilité des neurones pyramidaux via l'inhibition des interneurons PV+ (Zhang et al., 2016a)(**Figure 23**), démontrant la mise en place d'une réaction en chaîne induite par l'altération d'excitabilité d'une sous-population de neurones corticaux.

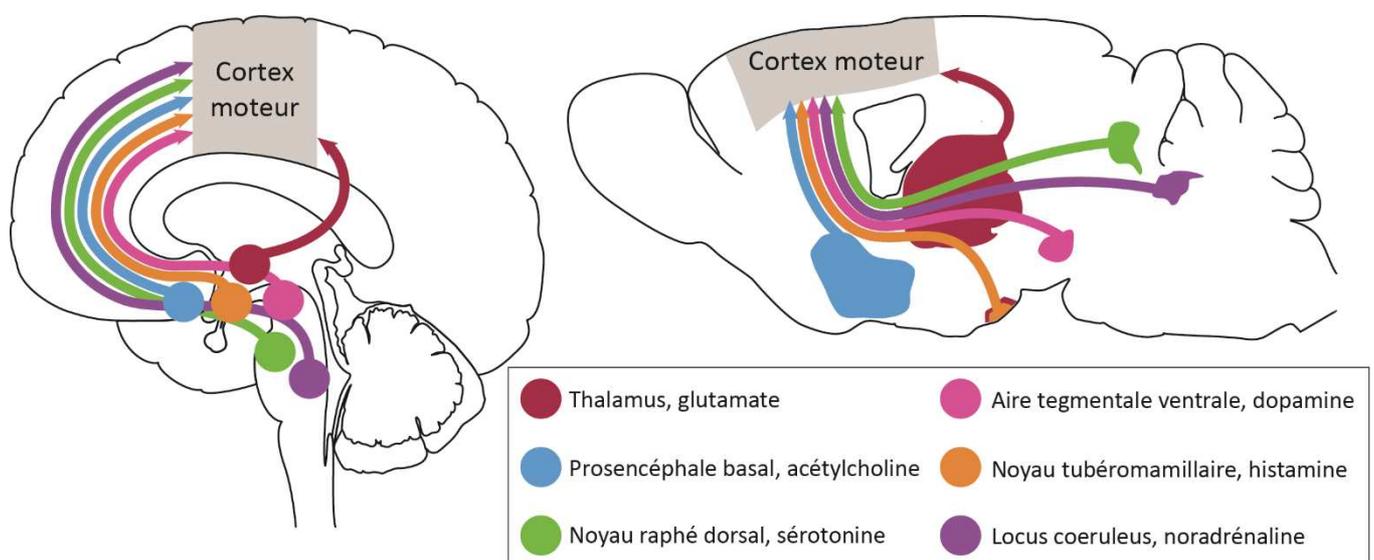
Ces travaux montrent donc les **conséquences directes et indirectes des altérations d'excitabilité neuronale sur l'activité des neurones corticospinaux** (Zhang et al., 2016a; Khademullah et al., 2020), **leur dégénérescence, celle des motoneurons et les atteintes motrices en résultant** (Khademullah et al., 2020). Ces données montrent également le possible lien entre ces altérations d'activité neuronale, et l'hyperexcitabilité corticale (Khademullah et al., 2020), elle aussi corrélée à l'évolution clinique des patients (Dharmadasa et al., 2020).



**Figure 23 : Altérations de l’excitabilité des neurones corticaux dans des modèles murins de SMA et bénéfiques de leur rétablissement.**

En conditions physiologiques, chez des souris sauvages, les interneurons somatostatines-positifs (IN SST+) régulent l’excitabilité des interneurons parvalbumine-positifs (IN PV+) qui, à leur tour, régulent celle des neurones à projection subcérébrale (NPSubC) de la couche V du cortex moteur. Dans le modèle murin de SMA *TDP-43<sup>A315T</sup>*, les IN SST+ présentent une hyperexcitabilité (HyperE) responsable de l’hypoexcitabilité (HypoE) des IN PV+ et consécutivement de l’hyperexcitabilité des NPSubC (Zhang et al., 2016a). Dans le modèle murin de SMA *SOD1<sup>G93A</sup>*, l’hypoexcitabilité des IN PV+ conduit, là aussi, à l’hyperexcitabilité des NPSubC, et l’activation chronique des IN PV+ par DREADD permet le rétablissement de l’excitabilité des NPSubC, leur préservation, celle des motoneurons spinaux (MN) et l’amélioration des performances motrices des animaux (Khademullah et al., 2020). (ci-contre)

Bien que ces études permettent de faire avancer les connaissances concernant l'excitabilité des neurones corticaux dans un contexte de SLA, et comment ces dernières sont associées à la symptomatologie motrice, **les mécanismes sous-tendant l'hyperexcitabilité corticale, pouvant expliquer ces altérations d'excitabilité neuronale, restent à déterminer.** La compréhension des mécanismes et systèmes potentiellement altérés dans le cortex cérébral, mais aussi dans les régions y projetant (schématisées en **Figure 24**), pourrait ainsi permettre le **développement de nouvelles approches thérapeutiques basées sur le rétablissement de l'excitabilité corticale.** Dans le chapitre suivant, nous aborderons l'un des systèmes projetant et agissant sur le cortex cérébral : le système noradrénergique. Enfin, dans la dernière partie de cette introduction, vous retrouver notre revue abordant le potentiel rôle du dysfonctionnement des circuits corticaux dans la SLA (Brunet et al., 2020).



**Figure 24 : Principales afférences du cortex moteur chez l'humain et la souris.**

Représentation schématique et principales afférences du cortex moteur chez l'Homme (gauche) et la souris (droite). Le cortex moteur reçoit des projections glutamatergiques du thalamus (rouge), cholinergiques du prosencéphale basal (bleu), sérotoninergiques du noyau raphé dorsal (vert), dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (rose), histaminergiques du noyau tubéromamillaire (orange) et noradrénergiques du locus coeruleus (violet).

## Chapitre III : Système noradrénergique et Cortex cérébral

Dans les années 1940, le physiologiste suédois **Ulf von Euler** identifie pour la première fois un neurotransmetteur du système nerveux central : la **noradrénaline** (Von Euler, 1946; Schwarz and Luo, 2015). La noradrénaline est issue de la tyrosine, convertie en L-DOPA par la **tyrosine hydroxylase** (TH) puis dopamine par la DOPA. La dopamine est ensuite vésiculée et transformée en noradrénaline par l'action de l'enzyme **Dopamine  $\beta$ -hydroxylase** (DBH) (Zhou, 2004)(Nestler et al., 2015).

La noradrénaline est présente dans le système nerveux central et périphérique mais est aussi produite en dehors du système nerveux, par **les cellules chromaffines de la glande surrénale** (Bondarenko et al., 2017). Nous nous concentrerons ici sur l'implication du système noradrénergique dans le fonctionnement du système nerveux, et plus particulièrement dans le cortex cérébral.

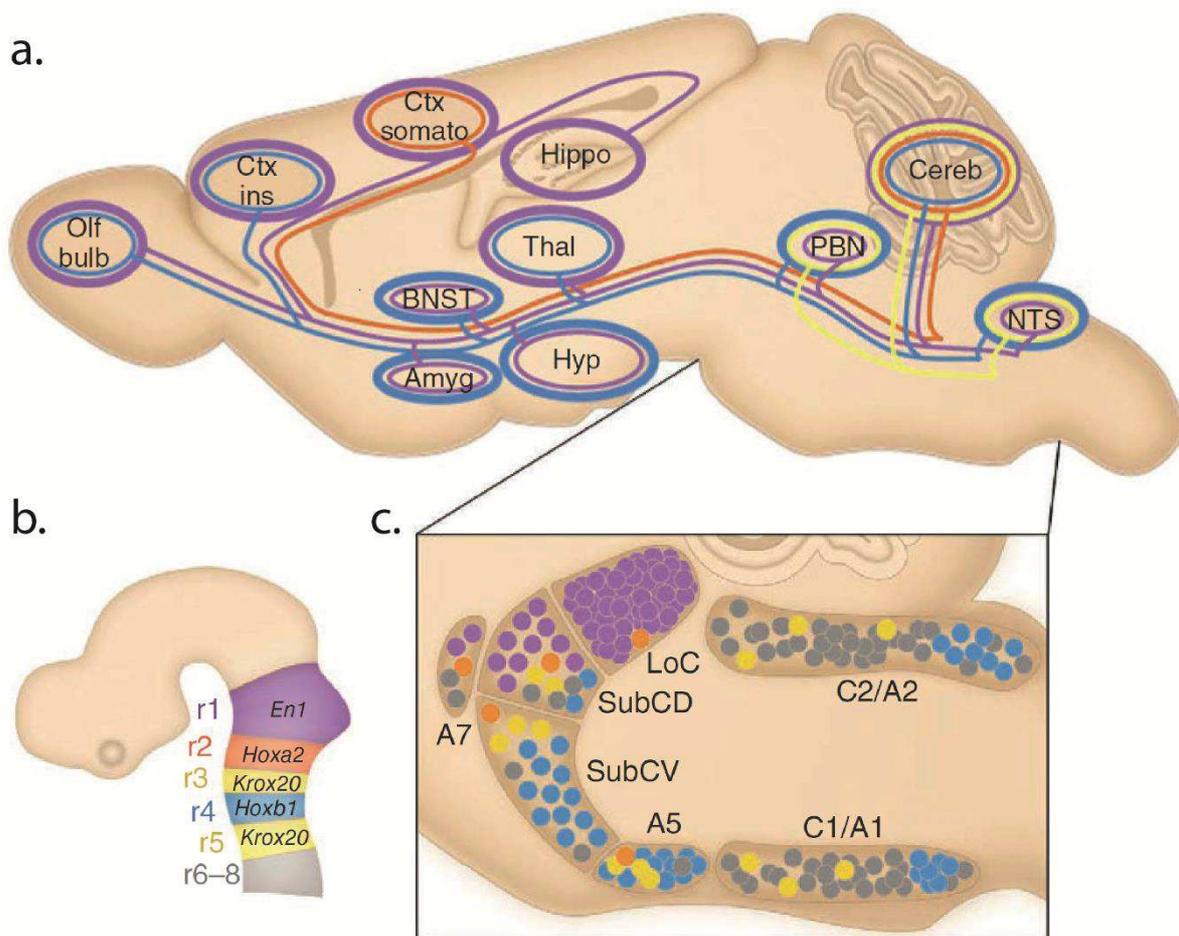
### 1. Les noyaux noradrénergiques

Dans le système nerveux adulte, les neurones noradrénergiques sont retrouvés dans différents noyaux du tronc cérébral. Au nombre de 6, ces noyaux sont nommés : **A1, A2, A5, A7, le locus coeruleus et le subcoeruleus**. Etant très proche les uns des autres, il est parfois difficile de les distinguer. C'est pourquoi, la subdivision par critères moléculaires, et non anatomiques, peut être utilisée.

Durant le neurodéveloppement et la segmentation du rhombencéphale, ce dernier est subdivisé en **rhombomères** d'expressions géniques différentes : r1, r2, r3, r4, r5, r6-8. Les neurones issus de chaque rhombomère expriment alors différents sets de gènes pouvant

permettre de les distinguer (**Figure 25**). Les neurones du locus coeruleus, par exemple, sont issus du r1 et expriment notamment *En1* (Lumsden and Krumlauf, 1996; Aroca et al., 2006).

En 2013, Robertson et collaborateurs réalisent une cartographie des neurones noradrénergique centraux en fonction de leur rhombomère d'origine. Ils s'intéressent également aux projections de ces différentes cellules et montrent une connectivité très étendue des noyaux noradrénergiques représentée en **figure 25** (Robertson et al., 2013).



**Figure 25 : Origine, localisation et sites de projections des noyaux noradrénergiques chez la souris.**

Les projections noradrénergiques depuis le tronc cérébral innervent de nombreuses structures cérébrales (a). Les noyaux noradrénergiques sont issus de la segmentation du rhombencéphale en rhombomères (r1, r2, r3, r4, r5, r6-8) possédant différents marqueurs génétiques (b). Les noyaux noradrénergiques sont au nombre de 6 : A1 (C1/A1), A2 (C2/A2), A5, A7, le locus coeruleus (LoC) et le subcoeruleus dorsal (SubCD) et ventral (SubCV) (c). (Adaptation de (Robertson et al., 2013))

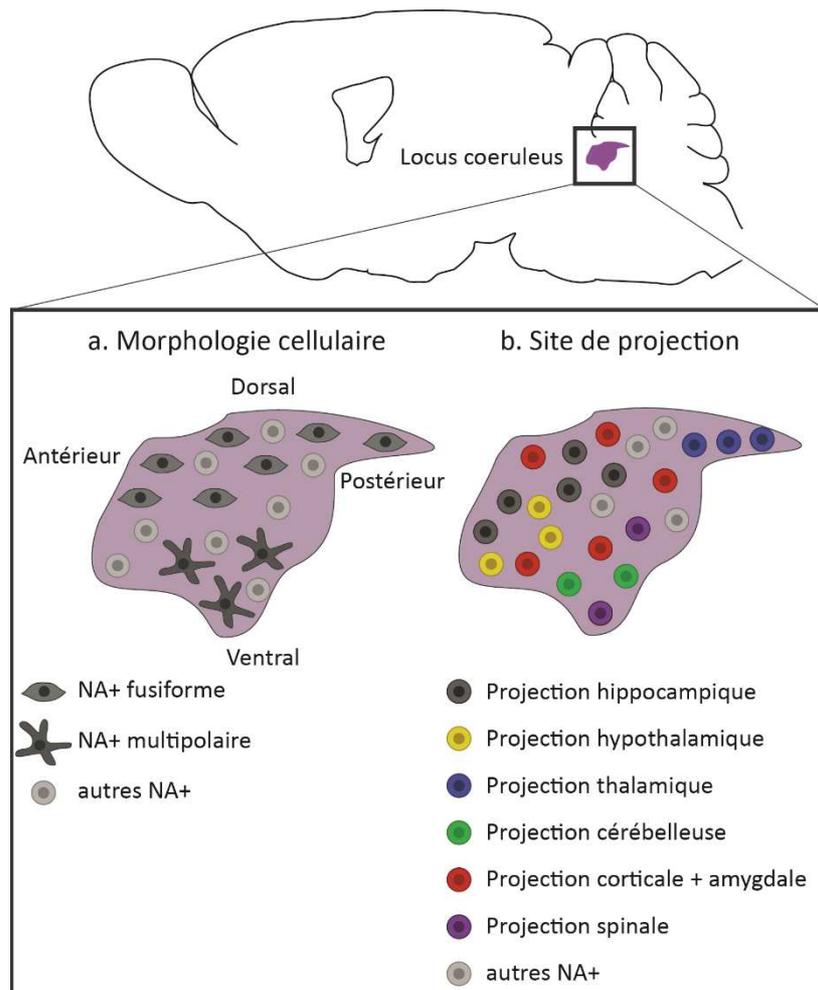
## 2. Le locus coeruleus

Le **locus coeruleus**, signifiant « tâche bleue » en latin, est décrit pour la première fois en 1786 par le médecin et anatomiste français **Félix Vicq d'Azyr**. Cette structure localisée dans le tronc cérébral, légèrement en avant du cervelet est retrouvée de part et d'autre de la ligne médiane. **Très denses**, chaque locus est composé d'**environ 1600 cellules**, toutes noradrénergiques. C'est dans les années 60 que Dahlström et Fuxe l'identifient comme **source principale de noradrénaline dans le cerveau** (Dahlstroem and Fuxe, 1964; Robertson et al., 2013; Schwarz and Luo, 2015).

### 2.1. Composition cellulaire

Bien que l'ensemble des cellules du locus coeruleus soient noradrénergiques, une hétérogénéité de forme a été mise en évidence. En effet, on retrouve 2 morphologies principales : des grandes **cellules multipolaires** d'environ 35  $\mu\text{m}$ , et de petites **cellules fusiformes** d'environ 20 $\mu\text{m}$ . Tandis que les multipolaires sont retrouvées dans la zone ventrale du locus, les fusiformes sont, elles, localisées dans sa partie dorsale (Swanson, 1976; Grzanna and Molliver, 1980) (**Figure 26**).

Le locus coeruleus présente une organisation topographique avec des sous-populations de neurones innervant certaines zones spécifiques. Dans la zone dorsale du locus, on retrouve les neurones projetant vers le prosencéphale avec notamment l'hippocampe. Ceux innervant le cervelet et la moelle épinière sont en partie ventrale, l'hypothalamus en antérieur et le thalamus en postérieur. Les neurones noradrénergiques projetant vers le cortex cérébral et l'amygdale sont, eux, retrouvés dans l'ensemble de la structure (Mason and Fibiger, 1979; Loughlin et al., 1986; Schwarz and Luo, 2015; Schwarz et al., 2015) (**Figure 26**).

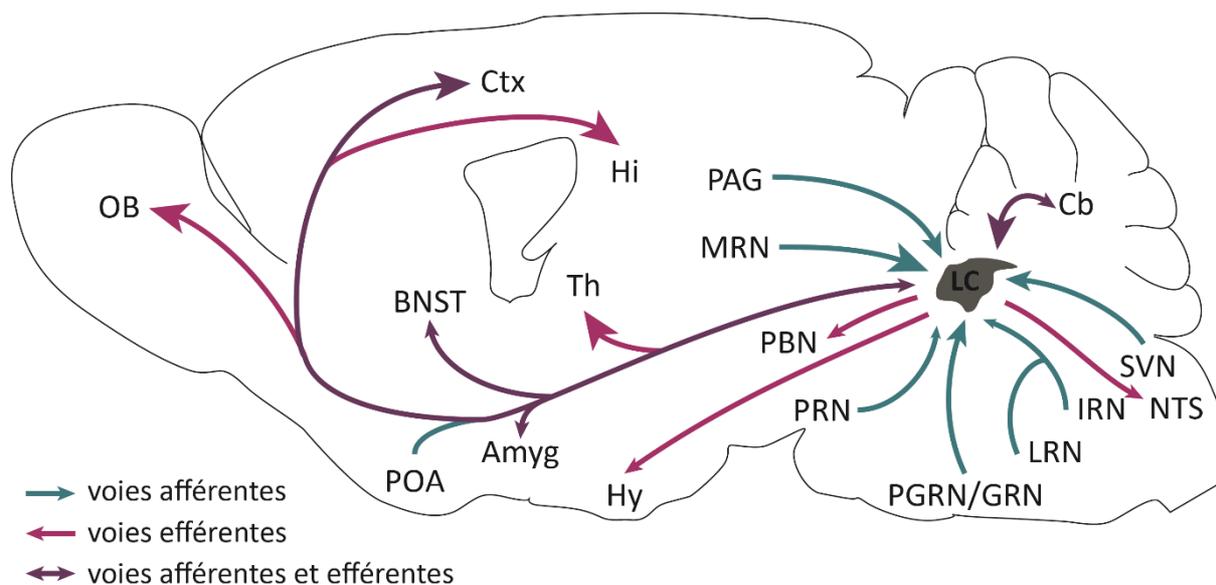


**Figure 26 : Hétérogénéité de morphologie, composition moléculaire et de projection des neurones noradrénergiques du locus coeruleus.**

Les neurones noradrénergiques (NA+) existent sous différentes morphologies dont des fusiformes dans la partie dorsale, et des multipolaires dans la partie ventrale du locus coeruleus (a). Ces neurones se distinguent aussi par leur site de projection (b). Ceux projetant vers le cortex cérébral et l'amygdale sont présents dans l'ensemble du locus coeruleus. Ceux projetant vers l'hippocampe, le cervelet et la moelle épinière sont répartis de la partie dorsale à la ventrale. Enfin, ceux innervant l'hypothalamus et le thalamus sont répartis de la partie antérieure à la postérieure. (Adaptation de (Schwarz and Luo, 2015))

## 2.2. Afférences et Efférences

La connectivité du locus coeruleus est vaste, le plaçant en position de réguler de nombreux processus sensoriels, moteurs ou encore cognitifs. Les afférences (Schwarz and Luo, 2015; Schwarz et al., 2015) et efférences (Aston-Jones, 2005; Robertson et al., 2013; Waterhouse and Chandler, 2016) du locus coeruleus sont schématisées en **figure 27**.



**Figure 27 : Afférences et efférences du locus coeruleus.**

Le locus coeruleus (LC) reçoit des afférences du cervelet (Cb), noyau réticulaire mésencéphalique (MRN), de la substance grise périaqueducale (PAG), des noyaux paragiganto- et gigantocellulaires (PGRN/GRN), du noyau vestibulaire spinal (SVN), des noyaux réticulaire latéraux, intermédiaires et pontiques (LRN, IRN et PRN), de l'amygdale (Amyg), de l'aire préoptique (POA), du noyau du lit de la strie terminale (BNST) et du cortex cérébral (Ctx). En retour, le LC envoie des projections vers le cervelet, le noyau du tractus solitaire (NTS), le noyau parabrachial (PBN) l'hypothalamus (Hy), le thalamus (Th), l'amygdale, le BNST, les bulbes olfactifs (OB), l'hippocampe (Hi) et le cortex cérébral. L'intensité des projections est représentée par la taille de la tête de flèche, les afférences sont en bleu, efférences en rose et les voies afférentes et efférentes en violet. (Adaptation de (Robertson et al., 2013; Schwarz and Luo, 2015; Schwarz et al., 2015))

### 3. Le système noradrénergique dans le cortex cérébral

#### 3.1. Projections noradrénergiques corticales

Le cortex cérébral reçoit des projections du **locus coeruleus** mais aussi de quelques neurones localisés dans les autres noyaux noradrénergiques issus des rhombomères **r2** et **r4** (**Figure 25**).

En 2014, Waterhouse et collaborateurs s'intéressent aux **innervations noradrénergiques corticales** et mettent en évidence une forte ségrégation de ces dernières. En effet, bien qu'une très faible portion des neurones du locus coeruleus innervent plusieurs

cibles corticales simultanément (cortex moteur primaire et préfrontal par exemple), la majorité des neurones noradrénergiques projettent vers une zone spécifique du cortex cérébral (Chandler et al., 2014). En plus de ces spécificités de projections, les neurones du locus projetant vers différentes régions corticales présentent des profils électrophysiologiques distincts avec, par exemple, une excitabilité plus importante des neurones noradrénergiques innervant le cortex préfrontal que ceux projetant vers le cortex moteur primaire (Chandler et al., 2014). Ces données suggèrent donc une **modulation noradrénergique variable des différentes aires corticales**, et cela via des populations distinctes de neurones.

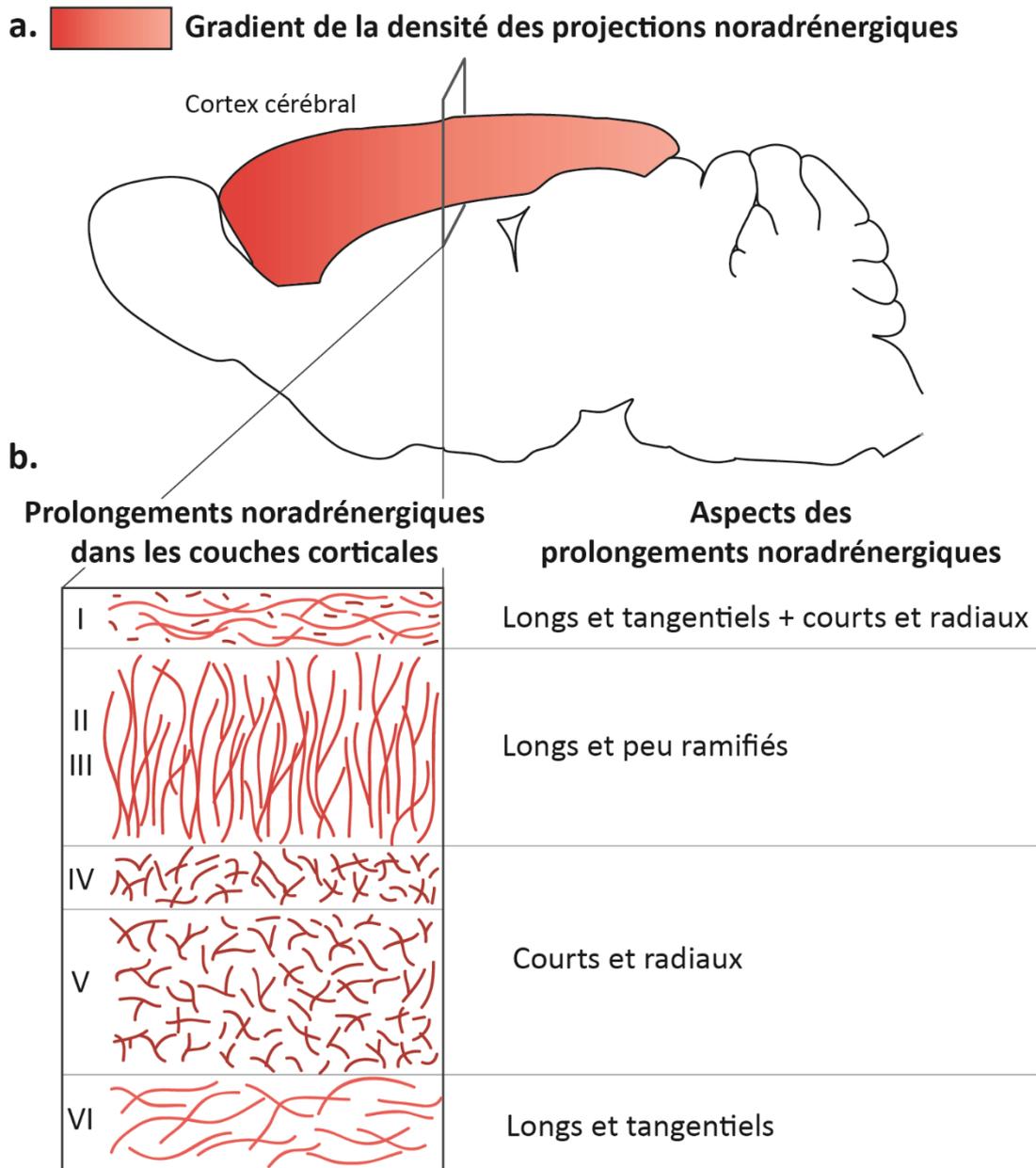
### 3.1.1. Distribution dans les aires corticales

Des études par autoradiographie ou immunofluorescence DBH ont montré la présence de **projections noradrénergiques dans l'ensemble du cortex cérébral** (Fuxe and Ungerstedt, 1968; Jones and Moore, 1977; Jones et al., 1977; Audet et al., 1988). Des études ont mis en avant que certaines régions corticales, comme le cortex visuel, reçoivent moins de projections que d'autres, telles que le cortex moteur ou somatosensoriel (Morrison and Foote, 1986), ou encore que, dans les lobes pariétaux, la distribution des projections noradrénergiques décroît selon l'axe rostro-caudal (Morrison et al., 1982). Plus récemment, il a été mis en évidence une densité décroissante des varicosités noradrénergiques du cortex frontal, au moteur, et enfin sensoriel suggérant, une nouvelle fois, une implication variable du système noradrénergique dans les différentes régions du cortex cérébral (Agster et al., 2013). Ces différences de densité d'innervations noradrénergiques sont associées à des variations de niveaux de noradrénaline. Il a, par exemple, été mis en évidence une plus grande concentration de ce neuromodulateur

dans le cortex préfrontal que le moteur (Bellesi et al., 2016). L'ensemble de ces données semblent donc suggérer une présence plus marquée du système noradrénergique dans les zones rostrales que dans les zones caudales du cortex cérébral (**Figure 28a**).

### 3.1.2. Distribution dans les couches corticales

Suivant une section coronale du cortex, les **fibres noradrénergiques** apparaissent  **fines et variqueuses** pouvant, dans certaines zones, faire de **1 à 2mm de long** et, dans d'autres, être plus **courtes et denses** (Morrison et al., 1982). De façon générale, la **couche I** présente des **fibres radiales** ainsi que de **longues fibres** tangentielles. Les **couches II/III** sont caractérisées par des **fibres longues et peu ramifiées**, suivant l'axe dorsol-ventral. Dans les couches plus profondes comme les **couches IV et V**, se trouvent de **denses fibres courtes et radiales**. Enfin, dans la **couche VI**, les **longues fibres** suivent l'axe rostro-caudal, et sont de faible arborisation (Morrison et al., 1982)(**Figure 28b**). Cette organisation des terminaisons nerveuses pourrait suggérer une transmission synaptique noradrénergique plus importantes dans les couches corticales profondes que les superficielles. Pourtant l'étude de la densité des varicosités noradrénergiques ont mis en évidence une densité plus importante de ces dernières dans les couches superficielles que dans les profondes (Agster et al., 2013), suggérant ainsi des mécanismes d'actions variables entre les couches comme les aires corticales. Ainsi, la dynamique de modulation noradrénergique varierait avec d'un côté une **transmission synaptique** plus importante dans les couches corticales profondes, et une **transmission non-synaptiques, via des varicosités**, de façon prédominante dans les couches superficielles (Agster et al., 2013).



**Figure 28 : Organisation des prolongements noradrénergiques dans le cortex cérébral de souris.**

**a.** Il existerait un gradient rostrocaudal de densité des projections noradrénergiques corticales avec une densité plus importante dans les régions rostrales que caudales. **b.** L'organisation et l'aspect des prolongements noradrénergiques varient dans les différentes couches corticales du cortex cérébral avec en couche I des prolongements longs et tangentiels ainsi que des courts et radiaux ; couches II/III des longs et peu ramifiés ; couches IV et V des courts et radiaux ; et couche VI des longs et tangentiels.

La densité de ces innervations noradrénergiques varie donc de façon couche spécifique et cela dépendamment de l'aire corticale (**Figure 28**). Chez le primate, il a été mis en évidence une plus forte densité de fibres dans les couches III, V et VI du cortex visuel, les couches médianes du cortex somatosensoriel primaire, la partie superficielle de la couche I dans le cortex préfrontal et de façon homogène dans le cortex entorhinal (Lewis et al., 1987). Mais, comme cela fut suggéré par Morrison et collaborateurs en 1982, la complexité des innervations noradrénergiques est plus importante chez les primates que les rongeurs, suivant ainsi une cytoarchitecture plus élaborée et associée à des fonctions plus hétérogènes chez les primates (Morrison et al., 1982).

### 3.2. Récepteurs adrénérgiques

La noradrénaline peut agir sur 3 types de récepteurs, dits adrénérgiques, tous présents dans le cortex cérébral (Diop et al., 1987) au niveau des **neurones pyramidaux glutamatergiques** (Ji et al., 2008; Santana et al., 2013), des **interneurones GABAergiques** (Scheinin et al., 1994; Aoki et al., 1998; Liu et al., 2014) et des **cellules gliales** (Aoki et al., 1998; Bekar et al., 2008; Gupta et al., 2009; Hertz et al., 2010; Ding et al., 2013). Tous métabotropiques et couplés à une protéine G, les récepteurs  **$\alpha_1$  et  $\beta$  sont excitateurs** (couplés à des protéines  $G_{q/11}$  et  $G_s$  respectivement), et les  **$\alpha_2$  inhibiteurs** (couplés à une protéine  $G_{i/o}$ ).

- Les récepteurs  $\alpha_1$  sont au nombre de 3 :  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  et  $\alpha_{1D}$ . Leur activation par fixation d'adrénaline ou noradrénaline induit l'activation de la phospholipase C, conduisant à une élévation de la concentration intracellulaire de calcium, et donc l'activation du neurone post-synaptique. Les récepteurs  $\alpha_{1A}$ , comme les  $\alpha_{1D}$  peu exprimés, seraient principalement présents dans les **couches superficielles et intermédiaires** (McCune et al.,

1993; Domyancic and Morilak, 1997; Santana et al., 2013). A contrario, les récepteurs  $\alpha_{1B}$  sont principalement retrouvés dans les **couches intermédiaires et profondes** du cortex cérébral, avec notamment une intensité plus importante dans la couche IV (McCune et al., 1993).

- Les récepteurs  $\beta$ , eux, peuvent induire l'activation du neurone post-synaptique par activation de l'adénylate cyclase qui entraîne la transformation d'ATP en adénosine monophosphate cyclique (cAMP). Il existe 3 types de récepteurs  $\beta$  :  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ . Tandis que les  $\beta_1$  sont davantage présents dans les **couches superficielles** comme les couches I et II, les  $\beta_2$ , eux, y sont moins abondants que dans les **couches intermédiaires et profondes** (Joyce et al., 1992). Les récepteurs  $\beta_3$  ne sont que peu exprimés dans le cortex cérébral, et peu d'informations concernant leur distribution dans cette région sont connues (Evans et al., 1999).
- Les récepteurs  $\alpha_2$  inhibiteurs sont aussi au nombre de 3 :  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ , et  $\alpha_{2C}$ . Eux vont inhiber l'action de l'adénylate cyclase et l'élévation de la concentration intracellulaire de calcium. Ces derniers, en plus d'être retrouvés en post-synaptique, peuvent également être présents en pré-synaptique pour y jouer un rôle de rétrocontrôle négatif. Alors que les  $\alpha_{2A}$  et  $\alpha_{2C}$  sont retrouvés dans l'ensemble des couches corticales, de façon plus marquée dans les **couches profondes** pour  $\alpha_{2A}$  et **superficielles** pour  $\alpha_{2C}$ , peu est connu concernant la distribution des  $\alpha_{2B}$  (McCune et al., 1993; Rosin et al., 1996; Talley et al., 1996).

### 3.3. Enzymes de dégradation de noradrénaline

Les enzymes capables de dégrader la noradrénaline comprennent COMT (catechol-O-methyltransférase) induisant l'inactivation des catécholamines par ajout d'un groupement

méthyl et MAO (monoamine oxydases) capable de dégrader les monoamines par oxydation de leur groupement amine. La dégradation de la noradrénaline peut impliquer, l'une et/ou l'autre ces enzymes (Nestler et al., 2015). En plus d'être retrouvées dans les terminaisons nerveuses des neurones noradrénergiques, dopaminergiques, sérotoninergiques et histaminergiques et les varicosités de tels projections, COMT et MAO sont exprimées dans différents populations cellulaires corticales.

**COMT** est exprimée dans les **interneurones GABAergiques** (Schendzielorz et al., 2013) et les **neurones pyramidaux** corticaux (Matsumoto et al., 2003). Elle est également retrouvée dans les cellules gliales (Matsumoto et al., 2003) : les **astrocytes** (Karhunen et al., 1995a, 1995b), la **microglie** (Mori et al., 2002) et les **oligodendrocytes** (Karhunen et al., 1995a).

Tandis que **MAO-A** est principalement retrouvée dans les **projections des neurones dopa- et noradrénergiques**, **MAO-B** est préférentiellement retrouvée dans les **projections des neurones sérotoninergiques** mais aussi et surtout dans les cellules gliales (Abell and Kwan, 2001), et plus spécifiquement les **astrocytes** (Levitt et al., 1982; Westlund et al., 1985).

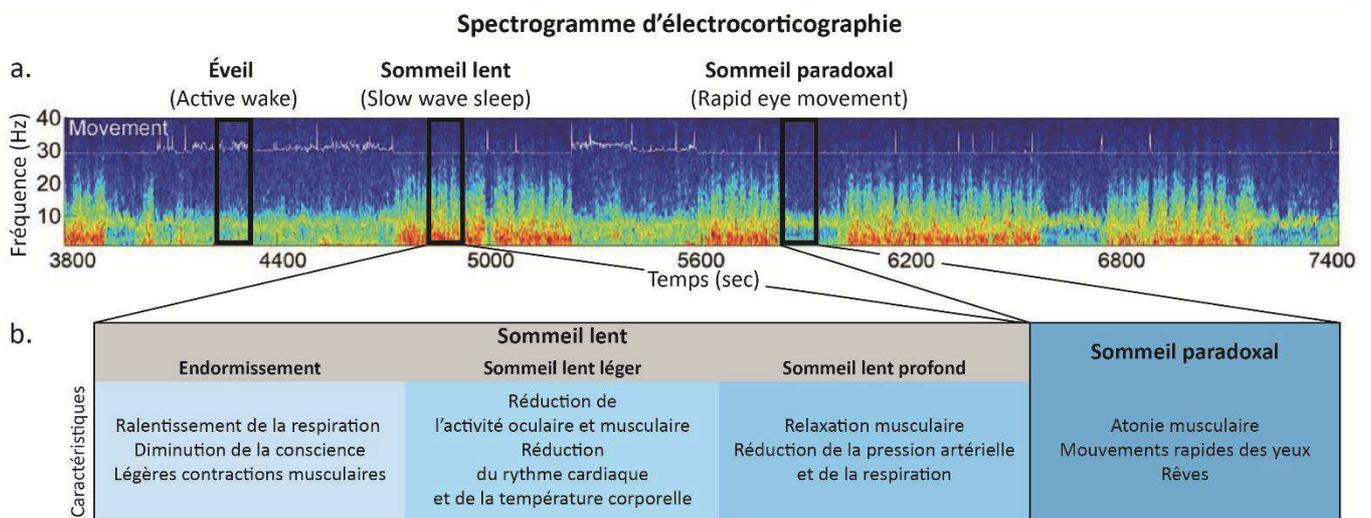
## 4. Fonctions du système noradrénergique

### 4.1. Eveil

L'une des premières fonctions associées au système noradrénergique est celle de l'éveil. En effet, une corrélation a été observée entre l'activité du locus coeruleus et le niveau d'éveil, et cela dès les années 70 (Hobson et al., 1975; McCarley and Hobson, 1975; Aston-Jones and Bloom, 1981).

Le **cycle veille-sommeil** se décompose en 3 grandes phases : l'**éveil**, le **sommeil lent** et le **sommeil paradoxal**. Le sommeil lent, ou SWS, est lui-même subdivisé en 3 stades :

l'**endormissement** avec ralentissement de la respiration, diminution de la conscience et de possibles légères contractions musculaires ; le **sommeil lent léger** avec une réduction de l'activité oculaire et musculaire ; et le **sommeil lent profond** précèdent le sommeil paradoxal. Ce dernier est caractérisé par une atonie musculaire et la présence de mouvements rapides des yeux. Tandis que le sommeil paradoxal, ou REM, représente 20 à 25% du sommeil total, le sommeil lent (léger et profond) correspond aux 70 à 75% restants (Cenas, n.d.)(**Figure 29**).



**Figure 29 : Le cycle veille-sommeil.**

a. Spectrogramme obtenu lors d'un enregistrement électrocorticographique faisant apparaître les mouvements de l'animal (fin tracé blanc, haut) et les 3 principales phases du cycle veille sommeil : l'éveil (active wake), le sommeil lent (slow wave sleep) et le sommeil paradoxal (rapid eye movement)(Issu de (Kim et al., 2017a)). b. Tableau représentant le sommeil lent et ses 3 stades, le sommeil paradoxal et les caractéristiques de ces 4 stades.

Différentes études couplant l'électroencéphalographie, pour visualiser les phases du sommeil, et l'enregistrement de l'activité des neurones du locus coeruleus ont pu mettre en évidence une activité de ces derniers lors des phases d'éveil et d'endormissement. Durant le sommeil lent, on peut observer une diminution de la décharge des neurones noradrénergiques. Enfin, durant le sommeil paradoxal, seule une infime partie des neurones du locus continuent à décharger (Hobson et al., 1975; McCarley and Hobson, 1975; Aston-Aurore BRUNET

Jones and Bloom, 1981). Bien qu'il ne puisse être nié une chute de l'activité du locus coeruleus durant cette phase, et une baisse importante des niveaux de noradrénaline dans le cortex, cette dernière reste présente durant le sommeil paradoxal. En effet, des études suivant les niveaux de noradrénaline dans différentes régions corticales par microdialyse *in vivo*, ont pu montrer cette baisse, et un maintien de la moitié de la concentration de noradrénaline durant le sommeil, comparativement à la phase d'éveil (Léna et al., 2005; Bellesi et al., 2016). La noradrénaline et la diminution d'activité du locus joueraient donc un rôle dans la mise en place du sommeil paradoxal, probablement en atténuant les processus cognitifs (David Johnson, 2003; Gottesmann, 2008).

#### 4.2. Processus cognitifs

La noradrénaline joue un rôle dans divers processus cognitifs tels que l'attention, la mémoire et la motivation.

Dans leur revue de 2018, Thiele et Bellgrove définissent l'**attention** comme un **mécanisme filtrant**, permettant de sélectionner les informations importantes à la réalisation d'une tâche (**attention bottom-up**) parmi un ensemble d'informations parasites (**attention top-down**) (Thiele and Bellgrove, 2018). La noradrénaline interviendrait dans ces 2 processus d'attention. L'activation de récepteurs  $\alpha_2$  inhibiteurs dans le cortex préfrontal participerait à l'attention top-down, et celle de récepteurs  $\alpha_1$  excitateurs dans le cortex sensoriel à l'attention bottom-up (Arnsten and Contant, 1992; Li et al., 1999; Arnsten, 2011; Thiele and Bellgrove, 2018). Les neurones noradrénergiques seraient impliqués dans un **contrôle temporel de l'attention** facilitant les comportements pertinents dans la réalisation d'une tâche (Aston-Jones et al., 1991, 1994, 1997; Clayton et al., 2004; Aston-Jones, 2005). Il a

d'ailleurs été montré qu'une augmentation de l'activité noradrénergique était associée à des déficits en performance de tâche, supportant l'implication de ce système dans les processus d'attention mais aussi de mémoire de travail (Rajkowski et al., 1994).

En effet, la noradrénaline a été montrée comme impliquée dans le fonctionnement de différentes structures jouant un rôle dans les processus en lien avec la **mémoire** parmi lesquelles l'hippocampe, le cortex préfrontal et l'amygdale. Dans l'hippocampe, il a été montré la nécessité d'une transmission noradrénergique dans le processus de **récupération de souvenirs** (Murchison et al., 2011; Schutsky et al., 2011; Zhang et al., 2013). Dans le cortex préfrontal, une altération des niveaux de noradrénaline, qu'ils soient trop faibles ou en excès, est associée à une altération des **performances en mémoire de travail**, tandis que des niveaux modérés permettent des performances optimales (Arnsten, 2000, 2011; Robbins and Arnsten, 2009; Berridge and Spencer, 2016). Enfin dans l'amygdale, l'activation de récepteurs adrénergiques excitateurs, de type  $\alpha_1$  et  $\beta$ , est associée à un meilleur apprentissage et augmente notamment la **consolidation des souvenirs émotionnels** (McGaugh, 2004; Likhtik and Johansen, 2019). La consolidation des souvenirs via le système noradrénergique se ferait par des interactions entre différentes régions à la suite de stimulation du locus coeruleus sur ces dernières, et cela de façon plus prononcée durant le sommeil (Eschenko et al., 2012; Sara, 2015), suggérant une action noradrénergique durant une période de faible activité du locus.

Enfin, le système noradrénergique serait également impliqué dans le processus de **motivation**. Dans leur étude de 2018, Bouret et collaborateurs montrent une réduction de la variabilité de choix après injection de clonidine, une molécule capable d'activer les récepteurs adrénergiques  $\alpha_2$  (Franowicz and Arnsten, 1999) et associée à une baisse de l'activité du locus coeruleus à certaines doses (Kawahara et al., 1999). Ils attribuent alors un rôle de la

noradrénaline dans les **processus de flexibilité comportementale et de motivation** (Jahn et al., 2018). Par ailleurs, la baisse d'activité noradrénergique a, par exemple, été associée une inhibition du comportement de préférence de place (Zarrindast et al., 2002) tandis que son augmentation faciliterait les effets du mécanisme de récompense (Drouin et al., 2002). La présence même de ce neuromodulateur dans des régions comme le cortex préfrontal semble être nécessaire à la mise en place de ce mécanisme, mais aussi à la libération de dopamine, neurotransmetteur clé du circuit de la récompense, par le noyau accumbens (Ventura et al., 2003, 2005).

L'ensemble de ces processus d'attention, mémoire et motivation sont intimement liés, et les nombreuses études portant sur le rôle de la noradrénaline dans ces derniers montrent de façon indéniable le rôle clé de ce système le bon fonctionnement des processus cognitifs.

#### 4.3. Motricité

De façon très intéressante, dans leur étude de 2018 traitant du rôle de la noradrénaline dans les processus de flexibilité comportementale et de motivation, Bouret et collaborateurs montrent également son implication dans la **régulation de l'intensité de force appliquée** durant la tâche. Bien qu'ils excluent une altération motrice dans ce contexte, ils suggèrent alors un rôle de la noradrénaline dans la **production d'effort et la mobilisation d'énergie**, un sujet qu'ils traitent de façon plus détaillée dans leur article de 2020 (Varazzani et al., 2015; Jahn et al., 2018; Borderies et al., 2020).

Mais d'autres études ont suggéré un lien entre noradrénaline et fonctions motrices. En effet, la lésion du locus coeruleus par injection de 6-OHDA ou DSP-4, des composés neurotoxiques, induit une baisse des niveaux corticaux de noradrénaline et un comportement

moteur aberrant avec répétition de rotations (Donaldson et al., 1976) ou encore une réduction des fonctions motrices avec une baisse de l'activité au rotarod ou en test d'agrippement chez les animaux prétraités au DSP-4 (Song et al., 2019). Les souris *Dbh*<sup>-/-</sup>, knock out pour l'enzyme de synthèse de la noradrénaline, montrent des altérations motrices, notamment de **coordination de mouvement**. Une supplémentation en noradrénaline chez ces souris permet, par ailleurs, d'améliorer le phénotype moteur (Rommelfanger et al., 2007).

En 1995, une étude s'est intéressée au rôle de la transmission noradrénergique spinale dans le fonctionnement moteur. Les auteurs montrent alors que l'activation des récepteurs  $\alpha_1$  de la moelle épinière facilite la **transmission motrice**, validant des observations faites en 1980 après application spinale de noradrénaline (White and Neuman, 1980). L'activation des récepteurs  $\alpha_2$  supraspinaux, elle, inhibe cette action facilitatrice (Ono and Fukuda, 1995).

Il semblerait donc que la noradrénaline et l'activité du locus coeruleus participent aux fonctions motrices et cela, non seulement par son action dans le cerveau mais aussi dans la moelle épinière.

#### 4.4. Excitabilité corticale

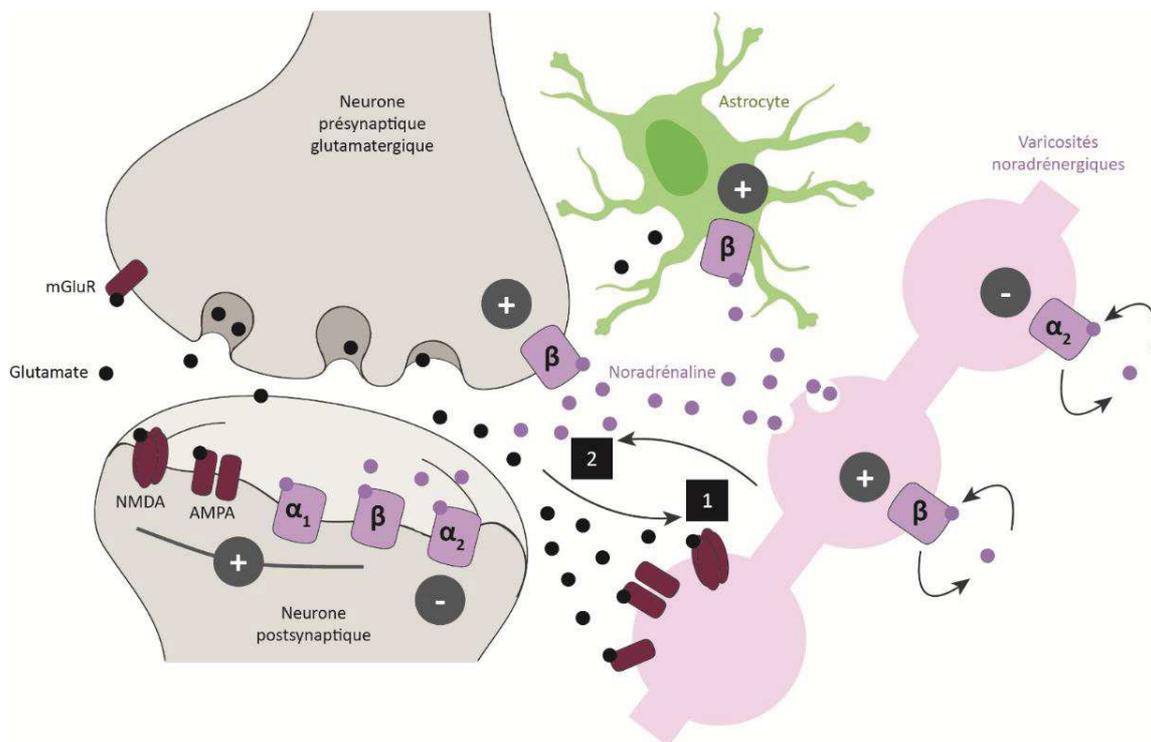
La noradrénaline n'interviendrait pas seulement dans les synapses noradrénergiques, mais pourrait aussi agir sur des synapses GABA et Glutamatergiques.

Dans un modèle proposé en 2016 par Mather et collaborateurs, les auteurs suggèrent que la présence de glutamate activerait des récepteurs présents sur les varicosités noradrénergiques voisines (distribution corticale des varicosités noradrénergiques vue en 3.1.1. et 3.1.2.)(**Figure 30**). Cela associé à l'activation du locus coeruleus, pourrait augmenter la libération de noradrénaline. Elle agirait alors sur les récepteurs pré- ou post-synaptiques de

la synapse glutamatergique voisine, et pourrait ainsi **moduler la transmission glutamatergique** (Mather et al., 2016; Poe et al., 2020)(Figure 30). Différentes études ont montré une réduction de la transmission glutamatergique, notamment via les récepteurs AMPA, en présence de noradrénaline dans le cortex préfrontal (Law-Tho et al., 1993), auditif (Dinh et al., 2009) ou encore entorhinal (Xiao et al., 2009). Dans l'hippocampe il a été montré, au contraire, une augmentation des courants médiés par les récepteurs AMPA (Hu et al., 2007). Enfin, dans le cortex visuel on retrouve ces différents types de modulation, dépendamment des récepteurs adrénergiques activés (Kobayashi et al., 2000; Salgado et al., 2012).

**Figure 30 : Le modèle GANE.**

Le glutamate (disques noirs) libéré par la terminaison glutamatergique interagit avec les récepteurs glutamatergiques (NMDA, AMPA et mGluR) des varicosités noradrénergiques dépolarisées par le locus coeruleus (1). Le glutamate pourrait augmenter la libération de noradrénaline (disques violets) de ces varicosités (2) pouvant induire : un rétrocontrôle positif de la terminaison glutamatergique (récepteurs  $\beta$ ) ; un recrutement des astrocytes (récepteurs  $\beta$ ) ; une activation des récepteurs adrénergiques post-synaptiques (récepteurs  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ). Enfin, une action autocrine de la noradrénaline sur les récepteurs  $\alpha_2$  et  $\beta$  des varicosités modulerait la libération de cette dernière.



Comme pour la transmission glutamatergique, la **modulation de la transmission GABAergique** par la noradrénaline varie d'une structure à une autre, et au sein même d'une structure. En effet, dans le cortex auditif, tandis que la noradrénaline induit une diminution des courant GABAergiques des prolongements neuronaux en couche I, aucun effet n'est observé en couche V, et une augmentation de ces courants est, elle, retrouvée en couches II/III (Salgado et al., 2012).

Ces études démontrent ainsi parfaitement le **rôle neuromodulateur de la noradrénaline dans le cortex cérébral**. Pourtant son rôle dans l'excitabilité corticale est débattu, parfois vu comme excitateur, d'autres fois comme inhibiteur.

En effet, certaines études ont mis en avant un **effet excitateur de la noradrénaline dans le cortex cérébral**. La réalisation de stimulation magnétique transcrânienne (TMS) chez des patients sains après administration d'un inhibiteur de recapture de la noradrénaline, la Reboxetine, a mis en évidence une augmentation de l'excitabilité corticale : augmentation de paramètres excitateurs comme la facilitation intracorticale et diminution de paramètres inhibiteurs (Herwig et al., 2002; Plewnia et al., 2002; Kuo et al., 2017). Mais une grande partie des études supportant un **effet inhibiteur de la noradrénaline** viennent de son effet **protecteur contre les crises d'épilepsie** en cas de stimulation du locus coeruleus (Libet et al., 1977; Weiss et al., 1990; Ferraro et al., 1994). De multiples études ont montré une facilitation des crises épileptiques dans des modèles d'épilepsie après lésion du système noradrénergique (Jerlicz et al., 1978; Mason and Corcoran, 1979; Bregman et al., 1985; Lindvall et al., 1988; Trottier et al., 1988; Mishra et al., 1994; Szot et al., 1999; Weinshenker and Szot, 2002; Giorgi et al., 2003; Fornai et al., 2011). Chez les souris knock out *Dbh*<sup>-/-</sup>, une augmentation de la susceptibilité aux stimuli inducteurs de crise tels que l'injection de pentylènetétrazol, ou PTZ,

a été retrouvée (Szot et al., 1999). Dans leur ensemble, ces études sur l'épilepsie suggèrent donc davantage un effet de frein de la noradrénaline sur l'excitabilité corticale.

Bien que l'action de la noradrénaline puisse parfois suggérer un rôle excitateur, et d'autres fois un rôle inhibiteur, ce système semble définitivement contribuer à l'excitabilité corticale et cela suivant des mécanismes complexes.

## 5. Implications pathologiques

En raison de ces multiples, et très diverses, fonctions, l'altération du système noradrénergique est associée à différentes pathologies notamment les troubles de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (ADHD), l'anxiété, la dépression mais aussi les pathologies neurodégénératives telles qu'Alzheimer ou Parkinson.

### 5.1. Troubles du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité

Les **troubles du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité**, ou ADHD, consistent en une pathologie neurocomportementale au développement très précoce caractérisée par une inattention, de l'impulsivité et/ou de l'hyperactivité. L'altération de la neurotransmission dopaminergique et noradrénergique, mais aussi des connexions entre cortex préfrontal et striatum ou cervelet, a été associée à l'ADHD (Biederman, 2005; Arnsten, 2006; del Campo et al., 2011). Le méthylphénidate, une molécule utilisée dans le traitement des symptômes de ADHD, réduit significativement la disponibilité des transporteurs de noradrénaline, induisant une augmentation des niveaux du neuromodulateur dans des régions comme le locus coeruleus, le raphé, l'hypothalamus ou le thalamus (Easton et al., 2007; Hannestad et al.,

2010). Ces résultats étant aussi vrais dans le cas de la dopamine, il semblerait que l'association des altérations de noradrénaline et dopamine soit impliquée dans la pathologie ADHD.

## 5.2. Dépression et Anxiété

Les neurones noradrénergiques du locus coeruleus projettent vers de nombreuses structures comme le thalamus, le cortex, l'amygdale, l'hippocampe et l'hypothalamus, des régions clés dans la compréhension des mécanismes sous-tendant **le stress et la dépression** (Leonard, 1997a). L'induction de stress chronique est d'ailleurs utilisée afin de modéliser la dépression chez l'animal, et induit une altération de l'expression des récepteurs adrénergiques (Leonard, 1997b). Il a été montré que les antidépresseurs, mais aussi la thérapie électro-convulsive, utilisés dans le traitement de la dépression, réduisent l'activité noradrénergique, notamment celle associée à l'adénylate cyclase (Vetulani and Sulser, 1975; Heal et al., 1989).

La noradrénaline a longtemps été suggérée comme étant impliquée dans les **troubles d'anxiété**. Il a été montré chez l'animal l'association entre noradrénaline et la réponse comportementale au stress, ou même dans le cas de modèles d'anxiété avec une augmentation de transmission noradrénergique (Bremner et al., 1996). Chez l'Homme, une augmentation de la libération de noradrénaline dans le plasma et le liquide céphalorachidien chez des patients souffrant de **trouble de stress post-traumatique** (Yehuda et al., 1998; Geraciotti et al., 2001), et une augmentation du turnover de la noradrénaline dans les l'amygdale et l'hypothalamus de patients sujets aux **crises de panique** (Esler et al., 2008) ont été mises en évidence. La Reboxetine, un inhibiteur de recapture sélectif de la noradrénaline, réduit les symptômes dépressifs (Schatzberg, 2000) mais aussi ceux de trouble de stress post-

traumatique (Spivak et al., 2006) soulignant l'implication du système noradrénergique dans ces troubles.

### 5.3. Maladie d'Alzheimer

La **maladie d'Alzheimer** est une maladie neurodégénérative caractérisée par l'atteinte de différentes régions cérébrales dont l'hippocampe. On retrouve notamment la formation de plaques amyloïde- $\beta$  et d'enchevêtrements neurofibrillaires de la protéine TAU, et la perte de neurones cholinergiques.

Il a été montré que les patients Alzheimer présentent une **perte de l'ordre de 70% des neurones du locus coeruleus** conduisant à une **réduction des niveaux de noradrénaline** dans le cortex et les régions limbiques (Matthews et al., 2002). La **pathologie tau** apparaît dans le locus coeruleus avant même d'atteindre l'hippocampe ou le neocortex, et le locus serait également la zone la plus précocement susceptible à l'accumulation d'**enchevêtrements neurofibrillaires** (Theofilas et al., 2018; Singh, 2020). Dans des modèles murins de la pathologie, la présence d'amyloïde- $\beta$  et d'une réduction du nombre de neurones du locus coeruleus a été mise en évidence, ainsi qu'une diminution des niveaux de monoamines, dont la noradrénaline, dans cette structure (Cui et al., 2018; Vicente et al., 2018; Yenkovyan et al., 2018).

En 2010, Heneka et collaborateurs montrent, dans un modèle murin de la maladie, que la dégénérescence induite du locus conduit à une augmentation de molécules pro-inflammatoires, et une diminution de la migration de la microglie, menant à l'accumulation d'amyloïde- $\beta$ . Ils concluent alors que la baisse de noradrénaline dans les régions cibles du locus coeruleus induirait une réaction inflammatoire, l'altération de la migration de la

microglie et de la phagocytose et donc une atteinte de la dégradation de l'amyloïde- $\beta$  avec formation de plaques (Heneka et al., 2010).

Ainsi les patients et modèles de la maladie d'Alzheimer présentent une atteinte du système noradrénergique, et notamment du locus coeruleus, qui, non seulement survient avant même l'atteinte hippocampique, mais pourrait aussi participer à la physiopathologie de la maladie.

#### 5.4. Maladie de Parkinson

La **maladie de Parkinson** est une maladie neurodégénérative caractérisée par l'atteinte des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNc). On retrouve notamment des **agrégats protéiques d' $\alpha$ -synucléine**, non seulement dans la SNc mais aussi dans d'autres régions, y compris le locus coeruleus. Il a même été mis en évidence la présence de tels agrégats dans cette structure dès le stade 2 de Braak, avant même l'atteinte de la SNc (Braak et al., 2004). Les patients présentent une **perte de neurones du locus coeruleus de 30 à parfois 90%** (Taquet et al., 1982; McMillan et al., 2011; Paredes-Rodriguez et al., 2020) et une **réduction des innervations du locus coeruleus** vers des cibles telles que le cortex moteur et préfrontal, le thalamus, hypothalamus et cervelet (Paredes-Rodriguez et al., 2020). Dans un modèle murin de la pathologie, une **perte de neurones du locus coeruleus**, une **baisse des niveaux de noradrénaline** dans différentes régions du cerveau et une **réduction des innervations noradrénergiques** vers la SNc (Luchtman et al., 2009; Nayyar et al., 2009; Pifl et al., 2012; Masilamoni et al., 2017) ont été retrouvées.

La lésion des neurones du locus coeruleus induit notamment une augmentation de la libération d'interleukines et cytokines, possiblement par altération de la microglie, et une

aggravation de l'atteinte des neurones dopaminergiques. Il a donc été proposé que l'altération du système noradrénergique pourrait participer à la dégénérescence des neurones dopaminergiques, et cela par neuroinflammation (Yao et al., 2015; Af Bjerkén et al., 2019), pouvant ainsi participer au développement des symptômes moteurs mais aussi d'apprentissage et de mémoire spatiale de la maladie (Li et al., 2018).

### 5.5. Epilepsie

Comme mentionné en 4.4., l'implication du système noradrénergique dans la régulation du fonctionnement cortical a été soutenue par des études réalisées dans le cadre de l'épilepsie, et montrant une **augmentation de la fréquence des crises épileptiques en cas de lésion du locus coeruleus**. Une majorité des études réalisées dans des modèles animaux d'épilepsie suggèrent un **effet anticonvulsant** du système noradrénergique, bien que la seule baisse de noradrénaline ne suffise pas à induire de crises (Jerlicz et al., 1978; Mason and Corcoran, 1979; Bregman et al., 1985; Lindvall et al., 1988; Trottier et al., 1988; Mishra et al., 1994; Szot et al., 1999; Weinshenker and Szot, 2002; Giorgi et al., 2003; Fornai et al., 2011). Dans leur revue de 2002, Weinshenker et Szot suggèrent que l'absence d'explication concernant le mécanisme sous-tendant ce rôle anticonvulsif pourrait s'expliquer par la multitude de récepteurs adrénergiques et de voies induisant leur activation (Weinshenker and Szot, 2002)(**Table 3**).

**Table 3 : Liste d'études mettant en évidence des effets pro- et anti-convulsants d'agonistes et antagonistes de récepteurs adrénergiques. (Weinshenker and Szot, 2002)**

Proconvulsant and anticonvulsant effects of adrenoceptor agonists and antagonists

Receptor	Species	Seizure model	Effect	Reference
$\alpha_1$ agonists				
Phenylephrine	Rat	GEPR	Anticonvulsant	Ko et al., 1984; Yan et al., 1998; Faingold & Casebeer, 1999
	Mouse	EI	Anticonvulsant	Tsuda et al., 1990
Methoxamine	Rat	QM	Anticonvulsant	Chermat et al., 1981
		GEPR	Anticonvulsant	Yan et al., 1998
St 587	Rat	QA	Anticonvulsant	Wu et al., 1987
		AK	Anticonvulsant	Löscher & Czuczwar, 1987
Cirazoline	Rat	SPMS	Anticonvulsant	Micheletti et al., 1987
		EC	Proconvulsant	Jackson et al., 1991
	Gerbil	PTZ	Proconvulsant	Gadie & Tulloch, 1985
	Rat	ABS	Anticonvulsant	Löscher & Czuczwar, 1987
		SPMS	Anticonvulsant	Micheletti et al., 1987
$\alpha_1$ antagonists				
Prazosin	Rat	KA	Anticonvulsant	Baran et al., 1985
		PEN	Proconvulsant	Neuman, 1986
		SPMS	Proconvulsant	Micheletti et al., 1987
	Mouse	PTZ	Proconvulsant	Weinshenker et al., 2001
		QM	Proconvulsant	Chermat et al., 1981
		SPON	Proconvulsant	Horton et al., 1980
		STR	Anticonvulsant	Amabeoku & Chandomba, 1994
Corynanthine	Gerbil	ABS	Proconvulsant	Löscher & Czuczwar, 1987
$\alpha_2$ agonists				
Clonidine	Rat	AK	Anticonvulsant	Gellman et al., 1987; Löscher & Czuczwar, 1987; McIntyre & Giugno, 1988; Pelletier & Corcoran, 1993; Yoshioka et al., 2000
		AK	Proconvulsant	Yoshioka et al., 2000
		EC	Anticonvulsant	Kulkarni, 1981
		EC	Proconvulsant	Crunelli et al., 1981; Löscher & Czuczwar, 1987
		KA	Anticonvulsant	Baran et al., 1985
		PTZ	Anticonvulsant	Papanicolaou et al., 1982a, 1982b; Lazarova et al., 1984; Scotti de Carolis et al., 1986
		QA	Proconvulsant	Wu et al., 1987
		PIC	Anticonvulsant	Kulkarni, 1981
		SPMS	Proconvulsant	Micheletti et al., 1987
		STR	Anticonvulsant	Kulkarni, 1981
	Mouse	AUD	Anticonvulsant	Horton et al., 1980
		EC	Anticonvulsant	Kulkarni, 1981; Jackson et al., 1991
		EI	Anticonvulsant	Tsuda et al., 1990
		FLUR	Proconvulsant	Greer & Alpern, 1980
		MET	Anticonvulsant	Homeida & Cooke, 1982
		NMDA	Anticonvulsant	Czuczwar et al., 1985
		PTZ	Anticonvulsant	Löscher & Czuczwar, 1987; Amabeoku et al., 1994
		PTZ	Proconvulsant	Oishi et al., 1979
		PTZ	Proconvulsant	Weinshenker et al., 2001
		QM	Proconvulsant	Chermat et al., 1981
		PIC	Anticonvulsant	Kulkarni, 1981
		STR	Anticonvulsant	Kulkarni, 1981; Amabeoku & Chandomba, 1994
		Gerbil	ABS	Anticonvulsant
Cat	AK	Anticonvulsant	Shouse et al., 1996	
Mouse	AUD	Anticonvulsant	Horton et al., 1980	
UK 14,304	Mouse	EC	Anticonvulsant	Jackson et al., 1991
44-549	Rat	PTZ	Anticonvulsant	Papanicolaou et al., 1982b
	Rat	PTZ	Anticonvulsant	Papanicolaou et al., 1982b
Lofexidine	Rat	PTZ	Anticonvulsant	Papanicolaou et al., 1982b
Guanfacine	Rat	PTZ	Anticonvulsant	Papanicolaou et al., 1982b

(continued on next page)

Receptor	Species	Seizure model	Effect	Reference
$\alpha_2$ agonists				
CP-14,304-18	Mouse	AUD	Anticonvulsant	Horton et al., 1980
Oxymetazoline	Mouse	AUD	Anticonvulsant	Horton et al., 1980
$\alpha_2$ antagonists				
Yohimbine	Rat	AK	Proconvulsant	Gellman et al., 1987
	Rat	EC	Anticonvulsant	Crunelli et al., 1981
		KA	Proconvulsant	Baran et al., 1985
		PEN	Anticonvulsant	Neuman, 1986
		PTZ	Proconvulsant	Lazarova & Samanin, 1983
		QA	Anticonvulsant	Wu et al., 1987
		SPMS	Anticonvulsant	Micheletti et al., 1987
	Mouse	BIC	Anticonvulsant	Lloyd & Worms, 1982
		BIC	Proconvulsant	Lloyd & Worms, 1982
		EI	Anticonvulsant	Tsuda et al., 1990
		PIC	Proconvulsant	Lloyd & Worms, 1982
		PTZ	Anticonvulsant	Lloyd & Worms, 1982
		PTZ	Proconvulsant	Lloyd & Worms, 1982; Gadie & Tulloch, 1985; Fletcher & Forster, 1988; Gross & Ferrendelli, 1982
	Rat	QM	Anticonvulsant	Chermat et al., 1981
		AK	Proconvulsant	Gellman et al., 1987
Idazoxan		GEPR	Anticonvulsant	Yan et al., 1998
	Mouse	HK	Proconvulsant	Kokaia et al., 1989; Bengzon et al., 1990
		AK	Proconvulsant	Janumpalli et al., 1998
		BIC	Proconvulsant	Fletcher & Forster, 1988
		EC	Proconvulsant	Jackson et al., 1991
		PTZ	Proconvulsant	Gadie & Tulloch, 1985; Fletcher & Forster, 1988
	Rat	STR	Proconvulsant	Amabeoku & Chandomba, 1994
Phentolamine	Rat	AK	Proconvulsant	Gellman et al., 1987
	Mouse	PTZ	Anticonvulsant	Oishi et al., 1979; Gross & Ferrendelli, 1982
	Mouse	STR	Anticonvulsant	Amabeoku & Chandomba, 1994
Rauwolscine	Mouse	BIC	Proconvulsant	Fletcher & Forster, 1988
Wy 26392	Mouse	PTZ	Proconvulsant	Fletcher & Forster, 1988
		EC	Proconvulsant	Jackson et al., 1991
Efaroxan	Mouse	EC	Proconvulsant	Jackson et al., 1991
RX811059	Mouse	EC	Proconvulsant	Jackson et al., 1991
RX821002	Mouse	EC	Proconvulsant	Jackson et al., 1991
$\beta$ agonists				
Isoproterenol	Rat	PEN	Anticonvulsant	Ferraro et al., 1994
	Mouse	EC	Proconvulsant	Jackson et al., 1991
		PTZ	Anticonvulsant	Weinshenker et al., 2001
Albuterol	Rat	GEPR	Anticonvulsant	Ko et al., 1984
Dobutamine	Rat	GEPR	Anticonvulsant	Ko et al., 1984
Terbutaline	Rat	GEPR	Anticonvulsant	Ko et al., 1984
$\beta$ antagonists				
Propranolol	Rat	HK	Anticonvulsant	Kokaia et al., 1989
	Rat	KA	Anticonvulsant	Baran et al., 1985
		LEP	Anticonvulsant	Papanicolaou et al., 1982c
		PTZ	Anticonvulsant	Louis et al., 1982
	Mouse	AUD	Anticonvulsant	Lints & Nyquist-Battie, 1985
		EC	Anticonvulsant	Murmann et al., 1966; Madan & Barar, 1974
		EI	Anticonvulsant	Tsuda et al., 1990
		LEP	Anticonvulsant	Murmann et al., 1966
		PTZ	Proconvulsant	Gross & Ferrendelli, 1982
		QM	Anticonvulsant	Chermat et al., 1981
		SNS	Proconvulsant	Ryan, 1985
	Rat	STR	Anticonvulsant	Amabeoku & Chandomba, 1994
		PTZ	Anticonvulsant	Louis et al., 1982
Pindolol	Mouse	AUD	Anticonvulsant	Lints & Nyquist-Battie, 1985
	Rat	PTZ	Anticonvulsant	Louis et al., 1982
Timolol	Rat	PTZ	Anticonvulsant	Louis et al., 1982

ABS, air blast stimulation; EC, electroconvulsions; EI, EI mouse mutant; LEP, leptazol; MET, metaldehyde; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; QM, quaking mouse mutant; SPMS, spontaneous petit-mal seizures; SPON, spontaneous; STR, strychnine.

Il est intéressant que des pathologies telles que Alzheimer ou Parkinson présentent à la fois une **altération du système noradrénergique**, et une **hyperexcitabilité corticale** comme l'épilepsie (Alzheimer : (Khedr et al., 2011), Parkinson : (Ridding et al., 1995), Epilepsie : (Manganotti et al., 2001; Badawy et al., 2013)). La noradrénaline est impliquée dans le fonctionnement cortical, agissant non seulement par transmission synaptique de noradrénaline, ou bien en modulant les synapses glutamatergiques et GABAergiques. Elle pourrait alors constituer une **piste de recherche dans le contexte des mécanismes sous-tendant ces altérations du fonctionnement cortical**, y compris dans le contexte de la SLA.

#### 5.6. Sclérose latérale amyotrophique ?

Certaines études se sont intéressées aux **niveaux spinaux de noradrénaline chez les patients SLA** par utilisation de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Chez seulement 4 patients SLA, et comparativement à 7 patients contrôles, Bertel et collaborateurs ont mis en évidence une **augmentation des niveaux de noradrénaline** dans les parties cervicales, thoraciques et lombaires de la moelle épinière (Bertel et al., 1991) tandis que Sofic et collaborateurs, eux, montrent une **baisse des niveaux de noradrénaline** dans l'ensemble des sections de la moelle épinière (cervical, thoracique, lombaire et sacré) chez 4 patients SLA comparativement à autant de patients contrôles (Sofic et al., 1991). Ainsi, ces 2 études sur un très faible nombre de patients ont montré des résultats opposés, ce qui soutient la nécessité d'une nouvelle étude des niveaux noradrénergiques dans la moelle épinière, mais aussi le cortex des patients SLA jusqu'alors non explorés. Des études par autoradiographie ont, quant à elles, montré une **augmentation de la concentration de MAO-B** dans la moelle épinière et le cortex cérébral de ces derniers, et une légère **tendance à l'augmentation de COMT** dans la

moelle épinière de patients SLA (Ekblom et al., 1993; Jossan et al., 1994), pouvant contribuer à une baisse des niveaux de noradrénaline corticaux et spinaux.

Dans la moelle épinière de souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, modèle de SLA, Millan et collaborateurs ont utilisé la chromatographie en phase liquide à haute performance et montré une augmentation des niveaux de dopamine et un **maintien des niveaux spinaux de noradrénaline chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*** comparativement aux contrôles. En réalisant des enregistrements extracellulaires dans la moelle épinière de ces animaux en présence de concentrations croissantes de noradrénaline, ils montrent une **hypersensibilité des neurones spinaux à la noradrénaline** et suggèrent que cela pourrait entraîner une dépolarisation aberrante des motoneurones et leur altération (Milan et al., 2014).

Dans son article de 2007, Ilya Ionov aborde la possibilité d'un l'excès de  $Ca^{2+}$  comme cause de neurodégénérescence des motoneurones dans la SLA (Ionov, 2007). La noradrénaline étant capable d'augmenter la transmission glutamatergique via les récepteurs NMDA, et donc induire une augmentation de l'influx de ces ions  $Ca^{2+}$ , il suggère un **rôle potentiel de la noradrénaline dans la physiopathologie des motoneurones dans la SLA** (Ionov, 2007).

Il est intéressant de noter que dans leur étude des inclusions TDP-43, Brettschneider et collaborateurs n'ont pas mis en évidence la présence de telles inclusions dans les neurones du locus coeruleus (Brettschneider et al., 2013). Pour autant, l'absence de pathologie TDP-43 dans une structure ne signifie pas que cette dernière n'est pas altérée. En effet, il a été mis en évidence une atteinte des neurones sérotoninergique dans la SLA, avec une perte de ces derniers retrouvée chez les patients (Dentel et al., 2013a; El Oussini et al., 2017) sans que des

inclusions TDP-43 ne soient retrouvées dans le noyau raphé dorsal hébergeant les neurones sérotoninergiques (Brettschneider et al., 2013).

Ainsi, l'étude du système noradrénergique dans la SLA n'a donné lieu qu'à un très faible nombre de publications aux résultats bien souvent contradictoires. De plus, une très grande majorité se sont concentrées sur l'étude du plasma, du liquide céphalorachidien ou de la moelle épinière, délaissant l'étude de la noradrénaline et de ses acteurs dans le cortex cérébral. Bien que ces résultats suggèrent une altération du système noradrénergique, et un potentiel rôle pathologique de cette dernière, une étude plus approfondie dans les modèles murins et patients SLA reste donc à effectuer.

## 6. Pharmacologie noradrénergique

### 6.1. L-DOPS et Benserazide

Il existe de multiples stratégies afin de cibler le système noradrénergique et le moduler dans un sens ou un autre. L'une de ces stratégies est de directement agir sur les neurones noradrénergiques et leur production de noradrénaline. En 1998, Thomas et collaborateurs développent des souris *Dbh*<sup>-/-</sup> et tentent de restaurer les niveaux de noradrénaline alors absents (Thomas et al., 1998). Comme Rommelfanger en 2007, ils utilisent une injection unique de le L-threo-dihydroxyphenylserine (L-DOPS, ou Droxidopa) (Thomas et al., 1998; Rommelfanger et al., 2007). Cette molécule, en présence d'acide décarboxylase aromatique, comme la DOPA décarboxylase, peut être transformée en noradrénaline. Les benserazides, ne passant pas la barrière hémato-encéphalique, permettent l'inhibition périphérique de ces derniers. Ainsi, la **combinaison de L-DOPS et benserazide** permet une formation de noradrénaline limitée au système nerveux central, et l'étude de cette supplémentation

noradrénergique sur différents mécanismes (Rommelfanger et al., 2007). Bien que principalement utilisée dans le traitement de l'hypotension via son action périphérique, L-DOPS a également été étudié dans le contexte des maladies d'Alzheimer et Parkinson et a montré une réduction de certains symptômes chez des modèles murins de ces pathologies (Rommelfanger et al., 2007; Kalinin et al., 2012).

## 6.2. 6-OHDA et DSP-4

Un autre moyen d'agir sur la production de noradrénaline, mais cette fois ci dans le but d'induire une déplétion noradrénergique est de léser les neurones du locus coeruleus. Cela a été très largement utilisé afin de mieux comprendre l'implication de ce système dans de multiples fonctions. Certaines études ont utilisé, et utilisent encore, l'injection locale, dans le locus, de **6-hydroxydopamine (6-OHDA)**, une neurotoxine capable d'induire la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques et noradrénergiques. 6-OHDA est un analogue de la dopamine hautement oxydable pouvant être capturé par les neurones catecholaminergiques via les transporteurs de la dopamine. Il existe 3 mécanismes proposés expliquant l'action de 6-OHDA : 1) l'auto-oxydation de 6-OHDA induisant la libération de radicaux libres, 2) l'action des monoamines oxydases (MAO) sur 6-OHDA induisant la libération de radicaux libres ou 3) l'action inhibitrice de 6-OHDA sur le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Hernandez-Baltazar et al., 2017). Afin de limiter son impact sur les neurones dopaminergiques possiblement contactés, les animaux peuvent recevoir, en amont, une injection d'inhibiteurs de recapture de dopamine (Sampaio et al., 2020).

Une autre façon de s'attaquer aux neurones noradrénergiques est par l'injection unique et intrapéritonéale de **N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine** (ou **DSP-4**). Cette

neurotoxique induit une réduction des niveaux de noradrénaline dans l'heure suivant l'injection. Après environ 1 semaine post-injection, une perte des projections noradrénergiques est observable, puis après 2 semaines, celle des corps cellulaires du locus coeruleus (Ross, 1976; Ross and Renyl, 1976; Jaim-Etcheverry and Zieher, 1980; Fritschy and Grzanna, 1991). DSP-4 est capable de traverser la barrière hématoencéphalique et d'agir au niveau des transporteurs de noradrénaline impliqués dans la recapture de noradrénaline. DSP-4 subirait une transformation intramoléculaire formant un ion aziridium. Ce dernier, capable d'interagir avec d'autres nucléophiles présents dans les tissus biologiques peut alors se lier au NAT et altérer le site de liaison de ce dernier par alkylation. La neurotoxicité de DSP-4 passerait donc d'abord par son action au niveau de l'élément pré-synaptique noradrénergique et conduirait progressivement à l'atteinte des prolongements puis du corps cellulaire des neurones noradrénergiques (Jaim-Etcheverry and Zieher, 1980; Ransom et al., 1982; Dudley et al., 1990; Bortel, 2014).

### 6.3. Inhibiteurs de COMT et MAO

Différents **inhibiteurs de COMT** et présentant des effets bénéfiques sur la symptomatologie parkinsonienne ont été étudiées en pré-clinique et clinique. Parmi ces molécules se trouve le **Tolcapone**, l'**Entacapone** et plus récemment l'**Opicapone** (Rodrigues and Ferreira, 2017; St Onge et al., 2020). En 2018, une étude de screening pharmacologique suggère l'utilisation de l'Opicapone comme inhibiteur de COMT dans le contexte de la maladie d'Alzheimer (Patel et al., 2018).

Il existe un très grand nombre d'**inhibiteurs de MAO** réversibles et non-réversibles utilisés en médecine (Finberg, 2014). La **Phenelzine** est un faible inhibiteur de MAO (Baker et

al., 1991), tandis que la **Tranlycypromine**, développée pour le traitement de la dépression, peut agir sur MAO-A et MAO-B (Baker et al., 1992; Finberg, 2014). Les Propargylamines constituent une famille d'inhibiteurs de MAO avec notamment la **Selegiline** et la **Rasagiline**. Ces dernières ont toutes deux une action anti-parkinsonienne (Birkmayer et al., 1977; Finberg and Youdim, 2002) conduisant notamment à une augmentation des niveaux de dopamine. La Selegiline aurait d'ailleurs un rôle neuroprotecteur contre le MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), utilisé dans la modélisation de la maladie de Parkinson et limiterait l'action de ce dernier sur les neurones dopaminergiques (Heikkila et al., 1984). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que Selegiline et Rasagiline ont un effet protecteur des mitochondries, augmentent l'expression ou l'activation d'enzymes anti-apoptotiques et celle d'enzymes antioxydantes comme SOD1 (Maruyama et al., 2002; Youdim et al., 2006; Weinreb et al., 2010). De façon très intéressante, le traitement d'un modèle murin de SLA (les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*) avec la Rasagiline, avec ou sans Riluzol, permet le prolongement de la durée de vie (Waibel et al., 2004). Malheureusement ce traitement à la Rasagiline, comme à la Selegiline, a été sans effet marqué notable chez les patients (Mazzini et al., 1994; Lange et al., 1998; Ludolph et al., 2018; Statland et al., 2019).

#### 6.4. Inhibiteurs de transport de la noradrénaline

Les inhibiteurs de recapture de la sérotonine, comme la Fluoxetine, sont particulièrement utilisés dans le cadre des troubles d'anxiété et dépression. Des **inhibiteurs de recapture de sérotonine et noradrénaline** ont été développés et utilisés pour leurs propriétés antidépressives. C'est le cas de la **Venlafaxine** et de la **Desvenlafaxine** par exemple.

Mais il existe également la **Reboxetine**, un **inhibiteur sélectif de recapture de la noradrénaline**. La Reboxetine a été montrée comme ayant un effet bénéfique dans des cas de narcolepsie, d'ADHD, d'attaques de panique mais aussi dans le traitement de la dépression chez les patients souffrant de Parkinson (Sepede et al., 2012). Un effet bénéfique de la Reboxetine a été démontrée sur des modèles murins de Parkinson (retardement de la progression de la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques et augmentation des niveaux de dopamines dans le striatum)(Kreiner et al., 2019) et d'Alzheimer (baisse de la neuroinflammation, des plaques d'amyloïde  $\beta$  et de la neurodégénérescence)(Gutiérrez et al., 2019). Il est intéressant de noter que dans ces 2 pathologies, dans lesquelles on retrouve à la fois une hyperexcitabilité corticale et une atteinte du système noradrénergique, le traitement à un inhibiteur sélectif de la recapture de noradrénaline semble avoir un effet bénéfique.

La **Réserpine** est un **bloqueur des VMAT**, des transporteurs vésiculaires de monoamines comme la noradrénaline. En l'absence d'une telle vésiculation, cette dernière est dégradée par les MAO et COMT. L'administration de Réserpine permettrait, par exemple, la modélisation de certains symptômes parkinsoniens (Duty and Jenner, 2011; Leão et al., 2015), suggérant un lien entre la dégradation des monoamines, telles que la noradrénaline, et le développement de tels symptômes.

### 6.5. Agonistes et antagonistes de récepteurs adrénergiques

La pharmacologie, notamment dans le cadre des agonistes et antagonistes adrénergiques, est particulièrement vaste et ne saurait être récapitulée ici. Je vais donc présenter une liste non exhaustive de molécules agissant sur les différents récepteurs adrénergiques, et leur potentielle utilisation dans des pathologies cérébrales.

### 6.5.1. Agonistes adrénérgiques

En dehors de la noradrénaline, agoniste naturel des récepteurs adrénérgiques, certaines molécules permettent d'activation spécifique de l'un ou l'autre de ces récepteurs. La **Phenylephrine**, par exemple, est un **agoniste des récepteurs  $\alpha_1$**  et classiquement utilisée comme décongestionnant. Les **agonistes des récepteurs  $\alpha_2$**  comprennent notamment la **Clonidine** et la **Guanfacine**. Bien que n'ayant pas non plus montré d'effet évident sur les symptômes parkinsoniens (Tarsy et al., 1975), la Clonidine permettrait cependant l'amélioration des performances de mémoire de travail chez les patients atteints de Parkinson (Riekkinen et al., 1999; Schneider et al., 2010). Enfin, l'**Isoproterenol** est un **agoniste des récepteurs  $\beta$** . Classiquement employé dans le traitement de la bradycardie et de l'asthme, l'Isoproterenol permettrait l'inhiber la formation d'oligomères Tau suggérant un potentiel rôle thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer (Soeda et al., 2015). Un autre agoniste des récepteurs  $\beta$ , sélectif des  $\beta_3$ , le **Xamoterol**, permettrait lui aussi de réduire la pathologie Tau mais aussi amyloïde  $\beta$  dans un modèle murin d'Alzheimer. Le Xamoterol réduirait aussi la neuroinflammation, sans impact bénéfique sur les troubles comportementaux (Ardestani et al., 2017).

### 6.5.2. Antagonistes adrénérgiques

Au niveau des **antagonistes des récepteurs  $\alpha_1$**  on trouve la **Doxazosine** mais surtout la plus commune **Prazosine**. La Prazosine, originellement utilisée comme anti-hypertensif, est capable de réduire la génération d'amyloïde  $\beta$  en culture cellulaire, et de prévenir les déficits de mémoire dans un modèle murin d'Alzheimer (Katsouri et al., 2013).

Il existe de multiples **antagonistes des récepteurs  $\alpha_2$** , avec par exemple la **Yohimbine**, l'Atipamezole, la Mirtazapine ou encore l'Idazoxan. **Atipamezole, Mirtazapine et Idazoxan** ont été montré comme induisant une augmentation des niveaux de noradrénaline par action sur les autorécepteurs  $\alpha_2$  (Laitinen et al., 1995; de Boer et al., 1996; Gobert et al., 1997; Anttila and Leinonen, 2001). Dans le cadre du syndrome de Rett, une maladie dans laquelle les patients présentent une réduction des niveaux cérébraux de noradrénaline et peuvent présenter des crises épileptiques (Roux and Villard, 2010) la Mirtazapine a des effets bénéfiques sur la morphologie des neurones du cortex somatosensoriel et un rétablissement de l'activité glutamatergique et GABAergique dans le tronc cérébral (Bittolo et al., 2016). Chez des patients atteints de démence de type frontal, l'Idazoxan a, quant à lui, permis d'améliorer les performances de ces derniers dans des tests d'attention, de planification ou encore de mémoire épisodique (Coull et al., 1996).

Enfin, le **Propranolol** est l'**antagoniste des récepteurs  $\beta$**  le plus communément utilisé et a été montré comme efficace dans le traitement de la dyskinésie tardive. La dyskinésie tardive consiste en des mouvements répétitifs involontaires apparaissant souvent chez les patients recevant des bloqueurs des récepteurs dopaminergiques, comme c'est le cas chez les patients schizophrènes (Hatcher-Martin et al., 2016).

Une très grande variété de molécules pharmacologiques impactant la synthèse noradrénergique est donc disponible. Ces molécules permettent l'étude de la déplétion noradrénergique, de sa supplémentation, de l'impact de lésions des neurones du locus coeruleus sur les fonctions modulées par la noradrénaline. Des molécules agonistes, ou antagonistes des différents récepteurs adrénergiques ont permis de mettre en évidence de

potentielles approches thérapeutiques dans des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, dans lesquelles une atteinte noradrénergique a été mise en évidence. Ainsi, une large palette de traitements pharmacologiques s'offre à nous afin d'étudier le système noradrénergique, jusqu'alors assez peu exploré, dans le contexte de la sclérose latérale amyotrophique.

## Revue – Le dysfonctionnement des circuits corticaux comme potentiel moteur de Sclérose Latérale Amyotrophique

Brunet A, Stuart-Lopez G, Burg T, Scekic-Zahirovic J, Rouaux C (2020) Cortical Circuit Dysfunction as a Potential Driver of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurosci* 14:363.



# Cortical Circuit Dysfunction as a Potential Driver of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Aurore Brunet<sup>†</sup>, Geoffrey Stuart-Lopez<sup>†</sup>, Thibaut Burg<sup>†</sup>, Jelena Scekcic-Zahirovic<sup>†</sup> and Caroline Rouaux<sup>\*</sup>

INSERM UMR\_S 1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Sabine Liebscher,  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München, Germany

### Reviewed by:

Valentina Bonetto,  
Mario Negri Institute  
for Pharmacological Research, Italy  
Foteini Christidi,  
National and Kapodistrian University  
of Athens, Greece

### \*Correspondence:

Caroline Rouaux  
caroline.rouaux@inserm.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Neurodegeneration,  
a section of the journal  
Frontiers in Neuroscience

Received: 31 December 2019

Accepted: 25 March 2020

Published: 29 April 2020

### Citation:

Brunet A, Stuart-Lopez G, Burg T,  
Scekcic-Zahirovic J and Rouaux C  
(2020) Cortical Circuit Dysfunction as  
a Potential Driver of Amyotrophic  
Lateral Sclerosis.  
Front. Neurosci. 14:363.  
doi: 10.3389/fnins.2020.00363

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease that affects selected cortical and spinal neuronal populations, leading to progressive paralysis and death. A growing body of evidences suggests that the disease may originate in the cerebral cortex and propagate in a corticofugal manner. In particular, transcranial magnetic stimulation studies revealed that ALS patients present with early cortical hyperexcitability arising from a combination of increased excitability and decreased inhibition. Here, we discuss the possibility that initial cortical circuit dysfunction might act as the main driver of ALS onset and progression, and review recent functional, imaging and transcriptomic studies conducted on ALS patients, along with electrophysiological, pathological and transcriptomic studies on animal and cellular models of the disease, in order to evaluate the potential cellular and molecular origins of cortical hyperexcitability in ALS.

**Keywords:** amyotrophic lateral sclerosis, cerebral cortex, hyperexcitability, network dysfunction, intrinsic, extrinsic

## INTRODUCTION

### Definition and Epidemiology of ALS

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset neurodegenerative disease of the motor neuron. It manifests as an initial focal muscular weakness and progresses into full paralysis of most of the skeletal muscles. ALS leads rapidly to death with a median survival of only 2 to 3 years of diagnosis. ALS was named after the initial histological description made by French neurologist Jean-Martin Charcot in 1869 (Charcot, 1874), who reported two pathological hallmarks in the spinal cord of patients: the degeneration of the corticospinal tract (CST), in the lateral columns (lateral sclerosis), and the disappearance of the spinal motor neurons (amyotrophic), in the ventral horns. This initial histological definition still corresponds to the current clinical definition of the disease. Indeed ALS is diagnosed when signs of corticospinal and corticobulbar neurons (CSN) degeneration (i.e., slowness of motions, hyperreflexia, spasticity), and of bulbar and spinal motor neurons (MN) degeneration (i.e., muscular weakness and atrophy, fibrillations, and fasciculations) are found in combination (Brown and Al-Chalabi, 2017; van Es et al., 2017). Above these precise histological and clinical descriptions, it is now also broadly admitted that ALS is a heterogeneous multisystem disease that also implies frequent extramotor

symptoms, and particularly behavioral and cognitive deficits, as well as defective energy metabolism (Dupuis et al., 2011).

ALS is the third most frequent neurodegenerative disease after Alzheimer's and Parkinson's diseases, with an incidence of 2.6/100,000 person-years and a prevalence of 7–9/100,000 persons (Hardiman et al., 2017b), which reflects the rapid progression of the disease even if very rare cases exist that evolve over decades. ALS affects mostly people in their late fifties, and is overall 1.5 times more frequent amongst men than women (Brown and Al-Chalabi, 2017; Rosenbohm et al., 2018). The vast majority of patients (90%) are considered sporadic, with no familial history. The remaining 10% instead are familial cases with a usually dominant transmission and a high penetrance (Brown and Al-Chalabi, 2017). More than 120 genetic mutations have been associated to ALS, and amongst those, at least 25 genes related to either familial or sporadic ALS, or both (Brown and Al-Chalabi, 2017). About 70% of familial ALS cases, and as much as 15% of sporadic ALS cases, have now been related to mutations (Chia et al., 2017). The most common causative genes are *C9ORF72* (close to 45% of familial cases), *SOD1* (close to 20% of familial cases), *FUS* and *TARDBP* (about 4% of familial cases each) (Brown and Al-Chalabi, 2017; Chia et al., 2017). These familial cases have greatly contributed to the study of the presymptomatic period, and the identification of the causative genes have and continue to inform the development of cellular and animal models of the disease.

### The Debated Origin of ALS

The duality of the neuronal impairments that characterizes ALS is likely responsible for the greater severity of the disease in comparison with neurodegenerative diseases that target only the CSN (hereditary spastic paraplegia, primary lateral sclerosis) or the MN (Kennedy's disease, adult-onset spinal and muscular atrophy) (Sorenson, 2012). But this duality also raised the question of the origin of the disease, which remains controversial (Ravits and La Spada, 2009).

For Charcot, ALS was a progressive descending neurodegeneration, initiated in the motor cortex, spreading to the MN and ultimately affecting the neuromuscular junctions (Eisen et al., 1992), a view which was later called the “dying-forward” hypothesis. This view was further supported by typical symptoms revealed by deep clinical examinations, such as gait abnormalities or the split hand syndrome, which are highly suggestive of a cortical origin of the disease (Eisen et al., 1992, 2017). Two alternative scenarios were proposed later: a simultaneous and independent degeneration of CSN and MN – which was quickly abandoned, due to the somatotopic relationship that exists between CSN and MN degenerations – and a retrograde progression of the neurodegeneration, known as the “dying-back hypothesis” (for review, see Eisen and Weber, 2001). With the numerous rodent models that followed the discovery of *SOD1* (Lutz, 2018), and the more recent emergence of induced MN from ALS patients' iPSC (Guo et al., 2017), the vast majority of preclinical studies have concentrated on deciphering the mechanisms involved in MN degeneration, implicitly favoring the “dying-back” hypothesis.

## Arguments Toward a Cortical Origin

### Genetic and Clinical Evidences

Recent genetic data have established a clear link between ALS and frontotemporal dementia (FTD), a neurodegenerative disease that affects the frontal and temporal cortices and results in behavioral and cognitive deficits. Mutations on several common genes have been identified in ALS and FTD familial cases (Ling et al., 2013). While the clinical presentations of ALS and FTD are extremely different, about 15% of ALS patients develop over time behavioral and cognitive deficits typical of FTD, and about 15% of FTD patients develop over time motor impairments typical of ALS (Ling et al., 2013). Finally, the link between ALS and FTD is also pathologic: the vast majority of ALS patients, whether of familial or sporadic origin, and as much as 45% of FTD patients present with the so-called TDP-43 pathology, i.e., toxic intracytoplasmic inclusions of a phosphorylated and misfolded form of the TDP-43 protein (Neumann et al., 2006; Ling et al., 2013). Altogether, genetic, clinical and pathological data have converged to unravel a strong link between ALS and FTD. Both diseases are thus currently seen as the two extremes of a single clinical continuum, with identified common denominators among which is a shared affected region of the central nervous system, the cerebral cortex, which stresses a potential primary contribution of this structure to both diseases.

### Histopathological Clues and the Corticofugal Hypothesis

Extensive examination of the TDP-43 pathology in post-mortem brains from ALS patients has shown that the motor cortex is the most affected region of the brain, together with the brain stem and spinal cord (Brettschneider et al., 2013). Importantly, by assessing the extent of the TDP-43 pathology in other brain regions, the authors proposed a “corticofugal hypothesis of ALS,” with an origin of the pathology in the motor cortex, followed by a sequential corticofugal pattern of progression to the downstream targets of the motor cortex via a direct, mono-synaptic transmission, similar to a prion-like mechanism (Braak et al., 2013). Such a corticofugal propagation of neurodegeneration is supported by longitudinal diffusion tensor imaging studies with tractography or connectome analysis of ALS patients (Verstraete et al., 2013; Kassubek et al., 2014). These pathology and imaging data further support a primary impairment of the motor cortex in ALS.

### Functional Studies and Early Cortical Hyperexcitability

Transcranial magnetic stimulation studies unraveled early hyperexcitability as a marker of cortical dysfunction in sporadic and familial ALS patients (Vucic and Kiernan, 2017). Importantly, longitudinal studies in pre-symptomatic *SOD1* mutation carriers revealed that cortical hyperexcitability develops prior to clinical onset of ALS (Vucic et al., 2008), and characterizes also early sporadic patients (Mills and Nithi, 1997; Zanette et al., 2002; Vucic, 2006; Hardiman et al., 2017a). The fact that cortical hyperexcitability negatively correlates with disease progression and survival (Shibuya et al., 2016) highlights the relevance of early cortical dysfunction to ALS onset and

progression. Cortical hyperexcitability has been proposed to translate into glutamatergic excitotoxicity to the downstream targets of CSN, and possibly of the whole corticofugal population (Geevasinga et al., 2016; Eisen et al., 2017; Vucic and Kiernan, 2017), contributing to the degeneration of spinal MN via an anterograde trans-synaptic mechanism (Eisen et al., 1992; Vucic and Kiernan, 2017).

#### First Connection Between Hyperexcitability and Pathology

In a recent article, Weskamp et al. (2019) investigated, in iPSC-derived glutamatergic neurons and in mouse primary cortical neurons, the link between hyperexcitability and TDP-43 pathology (Weskamp et al., 2019). In iPSC-derived glutamatergic neurons, neuronal activity was either induced with the potassium channel blocker tetraethylammonium (TEA) or blocked with the sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX). In mouse primary cortical neurons, activity was induced or inhibited by glutamate or GABA, respectively. The authors elegantly demonstrated in the two models that increased neuronal activity was accompanied with increased TDP-43 immunoreactivity (Weskamp et al., 2019). They also demonstrated that hyperexcitability induced alternative splicing of *TARDBP* mRNA, leading to the up-regulation of a short isoform of the transcript. This short TDP-43 (sTDP-43) corresponded to the N-terminal part of the full-length protein, and contained a newly identified nuclear export sequence, leading to its cytoplasmic accumulation (Weskamp et al., 2019). Importantly, similar sTDP43 inclusions were identified within the spinal cord and cortex of sporadic ALS and *C9ORF72* ALS patients (Weskamp et al., 2019). In its whole, this study demonstrated for the first time a pivotal connection between neuronal hyperexcitability and TDP-43 pathology, and further supports the earliness of hyperexcitability in the cascade of pathologic events that characterize ALS.

In this review, we present a collection of studies spanning from clinical neurology to electrophysiology, pathology and transcriptomics, in order to interrogate the potential cellular and molecular origins of cortical hyperexcitability in ALS.

### EVIDENCES FOR CORTICAL CIRCUITS DYSFUNCTION IN ALS

#### Cortical Excitability and Hyperexcitability

The terms “excitability” and “conductivity” were primarily related to the investigation of electrical properties of individual neurons and defined respectively as the capability of a structure to respond to a given electrical stimulus by generating an action potential (excitability) and to propagate it along its membrane (conductivity) (Hodgkin and Huxley, 1952). In this regard, “hyperexcitability” was thus initially considered as a decreased threshold of axonal membrane to respond to a stimulus. This initial definition evolved together with the methods to assess excitability at multiple levels of the nervous system. These span from the study of individual neuronal ion channels *ex-vivo*, to the investigation of entire brain regions with transcranial magnetic stimulation (TMS) in clinical neurology (Bakulin et al., 2016).

Consequently, the term “hyperexcitability” adapted to describe more broadly an altered electrical activity of various entities, from ion channels to highly specialized neuronal networks, but still lacks a commonly accepted definition. Indeed, it varies from “the ability to respond to stimuli that normally do not evoke any response” (Bakulin et al., 2016), to “an increased or exaggerated response to a stimulus, which may usually have been expected to evoke a normal response” (Bae et al., 2013), to “the predominance of excitation over inhibition” (Bakulin et al., 2016).

Cortical excitability is critically dependent on healthy, balanced, excitatory and inhibitory components. Under physiological conditions, the ratio of excitation to inhibition is invariant and dynamically controlled by the interaction of neurotransmitters and neuromodulators with cellular receptors, leading to the final activation of neurons (Badawy et al., 2012). In the cerebral cortex, this balance is mainly equilibrated by two neurotransmitters, the excitatory glutamate that acts on N-methyl-d-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors, and the inhibitory gamma-aminobutyric acid (GABA) that binds GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors (Badawy et al., 2012). Perturbation of the excitatory/inhibitory balance can lead to pathological changes in cortical excitability and to the development of neurological disease (Bozzi et al., 2017; Foss-Feig et al., 2017; Vucic and Kiernan, 2017). First attempts to assess cortical excitability were made some 40 years ago when Merton and Morton successfully stimulated the motor cortex by using transcranial electrical stimulation (TES) and delivered electrical impulses, through the scalp, to the primary motor cortex, activating underlying neurons and inducing the twitch of corresponding muscles (Merton and Morton, 1980). Despite their important achievement, the procedure was extremely painful, and Anthony T. Barker began exploring the use of magnetic fields to replace electrical stimulations. First stable transcranial magnetic stimulation devices were developed in the mid-1980s (Barker and Freeston, 1985). Using TMS, Ly et al. (2019) described cortical excitability as the strength of the response of cortical neurons to a given stimulation reflecting both neuron reactivity and response specificity and therefore constituting a fundamental aspect of human brain function.

#### TMS Assessment of Cortical Hyperexcitability in ALS

Commonly observed clinical features in ALS like brisk deep tendon reflexes and spasticity, that occur as a result of CSN failure, and spontaneous muscle twitching (fasciculation) and cramps that occur when MN become affected (Brown and Al-Chalabi, 2017), are considered to result from excessive electrical irritability (reviewed in Kleine et al., 2008). Caramia et al. (1991) conducted one of the first single pulse TMS paradigm (spTMS) studies to investigate excitability changes of motor responses to magnetic brain stimulation in patients with motor impairment (hyperreflexia, spasticity, and weakness) in the contexts of multiple sclerosis, ALS, spino-cerebellar ataxia, primary lateral sclerosis, and brain metastasis. ALS patients presented a particularly low threshold to induce motor evoked potential (MEP) (Caramia et al., 1991). Following spTMS studies

confirmed this lower “cortical” or “corticomotor” threshold, early in the disease and an increase of this same threshold as disease progressed (Eisen et al., 1993; Mills and Nithi, 1997; Desiato et al., 2002; Mills, 2003; Prout and Eisen, 2004). Lower cortical threshold suggested that the motor cortex of ALS patients was indeed hyperexcitable, at least at the beginning of the clinical manifestations (Caramia et al., 1991; Zanette et al., 2002).

Conventional paired pulse TMS paradigm (cppTMS), in which two stimuli, conditioning and test, are successively applied, allowed to further dissect components of motor cortex excitability (Kujirai et al., 1992; Nakamura et al., 1997) and provided evidences for the existence of early and late intracortical inhibition (ICI), as well as an intracortical facilitation (ICF) of the motor cortex (Nakamura et al., 1997).

The increasing knowledge about cortical hyperexcitability in ALS mainly comes from long and extensive work by the Australian group of researchers lead by Prof. M. Kiernan that introduced the threshold tracking variant of paired pulse (tppTMS) (Vucic, 2006), along with several new parameters including: short interval intracortical inhibition (SICI), ICF, the long interval intracortical inhibition (LICI) and the short interval intracortical facilitation (SICF), cortical silent period duration (CSP), and index of excitation, all relevant in clinical research, diagnosis and understanding of ALS pathogenesis (reviewed in Rossini et al., 2015; Van den Bos et al., 2018). Reduction or absence of SICI, and increase of ICF have emerged as the two most robust biomarkers of cortical hyperexcitability in ALS (Vucic and Kiernan, 2017), and cortical hyperexcitability was identified as an intrinsic and early feature characterizing both sporadic and familial ALS cases (Vucic et al., 2008), thereby suggesting a similar pathophysiological process (Figure 1). Importantly, reduction of SICI negatively correlates with survival of ALS patients (Shibuya et al., 2016), and increased index of excitation negatively correlated with the Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale-Revised score (ALS-FRS) (Van den Bos et al., 2018) highlighting the pathogenic importance of cortical hyperexcitability in ALS. In some familial cases that arise from the mutation of a known gene, cortical hyperexcitability has also been detected pre-symptomatically. This is the case of the *SOD1* mutation carriers (Vucic, 2006; Menon et al., 2015), but not the *FUS* or *C9ORF72* mutation carriers (Blair et al., 2010; Geevasinga et al., 2016).

Interestingly, cortical hyperexcitability (i.e., a combination of decreased SICI and/or CSP and/or increased ICF) was also reported in atypical forms of ALS, such as the primary lateral sclerosis (Geevasinga et al., 2016) characterized by a predominant upper motor neuron (UMN) phenotype, but also, and this is more surprising, the flail leg syndrome (Menon et al., 2016), characterized by a predominant lower motor neuron phenotype with absent or subtle UMN signs. Finally, cortical hyperexcitability has also been demonstrated in patients suffering from FTD (Bae et al., 2016). These studies indicate that cortical hyperexcitability is altogether a typical feature of ALS and closely related diseases, an early biomarker of the disease and a putative prognostic marker, highlighting a potentially important role of cortical circuits dysfunction in ALS pathogenesis.

Short interval intracortical inhibition and cortical silent period are believed to respectively reflect GABA actions on GABA<sub>A</sub> (Di Lazzaro et al., 2012, 2013) and GABA<sub>B</sub> (Chen et al., 2008) receptors, while ICF is believed to reflect activity of the glutamatergic system (Chen et al., 1998). Loss of GABAergic cortical inhibition was further confirmed by Positron Emission Tomography studies with the GABA<sub>A</sub>-selective radiotracer [<sup>11</sup>C] Flumazenil that showed binding reductions in sporadic or familial ALS patients compared to controls (Lloyd et al., 2000; Turner et al., 2005; Wicks et al., 2009; Yabe et al., 2012). As of today, it is admitted that dysfunction or degeneration of cortical inhibitory and excitatory components contribute together to cortical hyperexcitability in ALS, and not solely decreased inhibition or increased excitation (Nihei et al., 1993; Ziemann et al., 1996; Enterzari-Taheer et al., 1997; Zanette et al., 2002; Karandreas et al., 2009).

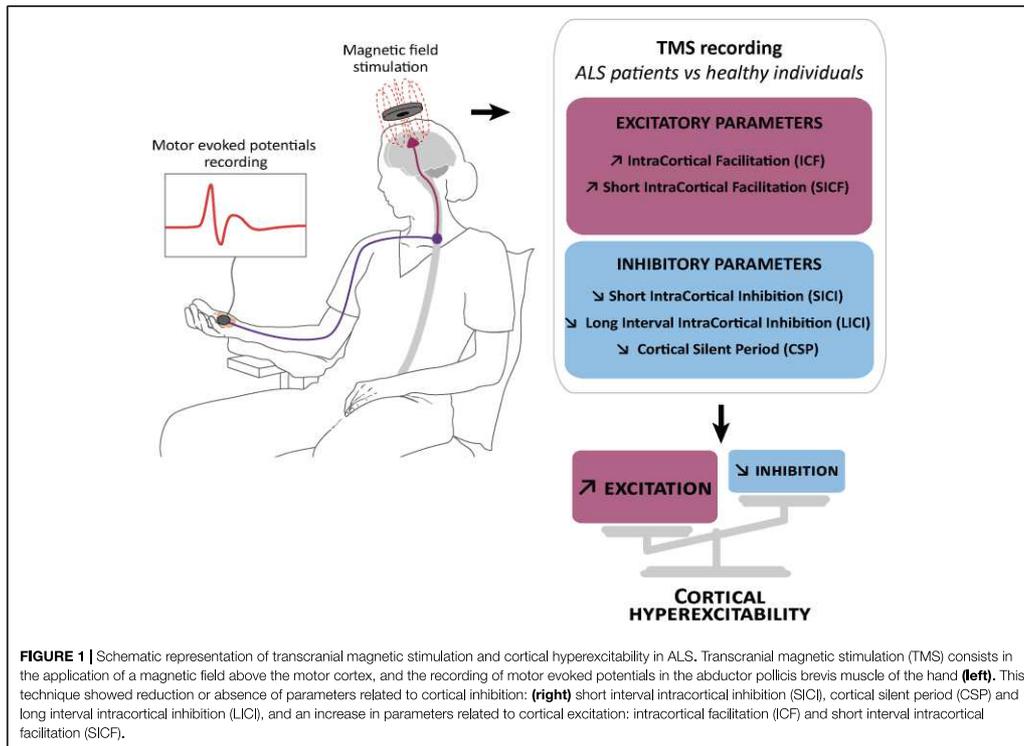
### Neuroimaging Studies in ALS

Several functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies reported increased functional connectivity (or hyperconnectivity) in the brain of ALS patients compared to controls (Lulé et al., 2007; Douaud et al., 2011; Menke et al., 2016; Schulthess et al., 2016; Agosta et al., 2018), which was also confirmed by electroencephalography (EEG) (Iyer et al., 2015) and resting state magnetoencephalography (MEG) (Proudfoot et al., 2018).

In a longitudinal fMRI study on cortical representation of motor imagery and function during execution task, Lulé et al. (2007) reported a stronger response within premotor and primary motor areas for imagery and execution in ALS patients compared to controls at two time points, and a spread of this increased activity to the precentral gyrus and frontoparietal network at the second time point, indicating a progression over time. Cross-sectional and longitudinal analysis of resting state fMRI (RS-fMRI) data revealed increased functional connectivity successively in the motor, brainstem, ventral attention, and default mode/hippocampal networks (Schulthess et al., 2016), confirming widespread effect on connected brain networks. A recent modeling study based on MRI scans allowed predicting late stage disease burden based on early stage white matter alterations (Meier et al., 2020), further supporting disease spread from the motor cortex along white matter tracts in a spatiotemporal manner (Meier et al., 2020). Together, these studies support disease progression along the corticofugal tracts.

Two scenarios have been proposed to explain increased functional connectivity: first, recruitment of additional brain structures to compensate for the impairment between major nodes of functional networks, and second, loss of inhibitory influence resulting in increased correlation of spontaneous blood-oxygen-level-dependent signals (Douaud et al., 2011).

Increased functional connectivity upon loss of cortical inhibition in ALS is supported by PET studies (Lloyd et al., 2000) and post-mortem histological analyses (Nihei and Kowall, 1993; Nihei et al., 1993; Petri et al., 2003, 2006; Maekawa et al., 2004) (detailed in the section “Cortical Inhibitory GABAergic Interneurons in ALS”), and is in accordance with cortical



hyperexcitability revealed by TMS (Vucic, 2006), and further supported by a recent MEG study (Proudfoot et al., 2016).

Few studies on asymptomatic mutation carriers exist that highlight the earliness of cortical impairment in ALS. A functional MEG study reported excess beta-band desynchronization during movement execution in asymptomatic *C9ORF72* mutation carriers (Proudfoot et al., 2016). Similarly, DTI and RS-fMRI analyses revealed increased functional connectivity in asymptomatic *SOD1* or *C9ORF72* mutation carriers (Menke et al., 2016).

While the numerous neuroimaging studies conducted on ALS patients (further reviewed in Chiò et al., 2014; Proudfoot et al., 2019) do not formally demonstrate a cortical origin of ALS, they nevertheless confirm (i) pre-symptomatic cortical dysfunction, (ii) cortical hyperexcitability, and (iii) disease propagation along the cortical connectomes.

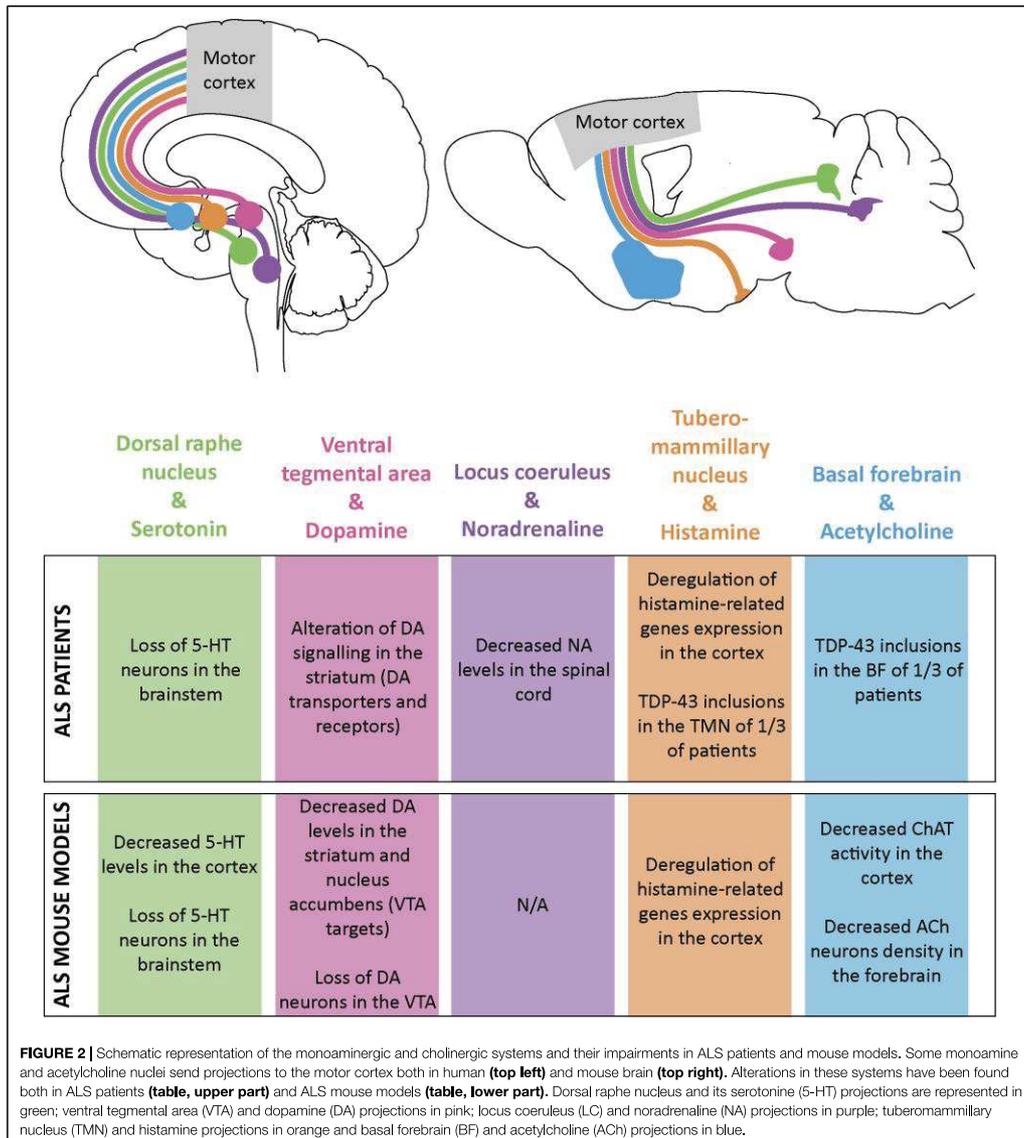
## CORTICOPETAL MODULATIONS OF CORTICAL EXCITABILITY AND ALS

The cerebral cortex sends numerous corticofugal projections to the forebrain, midbrain and hindbrain, and as far as the spinal

cord. Similarly, it receives a vast array of corticopetal projections from distant structures that influence its overall activity by the mean of various neuromodulators, the monoamines and acetylcholine (for excellent reviews see Gu, 2002; Vitrac and Benoit-Marand, 2017). This complex regulatory system includes the cholinergic neurons of the basal forebrain, the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus in the hypothalamus, the serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus, the dopaminergic neurons of the ventral tegmental area (VTA), and the noradrenergic neurons of the locus coeruleus (**Figure 2**). ALS patients present different levels of alteration of these pathways that could all account for cortical dysfunction in the disease (**Figure 2**).

## Serotonin and the Dorsal Raphe Nucleus

Serotonin is involved in numerous functions including sleep, attention or sensory information processing. Serotonergic neurons are confined to seven raphe nuclei of the brainstem. Their projections innervate a wide range of structures including the cerebral cortex, hypothalamus, amygdala, hippocampus, cerebellum, and spinal cord. The cerebral cortex is more specifically innervated by the dorsal raphe nucleus (Nestler et al., 2015). In Human, 13 serotonin receptors have been identified



amongst which only one is ionotropic and depolarizing. The 12 others are metabotropic with either excitatory or inhibitory effects. In the rodent motor cortex, serotonergic projections are found in every cortical layers (Vertes et al., 1999) and mainly act on excitatory neurons (Santana, 2004). In Human, both acute and chronic administration of paroxetine, a selective serotonergic

reuptake inhibitor increased excitability of the motor cortex, as assessed by TMS (Loubinoux et al., 2005). This motor output facilitation was further confirmed by pharmacological and electrophysiological manipulations in the rat (Scullion et al., 2013). It is hypothesized that this effect is mediated by activation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor expressed by GABAergic interneurons,

its hyperpolarizing effect on inhibitory neurons resulting in the release of inhibition on excitatory neurons (Puig et al., 2010; Vitrac and Benoit-Marand, 2017).

Serotonergic neurons also innervate the spinal cord and lower MN in particular. Serotonin action on motoneurons increases persistent calcium current, contributing to the maintenance of their excitability (Heckman et al., 2009). Dentel et al. (2013) showed the degeneration of serotonergic projections to the spinal cord and hippocampus, sometimes accompanied with the loss of serotonergic neuron cell bodies in the brainstem of ALS patients. The *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS displayed similar serotonergic degeneration, along with a presymptomatic decrease of serotonin levels in the brainstem and spinal cord (Dentel et al., 2013). Loss of serotonin innervation of motoneurons was accompanied by up-regulation of the constitutively active 5-HT<sub>2B/C</sub> receptors, involved in the development of spasticity (Dentel et al., 2013). Degeneration of serotonergic neurons in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice was involved in the spasticity recorded in end-stage animals (Oussini et al., 2017), and treatment of the *Sod1*<sup>G86R</sup> animals with a serotonin inverse agonist abolished end-stage spasticity (Dentel et al., 2013). Importantly, maintenance of serotonergic neurons and projection to the spinal cord in *Sod1*<sup>G86R</sup> animals accelerated appearance of disease onset and worsened motoneuron degeneration without affecting the survival of the animals (Oussini et al., 2017). On the other hand, inhibition of serotonin reuptake by administration of Fluoxetine to 30 day-old presymptomatic or 70 day-old symptomatic *SOD1*<sup>G93A</sup> mice did not affect their survival or motor performances, but transient postnatal Fluoxetine administration proved to be detrimental (Koschnitzky et al., 2014). In all, these studies demonstrated that early stimulation of the serotonergic system in ALS mouse models, either by preventing loss of serotonergic neurons (Oussini et al., 2017), or by treatment of young pups with serotonin reuptake inhibitor may have detrimental effects on disease onset and progression (Koschnitzky et al., 2014). It would be particularly interesting to investigate whether decreased levels of cortical serotonin observed in presymptomatic *Sod1*<sup>G86R</sup> mice (Dentel et al., 2013) has an impact of cortical network function. If similar mechanisms occur in the cortex and spinal cord, it is possible that decreased levels of cortical serotonin could be compensated by the up-regulation of constitutively active serotonergic receptors. This could very well contribute to overall cortical hyperexcitability. Interestingly, decreased binding of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor PET radiotracer [<sup>11</sup>C]-WAY100635 was reported in several cortical areas of sporadic ALS patients compared to controls (Turner et al., 2005; Figure 2), but to our knowledge, binding to the constitutively active 5-HT<sub>2B/C</sub> receptors in the cerebral cortex of ALS patients has not been reported yet.

### Dopamine and the Ventral Tegmental Area

Dopamine neurons are located in the VTA and the substantia nigra pars compacta (SNc), both found in the brainstem. Dopaminergic projections reach different cortical areas, including the motor cortex, with a predominance in the frontal

cortex, along with other structures: nucleus accumbens, striatum and hippocampus (Nestler et al., 2015). These dopaminergic projections to the motor cortex arise from the VTA and mostly target the deep layers (Vitrac and Benoit-Marand, 2017). While it is not yet clear whom of the excitatory projection neurons and inhibitory interneurons express D1 like and D2 like receptors, stimulation of the VTA of anesthetized rats induced a fast excitatory-inhibitory response of M1 neurons leading to overall facilitation of motor output to forelimb muscles (Kunori et al., 2014). However, depressions of cortical neuronal activity in response to dopamine were also reported (Gu, 2002; Vitrac and Benoit-Marand, 2017). A TMS study carried on healthy individuals showed that the receptor agonist cabergoline, thought to act mostly on D2 and D3, decreased cortical excitability (by increasing SIC1) (Korchounov et al., 2006). Similarly, enhanced cortical inhibition by dopamine receptor agonists pergolide and bromocriptine, and decreased cortical inhibition by dopamine receptor antagonist haloperidol were previously reported (Ziemann et al., 1996). These data suggest that dopamine may act as a brake to motor cortex excitability in humans.

This hypothesis is further supported by data obtained from Parkinson's disease patients. Parkinson's disease arises from the degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (Michel et al., 2016), but loss of neurons in the VTA has also been reported (Alberico et al., 2015). Interestingly, Parkinson's disease was also associated with cortical hyperexcitability mostly arising from decreased inhibition which can be partially reversed by dopaminergic therapies (Ridding et al., 1995; Vucic and Kiernan, 2017). Dopaminergic impairment (Martorana, 2014) and cortical hyperexcitability (Vucic and Kiernan, 2017) have also been documented in Alzheimer's disease. Similarly to the effect of dopaminergic therapies on cortical excitability in Parkinson's disease, L-Dopa restored normal intra-cortical inhibition in Alzheimer patients (Martorana, 2014). These data suggest that dopamine is involved in the modulation of cortical activity and that dopaminergic system impairment can lead to loss of cortical inhibition, and potentially to cortical hyperexcitability.

Less is known about potential dopaminergic impairment in ALS. Single photon emission computed tomography (SPECT) studies revealed a decrease of dopaminergic terminals in the putamen and caudate nucleus of ALS patients (Borasio et al., 1998), and a decrease of striatal D2 receptors (Vogels et al., 2000) without neuronal loss. Interestingly Vogels et al. (2000) attributed the loss of D2 receptor to increased glutamatergic signaling from the cerebral cortex, via the corticostriatal pathway. Fu et al. (2017) also reported on the reduced binding of <sup>18</sup>F-fallypride (D2/D3 antagonist) in different regions of the cerebral cortex. However, these studies did not investigate or report on dopaminergic signaling onto the motor cortex itself. In end-stage *SOD1*<sup>G93A</sup> mice, Kostic et al., 1997 reported decreased levels of dopamine in the caudate-putamen and nucleus accumbens, together with a loss of dopaminergic neurons in both the VTA and the substantia nigra pars compacta. In the same mouse line, MRI analysis recently confirmed VTA impairment and immunohistology revealed a loss of up to 50% of dopaminergic neurons in the VTA, and vacuolization of the remaining ones at disease end-stage

(Jouroukhin et al., 2013; **Figure 2**). Given the likely inhibitory role of dopamine on cortical networks, and the clinical and preclinical arguments indicating an impairment of the dopaminergic system in ALS patients and mouse models, it would be interesting to determine whether such impairment could also affect the motor cortex and contribute to its hyperexcitability.

### Noradrenaline and the Locus Coeruleus

The large majority of noradrenaline (or norepinephrine) is produced by neurons located in the locus coeruleus, a nucleus lying on the floor of the 4th ventricle in the rostral pons. A small proportion of the noradrenaline also arises from the brainstem and the lateral tegmental regions (Nestler et al., 2015; Schwarz and Luo, 2015). The only source of cortical noradrenaline is the locus coeruleus, which also innervates other regions of the forebrain, the brainstem, the cerebellum and the spinal cord. In the motor cortex, noradrenergic projections innervate every cortical layers but a greater density is found in layer I and layer VI (Agster et al., 2013). Noradrenaline acts on adrenergic receptors, which are G-protein coupled receptors. This family is composed of nine members that belong to the  $\alpha$ - or  $\beta$ -subfamilies, both types found in the cerebral cortex. Whereas all  $\beta$ -receptors are excitatory,  $\alpha$ -receptors can be excitatory or inhibitory, depending on the G-protein. Treatment with selective noradrenaline reuptake inhibitor or  $\alpha_2$  antagonist demonstrated in TMS that noradrenaline enhanced cortical excitability in healthy humans (Plewania et al., 2001).

Pathological studies revealed neurofibrillary tangles in the locus coeruleus of ALS patients (Orrell et al., 1995) but apparently no TDP-43 pathology (Brettschneider et al., 2013) or cell loss (Hoogendijk et al., 1995). However, liquid chromatography analysis of spinal cord samples from ALS patients revealed reduced levels of noradrenaline compared to controls (Bertel et al., 1991), suggesting that noradrenergic impairment could occur in ALS, without necessary loss of neurons in the locus coeruleus (**Figure 2**). If little is known about the state of the locus coeruleus and the noradrenergic system in ALS, this is not the case under other neurodegenerative conditions, and more particularly in PD and AD (for excellent review, see Marien et al., 2004) where neuronal loss in the locus coeruleus is more important than in the substantia nigra in PD, or the nucleus basalis in AD (Zarow et al., 2003).

### Histamine and the Tuberomammillary Nucleus

In the brain, histamine is synthesized exclusively by neurons located in the tuberomammillary nucleus which lies within the posterior hypothalamus (Nestler et al., 2015), and is implicated in sleep-wake cycle, nociception, motor circuits, satiety signaling, and neuroimmune functions (Panula and Nuutinen, 2013). Histaminergic neurons project both in the brain and the spinal cord with dense projections to the cerebral cortex. Histamine acts as a neurotransmitter and activates four subfamilies of metabotropic receptors,  $H_{1-4}$  leading either to neuronal depolarization or hyperpolarization of neurons, depending on the identity of the G-protein (Haas and Panula, 2003; Shan et al.,

2015). In the rodent motor cortex, histaminergic projections are found in every cortical layers (Panula et al., 1989) and can act both on excitatory and on inhibitory neurons. In addition to direct connections to the cerebral cortex, histamine may also indirectly influence cortical function via activation of cholinergic basal forebrain neurons and induction of acetylcholine release in the cortex (Cecchi et al., 2001; Zant et al., 2012). Finally, treatment with  $H_3$  receptor inverse agonist was shown to trigger increased levels of serotonin, noradrenaline and dopamine in the rat prefrontal cortex highlighting a potential central role of histamine in regulating the function of several cortical areas (Flik et al., 2015).

Detailed analysis of the hypothalamus of ALS patients revealed the presence of TDP-43 pathology in 5/28 cases (Cykowski et al., 2014), suggesting that neurons of the tuberomammillary nucleus may not be a primary target of the TDP-43 pathology, and may maintain, in most cases their function. The group of Sebastiano Cavallaro characterized the transcription profile of the motor cortex from sporadic ALS patients compared to healthy individuals (Aronica et al., 2015). Further data mining allowed them to identify the significant up-regulation of the genes involved in histamine synthesis (histidine decarboxylase, HDC) and catabolism (histamine N-methyl transferase and diamine oxidase, HNMT) (Apolloni et al., 2017). These data were further corroborated by western blot analyses of *SOD1<sup>G93A</sup>* mouse cerebral cortex showing transient symptomatic up-regulation of HDC and HNMT, along with early up-regulation of  $H_4$  and late up-regulation of  $H_1$  receptors (Apolloni et al., 2017). Together these studies suggest that in ALS patients and mouse models the histaminergic system may be overall up-regulated, similarly to what has been reported for Parkinson's or Huntington's diseases (Shan et al., 2015). Importantly, symptomatic treatment of *SOD1<sup>G93A</sup>* mice with histidine, the brain-permeable precursor of histamine, improved motor performance and increased survival (Apolloni et al., 2019). Whether this beneficial effect can solely be attributed to an anti-inflammatory response of cortical and spinal microglia, or to additional improvement of cortical and spinal network functions remains to be determined, but this seminal study strongly highlights the histaminergic system as a new therapeutic target in ALS (Apolloni et al., 2019; **Figure 2**). In addition to its direct effect on cortical cells and networks, histamine's indirect effects via serotonin, noradrenaline, and dopamine (Flik et al., 2015), all known to also modulate motor cortex activity (Vitrac and Benoit-Marand, 2017), make this monoamine a particularly interesting neuromodulator to follow in the context of ALS cortical dysfunctions and therapeutic intervention.

### Acetylcholine and the Basal Forebrain

In the human brain, the vast majority of cholinergic neurons are found clustered in eight small nuclei located in the basal forebrain and the brainstem, but scattered cholinergic neurons are also present in different brain regions (Nestler et al., 2015). Cholinergic projections to the cerebral cortex arise mostly from the nuclei of the basal forebrain, and more particularly the nucleus basalis and the substantia innominata, and follow a precise and complex topographical organization

(reviewed in Ballinger et al., 2016). In the cerebral cortex, acetylcholine acts both on excitatory pyramidal neurons and inhibitory interneurons. In addition, acetylcholine acts on two types of receptors: the ionotropic nicotinic receptors and the metabotropic muscarinic receptors. While binding of acetylcholine on nicotinic receptors induces depolarization, facilitating the excitation of the post-synaptic cell, binding of acetylcholine on muscarinic receptors induces either depolarization or hyperpolarization depending on the G-protein coupled to the receptor, and leads either to excitation or inhibition of the post-synaptic neuron (Ballinger et al., 2016). The duality of effects – excitatory or inhibitory –, along with the duality of targeted neuronal populations – excitatory or inhibitory –, and the variety of responses across cortical layers reflects the subtlety of acetylcholine action on cortical networks (Ballinger et al., 2016). Overall, if many studies converge toward a slow modulatory effect of acetylcholine resulting in an increased excitability of the targeted networks, recent work indicates that transient and faster kinetics of cholinergic signaling also exist (Sarter et al., 2014).

Basal forebrain cholinergic neurons have been mostly studied for their physiological role in sensory detection, attention, learning and memory, and their pathological contribution to cognitive decline (for review see Ballinger et al., 2016), but much less attention has been given to their effect on the motor cortex, or in the context of ALS. Kuo et al. (2007) demonstrated in the human motor cortex that acetylcholine could either increase or decrease cortical excitability, according to the basal stimulation conditions of the network, improving signal-to-noise ratios and refining information processing. Cykowski et al. (2014) reported the presence of cytoplasmic inclusions of TDP-43 in the basal forebrain and hypothalamus of one-third of ALS patients, suggesting that impairment of cholinergic neurons may occur in ALS. However, radioactive labeling of muscarinic receptors in the cerebral cortex did not show any difference between ALS patients and controls (Gredal et al., 1996), suggesting that basal forebrain alteration might not impact muscarinic receptors density in the cortex. Finally, symptomatic *SOD1*<sup>G93A</sup> mice displayed decreased numbers of cholinergic neurons in the basalis nucleus of the basal forebrain, that could account at least partly for the overall decrease in acetylcholine transferase activity measured in the cerebral cortex of these same animals (Crochemore et al., 2005; **Figure 2**). Thus, while little is known about a possible contribution of acetylcholine and basal forebrain cholinergic neurons to physiological motor cortical network function, and dysregulation in ALS, the subtle role of this neurotransmitter in other cortical areas and its implication in other neurodegenerative conditions such as Alzheimer's or Parkinson's diseases provide appealing background to push forward the investigation of the cholinergic system in the field of ALS.

All above-mentioned neuromodulators can impact the activity of the motor cortex (Vitrac and Benoit-Marand, 2017). Some of them have already been associated with neurodegenerative conditions, and thus represent possible contributing factors to cortical hyperexcitability in ALS (**Figure 2**).

## MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL ALTERATIONS OF CORTICAL EXCITATORY AND INHIBITORY NEURONS IN ALS

Whether of extra- or intra-cortical origin, or both, cortical excitation/inhibition (E/I) imbalance results from a dysfunction of the cortical circuits, i.e., from one or several of the cellular components of the cerebral cortex: the excitatory glutamatergic projection neurons, the inhibitory GABAergic interneurons, and possibly the astrocytes, for their contribution to the tripartite synapse and role in neuronal network development and maintenance (Farhy-Tselnicker and Allen, 2018). Analysis of the contribution of these cellular populations and their numerous sub-populations is limited in patients, because the techniques that can be applied on alive persons remain at the scale of the network/structure, and because analysis of post-mortem tissues, while extremely relevant, provides the snapshot of an exhausted network, and little information about the succession of events that drove it there. This is where preclinical models, and particularly rodent models of the disease can be extremely useful, proven that they recapitulate a few essential hallmarks of the disease.

### Evidences for Early Cortical Impairment in Rodent Models of ALS

If the spinal cord, the MN and the skeletal muscle occupy a prominent place in the landscape of preclinical ALS research, a few recent seminal studies contributed to shed light on a possible early role of the cerebral cortex and its neuronal populations in ALS pathophysiology. Indeed, several mouse models of the disease recapitulate CSN or subcortical projection neuron (that comprise CNS) degeneration. This is true for several mutant *SOD1* mouse models (Zang and Cheema, 2002; Ozdinler et al., 2011; Yasvoina et al., 2013; Marques et al., 2019) but also *C9ORF72* (Liu et al., 2016) *PFN1* (Fil et al., 2016), and *TARDBP* (Wegorzewska et al., 2009; Herdewyn et al., 2014). In several of these models, CSN loss precedes motor symptoms and neuromuscular junction denervation (Zang and Cheema, 2002; Ozdinler et al., 2011; Yasvoina et al., 2013; Marques et al., 2019), indicating that cortical alterations may take place very early in these models. Recently, we ran a comprehensive spatiotemporal analysis of CSN degeneration in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS, and showed that loss of CSN preceded loss of MN but also neuromuscular junction denervation, and weight loss (Marques et al., 2019). Early loss of CSN was accompanied with pre-symptomatic occurrence of hyperreflexia, a component of the UMN syndrome (Burg et al., 2019). Finally, CSN and MN degenerations were also somatotopically related, further suggesting that early cortical impairment may negatively influence MN function and survival (Marques et al., 2019). Together, these studies indicate that loss of CSN or subcortical projection neurons not only occurs in mouse models of ALS, but also that, when temporarily assessed, precedes MN degeneration, suggesting that alteration of cerebral cortex is a very early event on the time scale of disease progression.

First genetic manipulation in the cerebral cortex of a rat model of ALS further informed on the role of this structure in disease onset and progression. Thomsen et al. (2014) knocked-down a mutant *SOD1* transgene in the posterior motor cortex of the *SOD1<sup>G93A</sup>* rat model of ALS, using an AAV9 virus to selectively transduce neurons. AAV9-*SOD1*-shRNA injections delayed disease onset and extended survival without affecting disease duration (Thomsen et al., 2014). Recently, we experimentally tested the corticofugal hypothesis of ALS, by generating a mouse line ubiquitously overexpressing the murine *Sod1<sup>G86R</sup>* transgene, a condition sufficient to mimic ALS symptoms and premature death (Ripps et al., 1995), and knocked-out for the gene *Fezf2*, a condition sufficient to prevent the specification of subcerebral projection neurons (Molyneaux et al., 2005). Absence of subcerebral projection neurons, and in particular of CSN, was sufficient to delay disease onset, limit weight loss and motor decline and extend survival of the animals, providing a first experimental support to the corticofugal hypothesis (Burg et al., 2019). Together, these studies provide evidence for an early contribution of cortical dysfunctions in ALS.

### Cortical Excitatory Glutamatergic Neurons, and Corticospinal Neurons in ALS

In Humans, loss of CSN, or upper motor neurons (UMN), or Betz cells, and of their projections within the CST, results in appearance of the UMN syndrome, a series of symptoms including decreased motor control, altered muscle tone and strength, hyperreflexia, spasticity, and clonus (Ivanhoe and Reistetter, 2004), and allows the diagnosis of ALS, when combined with signs of bulbar or spinal MN degeneration (muscle denervation). Quantification of the progressive loss of Betz cells can be achieved in alive patients with the triple stimulation technique which estimates the proportion of motor units that can be stimulated by TMS (Wang et al., 2019), but to our knowledge, the technique has not been used yet for longitudinal analysis of CSN loss in ALS, or on pre-symptomatic patients. Together with a "pallor of the CST" (Charcot, 1874) that runs laterally in Human spinal cord, post-mortem analyses of ALS patients revealed a depletion of the giant Betz cells (CSN) of about 50–60%, and a shrinkage of the remaining Betz cell bodies (Nihei et al., 1993; Figure 3).

As already mentioned, various mouse models of the disease present with a loss of CSN or of cortical layer V subcellular projection neurons at disease end stage, such as the *C9-BAC* (Liu et al., 2016), the *hPFN1<sup>G118V</sup>* (Fil et al., 2016), the *TDP-43<sup>A315V</sup>* mouse models (Wegorzewska et al., 2009; Herdewyn et al., 2014) and the *TDP-43<sup>G298S</sup>* (Müller et al., 2019). *SOD1* mouse, generated earlier and further analyzed display a progressive loss of CSN that starts pre-symptomatically (Zang and Cheema, 2002; Ozdinler et al., 2011; Yasvoina et al., 2013; Marques et al., 2019; Figure 3). These studies reflect early alterations of the motor cortex of mouse models of the disease. In the context of overall cortical hyperexcitability, presymptomatic loss of a subpopulation of cortical excitatory neurons may reflect the consequence of an over-active network, rather than the origin

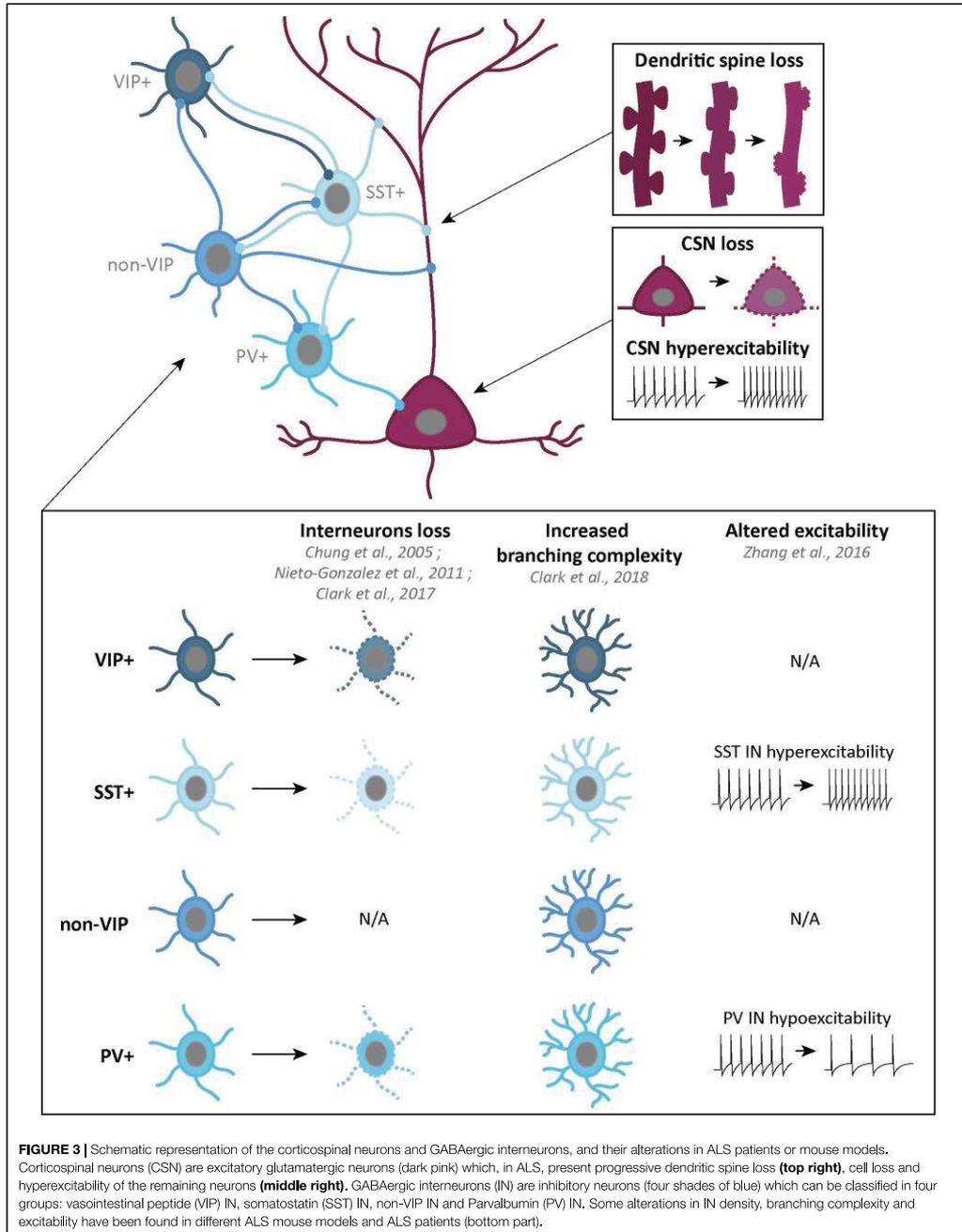
of this E/I imbalance. Thus paralleled longitudinal analyses to compare the rate of CSN loss and the progression of cortical hyperexcitability, either on patients, or in mouse models of the disease, would be particularly informative.

In mice, CSN and other layer V subcerebral projection neurons display, prior to their degeneration, morphological alterations or electrophysiological dysfunctions that reflect either their hyperexcitable state or altered excitatory and inhibitory inputs, or both. In young and presymptomatic *SOD1<sup>G93A</sup>* mice, CSN and other layer V subcerebral projection neurons present selective apical dendrite degeneration, together with a lack of spines and a vacuolation, but no impairment of the basal dendrites (Jara et al., 2015), before they start degenerating. Progressive spine loss was also reported in apical and basal dendrites of layer V subcerebral projection neurons located in the motor cortex of presymptomatic *TDP-43<sup>A315V</sup>* mice (Handley et al., 2018; Figure 3). Such features were also reported in the remaining Betz cells of sporadic and familial ALS cases (Hammer et al., 1979; Genç et al., 2017). In the motor cortex of *TDP-43<sup>Q331K</sup>* mice instead, Fogarty et al. (2016) reported increased spine densities along the proximal and distal compartments of apical and basal dendrites of layer V subcerebral projection neurons. While the two TDP-43 mouse models apparently display opposite spine phenotypes, it is worth mentioning that both affect the formation or maintenance of dendritic spines, in accordance with an emerging role of TDP-43 and other RNA-binding protein in synaptic integrity (Sephton and Yu, 2015).

Such morphological abnormalities are accompanied by changes in electrophysiological properties. Initial work from the team of Cristina Zona reported intrinsic hyperexcitability of primary cortical neurons from *SOD1<sup>G93A</sup>* embryos, compared to controls, as a result of increased persistent voltage-dependent  $\text{Na}^+$  current ( $I_{\text{NaP}}$ ) (Pieri et al., 2009). Patch-clamp methods on brain slices further demonstrated hyperexcitability of layer V subcerebral projection neurons from the motor cortex of presymptomatic (21 and 30 day-old) *SOD1<sup>G93A</sup>* mice (Saba et al., 2015). Kim et al. (2017) patched retrogradely labeled CSN and callosal projection neurons (CPN) present in the layer V of *SOD1<sup>G93A</sup>* motor cortex, and demonstrated increased intrinsic excitability of both neuronal types (Kim et al., 2017). Layer V subcerebral projection neurons displayed increased excitatory synaptic inputs in the presymptomatic *TDP-43<sup>Q331K</sup>* mice (Fogarty et al., 2016), but unchanged (P21) or decreased (P60) frequency of excitatory synaptic transmission in the presymptomatic *TDP-43<sup>A315T</sup>* mice (Handley et al., 2018; Figure 3). However, P21 layer V subcerebral projection neurons from the *TDP-43<sup>A315T</sup>* mice presented decreased inhibitory synaptic transmission resulting in hyperexcitability that was sustained throughout disease progression (Zhang et al., 2016). Interestingly, similar observations had been made previously in the Wobbler mouse model of ALS (Nieto-Gonzalez et al., 2010).

### Cortical Inhibitory GABAergic Interneurons in ALS

Cortical GABAergic interneurons (INs) can be differentiated by molecular markers, firing pattern and cortical layers organization



(Markram et al., 2004). Recently, a classification into three broad subgroups has been proposed: parvalbumin (PV)-positive INs (~40%), somatostatin (SST)-positive INs (~30%) and 5-HT<sub>3A</sub>R-positive INs (~30%) (Tremblay et al., 2016). Other markers also overlap with these groups. Neuropeptide Y (NPY), is expressed in a subpopulation of SST+ INs, and 5-HT<sub>3A</sub>R+ INs group can be divided into vasointestinal peptide (VIP)-positive and non-VIP INs. Finally, while some SST+ INs and VIP+ INs share calretinin (CR) as a marker, some SST+ and non-VIP INs share both nitric oxide synthase (NOS) and Reelin markers (Tremblay et al., 2016; **Figure 3**).

Interneurons inhibit not only projection neurons but also other interneurons. Layers V projection neurons, including CSN, receive GABAergic inputs from non-VIP INs on their apical dendrite in layers I and II/III, and on their basal dendrites in layers V/VI. SST+ INs inputs only come from layers V/VI. Finally, layers V/VI PV+ INs provide somatic inhibition. VIP+ INs are specifically involved in SST+ INs inhibition (**Figure 3**).

Impairment of GABAergic inhibition, starting with the loss of cortical INs, represents a simple way to explain cortical hyperexcitability in ALS. PET studies conducted on ALS patients with [<sup>11</sup>C]flumazenil revealed a decreased density of GABA<sub>A</sub> receptors (Lloyd et al., 2000). Whether this reflects a loss of cortical (excitatory and/or inhibitory) neurons, or a down-regulation of post-synaptic GABA<sub>A</sub> receptor expression, or both, is suggestive of an overall decreased cortical inhibition. Post-mortem analyses revealed decreased GABA<sub>A</sub> mRNA levels (Petri et al., 2003, 2006) significant loss of calbindin (CB) and PV immunoreactivity in the motor cortex of ALS patients, and atrophy of NPY-positive INs (Nihei and Kowall, 1993; Nihei et al., 1993; Maekawa et al., 2004). Decreased PV immunoreactivity could arise from a genuine neuronal loss, but also from decreased expression. Interestingly, decreased levels of PV modifies the dynamic of burst discharge (Albéri et al., 2013) and absence of PV increases the susceptibility to Pentylentetrazole (PTZ)-induced seizures in mouse (Schwaller et al., 2004), suggesting that both loss of PV-positive neurons, or decreased levels of the protein may affect proper functioning of the cortical network (**Figure 3**).

Quantifications of the various IN populations in the multiple mouse models of ALS gave different results. In the primary motor cortex of pre-symptomatic Wobbler mice, Nieto-Gonzalez et al. (2010) observed decreased densities of PV-positive and SST-positive INs, together with a reduced density of GABAergic synaptic boutons. In the *SOD1<sup>G93A</sup>* mouse model, classical quantification methods reported levels of PV+ INs similar to wild-type animals (Ozdinler et al., 2011; Clark et al., 2017). However, the Voronoi tessellation method revealed increased numbers of PV-positive INs, selectively in the motor and somatosensory areas, from pre-symptomatic ages to disease end-stage (Minciacchi et al., 2009). Early morphological alteration and late loss of upper layer CR-positive INs, together with a late increase of NPY immunoreactivity were also reported in *SOD1<sup>G93A</sup>* mice (Clark et al., 2017). Interestingly, the authors suggested that increased NPY expression in various IN populations could reflect the need to express neuroprotectants in a context of altered and toxic cortical activity (Clark et al., 2017). In *TDP-43<sup>A315T</sup>* mice, Zhang et al. (2016) reported

pre-symptomatic decrease followed by symptomatic loss of SST-positive neurons (**Figure 3**). Together, the data indicate that GABAergic INs undergo modifications in various mouse models of ALS, suggesting impairments of the inhibitory circuits. Above cell numbers, levels of calcium-binding proteins, such as PV, or of neuroprotective neuropeptides, such as NPY, need to be carefully assessed to further evaluate the inhibitory component of the cortical network. Interestingly, SST-positive neurons from different cortical areas were reported to receive dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic innervations, and SST to play the role of co-transmitter for GABA, thus involved in modulating surrounding neurons (for reviews see Liguz-Lecznar et al., 2016; Riedemann, 2019).

Kim et al. (2017) reported that PV-positive INs from neonatal and symptomatic *SOD1<sup>G93A</sup>* mice were hyperexcitable, similar to excitatory layer V CSN and CPN. Contrastingly, Zhang demonstrated that PV-positive INs were hypoactive, while SST-positive INs were hyperactive in the *TDP-43<sup>A315T</sup>* mouse model of ALS (Zhang et al., 2016). The authors elegantly demonstrated that hyperactivity of SST-positive INs was responsible for hypoactivity of PV-positive INs, and, in turn, for hyperexcitability of layer V subcerebral projection neurons, which could be restored to normal excitability by genetic ablation of SST-positive INs (Zhang et al., 2016; **Figure 3**). A better understanding and characterization of cortical INs families, inputs and outputs, as well as morphology and electrophysiology, will be essential in the future to better dissect the mechanisms underlying cortical hyperexcitability in ALS.

## ALTERED GENE EXPRESSION RELATED TO CORTICAL CIRCUITS DYSFUNCTION IN ALS

Neuronal excitability relies first on the establishment of membrane potential, i.e., differential concentrations of cations on each side of the plasma membrane, due to the presence of ATP-dependent sodium potassium pumps (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> pumps). Neuronal excitability is the ability of a neuron to respond to stimuli by rapid change in membrane potential, a phenomenon that requires the selective opening of specific ion channels. Thus, amounts and compositions of ion channels are directly related to neuronal excitability, and neuronal hyperexcitability can also be seen as the result of altered expression of these protein families, along with neurotransmitter receptors and other synaptic proteins.

In order to better understand the pathologic cascade leading to the neuronal degeneration in the cerebral cortex, a few studies interrogated the transcriptomic alterations in post-mortem cortex (motor or frontal) from ALS patients (Wang et al., 2009; Lederer et al., 2007; Aronica et al., 2015; Prudencio et al., 2015; Andrés-Benito et al., 2017), or individual populations of cells purified from the mouse cerebral cortex (Kim et al., 2017; Marques et al., 2019). Given the emerging role of altered RNA metabolism – and thus altered protein expression – as a common pathological mechanism of ALS, these seminal studies may point to transcriptomic alterations that could possibly underlie cortical hyperexcitability in ALS.

## Ion Homeostasis and Transportation

First microarray analysis of the motor cortex of sporadic ALS patients compared to control individuals revealed a small number of deregulated genes (Lederer et al., 2007). Amongst others, the study reported on the down-regulation of *ATPIA3* (*ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting subunit alpha 3*), that belongs to the family of P-type cation transport ATPases, and contributes to establishing and maintaining the electrochemical gradients of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions across the plasma membrane. Because mutations of *ATPIA3* cause rapid-onset dystonia parkinsonism (RDP), alternating hemiplegia of childhood (AHC), or early infantile epileptic encephalopathy (EIEE), the later two being characterized by seizures (Arystarkhova et al., 2019), its down-regulation in ALS patients could have repercussions on cortical excitability. In the same study, Lederer et al. (2007) also reported on the down-regulation of *KCNC2* (*potassium voltage-gated channel subfamily C member 2*), while similar microarray analyses conducted on motor and sensory cortex (Wang et al., 2009), or on motor cortex of ALS patients (Aronica et al., 2015) revealed the up-regulation of *KCNIP2* (potassium voltage-gated channel interacting protein 2) and of *SCN7A* (sodium voltage-gated channel alpha subunit 7), respectively, further supporting altered neuronal excitability and action potential firing. Down-regulation of *SLC12A5* (*solute carrier family 12 member 5*), a K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter, is also noticeable (Lederer et al., 2007). During development, increased expression of *SLC12A5*, formerly known as *KCC2*, lowers intracellular chloride concentrations below the electrochemical equilibrium potential, allowing GABA's action on postsynaptic components to switch from excitatory to inhibitory (Schulte et al., 2018). Thus, decreased expression of *SLC12A5* in the pathological context of ALS could partly reverse this effect and GABA-mediated inhibition of cortical networks.

The protein hormone *Adiponectin* (*ADIPOQ*) and its receptors R1 and R2 (*ADIPOR1* and *ADIPOR2*) were found down-regulated in the motor cortex of ALS patients compared to controls (Aronica et al., 2015). In the paraventricular nucleus of the hypothalamus, adiponectin and its receptors were shown to regulate neuronal excitability via their modulation of different potassium currents (Hoyda and Ferguson, 2010). In the hippocampus, *ADIPOR2* deletion leads to hyperexcitability of the dentate gyrus neurons (Zhang et al., 2016). Finally, adiponectin has been related to several disorders of the central nervous system, such as stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Multiple sclerosis (for review see Baranowska-Bik and Waszkiewicz-Hanke, 2017; Bloemer et al., 2018).

## Glutamatergic and GABAergic Components

Wang et al. (2009) reported up-regulations of the glutamate receptor *GRIK1* (*glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 1*), and of the postsynaptic density scaffolding protein *HOMER 3* (*homer scaffold protein*), which binds

group I metabotropic glutamate receptors, amongst numerous other proteins. Aronica et al. (2015) instead reported on the up-regulation of *GRIA1* in a subgroup of ALS patients, and down-regulation of several ionotropic and metabotropic glutamate receptors, *GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2D*, *GRIA2*, and *GRIA3*, in a second subgroup of patients. This was accompanied with the down-regulation of six subunits of the GABA<sub>A</sub> receptor in one subgroup of patients (Aronica et al., 2015). These transcriptomic changes in the post-mortem motor cortex of ALS patients could reflect the broad neuronal loss that occurred prior to death. In this regard, the study by Andrés-Benito et al. (2017) is particularly interesting because it was conducted on the frontal cortex of ALS patients that showed no sign of FTD, and for which no neuronal loss in the frontal cortex was suspected. Thus, the analysis could potentially provide a molecular snapshot of cortical hyperexcitability prior to neurodegeneration. In this study, numerous glutamate receptors and transporters were found up-regulated (Andrés-Benito et al., 2017). This was the case of *GRIA1*, which codes for the ionotropic glutamate receptor AMPA 1, *GRIN2A* and *GRIN2B*, which code for NMDA receptors, and *GRM5*, which codes for the glutamate metabotropic receptor 5, along with the glutamate transporters *SLC1A2* and *SLC17A7* (Andrés-Benito et al., 2017). Interestingly, *GAD1*, that encodes the glutamate carboxylase 1, that synthesizes GABA from glutamate, and the GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors subunits *GABRD*, *GABRB2*, and *GABBR2* were also increased (Andrés-Benito et al., 2017). Increased expression of components of the glutamatergic system are in agreement with overall increased cortical excitability, and increased expression of components of the GABAergic system could be interpreted as an attempt to counteract increased excitation.

## Altered Gene Expression in Mouse Models of ALS Suggest Possible Cortical Hyperexcitability in Rodents

While to our knowledge TMS has not been employed in mouse models of ALS and broad cortical hyperexcitability has not been demonstrated in these animals, Kim et al. (2017) reported intrinsic hyperexcitability of cortical neurons, and particularly layer V subcerebral projection neurons, but also CPN and populations on interneurons. Using RNAseq on purified sub-populations of cortical neurons, they demonstrated that intrinsic hyperexcitability of corticospinal neurons (CSN) and CPN from postnatal *SOD1<sup>G93R</sup>* mice was accompanied by changes of expression of several voltage-gated Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels, GABA and glutamate receptors (Kim et al., 2017). Interestingly, the sets of differentially regulated genes were different between the two neuronal populations, and the variations of common genes were sometimes opposite (Kim et al., 2017). This is in agreement with the different molecular identities of the two investigated populations, but may also reflect different strategies to deal with hyperexcitability, depending on the position within the cortical networks.

## CONCLUDING REMARKS

A growing number of evidences point to the cerebral cortex as the origin of ALS and suggest a corticofugal propagation of the disease. In this context, the earliness of cortical hyperexcitability in ALS patients, and the recent demonstration that it is sufficient to trigger TDP-43 pathology, suggest that cortical E/I unbalance may represent *per se* a particularly relevant therapeutic target. Because numerous extrinsic (i.e., non-cortical) and intrinsic (i.e., cortical) components contribute to the fine-tuning of cortical excitability and cortical network proper functioning, the possible candidates to cortical hyperexcitability are numerous, and combined impairments are very likely. To further unravel the mechanisms behind cortical hyperexcitability in ALS, mouse models that recapitulate this typical hallmark of the disease are needed, or, more simply, current mouse models of the disease should be tested for possible cortical hyperexcitability. These will in turn allow assessing various therapeutic strategies to restore proper cortical excitability, and to determine the impact of such intervention on direct corticofugal targets, and more broadly on disease onset and progression. These first steps may in turn pave the way to a new era of treatment in the field of ALS, and potentially other neurodegenerative diseases.

## REFERENCES

- Agosta, F., Spinelli, E. G., Marjanovic, I. V., Stevic, Z., Pagani, E., Valsasina, P., et al. (2018). Unraveling ALS due to SOD1 mutation through the combination of brain and cervical cord MRI. *Neurology* 90, e707–e716. doi: 10.1212/WNL.0000000000005002
- Agster, K. L., Mejias-Aponte, C. A., Clark, B. D., and Waterhouse, B. D. (2013). Evidence for a regional specificity in the density and distribution of noradrenergic varicosities in rat cortex. *J. Comp. Neurol.* 521, 2195–2207. doi: 10.1002/cne.23270
- Albéri, L., Lintas, A., Kretz, R., Schwaller, B., and Villa, A. E. P. (2013). The calcium-binding protein parvalbumin modulates the firing properties of the reticular thalamic nucleus bursting neurons. *J. Neurophysiol.* 109, 2827–2841. doi: 10.1152/jn.00072.2012
- Alberico, S. L., Cassell, M. D., and Narayanan, N. S. (2015). The vulnerable ventral tegmental area in Parkinson's disease. *Basal Ganglia*. 5, 51–55. doi: 10.1016/j.baga.2015.06.001
- Andrés-Benito, P., Moreno, J., Aso, E., Povedano, M., and Ferrer, I. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis, gene deregulation in the anterior horn of the spinal cord and frontal cortex area 8: implications in frontotemporal lobar degeneration. *Aging* 9, 823–851. doi: 10.18632/aging.101195
- Apolloni, S., Amadio, S., Fabbriozzo, P., Morello, G., Spampinato, A. G., Latagliata, E. C., et al. (2019). Histaminergic transmission slows progression of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* 10, 872–893. doi: 10.1002/jcsm.12261
- Apolloni, S., Fabbriozzo, P., Amadio, S., Napoli, G., Verdile, V., Morello, G., et al. (2017). Histamine regulates the inflammatory profile of SOD1-G93A microglia and the histaminergic system is dysregulated in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Immunol.* 8:1183. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03633.x
- Aronica, E., Baas, F., Iyer, A., ten Asbroek, A. L., Morello, G., and Cavallaro, S. (2015). Molecular classification of amyotrophic lateral sclerosis by unsupervised clustering of gene expression in motor cortex. *Neurobiol. Dis.* 74, 359–376. doi: 10.1016/j.nbd.2014.12.002
- Arystarkhova, E., Haq, I. U., Luebbert, T., Mochel, F., Saunders-Pullman, R., Bressman, S. B., et al. (2019). Factors in the disease severity of ATP1A3

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AB, GS-L, JS-Z, TB, and CR analyzed the data of the literature and wrote the manuscript. AB and CR designed the figures and AB elaborated them. All authors approved the publication of the manuscript.

## FUNDING

Work by our team has been supported by the European Research Council (ERC) starting grant #639737, the Marie Curie career integration grant #618764, an “Association Française contre les Myopathies” (AFM)-Telethon trampoline grant #16923, the “Federation pour la Recherche sur le Cerveau” (FRC), and the Neurex grant to CR. TB and AB received Ph.D. fellowships from the French Ministry of Research. JS-Z was supported by a post-doctoral fellowship from the AFM-Telethon #21993.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to Romain Goutagny for critical reading of the manuscript, and insightful comments.

- mutations: impairment, misfolding, and allele competition. *Neurobiol. Dis.* 132:104577. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104577
- Badawy, R., Loetscher, T., Macdonell, R., and Brodtmann, A. (2012). Cortical excitability and neurology: insights into the pathophysiology. *Funct. Neurol.* 27, 131–145.
- Bae, J. S., Ferguson, M., Tan, R., Mioshi, E., Simon, N., Burrell, J., et al. (2016). Dissociation of structural and functional integrities of the motor system in amyotrophic lateral sclerosis and behavioral-variant frontotemporal dementia. *J. Clin. Neurol.* 12:209. doi: 10.3988/jcn.2016.12.2.209
- Bae, J. S., Simon, N. G., Menon, P., Vucic, S., and Kiernan, M. C. (2013). The puzzling case of hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Clin. Neurol.* 9:65. doi: 10.3988/jcn.2013.9.2.65
- Bakulin, I. S., Chervyakov, A. V., Suponeva, N. A., Zakharova, M. N., and Piradov, M. A. (2016). “Motor Cortex hyperexcitability, neuroplasticity, and degeneration in amyotrophic lateral sclerosis,” in *Update on Amyotrophic Lateral Sclerosis*, ed. IntechOpen (London: Intech), doi: 10.5772/63310
- Ballinger, E. C., Ananth, M., Talmage, D. A., and Role, L. W. (2016). Basal forebrain cholinergic circuits and signaling in cognition and cognitive decline. *Neuron* 91, 1199–1218. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.006
- Baranowska-Bik, A., and Waszkiewicz-Hanke, M. (2017). Adiponectin as a neuropeptide. *PNM* 30, 717–722. doi: 10.25121/PNM.2017.30.12.717
- Barker, A. T., and Freeston, I. L. (1985). Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet* 1, 1106–1107. doi: 10.1016/s0140-6736(85)92413-4
- Bertel, O., Malessa, S., Sluga, E., and Hornykiewicz, O. (1991). Amyotrophic lateral sclerosis: changes of noradrenergic and serotonergic transmitter systems in the spinal cord. *Brain Res.* 566, 54–60. doi: 10.1016/0006-8993(91)91680-y
- Blair, I. P., Williams, K. L., Warraich, S. T., Durnall, J. C., Thoeng, A. D., Manavis, J., et al. (2010). FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 639–645. doi: 10.1136/jnnp.2009.194399
- Bloemer, J., Pinky, P. D., Govindarajulu, M., Hong, H., Judd, R., Amin, R. H., et al. (2018). Role of adiponectin in central nervous system disorders. *Neural Plast.* 2018:4593530. doi: 10.1155/2018/4593530
- Borasio, G. D., Linke, R., Schlamp, V., Abel, A., Mozley, P. D., and Tatsch, K. (1998). Dopaminergic deficit in amyotrophic lateral sclerosis assessed with [I-123] IPT

- single photon emission computed tomography. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 65, 263–265. doi: 10.1136/jnnp.65.2.263
- Bozzi, Y., Provenzano, G., and Casarosa, S. (2017). Neurobiological bases of autism-epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. *Eur. J. Neurosci.* 47, 534–548. doi: 10.1002/hipo.20389
- Braak, H., Brettschneider, J., Ludolph, A. C., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., and Del Tredici, K. (2013). Amyotrophic lateral sclerosis—a model of corticofugal axonal spread. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 708–714. doi: 10.1038/nrneuro.2013.221
- Brettschneider, J., Del Tredici, K., Toledo, J. B., Robinson, J. L., Irwin, D. J., Grossman, M., et al. (2013). Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 74, 20–38. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70014-5
- Brown, R. H., and Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 377, 162–172. doi: 10.1056/NEJMr1603471
- Burg, T., Bichara, C., Ščekić-Zahirović, J., Fischer, M., Stuart-Lopez, G., Lefebvre, F., et al. (2019). Absence of subcerebral projection neurons delays disease onset and extends survival in a mouse model of ALS. *bioRxiv* [Preprint]
- Caramia, M. D., Ciccinelli, P., Paradiso, C., Mariorezzi, R., Zarola, F., Bernardi, G., et al. (1991). Excitability changes of muscular responses to magnetic brain stimulation in patients with central motor disorders. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 81, 243–250. doi: 10.1016/0168-5597(91)90009-m
- Cecchi, M., Passani, M. B., Bacciottini, L., Mannaioni, P. F., and Blandina, P. (2001). Cortical acetylcholine release elicited by stimulation of histamine H<sub>2</sub>. *Eur. J. Neurosci.* 13, 68–78. doi: 10.1111/j.1460-9568.2001.01361.x
- Charcot, J. M. (1874). *Sclérose Latérale Amyotrophique: Oeuvres Complètes*. Paris: Bureaux du Progrès Médical.
- Chen, L., Wang, H.-T., Han, X.-H., Li, Y.-L., Cui, Q.-L., and Xie, J.-X. (2008). Behavioral and electrophysiological effects of pallidal GABA. *Brain Res.* 1244, 65–70. doi: 10.1016/j.brainres.2008.09.079
- Chen, R., Tam, A., Butefishch, C., Corwell, B., Ziemann, U., Rothwell, J. C., et al. (1998). Intracortical inhibition and facilitation in different representations of the human motor cortex. *J. Neurophysiol.* 80, 2870–2881. doi: 10.1152/jn.1998.80.6.2870
- Chia, R., Chiò, A., and Traynor, B. J. (2017). Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol.* 17, 94–102. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30401-5
- Chiò, A., Pagani, M., Agosta, F., Calvo, A., Citaro, A., and Filippi, M. (2014). Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. *Lancet Neurol.* 13, 1228–1240. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70167-X
- Clark, R. M., Blizzard, C. A., Young, K. M., King, A. E., and Dickson, T. C. (2017). Calretinin and Neuropeptide Y interneurons are differentially altered in the motor cortex of the SOD1. *Sci. Rep.* 7, 44461. doi: 10.1038/srep44461
- Crochemore, C., Peña-Altamira, E., Virgili, M., Monti, B., and Contestabile, A. (2005). Disease-related regressive alterations of forebrain cholinergic system in SOD1 mutant transgenic mice. *Neurochem. Int.* 46, 357–368. doi: 10.1016/j.neuint.2004.12.004
- Cykowski, M. D., Takei, H., Schulz, P. E., Appel, S. H., and Powell, S. Z. (2014). TDP-43 pathology in the basal forebrain and hypothalamus of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 5. doi: 10.1002/emmm.201201544
- Dentel, C., Palamiuc, L., Henriques, A., Lannes, B., Spreux-Varoquaux, O., Gutknecht, L., et al. (2013). Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* 136, 483–493. doi: 10.1016/0379-0738(93)90237-5
- Desiato, M. T., Bernardi, G., Hagi, A. H., Boffa, L., and Caramia, M. D. (2002). Transcranial magnetic stimulation of motor pathways directed to muscles supplied by cranial nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* 113, 132–140. doi: 10.1016/s1388-2457(01)00724-6
- Di Lazzaro, V., Manganeli, F., Dileone, M., Notturmo, F., Esposito, M., Capasso, M., et al. (2012). The effects of prolonged cathodal direct current stimulation on the excitatory and inhibitory circuits of the ipsilateral and contralateral motor cortex. *J. Neural. Transm.* 119, 1499–1506. doi: 10.1177/1073858409336227
- Di Lazzaro, V., Ranieri, F., Profice, P., Pilato, F., Mazzone, P., Capone, F., et al. (2013). Transcranial direct current stimulation effects on the excitability of corticospinal axons of the human cerebral cortex. *Brain Stimul.* 6, 641–643. doi: 10.1016/j.brs.2012.09.006
- Douaud, G., Filippini, N., Knight, S., Talbot, K., and Turner, M. R. (2011). Integration of structural and functional magnetic resonance imaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134, 3470–3479. doi: 10.1136/jnnp.61.6.596
- Dupuis, L., Pradat, P. F., Ludolph, A. C., and Loeffler, J. P. (2011). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 10, 75–82. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70224-6
- Eisen, A., Braak, H., Del Tredici, K., Lemon, R., Ludolph, A. C., and Kiernan, M. C. (2017). Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 88, 917–924. doi: 10.1136/jnnp-2017-315573
- Eisen, A., Kim, S., and Pant, B. (1992). Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve* 15, 219–228. doi: 10.1002/mus.880150215
- Eisen, A., Pant, B., and Stewart, H. (1993). Cortical excitability in amyotrophic lateral sclerosis: a clue to pathogenesis. *Can. J. Neurol. Sci.* 20, 11–16. doi: 10.1017/s031716710004734x
- Eisen, A., and Weber, M. (2001). The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 24, 564–573. doi: 10.1002/mus.1042
- Enterzari-Taheer, M., Eisen, A., Stewart, H., and Nakajima, M. (1997). Abnormalities of cortical inhibitory neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 20, 65–71. doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199701)20:1<65::aid-mus9<3.0.co;2-f
- Farhy-Tselnicker, I., and Allen, N. J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev.* 13, 7. doi: 10.1186/s13064-018-0104-y
- Fil, D., DeLoach, A., Yadav, S., Alkam, D., MacNicol, M., Singh, A., et al. (2016). Mutant Profilin1 transgenic mice recapitulate cardinal features of motor neuron disease. *Hum. Mol. Genet.* 36, ddw429. doi: 10.1093/hmg/ddw429
- Flik, G., Folgering, J. H. A., Cremers, T. I. H. F., Westerink, B. H. C., and Dremencov, E. (2015). Interaction between brain histamine and serotonin, norepinephrine, and dopamine systems: in vivo microdialysis and electrophysiology study. *J. Mol. Neurosci.* 56, 320–328. doi: 10.1007/s10073-015-0383-5
- Fogarty, M. J., Klenowski, P. M., Lee, J. D., Driberg-Thompson, J. R., Bartlett, S. E., Ngo, S. T., et al. (2016). Cortical synaptic and dendritic spine abnormalities in a presymptomatic TDP-43 model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* 6, 37968. doi: 10.1038/srep37968
- Foss-Feig, J. H., Adkinson, B. D., Ji, J. L., Yang, G., Srihari, V. H., McPartland, J. C., et al. (2017). Searching for cross-diagnostic convergence: neural mechanisms governing excitation and inhibition balance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Biol. Psychiatry* 81, 848–861. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.03.005
- Fu, X., Zhu, W., Guo, Z., Shu, G., Cui, F., Yang, F., et al. (2017). <sup>18</sup>F-fallypride PET-CT of dopamine D2/D3 receptors in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 377, 79–84. doi: 10.1016/j.jns.2017.03.013
- Geevasinga, N., Menon, P., Özdinler, P. H., Kiernan, M. C., and Vucic, S. (2016). Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 651–661. doi: 10.1038/nrneuro.2016.140
- Genç, B., Jara, J. H., Lagrimas, A. K. B., Pytel, P., Roos, R. P., Mesulam, M. M., et al. (2017). *Apical Dendrite Degeneration, Anovel Cellular Pathology for Betzcells in ALS*. Berlin: Nature Publishing Group, doi: 10.1038/srep41765
- Gredal, O., Pakkenberg, B., and Nielsen, M. (1996). Muscarinic, N-methyl-D-aspartate (NMDA) and benzodiazepine receptor binding sites in cortical membranes from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J. Neurol. Sci.* 143, 121–125. doi: 10.1016/s0022-510x(96)00196-7
- Gu, Q. (2002). Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience* 111, 815–835. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00026-x
- Guo, W., Fumagalli, L., Prior, R., and Van Den Bosch, L. (2017). Current advances and limitations in modeling ALS/FTD in a dish using induced pluripotent stem cells. *Front. Neurosci.* 11, 1282. doi: 10.1073/pnas.1315438110
- Haas, H., and Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 121–130. doi: 10.1007/BF00167568
- Hammer, R. P., Tomiyasu, U., and Scheible, A. B. (1979). Degeneration of the human betz cell dur to amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 63, 336–346.
- Handley, E. E., Pitman, K. A., Dawkins, E., Young, K. M., Clark, R. M., Jiang, T. C., et al. (2018). Reduced excitability and increased neurite complexity of cortical interneurons in a familial mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cereb. Cortex* 27, 3630–3647. doi: 10.1038/nn.4257

- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Brayne, C., Beghi, E., van den Berg, L. H., Chiò, A., et al. (2017a). The changing picture of amyotrophic lateral sclerosis: lessons from European registers. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 88, 557–563. doi: 10.1007/s00415-003-1026-z
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chiò, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., et al. (2017b). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3:17071. doi: 10.1038/nrdp.2017.71
- Heckman, C. J., Mottram, C., Quinlan, K., Theiss, R., and Schuster, J. (2009). Motoneuron excitability: the importance of neuromodulatory inputs. *Clin. Neurophysiol.* 120, 2040–2054. doi: 10.1016/j.clinph.2009.08.009
- Herdewyn, S., Cirillo, C., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., Berghe, P. V., and Van Damme, P. (2014). Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43(A315T) mice. *Mol. Neurodegener.* 9:24. doi: 10.1186/1750-1326-9-24
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004764
- Hoogendijk, W. J., Pool, C. W., Troost, D., van Zwielen, E., and Swaab, D. F. (1995). Image analyzer-assisted morphometry of the locus coeruleus in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 118, 131–143. doi: 10.1093/brain/118.1.131
- Hoyda, T. D., and Ferguson, A. V. (2010). Adiponectin modulates excitability of rat paraventricular nucleus neurons by differential modulation of potassium currents. *Endocrinology* 151, 3154–3162. doi: 10.1159/000108635
- Ivanhoe, C. B., and Reistetter, T. A. (2004). Spasticity: the misunderstood part of the upper motor neuron syndrome. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 83, S3–S9. doi: 10.1097/01.PHM.0000141125.28611.3E
- Iyer, P. M., Egan, C., Pinto-Grau, M., Burke, T., Elamin, M., Nasserolelami, B., et al. (2015). Functional connectivity changes in resting-state EEG as potential biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0128682
- Jara, J. H., Genc, B., Cox, G. A., Bohn, M. C., Roos, R. P., Macklis, J. D., et al. (2015). Corticospinal motor neurons are susceptible to increased ER stress and display profound degeneration in the absence of UCHL1 function. *Cereb. Cortex* 25, 4259–4272. doi: 10.1093/cercor/bhu318
- Jouroukhin, Y., Ostritsky, R., Assaf, Y., Pelled, G., Giladi, E., and Gozes, I. (2013). NAP (davunetide) modifies disease progression in a mouse model of severe neurodegeneration: protection against impairments in axonal transport. *Neurobiol. Dis.* 56, 79–94. doi: 10.1016/j.nbd.2013.04.012
- Karandreas, N., Papadopoulou, M., Kokotis, P., Papapostolou, A., Tsvigoulis, G., and Zambelis, T. (2009). Impaired interhemispheric inhibition in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* 8, 112–118. doi: 10.1002/cne.901880110
- Kassubek, J., Müller, H. P., Del Tredici, K., Bretschneider, J., Pinkhardt, E. H., Lule, D., et al. (2014). Diffusion tensor imaging analysis of sequential spreading of disease in amyotrophic lateral sclerosis confirms patterns of TDP-43 pathology. *Brain* 137, 1733–1740. doi: 10.1517/17530059.2010.536836
- Kim, J., Hughes, E. G., Shetty, A. S., Arlotta, P., Goff, L. A., Bergles, D. E., et al. (2017). Changes in the excitability of neocortical neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis are not specific to corticospinal neurons and are modulated by advancing disease. *J. Neurosci.* 37, 9037–9053. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0811-17.2017.f8-1
- Kleine, B. U., Stegeman, D. F., Schelhaas, H. J., and Zwarts, M. J. (2008). Firing pattern of fasciculations in ALS: evidence for axonal and neuronal origin. *Neurology* 70, 353–359. doi: 10.1212/01.wnl.0000300559.14806.2a
- Korchounov, A., Iliæ, T. V., and Ziemann, U. (2006). TMS-assisted neurophysiological profiling of the dopamine receptor agonist cabergoline in human motor cortex. *J. Neural Transm.* 114, 223–229. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.181b.x
- Koschnitzky, J. E., Quinlan, K. A., Lukas, T. J., Kajtas, E., Kocivar, E. J., Mayers, W. F., et al. (2014). Effect of fluoxetine on disease progression in a mouse model of ALS. *J. Neurophysiol.* 111, 2164–2176. doi: 10.1002/syn.10040
- Kostic, V., Gurney, M. E., Deng, H. X., Siddique, T., Epstein, C. J., and Przedborski, S. (1997). Midbrain dopaminergic neuronal degeneration in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 41, 497–504. doi: 10.1002/ana.410410413
- Kujirai, T., Caramia, M. D., Rothwell, J. C., Day, B. L., Thompson, P. D., Ferbert, A., et al. (1992). Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J. Physiol.* 471, 501–519. doi: 10.1113/jphysiol.1993.sp019912
- Kunori, N., Kajiwara, R., and Takashima, I. (2014). Voltage-sensitive dye imaging of primary motor cortex activity produced by ventral tegmental area stimulation. *J. Neurosci.* 34, 8894–8903. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5286-13.2014
- Kuo, M. F., Grosch, J., Fregni, F., Paulus, W., and Nitsche, M. A. (2007). Focusing effect of acetylcholine on neuroplasticity in the human motor cortex. *J. Neurosci.* 27, 14442–14447. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4104-07.2007
- Lederer, C. W., Torrisi, A., Pantelidou, M., Santama, N., and Cavallaro, S. (2007). Pathways and genes differentially expressed in the motor cortex of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics* 8:26. doi: 10.1186/1471-2164-8-26
- Liguz-Lecznar, M., Urban-Ciecko, J., and Kossut, M. (2016). Somatostatin and somatostatin-containing neurons in shaping neuronal activity and plasticity. *Front. Neural Circuits* 10:48. doi: 10.3389/fncir.2016.00048
- Ling, S.-C., Polymenidou, M., and Cleveland, D. W. (2013). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79, 416–438. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.033
- Liu, Y., Pattamatta, A., Zu, T., Reid, T., Bardhi, O., Borchelt, D. R., et al. (2016). C9orf72 BAC mouse model with motor deficits and neurodegenerative features of ALS/FTD. *Neuron* 90, 521–534. doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.005
- 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. *Brain* 123, 2289–2296. doi: 10.1093/brain/123.11.2289
- Loubinoux, I., Tombari, D., Pariente, J., Gerdelat-Mas, A., Franceries, X., Cassol, E., et al. (2005). Modulation of behavior and cortical motor activity in healthy subjects by a chronic administration of a serotonin enhancer. *NeuroImage* 27, 299–313. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.12.023
- Lulé, D., Diekmann, V., Kassubek, J., Kurt, A., Birbaumer, N., Ludolph, A. C., et al. (2007). Cortical plasticity in amyotrophic lateral sclerosis: motor imagery and function. *Neurorehabil. Neural Repair* 21, 518–526. doi: 10.1111/j.1600-0404.1992.tb04003.x
- Lutz, C. (2018). Mouse models of ALS: past, present and future. *Brain Res.* 1693(Pt A), 1–10. doi: 10.1016/j.brainres.2018.03.024
- Ly, J. Q. M., Gaggioni, G., Chellappa, S. L., Papachilleos, S., Brzozowski, A., Borsu, C. E., et al. (2019). Circadian regulation of human cortical excitability. *Nat. Commun.* 7:11828. doi: 10.1038/ncomms11828
- Maekawa, S., Al-Sarraj, S., Kibble, M., Landau, S., Parnavelas, J., Cotter, D., et al. (2004). Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain* 127(Pt 6), 1237–1251. doi: 10.1212/WNL.49.5.1292
- Marien, M. R., Colpaert, F. C., and Rosenquist, A. C. (2004). Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res. Rev.* 45, 38–78. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.02.002
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 793–807. doi: 10.1038/nrn1519
- Marques, C., Fischer, M., Keime, C., Burg, T., Brunet, A., Scekick-Zahirovic, J., et al. (2019). Early alterations of RNA metabolism and splicing from adult corticospinal neurons in an ALS mouse model. *bioRxiv*[Preprint]
- Martorana, A. (2014). Is dopamine involved in Alzheimer's disease? *Front. Aging Neurosci.* 6:252. doi: 10.3389/fnagi.2014.00252/abstract
- Meier, J. M., van den Burgh, H. K., Niter, A. D., Bede, P., de Lange, S. C., Hardiman, O., et al. (2020). Connectome-based propagation model in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* [Epub ahead of print].
- Menke, R. A. L., Proudfoot, M., Wu, J., Andersen, P. M., Talbot, K., Benatar, M., et al. (2016). Increased functional connectivity common to symptomatic amyotrophic lateral sclerosis and those at genetic risk. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87, 580–588. doi: 10.1007/s00401-011-0805-3
- Menon, P., Gevasinga, N., Yiannikas, C., Kiernan, M. C., and Vucic, S. (2016). Cortical contributions to the flail leg syndrome: pathophysiological insights. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 17, 389–396. doi: 10.1007/BF00863768
- Menon, P., Kiernan, M. C., and Vucic, S. (2015). Cortical hyperexcitability precedes lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clin. Neurophysiol.* 126, 803–809. doi: 10.1016/j.clinph.2014.04.023

- Merton, P. A., and Morton, H. B. (1980). Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature* 285:227. doi: 10.1038/285227a0
- Michel, P. P., Hirsch, E. C., and Hunot, S. (2016). Understanding dopaminergic cell death pathways in Parkinson disease. *Neuron* 90, 675–691. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.038
- Mills, K. R. (2003). The natural history of central motor abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 126, 2558–2566. doi: 10.1093/brain/awg260
- Mills, K. R., and Nithi, K. A. (1997). Corticomotor threshold is reduced in early sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 20, 1137–1141. doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199709)20:9<1137::aid-mus7<3.0.co;2-9
- Minciacci, D., Kassa, R. M., Del Tongo, C., Mariotti, R., and Bentivoglio, M. (2009). Voronoi-based spatial analysis reveals selective interneuron changes in the cortex of FALS mice. *Exp. Neurol.* 215, 77–86. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.09.005
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., and Macklis, J. D. (2005). Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* 47, 817–831. doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.030
- Müller, H.-P., Brenner, D., Roselli, F., Wiesner, D., Abaci, A., Gorges, M., et al. (2019). Longitudinal diffusion tensor magnetic resonance imaging analysis at the cohort level reveals disturbed cortical and callosal microstructure with spared corticospinal tract in the TDP-43. *Transl. Neurodegener.* 8:27. doi: 10.1186/s40035-019-0163-y
- Nakamura, H., Kitagawa, H., Kawaguchi, Y., and Tsuji, H. (1997). Intracortical facilitation and inhibition after transcranial magnetic stimulation in conscious human. *J. Physiol.* 498, 817–823. doi: 10.1113/jphysiol.1997.sp021905
- Nestler, E., Hyman, S. E., Holtzman, D. M., and Malenka, R. C. (2015). *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*, 3rd Edn. New York, NY: The McGraw-Hill Companies.
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., et al. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133. doi: 10.1126/science.1134108
- Nieto-Gonzalez, J. L., Moser, J., Lauritzen, M., Schmitt-John, T., and Jensen, K. (2010). Reduced GABAergic inhibition explains cortical hyperexcitability in the wobbler mouse model of ALS. *Cereb. Cortex* 21, 625–635. doi: 10.1016/j.cortex.2010.05.1292
- Nihei, K., and Kowall, N. W. (1993). Involvement of NPY-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurosci. Lett.* 159, 67–70. doi: 10.1016/0304-3940(93)90800-z
- Nihei, K., McKee, A. C., and Kowall, N. W. (1993). Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol.* 86, 55–64. doi: 10.1007/bf00454899
- Orrell, R. W., King, A. W., Hilton, D. A., Campbell, M. J., Lane, R. J., and de Belleruche, J. S. (1995). Familial amyotrophic lateral sclerosis with a point mutation of SOD-1: intrafamilial heterogeneity of disease duration associated with neurofibrillary tangles. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 59, 266–270. doi: 10.1038/ng1293-323
- Oussini, E. H., Sekic-Zahirovic, J., Vercurysse, P., Marques, C., Dirrig-Grosch, S., Dieterlé, S., et al. (2017). Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 82, 444–456. doi: 10.1038/nn.3544
- Ozdinler, P. H., Bann, S., Yamamoto, T. H., Guzel, M., Brown, R. H., and Macklis, J. D. (2011). Corticospinal motor neurons and related subcortical projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G93A transgenic ALS mice. *J. Neurosci.* 31, 4166–4177. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4184-10.2011
- Panula, P., and Nuutinen, S. (2013). *The Histaminergic Network in the Brain: Basic Organization and Role in Disease*. Berlin: Nature Publishing Group, doi: 10.1038/nrn3526
- Panula, P., Pirvola, U., Auvinen, M. S., and Airaksinen, M. S. (1989). Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 28, 585–610. doi: 10.1016/0306-4522(89)90007-9
- Petri, S., Kollwe, K., Grothe, C., Hori, A., Dengler, R., Bufler, J., et al. (2006). GABA<sub>A</sub>-receptor mRNA expression in the prefrontal and temporal cortex of ALS patients. *J. Neurol. Sci.* 250, 124–132. doi: 10.1016/j.jns.2006.08.005
- Petri, S., Krampfl, K., Hashemi, F., Grothe, C., Hori, A., Dengler, R., et al. (2003). Distribution of GABA<sub>A</sub> receptor mRNA in the motor cortex of ALS patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 1041–1051. doi: 10.1093/jnen/62.10.1041
- Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Mercuri, N. B., and Zona, C. (2009). Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 215, 368–379. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.11.002
- Plewania, C., Bartels, L., Cohen, L., and Gerloff, C. (2001). Noradrenergic modulation of human cortex excitability by the presynaptic. *Neurosci. Lett.* 307, 41–44. doi: 10.1016/s0304-3940(01)01921-8
- Proudfoot, M., Bede, P., and Turner, M. R. (2019). Imaging cerebral activity in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Neurol.* 9:42.
- Proudfoot, M., Colclough, G. L., Quinn, A., Wu, J., Talbot, K., Benatar, M., et al. (2018). Increased cerebral functional connectivity in ALS. *Neurology* 90, e1418–e1424. doi: 10.1212/WNL.0000000000005333
- Proudfoot, M., Rohenkohl, G., Quinn, A., Colclough, G. L., Wu, J., Talbot, K., et al. (2016). Altered cortical beta-band oscillations reflect motor system degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Brain Mapp.* 38, 237–254. doi: 10.1002/hbm.23129
- Prout, A. J., and Eisen, A. (2004). Cortical silent period and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 17, 217–223. doi: 10.1002/mus.880170213
- Prudencio, M., Belzil, V. V., Batra, R., Ross, C. A., Gendron, T. F., Pregent, L. J., et al. (2015). Distinct brain transcriptome profiles in C9orf72-associated and sporadic ALS. *Nat. Neurosci.* 18, 1175–1182. doi: 10.1038/nature13261
- Puig, M. V., Watakabe, A., Ushimaru, M., Yamamori, T., and Kawaguchi, Y. (2010). Serotonin modulates fast-spiking interneuron and synchronous activity in the rat prefrontal cortex through 5-HT1A and 5-HT2A receptors. *J. Neurosci.* 30, 2211–2222. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3335-09.2010
- Ravits, J. M., and La Spada, A. R. (2009). ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread. *Neurology* 73, 805–811. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b6bbdb
- Ridding, M. C., Inzelberg, R., and Rothwell, J. C. (1995). Changes in excitability of motor cortical circuitry in patients with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 37, 181–188. doi: 10.1002/ana.410370208
- Riedemann, T. (2019). Diversity and function of somatostatin-expressing interneurons in the cerebral cortex. *JMS* 20, 2952. doi: 10.7554/eLife.04979
- 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. U.S.A.* 92, 689–693. doi: 10.1073/pnas.92.3.689
- Rosenbohm, A., Liu, M., Nagel, G., Peter, R. S., Cui, B., Li, X., et al. (2018). Phenotypic differences of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in China and Germany. *J. Neurol.* 265, 774–782. doi: 10.1007/s00415-018-8735-9
- Rossini, P. M., Burke, D., Chen, R., Cohen, L. G., Daskalakis, Z., Di Iorio, R., et al. (2015). Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an I.F.C.N. Committee. *Clin. Neurophysiol.* 126, 1071–1107. doi: 10.1016/j.clinph.2015.02.001
- Saba, L., Viscomi, M. T., Caioli, S., Pignataro, A., Bisicchia, E., Pieri, M., et al. (2015). Altered functionality, morphology, and vesicular glutamate transporter expression of cortical motor neurons from a presymptomatic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cereb. Cortex* 26, 1512–1528. doi: 10.1093/cercor/bhu317
- Santana, N. (2004). Expression of serotonin1a and serotonin2a receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* 14, 1100–1109. doi: 10.1093/cercor/bhh070
- Sarter, M., Lustig, C., Howe, W. M., Gritton, H., and Berry, A. S. (2014). Deterministic functions of cortical acetylcholine. *Eur. J. Neurosci.* 39, 1912–1920. doi: 10.1111/ej.1460-9568.2005.04333.x
- Schulte, J. T., Wierenga, C. J., and Bruining, H. (2018). Chloride transporters and GABA polarity in developmental, neurological and psychiatric conditions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 90, 260–271. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.05.001
- Schulthess, I., Gorges, M., Müller, H.-P., Lulé, D., Del Tredici, K., Ludolph, A. C., et al. (2016). Functional connectivity changes resemble patterns of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* 6:38391. doi: 10.1038/srep38391
- Schwaller, B., Tetko, I. V., Tandon, P., Silveira, D. C., Vreugdenhil, M., Henzi, T., et al. (2004). Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 650–663. doi: 10.1016/j.mcn.2003.12.006

- Schwarz, L. A., and Luo, L. (2015). Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Curr. Biol.* 25, R1051–R1056. doi: 10.1016/j.cub.2015.09.039
- Scullion, K., Boychuk, J. A., Yamakawa, G. R., Rodych, J. T. G., Nakanishi, S. T., Seto, A., et al. (2013). Serotonin 1A receptors alter expression of movement representations. *J. Neurosci.* 33, 4988–4999. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4241-12.2013
- Sephton, C. F., and Yu, G. (2015). The function of RNA-binding proteins at the synapse: implications for neurodegeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3621–3635. doi: 10.1007/s00018-015-1943-x
- Shan, L., Bao, A.-M., and Swaab, D. F. (2015). The human histaminergic system in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* 38, 167–177. doi: 10.1016/j.tins.2014.12.008
- Shibuya, K., Park, S. B., Geevasinga, N., Menon, P., Howells, J., Simon, N. G., et al. (2016). Motor cortical function determines prognosis in sporadic ALS. *Neurology* 87, 513–520. doi: 10.1212/WNL.0000000000002912
- Sorenson, E. J. (2012). The electrophysiology of the motor neuron diseases. *Neurol. Clin.* 30, 605–620. doi: 10.1016/j.ncl.2011.12.006
- Thomsen, G. M., Gowing, G., Latter, J., Chen, M., Vit, J. P., Staggenborg, K., et al. (2014). Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J. Neurosci.* 34, 15587–15600. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2037-14.2014
- Tremblay, R., Lee, S., and Rudy, B. (2016). GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits. *Neuron* 91, 260–292. doi: 10.1016/j.neuron.2016.06.033
- Turner, M. R., Hammers, A., Al-Chalabi, A., Shaw, C. E., Andersen, P. M., Brooks, D. J., et al. (2005). Distinct cerebral lesions in sporadic and “D90A” SOD1 ALS: studies with [<sup>11</sup>C]flumazenil PET. *Brain* 128, 1323–1329. doi: 10.1212/WNL.49.5.1292
- Van den Bos, M. A. J., Menon, P., Howells, J., Geevasinga, N., Kiernan, M. C., and Vucic, S. (2018). Physiological processes underlying short interval intracortical facilitation in the human motor cortex. *Front. Neurosci.* 12:74. doi: 10.1016/S0924-980X(98)00023-X
- van Es, M. A., Hardiman, O., Chiò, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R. J., Veldink, J. H., et al. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 390, 2084–2098. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31287-4
- Verstraete, E., Veldink, J. H., van den Berg, L. H., and van den Heuvel, M. P. (2013). Structural brain network imaging shows expanding disconnection of the motor system in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Brain Mapp.* 35, 1351–1361. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.004
- Vertes, R. P., Fortin, W. J., and Crane, A. M. (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 407, 555–582. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19990517)407:4<555::aid-cne7>3.0.co;2-e
- Vitrac, C., and Benoit-Marand, M. (2017). Monoaminergic modulation of motor cortex function. *Front. Neural Circuits* 11:72. doi: 10.3389/fncir.2017.00072
- Vogels, O., Veltman, J., Oyen, W., and Horstink, M. (2000). Decreased striatal dopamine D2 receptor binding in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and multiple system atrophy (MSA): D2 receptor down-regulation versus striatal cell degeneration. *J. Neurol. Sci.* 180, 62–65. doi: 10.1016/S0022-510X(00)00429-9
- Vucic, S. (2006). Novel threshold tracking techniques suggest that cortical hyperexcitability is an early feature of motor neuron disease. *Brain* 129, 2436–2446. doi: 10.1093/brain/awl172
- Vucic, S., and Kiernan, M. C. (2017). Transcranial magnetic stimulation for the assessment of neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics* 14, 91–106. doi: 10.1007/s13311-016-0487-6
- Vucic, S., Nicholson, G. A., and Kiernan, M. C. (2008). Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131, 1540–1550. doi: 10.1212/WNL.49.5.1292
- Wang, X. S., Simmons, Z., Liu, W., Boyer, P. J., and Connor, J. R. (2009). Differential expression of genes in amyotrophic lateral sclerosis revealed by profiling the post mortem cortex. *Amyotroph. Lateral Scler.* 7, 201–216. doi: 10.1038/88842
- Wang, Y., Wang, H., and Cui, L.-Y. (2019). Triple stimulation technique in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Clin. Neurophysiol.* 36, 87–92. doi: 10.1097/WNP.0000000000000520
- Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N. J., Miller, T. M., and Baloh, R. H. (2009). TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *PNAS* 106, 18809–18814. doi: 10.1073/pnas.0908767106
- Weskamp, K., Tank, E. M., Miguez, R., McBride, J. P., Gómez, N. B., White, M., et al. (2019). Shortened TDP43 isoforms upregulated by neuronal hyperactivity drive TDP43 pathology in ALS. *J. Clin. Invest.* 130, 1139–1155. doi: 10.1172/JCI130988DS1
- Wicks, P., Turner, M. R., Abrahams, S., Hammers, A., Brooks, D. J., Leigh, P. N., et al. (2009). Neuronal loss associated with cognitive performance in amyotrophic lateral sclerosis: an (11C)-flumazenil PET study. *Amyotroph. Lateral Scler.* 9, 43–49. doi: 10.1080/17482960701737716
- Yabe, I., Tsuji-Akimoto, S., Shiga, T., Hamada, S., Hirata, K., Otsuki, M., et al. (2012). Writing errors in ALS related to loss of neuronal integrity in the anterior cingulate gyrus. *J. Neurol. Sci.* 315, 55–59. doi: 10.1016/j.jns.2011.11.039
- Yasvoina, M. V., Genc, B., Jara, J. H., Sheets, P. L., Quinlan, K. A., Milosevic, A., et al. (2013). eGFP expression under UCHL1 promoter genetically labels corticospinal motor neurons and a subpopulation of degeneration-resistant spinal motor neurons in an ALS mouse model. *J. Neurosci.* 33, 7890–7904. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2787-12.2013
- Zanette, G., Tamburin, S., Manganotti, P., Refatti, N., Forgiato, A., and Rizzuti, N. (2002). Different mechanisms contribute to motor cortex hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* 113, 1688–1697. doi: 10.1016/S1388-2457(02)00288-2
- Zang, D. W., and Cheema, S. S. (2002). Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1. *Neurosci. Lett.* 332, 99–102. doi: 10.1016/S0304-3940(02)00944-8
- Zant, J. C., Rozov, S., Wigren, H. K., Panula, P., and Porkka-Heiskanen, T. (2012). Histamine release in the basal forebrain mediates cortical activation through cholinergic neurons. *J. Neurosci.* 32, 13244–13254. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5933-11.2012
- Zarow, C., Lyness, S. A., Mortimer, J. A., and Chui, H. A. (2003). Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch. Neurol.* 60, 337–341. doi: 10.1001/archneur.60.3.337
- Zhang, W., Zhang, L., Liang, B., Schroeder, D., Zhang, Z.-W., Cox, G. A., et al. (2016). Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nat. Neurosci.* 19, 557–559. doi: 10.1038/nbn3165
- Ziemann, U., Bruns, D., and Paulus, P. (1996). Enhancement of human motor cortex inhibition by the dopamine receptor agonist pergolide: evidence from transcranial magnetic stimulation. *Neurosci. Lett.* 208, 187–190. doi: 10.1016/0304-3940(96)12575-1

**Conflict of Interest:** The 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 © 2020 Brunet, Stuart-Lopez, Burg, Scekcic-Zahirovic and Rouaux. 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.

# Objectifs du travail de thèse

## Objectifs du travail de thèse

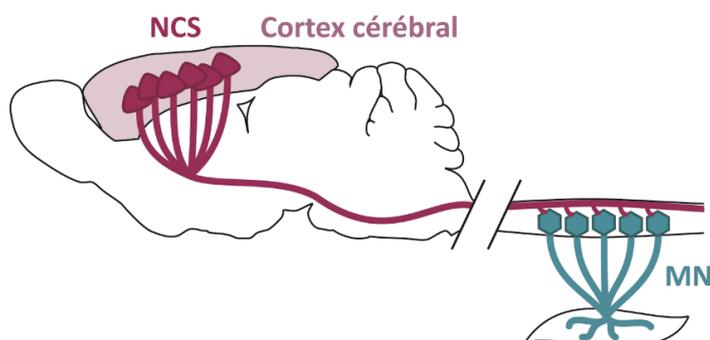
Comme nous l'avons vu précédemment, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones corticospinaux (NCS) localisés dans le cortex cérébral, et des motoneurones, localisés dans le tronc cérébral et la moelle épinière. Malgré les efforts de recherche, la SLA reste encore incurable.

L'altération du fonctionnement cortical caractérisée par une hyperexcitabilité corticale, et mise en évidence chez les patients par stimulation magnétique transcrânienne, est retrouvée de façon précoce chez ces derniers. Cette altération de la balance excitation-inhibition corticale est même pré-symptomatique chez les patients porteurs d'une mutation *SOD1*. Enfin, elle est négativement corrélée à la survie des patients. La précocité de cette altération pourrait suggérer son implication dans la physiopathologie de la SLA et la neurodégénérescence des NCS. Il apparait donc essentiel de comprendre **1) comment se reflète cette hyperexcitabilité corticale dans les NCS, 2) les mécanismes sous-tendant cette altération et 3) par quels moyens ce déséquilibre pourrait être corrigé.**

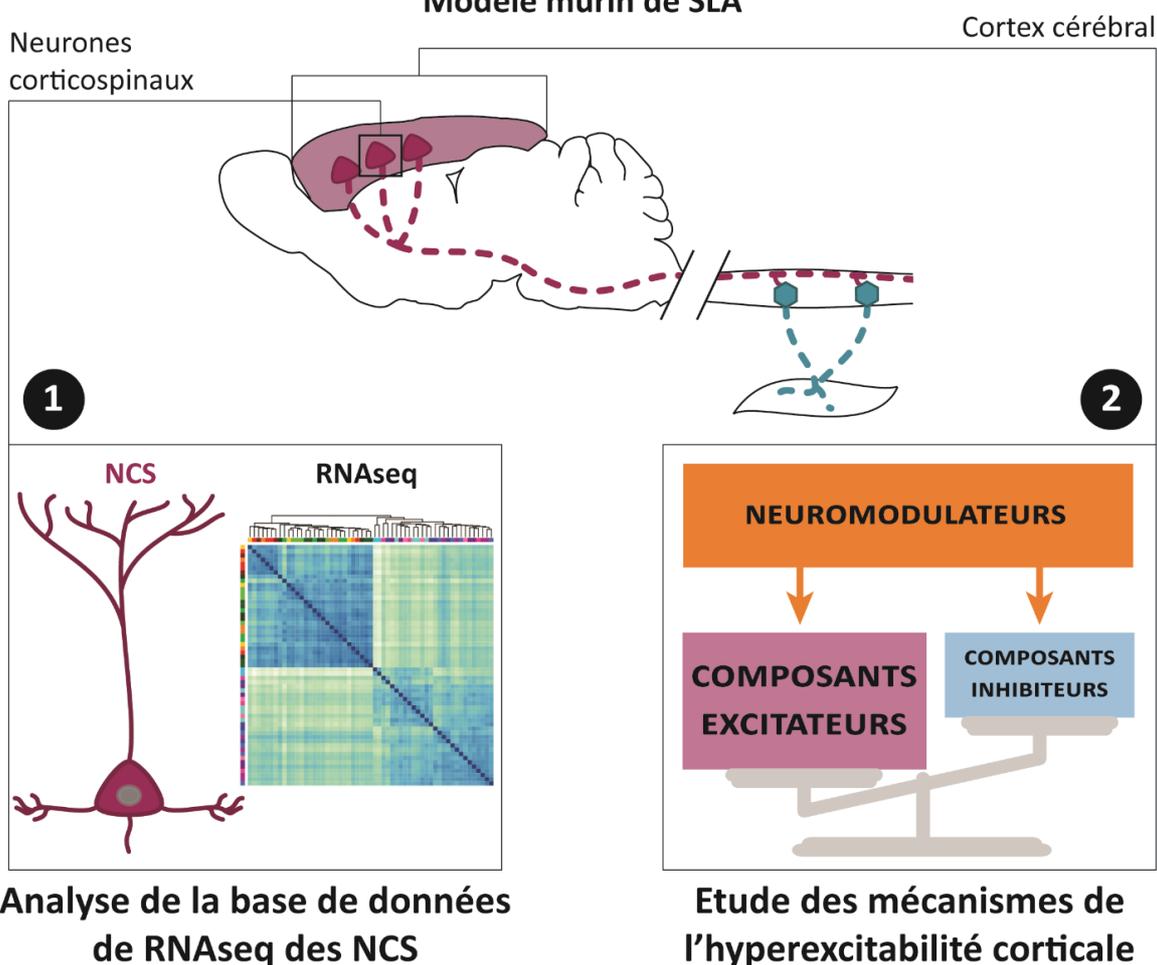
Pour cela, nous avons utilisé plusieurs modèles murins de SLA parmi lesquels les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. L'utilisation d'électrocorticographie et d'un test de susceptibilité au pentylènetétrazol, un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>, a permis la mise en évidence d'une altération de la balance excitation-inhibition dans le sens d'une hyperexcitabilité corticale chez ces modèles. Ainsi, il semble que les modèles murins de SLA récapitulent l'altération du fonctionnement cortical retrouvé chez les patients.

La neurodégénérescence caractéristique des NCS, retrouvée dans les modèles murins de SLA, se fait donc dans un environnement cortical à l'excitabilité altérée.

## Souris sauvage



## Modèle murin de SLA



### Figure 31 : Objectifs de thèse.

Les modèles murins de SLA récapitulent la perte des neurones corticospinaux (NCS), des motoneurons (MN) et l'hyperexcitabilité corticale retrouvés chez les patients. Cette thèse a eu pour but (1) d'identifier des gènes candidats issus de l'analyse de la base de données de séquençage des ARNm de NCS d'un modèle murin de SLA et (2) de rechercher les mécanismes pouvant sous-tendre l'hyperexcitabilité corticale dans des modèles murins de la maladie.

L'utilisation de séquençage des ARNm sur des NCS de souris sauvages et *Sod1<sup>G86R</sup>* a permis la génération d'une base de données des gènes dérégulés chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* de cette population neuronale. **Le premier objectif de ma thèse était d'étudier les dérégulations transcriptomiques des neurones corticospinaux pouvant répondre ou traduire de l'hyperexcitabilité corticale dans un modèle murin de SLA (Figure 31).** Pour ce faire, j'ai généré une liste de gènes en lien avec l'excitabilité neuronale que j'ai confronté à la base de données mentionnées précédemment. J'ai ainsi pu identifier des gènes candidats que j'ai ensuite validé à l'échelle du cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>*.

Les résultats issus de cette première partie suggèrent une altération de la réponse au GABA des NCS et une possible atteinte de la transmission GABAergique à l'échelle du cortex moteur. J'ai donc étudié les niveaux de différents neurotransmetteurs inhibiteurs, excitateurs et neuromodulateurs dans le cortex de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/-ANLS</sup>* présentant cette hyperexcitabilité corticale. Ainsi, **le second objectif de ma thèse consistait à déterminer les bases moléculaire et cellulaire de l'hyperexcitabilité corticale dans les modèles murins de SLA (Figure 31).** J'ai utilisé des approches de spectrométrie de masse mettant notamment en évidence, et cela pour la première fois, une altération du système noradrénergique. J'ai ensuite employé des techniques d'histologie et biochimie afin d'étudier l'atteinte de ce dernier. En combinant l'électrocorticographie à l'application de molécules modulant le système noradrénergique, j'ai pu étudier l'impact de la déplétion des niveaux corticaux de noradrénaline et de leur supplémentation sur la balance excitation-inhibition corticale.

Les résultats obtenus mettent en évidence, pour la première fois, une altération du système noradrénergique et la contribution de la déplétion des niveaux corticaux de noradrénaline à l'hyperexcitabilité corticale dans des modèles murins de SLA.

# Résultats

## Résultats

### I. Identification de gènes candidats impliqués dans l'excitabilité des neurones corticospinaux dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique

#### *English summary*

Incurable and fatal, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease leading to progressive paralysis and death within 3 to 5 years. In the clinical field, it is defined by the combined degeneration of corticospinal neurons (CSN) and bulbar and spinal motoneurons. ALS is also characterised by an early cortical hyperexcitability, negatively correlated to patient survival, which could be decisive in the onset and progression of the disease.

Recently, Christine Marques and Jelena Scekcic-Zahirovic demonstrated that *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, a mouse model of ALS, reproduce the progressive loss of CSN (Marques et al., 2021) and cortical hyperexcitability (Brunet, Scekcic-Zahirovic et al., in preparation). To elucidate the molecular pathways that govern this dysfunction and neurodegeneration, Christine Marques and collaborators generated a RNAseq database of CSN purified from the motor cortex of wild type and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice at different stages of the disease (presymptomatic: 30 and 60 days old; symptomatic: 90 and 105 days old).

The first objective of this study was to use this database to identify transcriptional modifications linked to CSN excitability and/or functionality in *Sod1*<sup>G86R</sup> compared to wild type mice. To do so, I generated a list of 271 genes encoding receptor subunits (glutamate, GABA, glycine, ATP, acetylcholine, monoamine), transporters, glutamate synthesis and degradation

enzymes, catecholamine/monoamine degradation enzymes, voltage gated ion channels subunits or molecules involved in docking and fusion of vesicles. Using a selection based on statistical criteria (adjusted p value < 0.01; Log<sub>2</sub>(Fold change) > |0.5|), 16 candidate genes were identified: 4 GABA<sub>A</sub> receptor subunits (*Gabra1*, *Gabra3*, *Gabrd*, *Gabrg2*), 4 voltage gated ion channel subunits (*Cacna1g*, *Kcnab3*, *Kcng2*, *Scn1b*), 5 molecules involved in docking and fusion of vesicles (*Snap25*, *Snap47*, *Stx12*, *Sv2c*, *Syt12*), 1 glycinergic receptor (*Glr3b*), 1 adrenergic receptor (*Adra2b*) and 1 histamine degradation enzyme (*Hnmt*). While the expression of *Adra2b* and *Cacna1g* is decreased, all the other candidate genes expressions are increased.

The expression of the 3 major group of candidate genes (GABA<sub>A</sub> receptor subunits, voltage gated ion channel subunits and molecules involved in docking and fusion of vesicles) was analysed in the layer V of the motor cortex of wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 60 and 90 days old using qPCR. Among these 13 genes, the dysregulation found in CSN was validated in the cortical layer V for 6 of them: *Gabrg2*, *Kcnab3*, *Scn1b*, *Snap47*, *Sv2c* and *Syt12*. Transcriptional modifications found in CSN and/or layer V of the motor cortex for gene encoding voltage gated ion channel subunits and molecules involved in docking and fusion of vesicles might suggest an increased neuronal excitability of CSN and other layer V neuronal populations. In this context, and when cortical hyperexcitability was shown in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (Brunet, Scekic-Zahirovic et al., in preparation), the increased expression of genes encoding GABA<sub>A</sub> receptor subunits might suggest a compensatory attempt.

To determine if the upregulation of genes involved in neuronal excitability and activity, as well as genes encoding GABA<sub>A</sub> receptor subunits, might result from an altered inhibitory system, GABAergic interneurons markers were evaluated. Using qPCR in layer II/III and V of the motor cortex of wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 60 and 90 days old, we showed increased

*Pvalb* (Parvalbumine, ~40% of cortical GABAergic interneurons (Tremblay et al., 2016)) expression in both layers and *Gad1* (glutamate decarboxylase 1, GABA synthesis enzyme) expression in layer II/III. While some CSN inhibition occurs on their soma and dendrites, in layer V, a lot of GABAergic connections also occurs on their apical dendrite, in layer II/III (Markram et al., 2004).

To elucidate if the increased *Gad1* and *Pvalb* expression results in an increased transcription of these genes or an increase in interneurons density in the tested cortical layers, hybridation in situ and fluorescence immunolabelling were performed on wild type and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice. At 60 days, hybridation in situ for *Gad1*, *Pvalb* and *Sst* (Somatostatine, ~30% of cortical GABAergic interneurons (Tremblay et al., 2016)) showed no modification of these GABAergic interneurons density in *Sod1*<sup>G86R</sup> motor cortex. Fluorescence immunolabelling targeting PV (parvalbumin), SST, CR (calretinin) and NPY (neuropeptide Y)(interneurons markers) on the motor cortex of 60 and 90 days old *Sod1*<sup>G86R</sup> and wild type mice showed no modification in interneurons density either. These data suggest that the increased expression of *Gad1* and *Pvalb* in layer II/III of *Sod1*<sup>G86R</sup> motor cortex cannot be explained by an increased density of GABAergic interneurons.

Because cortical hyperexcitability is an early characteristic of ALS and negatively correlated to patient survival, it might play a key role in the onset and progression of the disease (Eisen et al., 2017). *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse, a widely used ALS mouse model, recapitulates both CSN and motoneurons loss and this early cortical hyperexcitability (Brunet, Scekic-Zahirovic et al., in preparation).

In this context, this study unravelled transcriptional modifications linked to a potential alteration of CSN excitability and functionality in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. A first part of our analyses, when confronted to RNAseq database of CSN purified from the motor cortex of wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, allowed the selection of 16 candidate genes significantly dysregulated in this model including 4 gene encoding GABA<sub>A</sub> receptor subunits, 4 voltage gated ion channel subunits and 5 molecules involved in docking and fusion of vesicles. qPCR analyses on cortical layer V validated transcriptional dysregulations for 6 of these 13 genes suggesting that some of these alterations are common to different cortical cellular populations.

The significant increase in *Kcnab3* and *Scn1b* involved in the generation and propagation of action potentials, and *Snap47*, *Sv2c* and *Syt12* involved in docking and fusion of vesicles might support a global increase of neuronal excitability and activity in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice motor cortex. Such neuronal hyperexcitability has been demonstrated in layer V pyramidal neurons of different SOD1 and TDP-43 ALS mouse model motor cortex (Saba et al., 2016; Zhang et al., 2016; Kim et al., 2017; Khademullah et al., 2020).

The significant increase in *Gabra1*, *Gabra3*, *Gabrd* and *Gabrg2* in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice CSN, also found in the cerebral cortex of ALS patients (*GABRA1*, *GABRA3*, *GABRD*)(Andrés-Benito et al., 2017), might be interpreted as a compensatory attempt to increase cortical inhibition in a hyperexcitable cortex. *Sod1<sup>G86R</sup>* mice motor cortex does not show any modification of GABAergic interneurons density but an increase in *Gad1* expression in layer II/III which could suggest an alteration of cortical GABA levels.

Here, we proposed two models of interpretation of these data: 1) increased excitability of CSN following decreased inhibition from PV+ interneurons due to increased activity of SST+

interneurons (Zhang et al., 2016) or 2) intrinsic modification of CSN response to GABA due to increased NKCC1/KCC2 ratio leading to their hyperexcitability (Ben-Ari et al., 2012).

## 1. Introduction

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative, caractérisée par l'atteinte conjointe des neurones corticospinaux et des motoneurones bulbaires et spinaux (Charcot, 1886), conduisant à la paralysie progressive des patients et à leur décès dans les 3 à 5 ans suivant le diagnostic (Goetz, 2000).

De nombreuses études pointent du doigt le cortex cérébral et les neurones corticospinaux comme site d'origine et de propagation de la SLA (Geevasinga et al., 2016; Eisen et al., 2017; Brunet et al., 2020; Gunes et al., 2020). Il a été proposé que le mécanisme de propagation, dite corticofuge (Braak et al., 2013), via les neurones corticospinaux, serait due à une excitabilité aberrante de ces derniers, induite par l'hyperexcitabilité corticale, et conduisant à une excitotoxicité glutamatergique sur leurs cellules (Eisen et al., 2017; Vucic and Kiernan, 2017).

Une hyperexcitabilité corticale est retrouvée de façon précoce chez les patients (Vucic and Kiernan, 2006; Menon et al., 2015a), voire présymptomatique chez les porteurs d'une mutation *SOD1* (Vucic et al., 2008), et est négativement corrélée à la survie (Eisen et al., 1993; Shibuya et al., 2016). Localisés dans le cortex cérébral, et cet environnement d'hyperexcitabilité corticale, les neurones corticospinaux persistants présentent une hyperexcitabilité dans différents modèles murins de SLA (Pieri et al., 2009; Saba et al., 2016b; Zhang et al., 2016a; Kim et al., 2017b; Khademullah et al., 2020).

Afin de déterminer ce qui pourrait traduire d'une altération de l'excitabilité des neurones corticospinaux et ce qui pourrait participer à leur neurodégénérescence, nous avons exploré, avec une stratégie *a priori*, une base de données de séquençage des ARNm de neurones corticospinaux issus de la couche V du cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et leurs contrôles

sauvages, à 4 âges présymptomatiques (30, 60 jours) et symptomatiques (90, 105 jours)(Marques et al., 2019). Nous avons mis en évidence la dérégulation, principalement par augmentation, de l'expression de gènes codants notamment des sous-unités de récepteurs GABAergiques, de canaux voltage-dépendants et des molécules de fusion ou arrimage des vésicules synaptiques. L'augmentation d'expression de ces deux dernières catégories pourrait refléter l'hyperexcitabilité des neurones corticospinaux, déjà mise en évidence dans d'autres modèles murins de SLA (Pieri et al., 2009; Saba et al., 2016b; Zhang et al., 2016a; Kim et al., 2017b; Khademullah et al., 2020), avec notamment une augmentation de la transmission glutamatergique. L'étude de la densité des principales populations d'interneurones inhibiteurs ne montre aucune altération, ainsi l'augmentation d'expression de sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> pourrait suggérer la mise en place un mécanisme compensatoire afin de réguler l'activité des neurones corticospinaux.

Nous démontrons donc que l'utilisation de la base de données de séquençage des ARNm de neurones corticospinaux permet de retrouver des dérégulations transcriptomiques pouvant traduire de l'altération d'excitabilité de ces derniers ou de potentiels mécanismes compensatoires.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Présélection bibliographique et sélection statistique des gènes candidats

Des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'excitabilité et le fonctionnement des neurones excitateurs corticaux ont été déterminés. Des recherches bibliographiques, sur des sites tels que PubMed (US National Library of Medicine National Institutes of Health), GeneCards et le Mouse Gene Sorter du site GenomeBrowser de l'Université californienne de Santa Cruz, ont permis de dresser une liste de 271 gènes.

Une base de données de séquençage des ARNm de neurones corticospinaux (NCS) de souris sauvages et *Sod1<sup>G86R</sup>* aux âges de 30, 60, 90 et 105 jours (RNAseq\_NCS<sup>WT/Sod1G86R</sup>) générée au laboratoire (Marques et al., 2019) a été interrogée. Pour se faire, un test de rapport de vraisemblance a été appliqué de manière à déterminer si, aux 4 âges testés, les gènes présélectionnés présentaient des niveaux d'expression différents dans les échantillons *Sod1<sup>G86R</sup>* comparativement aux sauvages. Deux critères statistiques ont été choisis : une valeur p ajustée  $< 0.01$ , et un rapport d'expression des gènes entre les conditions sauvage et transgénique, exprimé en  $\log_2(\log_2(FC))$ ,  $> |0.5|$ , correspondant à un rapport de niveau d'expression des gènes entre échantillons de 1.41.

### 2.2. Animaux

Toutes les procédures expérimentales appliquées ont été préalablement autorisées par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS), sous le numéro de projet 2015082617403748\_v2. Les manipulations ont été menées sur des souris de la lignée FVB/N sauvages et transgéniques *Sod1<sup>G86R</sup>* (Ripps et al.,

1995) issues de mêmes portées. Les souris *Sod1*<sup>G86R</sup> surexpriment une forme inactive et mutée (substitution d'une arginine par une glycine) du gène murin *Sod1*. Les souris ont été élevées dans l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg à une température constante de 22°C, un cycle jour/nuit de 12h/12h et de l'eau et nourriture *ad libitum*. Pour des raisons éthiques, les femelles ont servi aux études de biologie moléculaire, et les mâles aux études histologiques.

### 2.3. Préparation des tissus

Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital de sodium (Doléthal, 120mg/kg). Pour l'analyse en qPCR (femelles 60 jours : n = 6 WT, n = 6 *Sod1* ; 90 jours : n = 6 WT, n = 6 *Sod1*), les cerveaux ont été prélevés, placés dans une matrice et coupés en coupes coronales de 1mm d'épaisseur (Zivic Instrument, 1mm). Sous microscope stéréotaxique, les couches corticales II/III et V ont été micro-disséquées sur 4 coupes consécutives (Bregma -2 à +2mm) et les tissus immédiatement placés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Pour les analyses histologiques (mâles 60 jours : n = 4-6 WT, n = 4-6 *Sod1* ; 90 jours : n = 6 WT, n = 6 *Sod1*), les souris ont été perfusées en intracardiaque avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) (Sigma, 47608) 4% dans du tampon phosphate salin (PBS 1X) (Sigma, P4417). Les cerveaux ont été prélevés, post-fixés dans du PFA 4% 18h à 4°C puis rincés dans du PBS 1X et coupés selon le plan coronal à 40µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome (VT 1000 S, Leica Biosystems, Allemagne). Les coupes ont été stockées à 4°C dans du PBS 1X-0.02% Thimérosal (Sigma, T5125) jusqu'à utilisation.

## 2.4. Extraction d'ARN et RT-qPCR

Les tissus congelés des couches corticales II/III et V ont été placés dans du TRIzol (Ambion, 15596) et l'ARN total a été extrait suivant les recommandations du fournisseur. L'ARN (1µg) a subi une transcription inverse en ADNc à l'aide de iScript reverse transcription (Bio-Rad, 1708841). Les qPCR ont été réalisées en utilisant le SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) sur le système CFX (Bio-Rad) et quantifiées par le logiciel Bio-Rad. L'expression génique a été normalisée à l'aide de 3 gènes de référence (*Actb*, *Gusb* et *Hsp90ab1*) via le programme GeNorm Software 3.5 (Vandesompele et al., 2002). Les séquences de primer suivantes ont été utilisées pour les RT-qPCR :

<i>Actb</i>	F-ATGTGGATCAGCAAGCAGGA	R-AGCTCAGTAACAGTCCGCCT
<i>Cacna1g</i>	F-CACCCTCACCAGCTTCAACA	R-CAGGCTCCCGTACTCTGTGT
<i>Gabra1</i>	F-CCCACAACATGACCATGCCTA	R-TCTCACGGTCAACCTCATGG
<i>Gabra3</i>	F-ATCAGGGCTTAGCCTCCAACTT	R-GAAGAGACCTGTGAGATCGAGTGT
<i>Gabrd</i>	F-CACCAGTTACCGCTTACCA	R-GGAAGTGTAAGCTGAGCCGT
<i>Gabrg2</i>	F-TATCCATGCCCAATCCGTGG	R-TGCCTTGCAGGTTTGAAGGA
<i>Gad1</i>	F-CTGGTGAATGGCTGACATCG	R-TCCATGAGAACAAACACGGG
<i>Gusb</i>	F-CGAGTATGGAGCAGACGCAA	R-AGCCTTCTGGTACTCCTCACT
<i>Hsp90ab1</i>	F-TACTACTCGGCTTTCCCGTCA	R-CCTGAAAGGCAAAGGTCTCCA
<i>Kcnab3</i>	F-ATGAGCACGGCGTAAACCT	R-CTCCTCCAGCCTTTGCTCTT
<i>Kcng2</i>	F-ACAGCCGAGAACAAACATCCT	R-GCTTGGTTGGTTCCTGACTT
<i>Pvalb</i>	F-TGTCGATGACAGACGTGCTC	R-TTTGTGGTGAAGGAGTCTGC
<i>Scn1b</i>	F-GGCAGAGATGGTGTACTGCT	R-CAGGTATTCTGAGGCGTTCTCT
<i>Snap25</i>	F-GCTGCAGCTGGTTGAAGAGA	R-CCATCCCTCCTCAATGCGT
<i>Snap47</i>	F-CTCCTCTTGCCTCAGCAGATA	R-CAGGAGTGGACACGCATATCA
<i>Sst</i>	F-ACCCAGACTCCGTGAGTTT	R-TACTTGGCCAGTTCCTGTTTCC
<i>Stx12</i>	F-TTGCACCCGTGACTTCAGAC	R-AGACTGTCCCACACAACCTG
<i>Sv2c</i>	F-AATTGAGAGCGACACGGGAA	R-TGTCAGCCAAATTCCGTACAGT
<i>Syt12</i>	F-CTGAAGCTGTCCGTTCTGGAT	R-CGTCAGCAGCCTTATTCTGGT

## 2.5. Hybridation *in situ*

Les ribosondes antisens permettant de reconnaître les ARNm des gènes *Gad*, *Pvalb* et *Sst* ont été généreusement fournies par le laboratoire du Pr. Paola Arlotta (Lodato et al., 2011). Les coupes (mâles 60 jours : n = 4 WT, n = 4 *Sod1*) correspondantes entre chaque animal ont été montées sur lames superfrost (Superfrost, Thermo Scientific), laissées à sécher avant d'être réhydratées au PBS. Les coupes ont été perméabilisées au Triton X (Sigma, T8787) puis traitées dans une solution de RIPA (Desoxycholate de sodium 0,5%; NaCl 150mM; Tris 50mM; EDTA 1mM ; NP40 1%; SDS 0,1%). Les coupes ont été fixées une seconde fois au PFA 4% avant d'être immergées 10min dans une solution de Triethanolamine 100mM à 0,4% d'anhydride acétique et incubées 1h température ambiante, dans la solution d'hybridation (formamide 50%, Solution Saline de Citrate de Sodium, ou SSC, 5X ; solution de Denhardt's 5X ; ADN de sperme de saumon 500µg/ml ; ARN de levure 250µg/ml) préchauffée à 70°C. Les coupes ont été mises à hybrider durant la nuit à 70°C (sondes à 0.005µg/µL) dans un four à hybridation (VWR). Après lavage dans une solution de post-hybridation (formamide 50%, SSC 2X ; Tween-20 0,1%) à 70°C puis une solution de MABT (acide maléique 100 mM ; NaCl 150 mM ; Tween-20 0,1%) à température ambiante, les lames ont été incubées dans une solution de blocage (MABT complété de 10% de sérum de chèvre) 1h à température ambiante puis recouvertes d'une solution de blocage additionnée d'anticorps antidigoxigénine couplés à la phosphatase alcaline (anti-digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche) dilué au 1/1000, et maintenues ainsi à 4°C jusqu'au lendemain. Après lavages au MABT, une incubation de 30min dans une solution de révélation (Tris, pH9.5, 100mM ; MgCl<sub>2</sub>, 50mM ; NaCl, 100mM ; Tween-20, 0,1%), sans substrat, a été effectuée avant de commencer la révélation du signal par incubation avec la même solution additionnée d'un substrat commercial de l'alcaline

phosphatase, le NBT-BCIP (nitro blue tetrazolium chloride à 0,375mg/ml et 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate p-toluidine-salt à 0,188mg/ml final ; Roche), à température ambiante et à l'obscurité sur une durée de 8h. Les lames ont enfin été lavées au PBS 1X contenant 0,1% et de Tween-20, puis à l'eau, avant d'être séchées à l'air libre puis montées sous lamelle avec du Roti-Histokitt (Karl Roth). Un contrôle d'hybridation réalisé avec les ribosondes sens a été réalisé à plusieurs reprises au laboratoire et dans le laboratoire qui a fourni les plasmides, sans jamais obtenir de signal.

## 2.6. Immunofluorescence

Les coupes (mâles 60 jours : n = 5 WT, n = 5 *Sod1* ; 90 jours : n = 5 WT, n = 5 *Sod1*) correspondantes entre chaque animal ont été incubées dans une solution de blocage (8% sérum de chèvre ou de cheval, 0.3% BSA, 0.3% Triton dans du PBS), puis une nuit à 4°C dans une solution de blocage et d'anticorps primaires. Après rinçage au PBS, les coupes ont été incubées dans une solution de blocage et d'anticorps secondaires pendant 2h. Les coupes ont été rincées au PBS et à l'eau avant d'être montées sur lame avec du DPX (Sigma, 06522).

Les anticorps primaires utilisés étaient les suivant : souris anti-PV (Sigma, P3088, 1/1000), souris anti-SST (Santa Cruz, sc-74556, 1/200), lapin anti-NPY (Abcam, ab30914, 1/1000), chèvre anti-CR (Millipore, ab1550, 1/1000) et rat anti-CTIP2 (Abcam, ab18465, 1/500). Les anticorps secondaires utilisés étaient : âne anti-souris Dylight 649 (Abcam, ab98769), chèvre anti-souris-647 (Invitrogen, A21236), âne anti-lapin Alexa-647 (Jackson, 711-605-152), âne anti-rat Alexa-594 (Molecular probes, A21209), chèvre anti-rat Alexa-546 (Life Technologies, A11081) et âne anti-chèvre Alexa-488 (Jackson, 705-545-147).

## 2.7. Analyses histologiques

Les acquisitions ont été faites à l'aide d'un microscope droit à fluorescence AxioImager et d'une caméra couleur AxioCam (ZEISS Microscopy, Allemagne), l'ensemble piloté par le logiciel Zen 2 pro.

Les images ont été recadrées de manière à créer, en utilisant les repères anatomiques présents sur l'image, un rectangle de la hauteur du cortex et dont la largeur correspond à celle de la zone contenant les NCS. Le rectangle a été subdivisé en 6 ou 10 rectangles (pour l'hybridation *in situ* et l'immunofluorescence respectivement) de même aire dans lesquels les comptages ont été réalisés manuellement. L'aire de comptage a été mesurée pour chaque image afin de normaliser les comptages en densités de neurones (nombre de neurones/mm<sup>2</sup>). Pour chaque animal, les 2 hémisphères ont été comptés et moyennés.

## 2.8. Analyses statistiques

Toutes les valeurs sont représentées sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM (erreur standard à la moyenne). Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism (GraphPad). L'analyse de variance à deux facteurs a été utilisée pour les résultats de qPCR et le test paramétrique de Student pour les résultats de comptage des interneurones. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Gènes						Critères de sélection	Gènes candidats	Sens de dérégulation
<i>Grin1</i>	<i>Drd1</i>	<i>Chrna9</i>	<i>Kcnd1</i>	<i>Cacnb3</i>	<i>Syt10</i>	Valeur p ajustée < 0,01 Log2(FC) >  0,5  	<i>Gabra1</i>	↗
<i>Grin2a</i>	<i>Drd2</i>	<i>Chrna10</i>	<i>Kcnd2</i>	<i>Cacnb4</i>	<i>Syt11</i>		<i>Gabra3</i>	↗
<i>Grin2b</i>	<i>Drd3</i>	<i>Chrnb1</i>	<i>Kcnd3</i>	<i>Cacng1</i>	<i>Syt12</i>		<i>Gabrd</i>	↗
<i>Grin2c</i>	<i>Drd4</i>	<i>Chrnb2</i>	<i>Kcne1</i>	<i>Cacng2</i>	<i>Syt13</i>		<i>Gabrg2</i>	↗
<i>Grin2d</i>	<i>Drd5</i>	<i>Chrnb3</i>	<i>Kcne2</i>	<i>Cacng3</i>	<i>Syt14</i>		<i>Adra2b</i>	↘
<i>Grin3a</i>	<i>Slc6a3</i>	<i>Chrnb4</i>	<i>Kcne3</i>	<i>Cacng4</i>	<i>Syt15</i>		<i>Hnmt</i>	↗
<i>Grin3b</i>	<i>Htr1a</i>	<i>Chrnd</i>	<i>Kcne4</i>	<i>Cacng5</i>	<i>Syt16</i>		<i>Glr</i>	↗
<i>Gria1</i>	<i>Htr1b</i>	<i>Chrne</i>	<i>Kcnf1</i>	<i>Cacng6</i>	<i>Syt17</i>		<i>Cacna1g</i>	↘
<i>Gria2</i>	<i>Htr1d</i>	<i>Chrng</i>	<i>Kcng1</i>	<i>Cacng7</i>	<i>Cplx1</i>		<i>Kcnab3</i>	↗
<i>Gria3</i>	<i>Htr1f</i>	<i>P2rx1</i>	<i>Kcng2</i>	<i>Cacng8</i>	<i>Cplx2</i>		<i>Kcng2</i>	↗
<i>Gria4</i>	<i>Htr2a</i>	<i>P2rx2</i>	<i>Kcng3</i>	<i>Syn1</i>	<i>Cplx3</i>		<i>Scn1b</i>	↗
<i>Grik1</i>	<i>Htr2b</i>	<i>P2rx3</i>	<i>Kcng4</i>	<i>Syn2</i>	<i>Cplx4</i>		<i>Snap25</i>	↗
<i>Grik2</i>	<i>Htr2c</i>	<i>P2rx4</i>	<i>Kcnh1</i>	<i>Syn3</i>	<i>Sv2a</i>		<i>Snap47</i>	↗
<i>Grik3</i>	<i>Htr3a</i>	<i>P2rx5</i>	<i>Kcnh2</i>	<i>Syp</i>	<i>Sv2b</i>		<i>Stx12</i>	↗
<i>Grik4</i>	<i>Htr3b</i>	<i>P2rx6</i>	<i>Kcnh3</i>	<i>Snap23</i>	<i>Sv2c</i>		<i>Sv2c</i>	↗
<i>Grik5</i>	<i>Htr4</i>	<i>P2rx7</i>	<i>Kcnh4</i>	<i>Snap25</i>	<i>Stxbp1</i>		<i>Syt12</i>	↗
<i>Grm1</i>	<i>Htr5a</i>	<i>P2ry1</i>	<i>Kcnh5</i>	<i>Snap29</i>	<i>Stxbp2</i>			
<i>Grm2</i>	<i>Htr5b</i>	<i>P2ry2</i>	<i>Kcnh6</i>	<i>Snap47</i>	<i>Stxbp3</i>			
<i>Grm3</i>	<i>Htr7</i>	<i>P2ry4</i>	<i>Kcnh7</i>	<i>Snap91</i>	<i>Stxbp4</i>			
<i>Grm4</i>	<i>Slc6a4</i>	<i>P2ry6</i>	<i>Kcnh8</i>	<i>Stx1a</i>	<i>Stxbp5</i>			
<i>Grm5</i>	<i>Adra1a</i>	<i>P2ry10</i>	<i>Scn1a</i>	<i>Stx1b</i>	<i>Stxbp6</i>			
<i>Grm6</i>	<i>Adra1b</i>	<i>P2ry12</i>	<i>Scn1b</i>	<i>Stx2</i>				
<i>Grm7</i>	<i>Adra1d</i>	<i>P2ry13</i>	<i>Scn2a1</i>	<i>Stx3</i>				
<i>Grm8</i>	<i>Adra2a</i>	<i>P2ry14</i>	<i>Scn2b</i>	<i>Stx4a</i>				
<i>Scl17a6</i>	<i>Adra2b</i>	<i>Gla1</i>	<i>Scn3a</i>	<i>Stx5a</i>				
<i>Scl17a7</i>	<i>Adra2c</i>	<i>Gla2</i>	<i>Scn3b</i>	<i>Stx6</i>				
<i>Scl17a8</i>	<i>Adrb1</i>	<i>Gla3</i>	<i>Scn4a</i>	<i>Stx7</i>				
<i>Gls</i>	<i>Adrb2</i>	<i>Gla4</i>	<i>Scn4b</i>	<i>Stx8</i>				
<i>Gls2</i>	<i>Adrb3</i>	<i>Glr</i>	<i>Scn5a</i>	<i>Stx11</i>				
<i>Glud1</i>	<i>Slc6a2</i>	<i>Slc6a5</i>	<i>Scn7a</i>	<i>Stx12</i>				
<i>Gabbr1</i>	<i>Hnmt</i>	<i>Slc6a9</i>	<i>Scn8a</i>	<i>Stx16</i>				
<i>Gabbr2</i>	<i>Hrh1</i>	<i>Slc12a2</i>	<i>Scn9a</i>	<i>Stx17</i>				
<i>Gabra1</i>	<i>Hrh2</i>	<i>Slc12a5</i>	<i>Scn10a</i>	<i>Stx18</i>				
<i>Gabra2</i>	<i>Hrh3</i>	<i>Kcna1</i>	<i>Scn11a</i>	<i>Stx19</i>				
<i>Gabra3</i>	<i>Hrh4</i>	<i>Kcna2</i>	<i>Cacna1a</i>	<i>Vamp1</i>				
<i>Gabra4</i>	<i>Comt</i>	<i>Kcna3</i>	<i>Cacna1b</i>	<i>Vamp2</i>				
<i>Gabra5</i>	<i>Maoa</i>	<i>Kcna4</i>	<i>Cacna1c</i>	<i>Vamp3</i>				
<i>Gabra6</i>	<i>Maob</i>	<i>Kcna5</i>	<i>Cacna1d</i>	<i>Vamp4</i>				
<i>Gabrb1</i>	<i>Chrm1</i>	<i>Kcna6</i>	<i>Cacna1e</i>	<i>Vamp5</i>				
<i>Gabrb2</i>	<i>Chrm2</i>	<i>Kcna7</i>	<i>Cacna1f</i>	<i>Vamp7</i>				
<i>Gabrb3</i>	<i>Chrm3</i>	<i>Kcna10</i>	<i>Cacna1g</i>	<i>Vamp8</i>				
<i>Gabrd</i>	<i>Chrm4</i>	<i>Kcnab1</i>	<i>Cacna1h</i>	<i>Syt1</i>				
<i>Gabre</i>	<i>Chrna1</i>	<i>Kcnab2</i>	<i>Cacna1i</i>	<i>Syt2</i>				
<i>Gabrg1</i>	<i>Chrna2</i>	<i>Kcnab3</i>	<i>Cacna1s</i>	<i>Syt3</i>				
<i>Gabrg2</i>	<i>Chrna3</i>	<i>Kcnb1</i>	<i>Cacna2d1</i>	<i>Syt4</i>				
<i>Gabrg3</i>	<i>Chrna4</i>	<i>Kcnb2</i>	<i>Cacna2d2</i>	<i>Syt5</i>				
<i>Gabrq</i>	<i>Chrna5</i>	<i>Kcnc1</i>	<i>Cacna2d3</i>	<i>Syt6</i>				
<i>Gabbr1</i>	<i>Chrna6</i>	<i>Kcnc2</i>	<i>Cacna2d4</i>	<i>Syt7</i>				
<i>Gabbr2</i>	<i>Chrna7</i>	<i>Kcnc3</i>	<i>Cacnb1</i>	<i>Syt8</i>				
<i>Gabbr3</i>	<i>Chrna8</i>	<i>Kcnc4</i>	<i>Cacnb2</i>	<i>Syt9</i>				

Légende :
Système glutamatergique
Système GABAergique
Système dopaminergique
Système sérotoninergique
Système noradrénergique
Système histaminergique
Dégradation des catécholamines/monoamines
Système cholinergique
Système purinergique
Système glycinergique
Canaux voltage dépendants / Transporteurs ioniques
Arrimage et Fusion des vésicules synaptiques

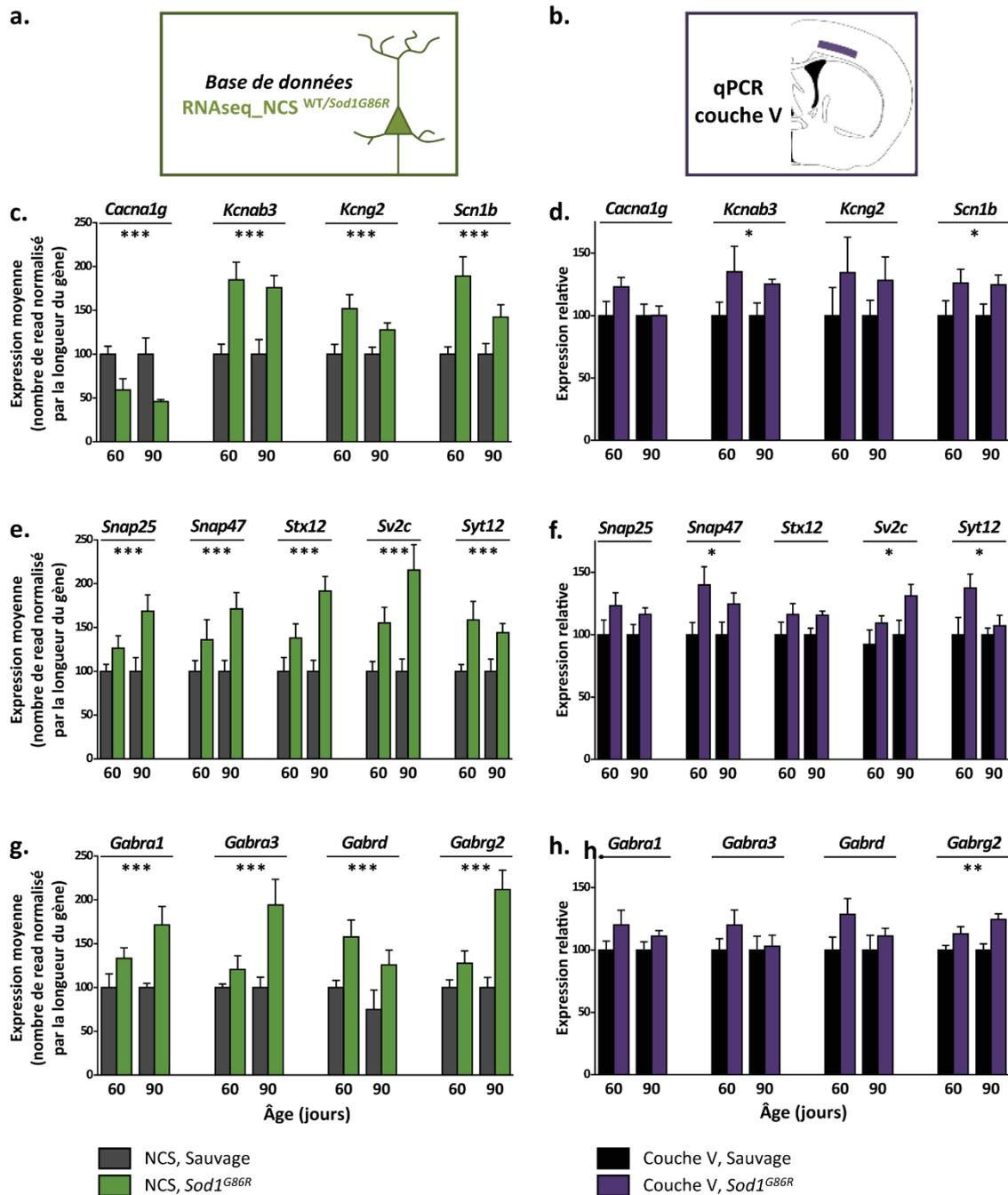
**Figure 1: Sélection de gènes candidats en lien avec l'excitabilité des neurones glutamatergiques corticaux.** Une recherche bibliographique de gènes a permis d'élaborer une liste de 271 gènes liés à l'excitabilité des neurones glutamatergiques corticaux (colonne gauche). La base de données RNAseq\_NCSW7/Sod1G86R a été interrogée (colonne centrale) afin de sélectionner 16 gènes candidats (colonne droite) correspondants aux critères statistiques fixés :  $p < 0.01$  et  $\text{Log}_2(\text{Fold Change}) > |0.5|$ .

### 3. Résultats

#### 3.1. Dérégulation de l'expression de gènes candidats liés au fonctionnement neuronal et de certaines sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> dans les NCS de souris *Sod1*<sup>G86R</sup>

Une recherche bibliographique a permis de dresser une liste de 271 gènes impliqués dans l'excitabilité neuronale, et notamment celle des neurones corticaux glutamatergiques. Ces gènes codent des récepteurs et transporteurs de différents neurotransmetteurs (glutamate, GABA, monoamines, acétylcholine, glycine, ATP), des canaux voltages dépendants (potassiques, sodiques, calciques), des co-transporteurs d'ions chlorure, des molécules d'arrimage et fusion des vésicules synaptiques, et enfin des enzymes de synthèse du glutamate, ou de dégradation des neuromodulateurs (**Figure 1, gauche**). Après confrontation à la base de données RNAseq\_NCS<sup>WT/Sod1G86R</sup> (valeur p ajustée <0.01 ; Log<sub>2</sub>(FC) > |0.5|) (**Figure 1, central**), 16 gènes candidats ont été sélectionnés (**Figure 1, droite**).

Parmi ces gènes candidats on retrouve une augmentation d'expression de sous-unités de canaux voltage-dépendants potassiques et sodiques, et la diminution d'une sous-unité de canal calcique, pouvant refléter l'altération de l'excitabilité des NCS (**Figure 2c**). On retrouve également une augmentation d'expression de 5 gènes codant des molécules d'arrimage et fusion des vésicules synaptiques pouvant traduire d'une augmentation d'excitabilité des NCS comme cela a pu être décrit chez les souris *SOD1*<sup>G93A</sup> ou *TDP-43*<sup>A315T</sup> (Zhang et al., 2016a; Kim et al., 2017b) (**Figure 2e**). A contrario, l'expression de 4 gènes codant des sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> est augmentée, pouvant suggérer un mécanisme de compensation afin de réguler l'activité des NCS (**Figure 2g**).



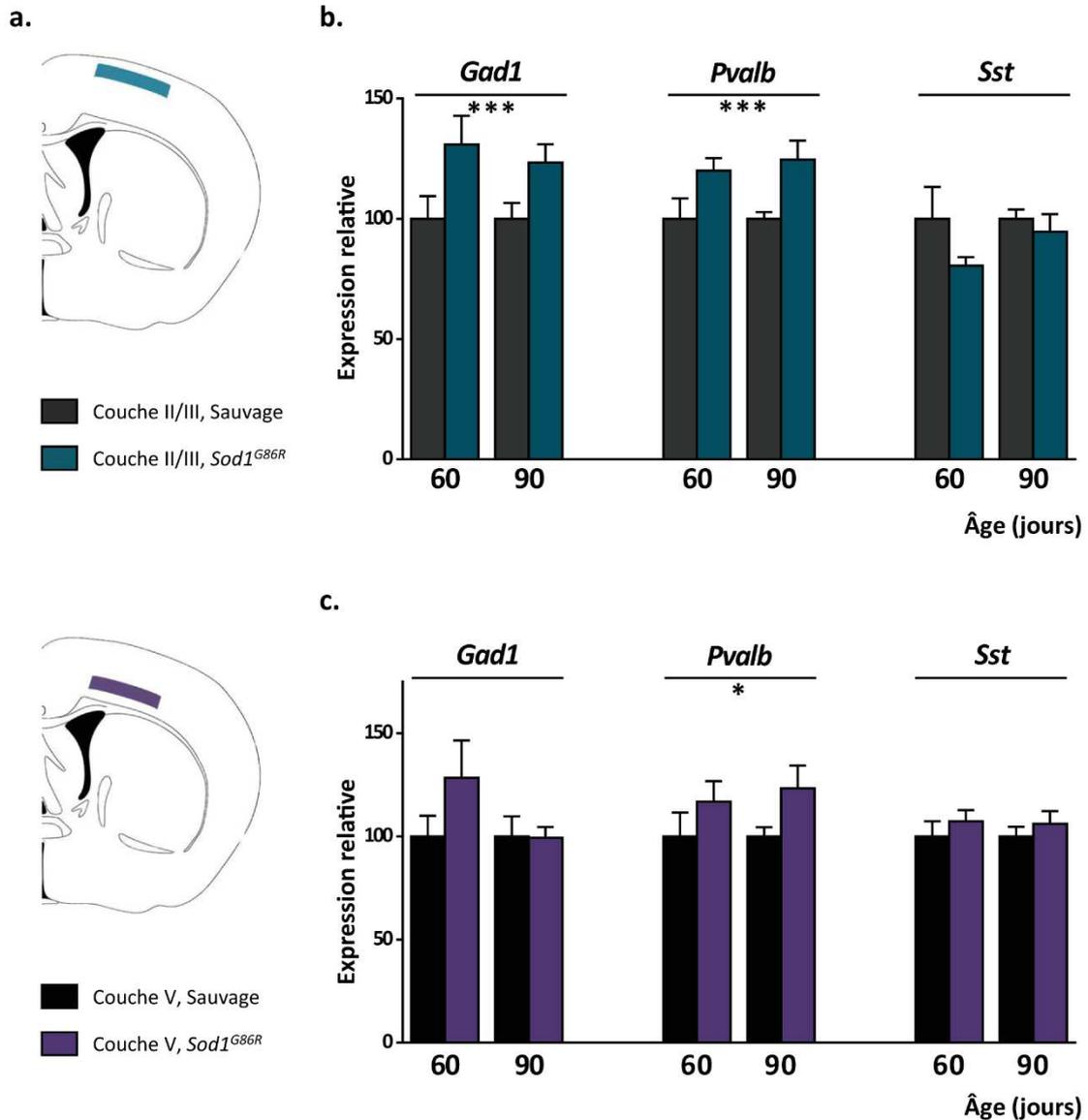
**Figure 2 : Niveaux d'expression de gènes candidats sélectionnés en séquençage des ARNm et qPCR.** **a.** Pour déterminer les niveaux d'expression des gènes sélectionnés dans les NCS de souris sauvages et *Sod1<sup>G86R</sup>*, la base de données RNAseq\_NCS<sup>WT/Sod1<sup>G86R</sup> a été interrogée. **b.** Des qPCR sur des couches corticales V micro-disséquées à partir de cerveaux de souris sauvages et *Sod1<sup>G86R</sup>* ont été réalisées afin de valider les différences d'expression des candidats à 60 et 90 jours. **c-h.** Graphiques représentatifs des résultats de séquençage des ARNm de NCS (**c**, **e**, **g**) ou de qPCR de couche V (**d**, **f**, **h**) pour les gènes codant des sous-unités de canaux voltages dépendants *Cacna1g*, *Kcnab3*, *Kcng2*, *Scn1b* (**c**, **d**) ; des protéines d'arrimage et fusion des vésicules synaptiques *Snap25*, *Snap47*, *Stx12*, *Sv2c*, *Syt12* (**e**, **f**) ; et des sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> *Gabra1*, *Gabra3*, *Gabrd*, *Gabrg2* (**g**, **h**). 2 way ANOVA sur l'effet du génotype \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.</sup>

Enfin, 2 gènes exprimant un récepteur à la glycine et une enzyme de dégradation de l'histamine sont augmentés, et un gène codant un récepteur adrénergique inhibiteur  $\alpha_2$  est diminué, suggérant une réponse altérée des NCS aux neuromodulateurs.

### 3.2. Validation de l'augmentation d'expression de la majorité des gènes candidats dans la couche V du cortex moteur

Parmi ces 16 gènes candidats, 3 grandes catégories se distinguent et regroupent 13 de ces gènes : les sous-unités de récepteur GABA<sub>A</sub> (**Figure 2g,h**), les sous-unités de canaux voltage dépendants (**Figure 2c,d**) et les molécules d'arrimage et fusion des vésicules synaptiques (**Figure 2e,f**). Afin de déterminer si les dérégulations d'expression observées chez les NCS de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* sont spécifique de ces derniers ou présents à l'échelle de la couche V du cortex moteur dans lequel ils sont situés, nous avons réalisé des qPCR sur cette dernière pour ces 13 gènes (**Figure 2b,d,f,h**).

Sur les 13 gènes, 6 présentent une dérégulation similaire à celle des NCS dans la couche V du cortex moteur des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* à 60 et 90 jours. L'augmentation de l'expression de gènes codant des sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> est retrouvée pour *Gabrg2*, codant la sous-unité  $\gamma_2$  (**Figure 2h**). Pour ce qui est des 4 gènes codant des sous-unités de canaux voltage-dépendants, l'augmentation de l'expression de *Kcnab3* et *Scn1b*, retrouvés respectivement dans des canaux potassiques et sodiques, est retrouvée dans la couche V du cortex moteur des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (**Figure 2d**). Enfin, parmi les 5 gènes codant des molécules d'arrimage et fusion des vésicules synaptiques, 3 sont également augmentés dans la couche V : *Snap47*, *Sv2c* et *Syt12* (**Figure 2f**).



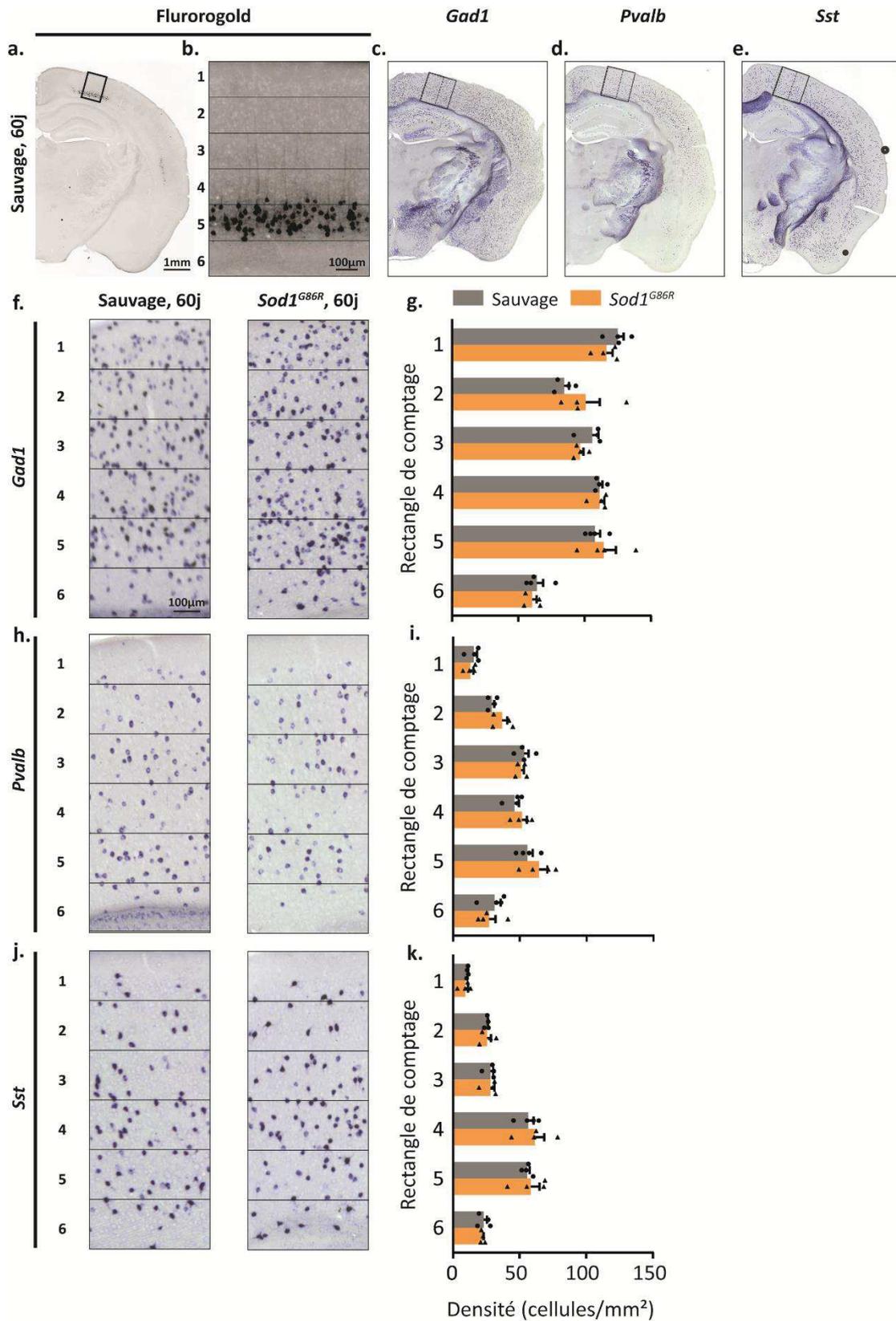
**Figure 3 : Niveaux d'expression des marqueurs d'interneurones dans les couches II/III et V.**  
**a.** Représentation schématique des micro-dissections des couches II/III et V de souris Sauvages et *Sod1<sup>G86R</sup>*. **b,c.** Graphiques représentatifs des résultats de qPCR sur les couches II/III (**b**) et V (**c**) pour les gènes codant des marqueurs d'interneurones inhibiteurs GABAergiques : *Gad1*, *Pvalb* et *Sst* à 60 et 90 jours. 2 way ANOVA sur l'effet du génotype \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### 3.3. Augmentation d'expression de marqueurs d'interneurones GABAergiques dans les couches II/III et V du cortex moteur

Quatre des 16 gènes candidats sélectionnés codant des sous-unités d'un type de récepteur GABAergique, et dans un contexte d'hyperexcitabilité corticale des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (Brunet, Scekic-Zahirovic et al. en préparation), nous nous sommes plus particulièrement intéressé au système GABAergique.

L'inhibition des neurones excitateurs de la couche V se fait non seulement au niveau de leur corps cellulaire, au sein de la couche V, mais aussi et surtout au niveau de leur importante dendrite apicale dans les couches II/III (Markram et al., 2004). Des qPCR pour les principaux marqueurs d'interneurones ont donc été réalisées sur les couches II/III et V du cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* à 60 et 90 jours (**Figure 3a**). Les couches II/III montrent une augmentation de l'expression de *Gad1* et *Pvalb* (**Figure 3b**), tandis que seule l'augmentation de *Pvalb* est retrouvée en couche V (**Figure 3c**). *Gad1* code la *Glutamate decarboxylase 1*, enzyme de synthèse du GABA retrouvée dans l'ensemble des interneurones inhibiteurs. *Pvalb* code la *Parvalbumine*, un marqueur retrouvé dans environ 40% des interneurones GABAergiques corticaux (Tremblay et al., 2016). L'expression de *Sst*, codant la *Somatostatine*, un marqueur retrouvé dans environ 30% des interneurones corticaux (Tremblay et al., 2016), n'est, quant à elle, pas modifiée que ce soit en couche II/III ou V (**Figure 2a,b**).

L'augmentation de ces marqueurs pourrait suggérer une augmentation du nombre d'interneurones ou bien des protéines que ces gènes encodent. L'augmentation de *Gad1* pourrait alors refléter une augmentation des niveaux corticaux de GABA.



**Figure 4 : Analyse des densités d'interneurones inhibiteurs par hybridation *in situ*.** (légende ci-contre)

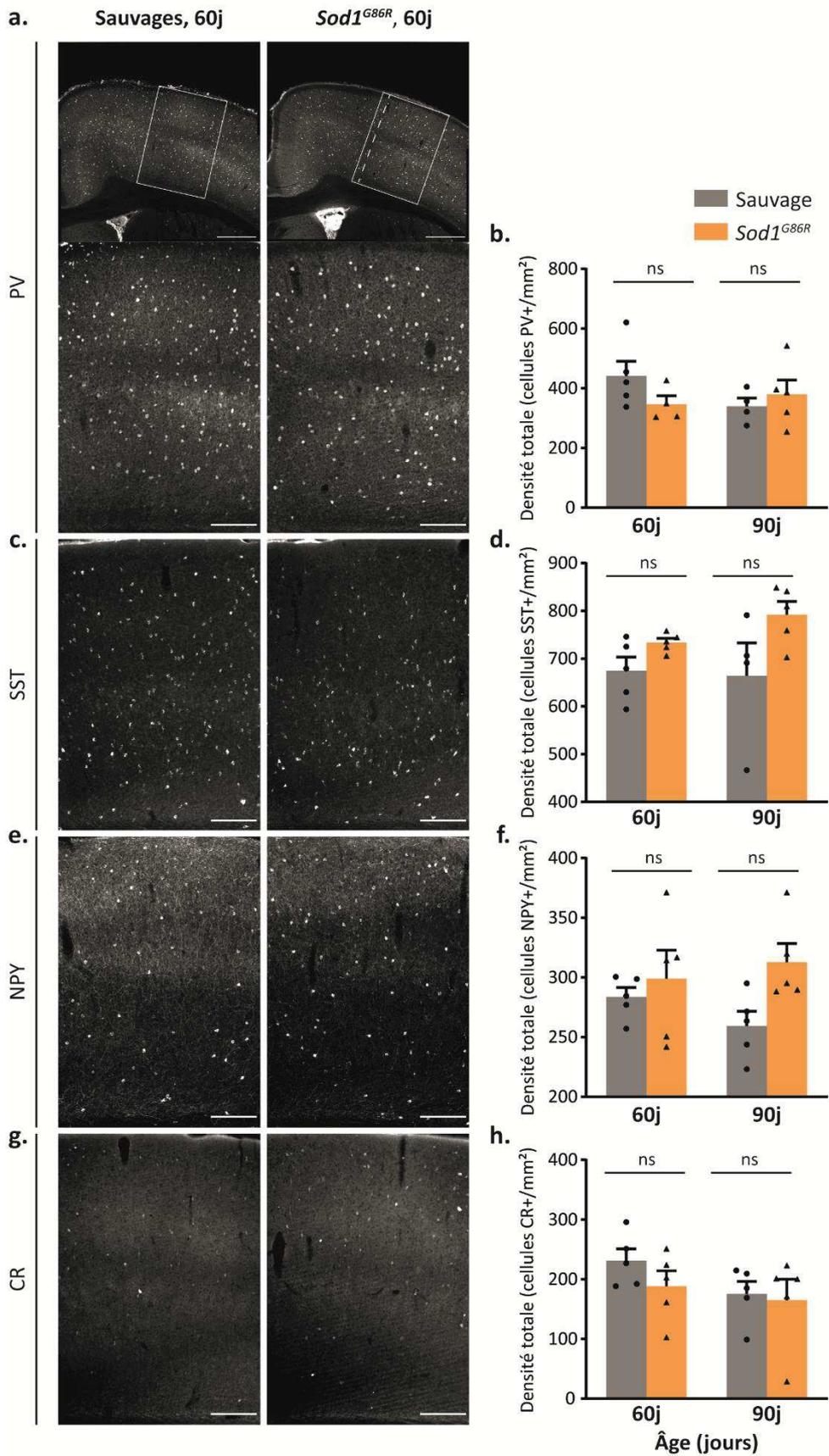
**Figure 4 : Analyse des densités d'interneurones inhibiteurs par hybridation *in situ*.** **a,b.** Images de microscopie à fluorescence représentatives de l'emplacement des NCS à projection lombaire sur une coupe coronale de cerveau de souris sauvage de 60 jours (**a**) et sur la hauteur du cortex cérébral (**b**). 6 rectangles identiques ont été utilisés pour subdiviser le cortex cérébral et effectuer les comptages d'interneurones. **c-e.** Images de microscopie en lumière transmise représentatives de coupes coronales de cerveau de souris sauvages de 60 jours pour lesquelles l'expression des gènes *Gad1* (**c**), *Pvalb* (**d**) et *Sst* (**e**) a été relevée par hybridation *in situ*. **f,h,j.** Images représentatives des zones dans lesquelles les densités d'interneurones positifs pour *Gad1* (**f**), *Pvalb* (**h**) et *Sst* (**j**) ont été comptés chez les souris sauvages (**gauche**) et *Sod1<sup>G86R</sup>* (**droite**) de 60 jours. **g,i,k.** Graphiques représentant les densités de neurones par mm<sup>2</sup> pour chacun des 6 rectangles de comptage pour *Gad1* (**g**), *Pvalb* (**i**) et *Sst* (**k**) chez des souris sauvages et *Sod1<sup>G86R</sup>* de 60 jours. Echelle : 1mm pour les hémisections, 100µm pour les images rapprochées.

### 3.4. Densité d'interneurones inchangée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*

Afin de déterminer si l'augmentation d'expression de *Gad1* est associée à une altération de la densité d'interneurones dans le cortex moteur, des marquages par hybridations *in situ* à 60 jours et immunofluorescences à 60 et 90 jours pour différents marqueurs d'interneurones ont été réalisés dans le cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>*.

Les hybridations *in situ* ont été réalisées au niveau rostrocaudal correspondant à la zone dans laquelle les premiers NCS dégénèrent dans le modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>* (Marques et al., 2021) (**Figure 4a,b**). L'analyse de densité des cellules *Gad1* (**Figure 4c,f,g**), *Pvalb* (**Figure 4d,h,i**) ou *Sst* (**Figure 4e,j,k**) dans la zone contenant les NCS ne montre aucune différence entre souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et sauvages de 60 jours, et cela quel que soit le niveau dorso-ventral considéré.

Afin d'analyser la densité de cellules exprimant des marqueurs d'interneurones GABAergiques à un niveau protéique, des marquages par immunofluorescence ont été réalisés dans le cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* de 60 et 90 jours. Ils ont été réalisés dans la zone contenant une grande majorité des NCS, soit à un niveau plus rostral que les hybridation *in situ*.



**Figure 5:** Analyse des densités d'interneurones inhibiteurs par marquage immunofluorescence. (légende ci-contre)

**Figure 5 : Analyse des densités d'interneurones inhibiteurs par marquage immunofluorescence. a,c,e,g.** Images de microscopie à fluorescence représentatives des zones dans lesquelles les densités d'interneurones positifs pour PV (a), SST (c), NPY (e) et CR (g) ont été comptés chez des souris sauvage (gauche) et *Sod1<sup>G86R</sup>* (droite) de 60 jours. **b,d,f,h.** Graphiques représentant les densités d'interneurones PV+ (b), SST+ (d), NPY+ (f) et CR+ (h) par mm<sup>2</sup> pour l'ensemble de la hauteur du cortex cérébral chez des souris sauvages et *Sod1<sup>G86R</sup>* de 60 et 90 jours. Echelle : 500µm pour les hémisections, 200µm pour les images rapprochées.

Une analyse des cellules PV (parvalbumine) (Figure 5a,b), SST (somatostatine) (Figure 5c,d), NPY (neuropeptide Y) (Figure 5e, f) et CR (calrétinine) (Figure 5g, h) positives ne montre aucune différence de densité neuronale que ce soit à 60 ou 90 jours dans le cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Tout comme cela a été montré par hybridation *in situ*, la distribution de ces populations d'interneurones dans les différentes couches corticales n'est pas non plus altérée (données non présentées).

#### 4. Discussion

Outre l'apparition et l'évolution rapide de symptômes moteurs indiquant la perte conjointe des NCS et des motoneurones, la SLA se caractérise également par une hyperexcitabilité corticale qui résulte à la fois d'une baisse d'inhibition intracorticale et d'une augmentation de la facilitation intracorticale (Vucic et al., 2013). Parce que l'hyperexcitabilité est un signe particulièrement précoce de la maladie, voire pré-symptomatique chez les porteurs de mutation SOD1, et qu'elle est négativement corrélée à la survie des patients, elle pourrait jouer un rôle important dans le déclenchement et la progression de la maladie (Eisen et al., 2017). En effet une série de travaux récents menés sur les patients SLA converge vers une origine corticale de la SLA (Eisen et al., 2017). L'étude du modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>* a

Scekic-Zahirovic et al., en préparation), qui pourrait refléter une baisse de l'inhibition corticale (Bandarabadi et al., 2017), dans un contexte où d'autres points cardinaux de la maladie sont retrouvés : une dégénérescence conjointe (mais pas simultanée) des NCS et des motoneurones, et une relation somatotopique entre les atteintes corticales, spinales et musculaires (Marques et al., 2021).

Dans ce contexte, j'ai cherché à dégager les modifications transcriptionnelles en lien avec une potentielle altération de l'excitabilité et/ou du fonctionnement des NCS (réponses à l'excitation, à l'inhibition, propagation d'un potentiel d'action et transmission synaptique) chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* en comparaison des souris sauvages. En effet, en tant que voie directe entre le cortex cérébral et la moelle épinière, les NCS sont susceptibles de jouer un rôle prépondérant dans la propagation corticofuge de la maladie, et ce, possiblement par le biais d'une altération de leur excitabilité et de leur activité. Une première série d'analyses bioinformatiques m'a permis de dresser une liste de 271 gènes dont la modification d'expression pourrait avoir un effet sur l'excitabilité et l'activité neuronale. L'interrogation de la base de données RNAseq\_NCS<sup>WT/Sod1<sup>G86R</sup> générée au laboratoire (Marques et al., 2019) m'a permis de sélectionner 16 gènes candidats dont l'expression était statistiquement modifiée (majoritairement augmentée) dans les NCS de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* par rapport à leur contrôles sauvages. L'analyse par qPCR sur la couche V micro-disséquée à partir du cortex cérébral de souris sauvages et mutantes a permis de valider les différences d'expression observées pour 13 gènes sur 16, avec des différences statistiquement significatives pour 6 de ces gènes. Cette première série de résultats met l'accent sur trois groupes de gènes codant pour : 1) des sous-unités de canaux voltage-dépendants, 2) des protéines d'arrimage et de fusion des vésicules synaptiques, et 3) des sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub>.</sup>

#### 4.1. Limites de l'approche et confrontation avec les données humaines

L'approche choisie ici comporte deux limites majeures. Premièrement la comparaison des données de RNAseq avec celles de qPCR n'a pas été réalisée à la même résolution cellulaire. En effet, le RNAseq a été réalisé sur des NCS purifiés par FACS (fluorescence activated cell sorting), alors que les qPCR ont été réalisées sur des microdissections de couches corticales, qui contiennent non seulement des neurones excitateurs glutamatergiques mais également des interneurons inhibiteurs GABAergiques et des cellules gliales. Il est donc possible que certaines modifications transcriptionnelles spécifiques des NCS ne puissent être perçues en qPCR de la couche V. A l'inverse, les modifications transcriptionnelles qui apparaissent significatives à la fois en RNAseq et en qPCR pourraient être communes aux neurones excitateurs et inhibiteurs de la couche V, et non spécifiques des NCS. Les deux cas de figure sont intéressants, et requièrent d'être pris en considération dans l'interprétation des résultats.

La seconde limite à notre approche est qu'elle est essentiellement concentrée sur la détection des ARNm et la quantification de leur expression relative, et ne garantit pas que les modifications observées se traduisent 1) par des modifications des niveaux de protéines correspondantes, et 2) par des modifications électrophysiologiques. Une estimation des niveaux protéiques, par Western blot ou immunomarquage sera donc nécessaire, de même que des mesures d'excitabilité et d'activité neuronales.

Malgré ces limites évidentes, l'augmentation d'expression de 9 des 16 gènes testés est retrouvée dans le cortex cérébral de patients SLA : *KCNAB3*, *SNC1B*, *SNAP47*, *SYT12*, *GABRA1*, *GABRA3*, *GABRD* et *GAD1* (Andrés-Benito et al., 2017), ce qui indique que ces modifications ne sont pas spécifiques au modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>*, et corrèlent bien avec une hyperexcitabilité

corticale. Cependant, parce qu'elles ont été détectées à partir d'ARN de cortex et non de neurones purifiés, il est probable qu'elles concernent également des neurones autres que les NCS.

#### 4.2. Une augmentation probable de l'activité neuronale

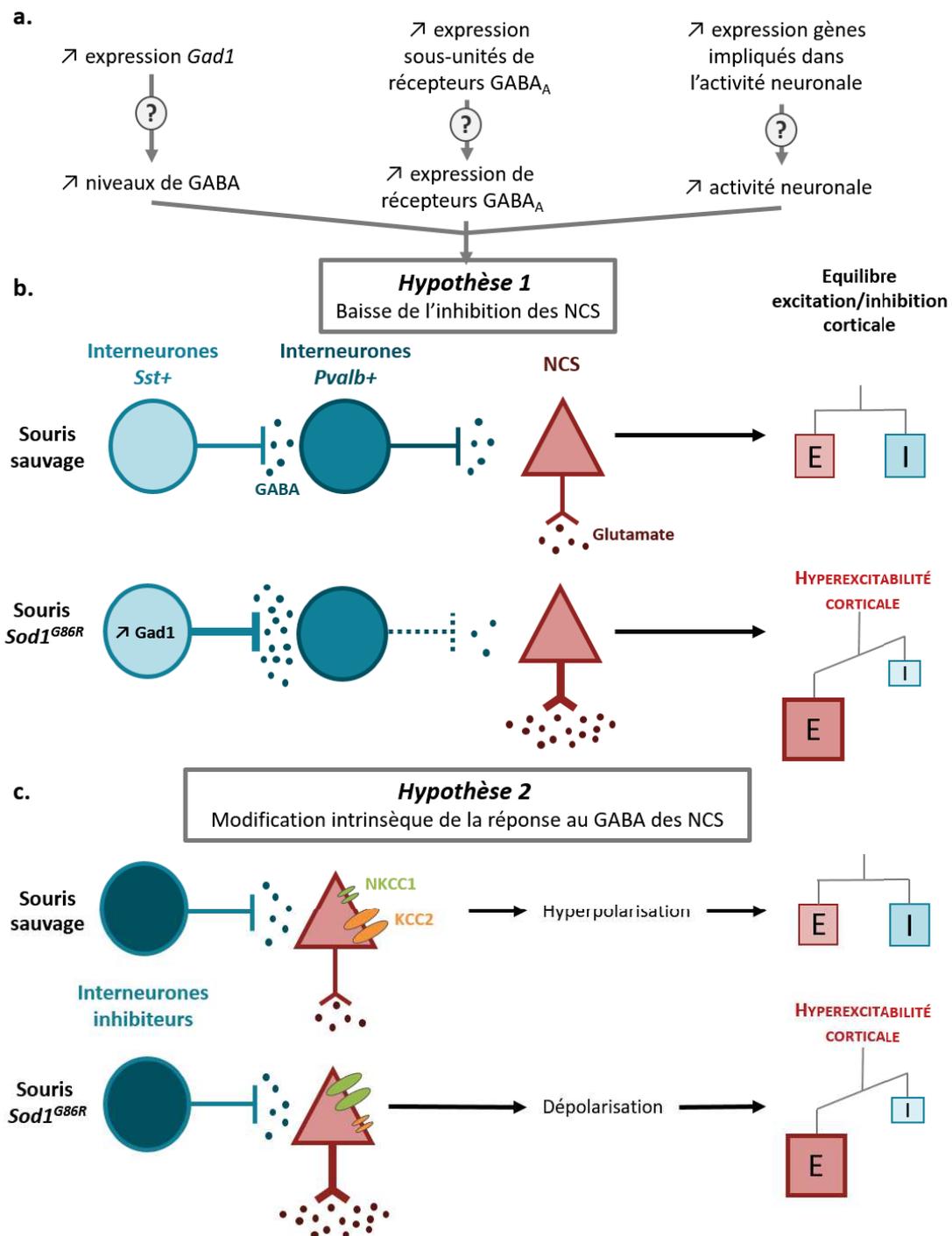
Mes résultats de qPCR confirment l'augmentation significative d'expression des gènes *Kcnab3* et *Scn1b*, impliqués dans la génération et la propagation du potentiel d'action, ainsi que de *Snap47*, *Sv2c* et *Syt12*, impliqués dans le relargage de vésicules synaptiques. L'augmentation de l'expression de tels gènes pourrait soutenir une augmentation globale de l'excitabilité et/ou de l'activité neuronale chez les *Sod1<sup>G86R</sup>* par rapport aux animaux contrôles. Dans le modèle murin *SOD1<sup>G93A</sup>*, qui surexprime un mutant du gène SOD1 humain, une hyperexcitabilité intrinsèque des neurones pyramidaux de la couche V, et notamment des NCS, a été mise en évidence (Saba et al., 2016b; Kim et al., 2017b; Khademullah et al., 2020), accompagnée d'une augmentation de l'expression de *Scn1b*, et d'une augmentation des niveaux de calcium intracellulaires dans les NCS (Kim et al., 2017b). Une augmentation d'activité des NCS chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* semble donc possible, et devra à l'avenir être mesurée, en imagerie calcique par exemple.

#### 4.3. Le rôle ambigu des interneurones et de GABA

Dans le contexte d'une potentielle augmentation de l'excitabilité et de l'activité des neurones excitateurs, l'augmentation d'expression de gènes encodant des sous-unités GABA<sub>A</sub> (*Gabra1*, *Gabra3*, *Gabrd* et *Gabrg2*) observée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* par rapport aux contrôles, ainsi que dans le cortex cérébral des patients SLA (*GABRA1*, *GABRA3* et *GABRD*)

(Andrés-Benito et al., 2017) peut être interprétée comme une tentative de compensation, une manière d'augmenter la sensibilité au GABA.

Chez les patients, cette augmentation des niveaux d'expression de gènes encodant des sous-unités GABA<sub>A</sub> est corrélée à une baisse des niveaux d'expression du gène *PVALB* (Lederer et al., 2007), et une diminution du nombre d'interneurones positifs à la parvalbumine (Nihei et al., 1993). Chez les souris *Sod1*<sup>G86R</sup> en revanche, mes analyses d'hybridation *in situ* et immunofluorescence indiquent que la densité d'interneurones, qu'il s'agisse de l'ensemble des interneurones corticaux GABAergiques ou des sous-populations d'interneurones positifs à la parvalbumine, somatostatine, calrétinine ou au neuropeptide Y, demeure inchangée entre les souris sauvages et transgéniques, et ne diminue pas au cours du temps chez les souris transgéniques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le modèle murin *SOD1*<sup>G93A</sup> qui ne présente pas de perte d'interneurones positifs à la parvalbumine (Ozdinler et al., 2011). Enfin, patients (Andrés-Benito et al., 2017) et souris présentent une augmentation des niveaux d'expression de *Gad1* qui encode la glutamate décarboxylase. Ceci suggère une possible augmentation de la synthèse de GABA, possiblement pour compenser une perte d'interneurones GABAergiques chez les patients, et dans les deux cas pour potentiellement moduler l'activité exacerbée de neurones excitateurs avoisinants. Une mesure des niveaux de GABA cortical semble nécessaire afin de déterminer les conséquences des changements transcriptionnels et cellulaires observés. Ceci pourrait être réalisé en spectrométrie de masse.



**Figure 6 : Modèles d'interprétation des résultats obtenus.** **a.** Résumé des résultats obtenus (haut) et premier niveau d'interprétation (bas). **b.** Premier scénario envisagé : seuls les interneurones positifs à la somatostatine sont concernés par une augmentation de *Gad1*. Il en résulte une inhibition accrue des interneurones positifs à la parvalbumine et une désinhibition indirecte des NCS (et autres neurones excitateurs ?), à l'origine d'une hyperexcitabilité corticale. **c.** Deuxième scénario envisagé : l'augmentation intracellulaire d'ions Cl<sup>-</sup>, en réponse par exemple à une modification de l'importance relative de NKCC1 et de KCC2 dans l'établissement de ces niveaux modifierait la réponse des NCS (et autres neurones excitateurs ?) au GABA vers une dépolarisation et une activation, au lieu d'une hyperpolarisation et d'une inhibition, et vers une hyperexcitabilité corticale.

#### 4.4. Modèles d'interprétation

L'augmentation de l'expression de sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub>, et l'augmentation de l'expression de *Gad1* pourraient paraître en contradiction totale avec l'hyperexcitabilité corticale avérée (Brunet, Scekcic-Zahirovic et al. en préparation) et l'augmentation possible de l'excitabilité et de l'activité des neurones excitateurs (**Figure 10a**). Cependant, deux scénarios permettraient de réconcilier ce paradoxe.

Selon un premier scénario (**Figure 10b**), l'augmentation de *Gad1*, si tant est qu'elle se traduit par une augmentation de GABA, ne concerne pas tous les interneurons, mais seulement une ou quelques sous-populations ayant pour cible non seulement des neurones excitateurs mais également des neurones inhibiteurs. C'est le cas notamment des interneurons positifs à la somatostatine qui inhibent les interneurons positifs à la parvalbumine. De manière intéressante, dans le modèle murin de la double pathologie SLA/DFT, *TDP-43<sup>A315T</sup>*, il a été montré que les interneurons positifs à la somatostatine étaient hyperactifs et induisaient, indirectement une désinhibition des neurones excitateurs de la couche V : l'hyperactivité des interneurons positifs à la somatostatine induit une augmentation de l'inhibition des interneurons positifs à la parvalbumine qui en conséquence ne sont plus à même d'inhiber suffisamment les neurones excitateurs de la couche V (Zhang et al., 2016a). Il est donc possible d'envisager une augmentation sélective des niveaux de *Gad1* par les interneurons somatostatine-positifs, une augmentation de l'inhibition des interneurons parvalbumine-positifs et une levée de l'inhibition des NCS et autres neurones excitateurs de la couche V, qui tenteraient de compenser par une augmentation des récepteurs GABA<sub>A</sub> (**Figure 10b**).

Un deuxième scénario (**Figure 10c**) envisageable est la modification de la réponse à GABA par les neurones excitateurs. En effet, on peut imaginer qu'au lieu d'engendrer une hyperpolarisation inhibitrice, la liaison de GABA à ces récepteurs induirait une dépolarisation excitatrice. Il s'agit là d'un mécanisme naturel, qui peut être soit physiologique lors de la corticogénèse, soit pathologique dans certains cas d'épilepsie, de neuropathies sensorielles ou encore de lésions de la moelle épinière (pour revue, voir (Ben-Ari et al., 2012)). L'effet excitateur ou inhibiteur de GABA ne dépend pas de la nature ou de la composition des récepteurs qu'il active, mais des niveaux d'ions chlorure,  $\text{Cl}^-$ , intracellulaires. Si les niveaux sont supérieurs au compartiment extracellulaire, tel que c'est le cas dans le neurone immature, l'activation des récepteurs  $\text{GABA}_A$  conduit à une sortie de  $\text{Cl}^-$  et à une dépolarisation. Si, au contraire, la concentration de  $\text{Cl}^-$  intracellulaire est inférieure à celle du milieu extracellulaire, comme c'est le cas dans le neurone adulte sain, alors l'activation des récepteurs  $\text{GABA}_A$  va induire une entrée de  $\text{Cl}^-$  et une hyperpolarisation. Au cours du développement, le changement des concentrations intracellulaires de  $\text{Cl}^-$  est sous contrôle de transporteurs NKCC et KCC, dont les niveaux d'expression relatives varient avec le temps et dont les activités sont régulées par des mécanismes post-traductionnels, notamment des phosphorylations, et un accès contrôlé à la membrane plasmique (Kahle et al., 2005; Ben-Ari et al., 2012). Il conviendrait donc de déterminer 1) les niveaux d'expression des gènes encodant NKCC1 et KCC2, et autres membres de la famille dans notre modèle, 2) les niveaux de protéines correspondants, 3) leur état de phosphorylation et 4) la localisation subcellulaire, en combinant des analyses par qPCR, Western blot et immunomarquage.

## 5. Conclusion et perspectives

La sélection et l'analyse, par une combinaison d'approches bioinformatique, de biologie moléculaire et d'histologie, d'un certain nombre de gènes impliqués dans l'excitabilité et l'activité neuronale dans le modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>* de SLA a mis en évidence des dérégulations déjà rapportées chez les patients, et donc corrélées avec l'hyperexcitabilité corticale qui caractérise la maladie. Mes travaux suggèrent une augmentation globale de l'activité neuronale, ainsi qu'une tentative possible d'augmenter la sensibilité au GABA potentiellement pour contrecarrer un déséquilibre en faveur de l'excitation. Par ailleurs, les souris transgéniques *Sod1<sup>G86R</sup>* présentent une densité maintenue d'interneurones et une augmentation possible de synthèse de GABA, ce qui semble paradoxal dans un contexte hyperexcitable. Je propose ici deux interprétations possibles de cet apparent paradoxe. Ces résultats et interprétations préliminaires requièrent à présent l'utilisation d'approches qui permettront de passer de l'échelle transcriptionnelle aux échelles traductionnelle, post-traductionnelle, subcellulaire et enfin fonctionnelle. A terme, ces travaux pourraient permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques, basées sur la modulation des niveaux de GABA, ou sur la modulation de la réponse au GABA par certaines sous-populations de neurones corticaux, excitateurs ou inhibiteurs.

## **II. La réduction des niveaux de noradréline contribue à l'hyperexcitabilité corticale dans des modèles murins de sclérose latérale amyotrophique**

## Decreased noradrenaline levels contribute to cortical hyperexcitability in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis

Brunet A<sup>1\*</sup>, Scekcic-Zahirovic J<sup>1,2\*</sup>, Douchamp V<sup>3</sup>, Stuart-Lopez G<sup>1</sup>, Gilet J<sup>1</sup>, Andry V<sup>4</sup>, Trombini M<sup>1</sup>, Sinniger J<sup>1</sup>, Fischer M<sup>1,5</sup>, René F<sup>1</sup>, Dupuis L<sup>1</sup>, Kessler P<sup>6</sup>, Véronique Marchand-Pauvert<sup>7</sup>, Goumon Y<sup>4#</sup>, Goutagny R<sup>3#</sup>, Rouaux C<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Inserm UMR\_S 1118, Université de Strasbourg, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, 1 rue Eugène Boeckel, 67 000 Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Current address: Neurology department, ZBMF, Systems Neurology Laboratory, Universität Ulm, Ulm, Germany.

<sup>3</sup> Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), Université de Strasbourg, Faculté de Psychologie, 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France.; LNCA, UMR 7364, CNRS, 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France.

<sup>4</sup> CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France

<sup>5</sup> Current address: Department of Paediatrics, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, Oxford, UK.

<sup>6</sup> Inserm UMR\_S 38, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 67 085 Strasbourg, France.

<sup>7</sup> Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, LIB, Paris, France.

\* Equal contribution

# Co-corresponding authors : [caroline.rouaux@inserm.fr](mailto:caroline.rouaux@inserm.fr)  
[goutagny@unistra.fr](mailto:goutagny@unistra.fr)  
[ygoumon@unistra.fr](mailto:ygoumon@unistra.fr)

## **Abstract**

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the most common adult-onset motor neuron disease, relies on the detection of the combined degeneration of upper motor neurons in the cerebral cortex, and lower motor neurons in the brain stem and spinal cord. Early cortical hyperexcitability was demonstrated, even prior to motor symptoms in some cases, and is negatively correlated to patients' survival. To unravel the dynamics of cortical network impairment in ALS, we used electrocorticography (ECoG) and phase-amplitude frequency coupling (PAC) analyses on ALS mouse models and showed early and constant alteration of cortical network functions. To gain insights into the molecular and cellular origins of this cortical dysfunction, we analysed cortical levels of different neurotransmitters and showed decreased noradrenaline levels. Here, we showed that cortical noradrenaline depletion is sufficient to induce cortical network dysfunction and that its supplementation in an ALS mouse model allows the improvement of PAC in ECoG, paving the way to the development of new therapeutic approaches targeting cortical network dysfunction.

## Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset motor neuron disease, with 120 000 new patients worldwide each year, but a relatively low prevalence of 4-8/100 000 due to its extremely rapid progression, leading to death within 2 to 5 years after disease onset (Masrori and Van Damme, 2020). ALS diagnosis relies on the detection of the combined degeneration of upper motor neurons (UMN) in the cerebral cortex, and lower motor neurons (LMN) in the brain stem and spinal cord (Shefner et al., 2020). UMN degeneration leads to the so-called upper motor neuron syndrome, a series of signs that include muscular weakness, decreased motor control, hyperreflexia including spasticity, and clonus (Purves et al., 2008). LMN signs include muscle atrophy and weakness, and hyporeflexia without sensory involvement. However, clinical heterogeneity and the fact that UMN signs can be masked by LMN signs (Shefner et al., 2020), strongly hamper ALS diagnosis greatly delaying treatment initiation and strongly limiting inclusion in clinical trials.

ALS mouse models that were built upon identification of causative mutant genes of familial ALS (10 to 20% of all cases) (Zou et al., 2017), recapitulate UMN and LMN degeneration (Brunet et al., 2020). Even more than in patients, UMN signs are particularly difficult to observe in rodents, and histology has been the gold standard so far. For some models, UMN retrograde labelling from the spinal cord unravelled that onset of UMN loss occurs long before the first signs of LMN degeneration can be detected (Zang and Cheema, 2002; Ozdinler et al., 2011; Marques et al., 2021; Scekcic-Zahirovic et al., 2021b), suggesting that cortical impairment may take place particularly early in the presymptomatic phase of the disease (Kiernan et al., 2019), and that detection of cortical impairment could be an alternative to the difficult detection of UMN signs.

In patients, earlier cortical network impairment was demonstrated using paired-pulse transcranial magnetic stimulation (ppTMS) that revealed motor cortex hyperexcitability in both sporadic (sALS) and familial (fALS) forms (Van den Bos et al., 2018a). Cortical hyperexcitability precedes LMN signs, is detrimental to LMN function, and negatively correlates with patients' survival (Van den Bos et al., 2018a). Most importantly, cortical hyperexcitability is not detected in ALS-mimic diseases that solely affect LMN without UMN impairment (Turner and Talbot, 2013; Vucic et al., 2013), suggesting that it could represent a powerful feature to promote early diagnosis of ALS. However, ppTMS is difficult to implement

with disease progression (due to an increased threshold response to TMS, and progressive LMN loss), and is hardly employed in mice. Functional magnetic resonance imaging (fMRI) could be an alternative to ppTMS, but its costs, complex implementation and possible contraindications in some patients (prolonged lying position) strongly limit its routine use in the clinic. Consequently, there is a critical need for new approaches to detect and monitor cortical dysfunction both in ALS patients and in mouse models.

To unravel the dynamics of cortical network impairment in ALS, its molecular and cellular origins, and its consequences on disease onset and progression, translational tools that would allow its assessment in a non-invasive and longitudinal manner are needed. Electroencephalography (EEG) and electrocorticography (ECoG) offer these advantages through the investigation of brain oscillations and their interactions, such as the analysis of cross-frequency coupling: a specific pattern of oscillatory activity corresponding to the modulation of the amplitude of a fast oscillation by the phase of a slow oscillation. Phase-amplitude frequency coupling (PAC) is highly dependent on proper excitation/inhibition balance (Buzsáki and Wang, 2012; Keeley et al., 2017), and is altered in neurodegenerative conditions such as in Parkinson's disease patients (de Hemptinne et al., 2013, 2015), and non-human primate model (Devergnas et al., 2019) and Alzheimer's disease patients (Wang et al., 2017; Goodman et al., 2018) and mouse models (Goutagny et al., 2013; Zhang et al., 2016b; Ahnaou et al., 2017).

Here, we used ECoG and PAC analyses to investigate whether mouse models of ALS recapitulate cortical network dysfunction. We chose the BAC transgenic *Sod1<sup>G86R</sup>* mouse model of ALS (Ripps et al., 1995), the knock-in *Fus<sup>+/ $\Delta$ LNS</sup>* (Scekic-Zahirovic et al., 2016) and the BAC transgenic *CHMP2B<sup>intron5</sup>* (Vernay et al., 2016) mouse models of ALS and fronto-temporal dementia (FTD) for their genetic and phenotypic complementarity. *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ LNS</sup>* mice displayed altered cortical network functions which allowed us to further investigate its origins.

## Materials and Methods

### *Animals*

All mouse experiments were performed by authorized investigators and approved by the local ethics committee of Strasbourg University (CREMEAS, agreements #12138-2017111016579993 v3). Animals were group-housed (2-5 per cage) in the Faculty of Medicine at Strasbourg University with a 12-12h of light-dark cycle, in constant temperature and humidity conditions ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 60% relative humidity). Access to food and water was unrestricted. Male and female *Sod1<sup>G86R</sup>*, *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* and *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mice, along with their control littermates were used in this study (Ripps et al., 1995; Scekcic-Zahirovic et al., 2016; Vernay et al., 2016). Male and female were used for electrocorticography. Female were used for both mass spectrometry and quantitative PCR analyses (*Sod1<sup>G86R</sup>* : 45 days: n = 9 *WT*, n = 8 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 60 days: n = 10 *WT*, n = 10 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 90 days: n = 8 *WT*, n = 8 *Sod1<sup>G86R</sup>*; *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* 4 months: n = 8 *WT*, n = 8 *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*), retrograde labelling (*Sod1<sup>G86R</sup>* 85 days: n = 6 *WT*, n = 6 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and histology (*Sod1<sup>G86R</sup>* 45 days: n = 6 *WT*, n = 5 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 60 days: n = 5 *WT*, n = 5 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 90 days: n = 5 *WT*, n = 5 *Sod1<sup>G86R</sup>*; *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* 4 months: n = 5 *WT*, n = 4 *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*).

### *Drugs*

Pentylentetrazol (PTZ) (P6500), N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP) (C8417) and Benserazide (B7283) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and L-threo 3,4-Dihydroxyphenylserine (L-DOPS, S3041) from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA).

### *Electrode implantation surgery*

Electrode implantation was performed as previously described (Kam et al., 2016). Mice were deeply anesthetized with isoflurane (Piramal Critical Care, Voorschoten, Netherlands), and placed in a stereotaxic frame (World Precision Instruments, Sarasota, USA). The skull was exposed and four epidural screw electrodes (Bilaney, Sevenoaks, UK) were positioned through the skull: one above the right frontal cortex (2.5mm anterior to Bregma, 0.5mm lateral to the midline) to serve as reference, two above the most caudal portion of the motor area (1.5mm posterior to Bregma, 2mm lateral to the midline), and one above the cerebellum (6.5mm posterior to Bregma, on the midline) to serve as ground. Two electromyography electrodes (Bilaney, Sevenoaks, UK) were placed in the deep muscles of the neck. A 6-pin connector

(Bilaney, Sevenoaks, UK) was centered over the skull with dental cement (Sun Medical, Moriyama, Japan). Animals were returned to their home cage and monitored daily until the first recording, at least 7 days after surgery.

### *Electrocorticography, Electromyography and Video recordings*

#### *Data acquisition*

ECoG and EMG signals were recorded simultaneously on LabChart 8 (AdInstruments, Sydney, Australia). ECoG signals were acquired at 2000Hz sampling rate and bandpass filtered at 0.5-200Hz (AdInstruments, Sydney, Australia). Video was recorded continuously at 25.42 frames/s, using an infrared LED camera to allow recordings during both light and dark periods (Sony, Tokyo, Japan).

For longitudinal recordings, *Sod1<sup>G86R</sup>*, *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* and *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mice were recorded 24h every 2 weeks (*Sod1<sup>G86R</sup>*) or every month (*Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*, *CHMP2B<sup>intron5</sup>*). For PTZ susceptibility test, *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice were recorded for 15min, injected with PTZ (30mg/kg i.p.) and recorded again for 30min. Wild type mice injected with DSP-4 (50mg/kg i.p.) were recorded during 24h before DSP-4 injection, and after either 2 or 7 days after DSP-4 injection. *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice injected with L-DOPS (0.5mg/kg i.p.) and benserazide (0.125mg/kg i.p.) were recorded 24h before injection and 12h after injection.

#### *Data Analysis*

ECoG recordings were analyzed using custom-made scripts on Matlab (MathWorks, Natick, USA) to clean the signal from 50Hz frequencies. After representation of ECoG traces in spectrogram, they were screened manually to identify active wake (aWA), slow wave sleep (SWS) and rapid eye movement (REM) sleep, and validated using EMG and video recordings. Power spectra were calculated using the multitaper method (Chronux toolbox) as previously described (Goutagny et al., 2013) and modulation index (MI) was calculated using the Tort method (Tort et al., 2010), as previously described (Goutagny et al., 2013).

#### *Pentylentetrazol susceptibility*

ECoG and video were recorded 10 min prior to and 10 min following I.P. injection of pentylentetrazol (PTZ) dissolved at 2 mg/mL in NaCl 0.9% and administered at the subconvulsive dose of 30mg/kg. ECoG traces were analysed using LabChart software (AD

Instrument, Sydney, Australia) to identify electrographic seizures characterized as sharp spikes, polyspikes (2 to 3 spikes separated by less than 1 sec) and long perturbations (more than close 3 spikes) (Van Erum et al., 2020).

#### *Tissue preparation*

For mass spectrometry (LC-MS/MS) and quantitative PCR (qPCR) analyses, mice were euthanized with a lethal dose of 120 mg/kg of pentobarbital sodium and phenytoin sodium and decapitated. The brains were dissected out and sliced in a cooled stainless steel coronal brain matrix (Harvard Apparatus, Boston, USA). 1 mm-thick sections were transferred under a stereomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan) to further microdissect the motor areas and hippocampus. Lumbar spinal cords were dissected and separated in two along the midline. Collected tissues were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. For histology, mice were euthanized with a lethal dose of 120 mg/kg of pentobarbital sodium and phenytoin sodium and transcardially perfused with cold 0.01 M PBS, followed by cold 4% PFA in 0.01 M PBS. Brains were dissected and post-fixed overnight in 4% PFA. Brains were cut coronally into 40- $\mu$ m-thick vibratome sections (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany), and stored at 4°C in 0.01 M PBS with 0.002% Thimerosal until used.

#### *Mass spectrometry*

Mass spectrometry analyses was performed as previously described (Kremer et al., 2018). Briefly, tissues were homogenized with Bio-Gen PRO200 Homogenizer (ProScientific, Oxford, USA) in 200 $\mu$ L of 0.1mM ascorbic acid, sonicated 2 x 5sec at 100W and centrifuged (20 000g, 30min, 4°C). Supernatants were collected and protein concentrations assessed with the Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, USA). 20 $\mu$ L of the supernatant was derived with the AccQtag Ultra derivatization kit (Waters, Guyancourt, France). 10 $\mu$ L of samples were mixed with 30 $\mu$ L of the kit's borate buffer and 10 $\mu$ L of internal standards (10 pmol/standard: D6-GABA, D5-glutamate, C6-noradrenaline, D4-serotonine, D5-HIAA, D4-dopamine and D3-L-DOPA). Then, 10 $\mu$ L of AccQtag reagent were added and the mixture was incubated 10 min at 55°C under agitation. 4 volumes of acetonitrile were added before centrifugation (20,000  $\times$  g, 20°C, 5 min). Supernatants were then subjected to LC-MS/MS analysis.

LC analyses were performed on a Dionex Ultimate 3000 HPLC system coupled to an Endura triple quadrupole mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) controlled by Xcalibur v. 2.0 (Thermo Electron, Waltham, USA), using the multiple reaction monitoring mode (MRM). 5µl of samples were loaded onto a ZORBAX SB-C18 Micro Bore Rapid Resolution column (1 x 150mm, 3.5µm; 90µL/min) (Agilent technologies, Santa Clara, USA). Identification of the compounds was based on precursor ion, selective fragment ions, and retention times obtained for the neurotransmitters or neuromodulators and corresponding internal standards. Absolute quantifications of the compounds were done using the ratio of daughter ions response areas on the internal standards according to the isotopic dilution method (Ho et al., 1990). Amounts of target compounds were normalized to protein concentrations.

#### *Quantitative PCR analysis*

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. 1µg of RNA was reverse transcribed using the iScripts kit (Bio-Rad, Hercules, USA). qPCR were performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix on a CFX System (Bio-Rad, Hercules, USA). Gene expression was normalized using the  $\Delta\Delta C_t$  method using *Gusb* or *Hsp90ab1* as reference housekeeping genes. The following primer sequences were used for RT-qPCR:

*Gusb*: CGAGTATGGAGCAGACGCAA; AGCCTTCTGGTACTCCTCACT  
*Hsp90ab1*: TACTACTCGGCTTTCCCGTCA; CCTGAAAGGCAAAGGTCTCCA  
*Adra1b*: TCTTCATCGCTCTCCCACTTG; TTGAAGTAGCCCAGCCAGAAC  
*Adra1d*: AGACCCTAGCCATCGTCGTG; AGGGAACAGAGAACCCAGAGG  
*Adra2a*: TCATCTCCTCGTCCATCGGT; ACGCTTGCGATCTGGTAAA  
*Adra2b*: CTGTACCTCCTCCATCGTGC; TACTCCAATGCTCGGCTCAC  
*Adra2c*: CTGGATCGGCTACTGCAACA; GAAAGAGCGCCTGAAGTCCT  
*Adrb1*: TTTCTGCAAGGACCCGAGTG; TCCTAGGTGTGGAACCGGAA  
*Adrb2*: CAGCCATTGCCAAGTTCGAG; GACTAGATCAGCACACGCCA  
*Comt*: GGGATGAGAGAGTCCTACCAC; AGCAACAGGAGACCCAATGAG  
*Maoa*: CTGGAGAACGAGCAGCTAGAG; GAGCTGGAACATCCTTGGACT  
*Maob*: TGGAACCTAGCAAGCAGCAT; GGCCACAATCATGCAGAAGT

### *Retrograde labelling of noradrenergic neurons*

Mice were deeply anesthetized with isoflurane and positioned onto stereotaxic apparatus. The skull was drilled over the motor area (1mm anterior to Bregma, 1.5mm lateral to the midline) on each hemisphere. A pulled glass micropipette mounted onto a nanoinjector (Drummond Scientific Company, Philadelphia, USA) was lowered into the cortical parenchyma (-0.75mm) and 500nl of retrograde AAV-hSyn-EGFP at  $1.53 \times 10^{13}$  GC/mL (Addgene, Watertown, USA) was injected per hemisphere. Two weeks after surgery, brains were collected for analysis.

### *Immunofluorescence and image analysis*

Brain and brainstem sections were heated at 80°C in 10mM citrate buffer for 30min, incubated 1h in blocking solution (8% goat serum, 0.3% BSA, 0.3% Triton in PBS), and 72hrs at 4°C with primary antibodies diluted in the blocking solution. Sections were rinsed in PBS, incubated 2h with secondary antibody in blocking solution, rinsed in PBS and mounted. Brainstem sections labelled with EGFP were not incubated in citrate buffer. The primary antibodies used were: rabbit anti-DBH (Abcam, ab209487, 1/1000), rat anti-CTIP2 (Abcam, ab18465, 1/500), rabbit anti-TH (Millipore, ab152, 1/500) and chicken anti-GFP (Rockland, 600-901-215S, 1/500). Secondary antibodies (1/1000) were from the Alexa series (Life technologies, Carlsbad, CA, USA). Images were captured using an AxioImager.M2 microscope equipped with a structured illumination system (Zeiss, Oberkochen, Germany) and a high-resolution B/W camera (Hamamatsu, Iwata, Japan), and run by the ZEN 2 software (Zeiss, Oberkochen, Germany). Image analyses were performed with ImageJ software (NIH, Bethesda, USA). For cortical noradrenergic projection analyses, three brain sections were selected (1.00mm anterior to Bregma and 0.50mm and 1.70mm posterior to Bregma). Noradrenergic fibre density was quantified as the ratio of DBH-positive area on total region of interest area. Noradrenergic neurons of the locus coeruleus were quantified on matched brainstem sections (~5.4mm posterior to Bregma) and manually counted.

### *Statistics*

Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed on GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, USA). Student's t-test was used for

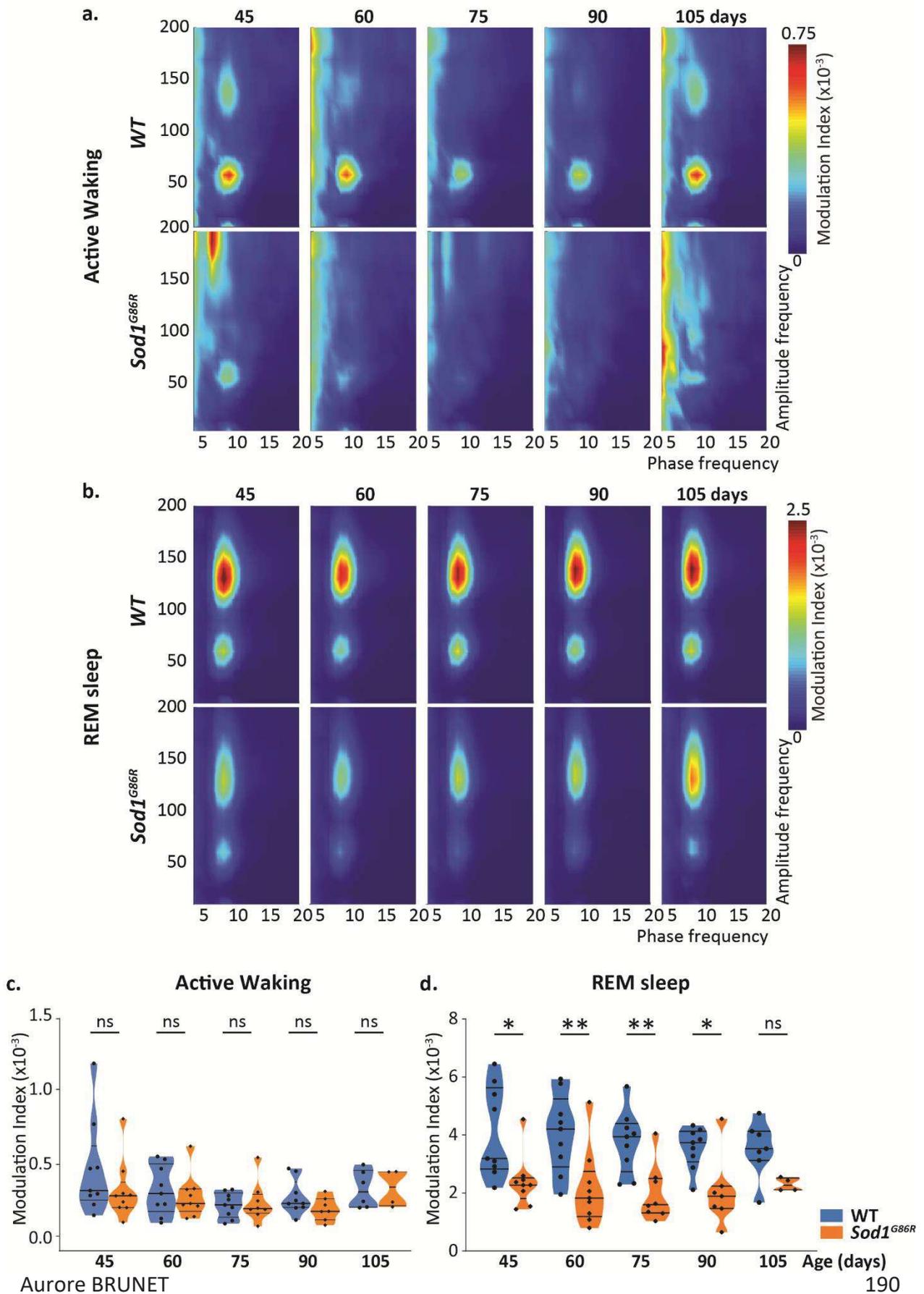
comparison between two groups, 1-way or 2-way analysis of the variance, followed by Tukey's multiple comparison post hoc test and 2-way repeated measures (RM) analysis of the variance, followed by Bonferroni's multiple comparison post hoc test were applied for three or more groups. Chi square test was used for comparison of the frequency of three classes of events between two groups. Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### *Sod1<sup>G86R</sup> and Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup> mice display impaired cross-frequency coupling*

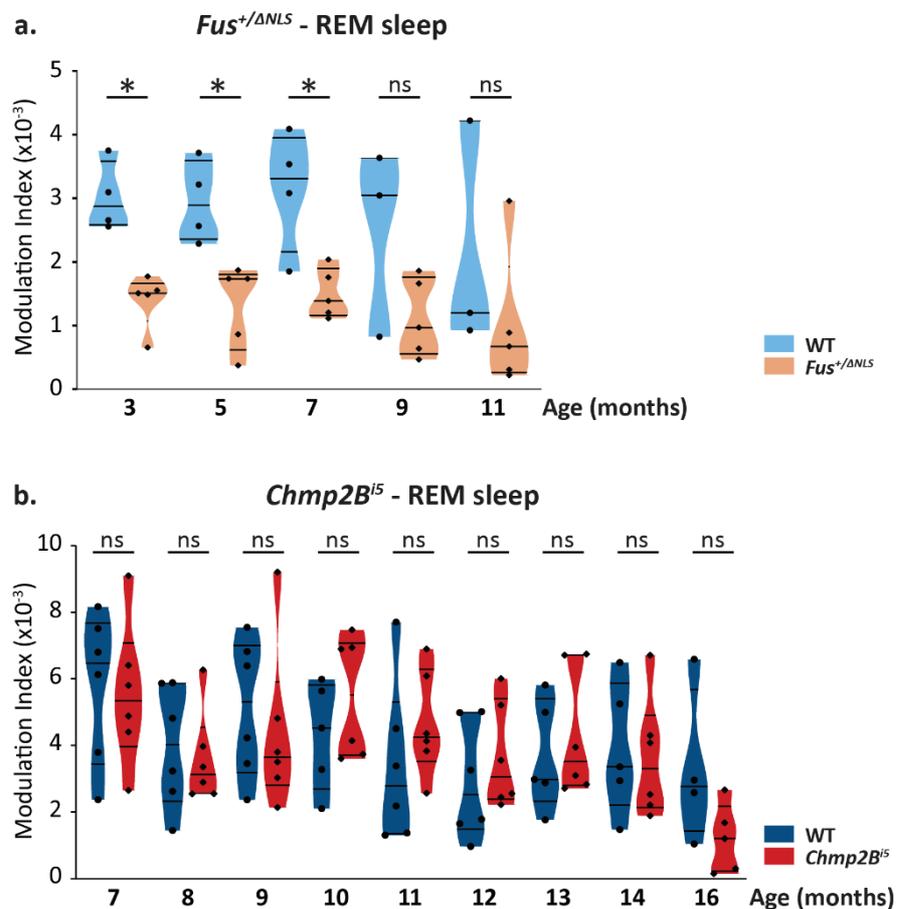
To test whether mouse models of ALS recapitulate cortical network dysfunction, we first ran longitudinal ECoG recordings and PAC analyses on *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, from the early presymptomatic age of 45 days until disease end-stage. In wild-type (WT) animals, averaged comodulogram maps indicated a coupling between Theta and Slow Gamma (50-60Hz) during active waking, and couplings between Theta and Slow Gamma (50-60Hz) and Theta and Fast Gamma (120-140 Hz) during rapid eye movement (REM) sleep at all tested ages (**Figure 1a,b**). However these couplings appeared all decreased in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals at all ages (**Figure 1a,b**). Plotting of the modulation index (MI) for the Theta-Fast Gamma coupling indicated a significant decrease during REM sleep ( $p=0.0015$  in two way-ANOVA; **Figure 1d**), but not during active waking ( $p=0.2354$  in two way-ANOVA; **Figure 1c**). Together, these data suggest that the *Sod1<sup>G86R</sup>* mouse model of ALS displays altered cortical network function, that seems to be more prominent during REM sleep. Importantly, this phenotype is altogether particularly early in these animals (45 days of age, long before symptoms onset and neuronal degeneration) and maintained throughout the whole disease progression. To evaluate whether mouse models of ALS and FTD displayed similar cortical network impairment, we ran identical ECoG recordings on *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* and *CHMP2B<sup>intron5</sup>* heterozygous mice and their respective controls. Compared to their WT littermates, *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* displayed a significant decrease of Theta-Fast Gamma coupling from the presymptomatic age of 3 months and until the end of the recordings at 11 months ( $p=0.0017$  in two way-ANOVA; **Figure 2a**). Contrastingly, *CHMP2B<sup>intron5</sup>* animals displayed similar MI as their controls ( $p=0.9847$  in two way-ANOVA; **Figure 2b**). Together, the data indicate that *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mouse models of ALS or ALS-FTD, but not the *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mouse model of ALS-FTD, display altered cortical network activity from presymptomatic ages, and that this phenotype is maintained throughout the whole disease duration.

Brunet\*, Scekcic-Zahirovic\* et al., Figure 1



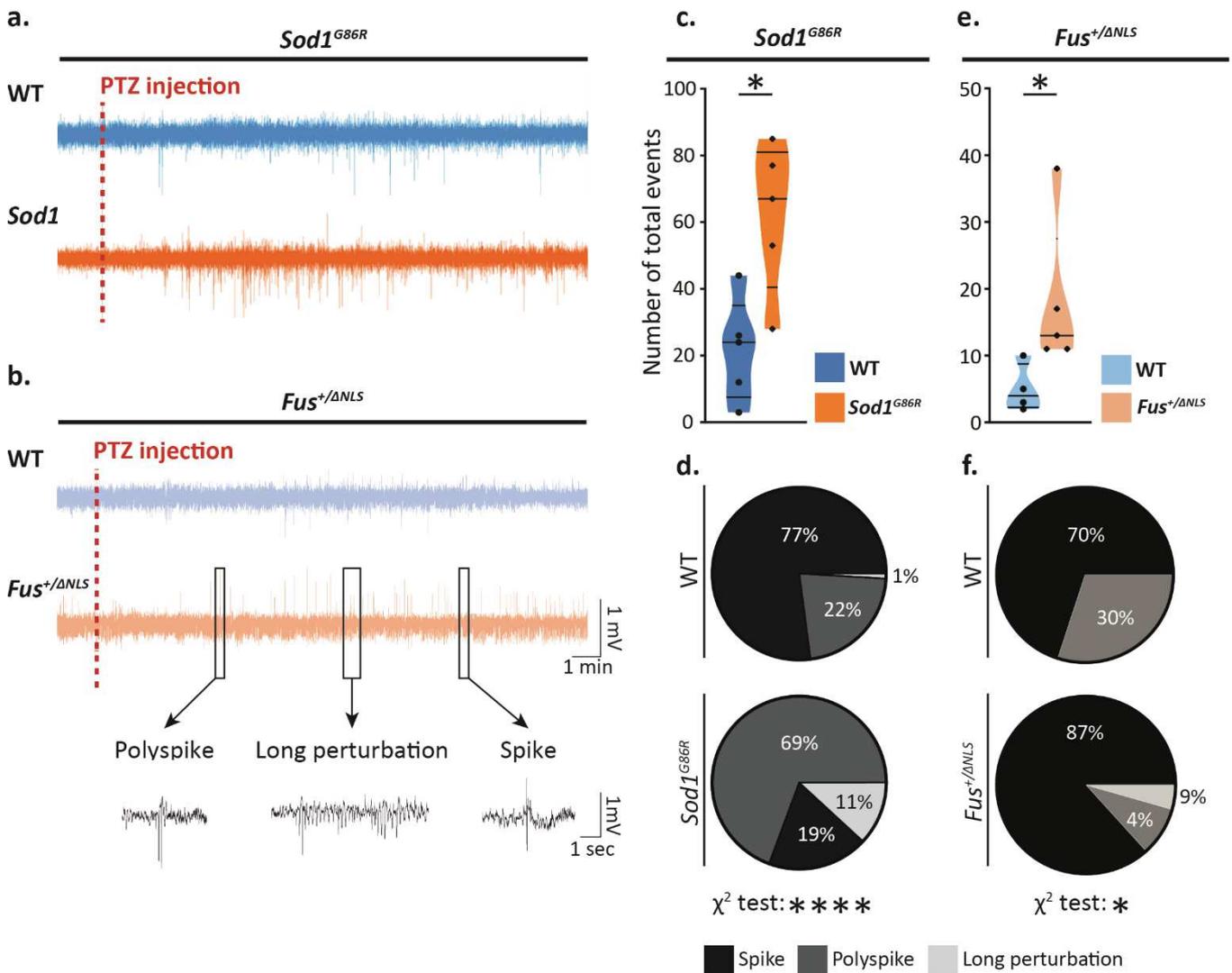
**Figure 1: *Sod1<sup>G86R</sup>* mice exhibit early cortical activity dysfunction characterized by decreased Theta-Fast Gamma decoupling. a-b.** Averaged comodulogram maps of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice during active waking (a) and REM sleep (b). Color gradient represent the modulation index (MI). **d-e.** Graphs representing the MI of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice during active waking (d) and REM sleep (e). n = 9 (45, 60, 75, 90 days) and 7 (105 days) WT, and 9 (45, 60 days), 8 (75 days), 7 (90 days) and 4 (105 days) *Sod1<sup>G86R</sup>*. Two-way ANOVA followed by multiple comparison test. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. (left page)

**Brunet\*, Scekcic-Zahirovic\* et al., Figure 2**



**Figure 2: *Fus<sup>+ΔNLS</sup>* but not *Chmp2b<sup>i5</sup>* mice exhibit early cortical activity dysfunction characterized by decreased Theta-Fast Gamma decoupling. a-b.** Graphs representing the MI of *Fus<sup>+ΔNLS</sup>* (a) and *Chmp2b<sup>i5</sup>* (b) mice during and REM sleep. n = 4 (3, 5, 7 months) and 3 (9, 11 months) WT, and 5 (all ages) *Fus<sup>+ΔNLS</sup>*. n = 6 (7, 8, 9, 11, 12 months), 5 (10, 13, 14 months) and 4 (16 months) WT, and 6 (7-14 months) and 5 (16 months) *Chmp2b<sup>i5</sup>*. Two-way ANOVA followed by multiple comparison test. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Brunet\*, Scekic-Zahirovic\* et al., Figure 3

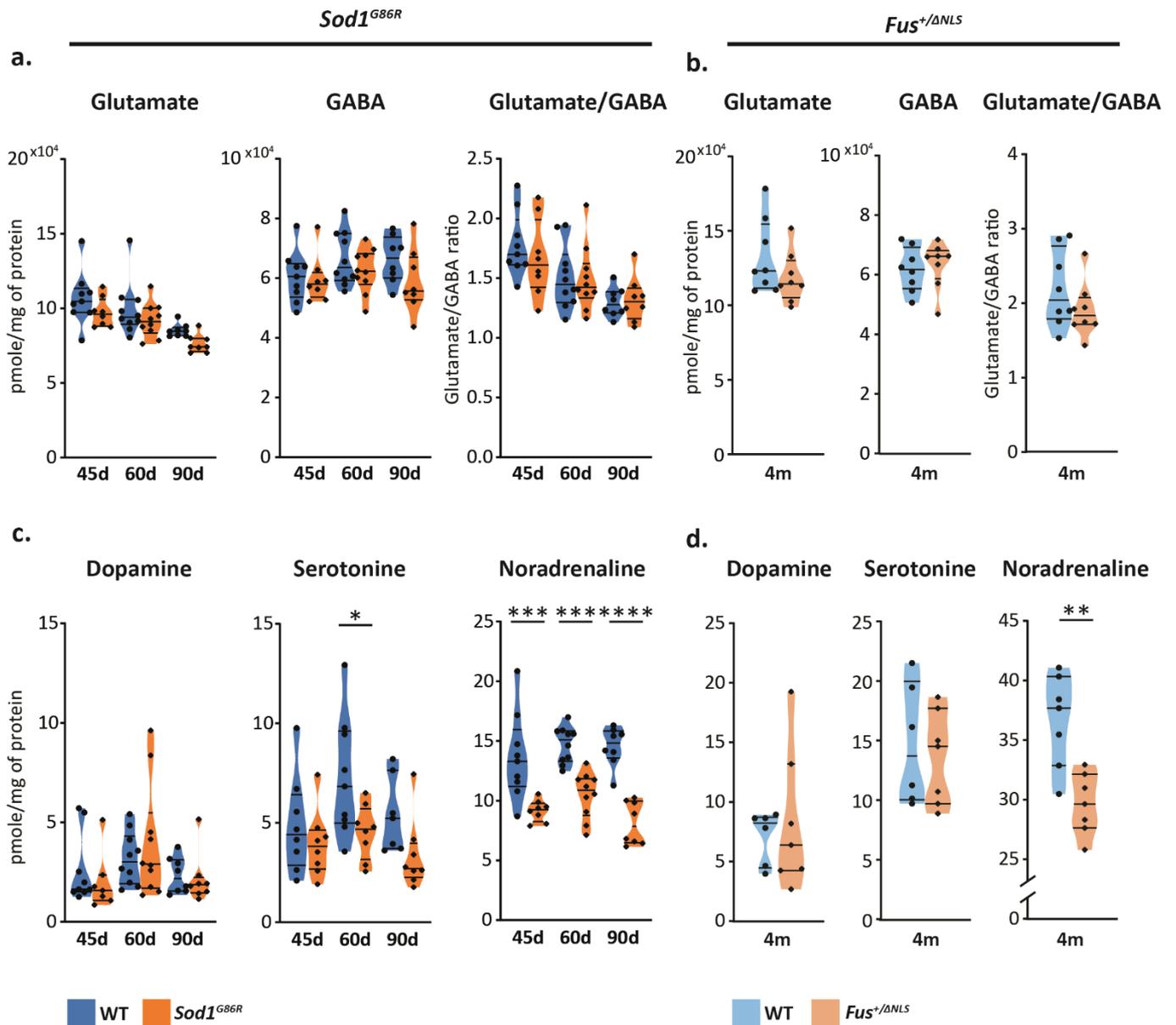


**Figure 3: *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice exhibit early cortical hyperexcitability shown by increased PTZ susceptibility. a-b.** Electrocorticography trace following a single subconvulsant pentylenetetrazol (PTZ) injection on WT and *Sod1<sup>G86R</sup>* (a) or *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* (b) mice at 85 days and 4 months respectively. Examples of spike, polyspike and long perturbation are shown in panel b. **c-f.** During the first 10min post-PTZ injection, *Sod1<sup>G86R</sup>* (c) and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice (e) exhibit an increase in the number of spike, polyspike and long perturbation events, and a modification of events distribution (d and f respectively). n=5WT and 5 *Sod1<sup>G86R</sup>*. n=4 WT and 5 *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Unpaired t test (c,e); Chi-squared test (d,f). \*p<0.05; \*\*\*\*p<0.0001.

*Sod1<sup>G86R</sup> and Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup> mice display increased susceptibility to pentylenetetrazol*

Because Theta-Gamma PAC is highly dependent on proper excitation/inhibition balance (Buzsáki and Wang, 2012; Keeley et al., 2017), we further sought to assess whether the decreased PAC revealed in *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice corresponded to increased excitation over inhibition, or vice versa. To do so, we employed a pentylenetetrazol (PTZ) susceptibility test. PTZ is a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist used as a convulsant drug to model epilepsy (Dhir, 2012). Here, we administered a single subconvulsive dose of PTZ (30mg/kg) to pharmacologically increase cortical excitability (Koryntová et al., 2002) and record the cortical network responses on ECoG traces (**Figure 3a,b**). A single dose of PTZ significantly increased the number of events in *Sod1<sup>G86R</sup>* (p=0.0259, **Figure 3c**) and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* (p=0.0337, **Figure 3e**) compared to their WT littermates. In addition, analysis of the different firing events classified as spikes, poly-spikes and long perturbations further revealed a significant difference in their distribution between WT and *Sod1<sup>G86R</sup>* (p<0.0001, **Figure 3d**) or *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* (p=0.0278, **Figure 3f**). These results indicate that decreased PAC in mouse models of ALS and FTD correlates with increased PTZ susceptibility and cortical excitability, a phenotype that is reminiscent of the cortical hyperexcitability revealed by TMS in ALS patients.

Brunet\*, Scekic-Zahirovic\* et al., Figure 4

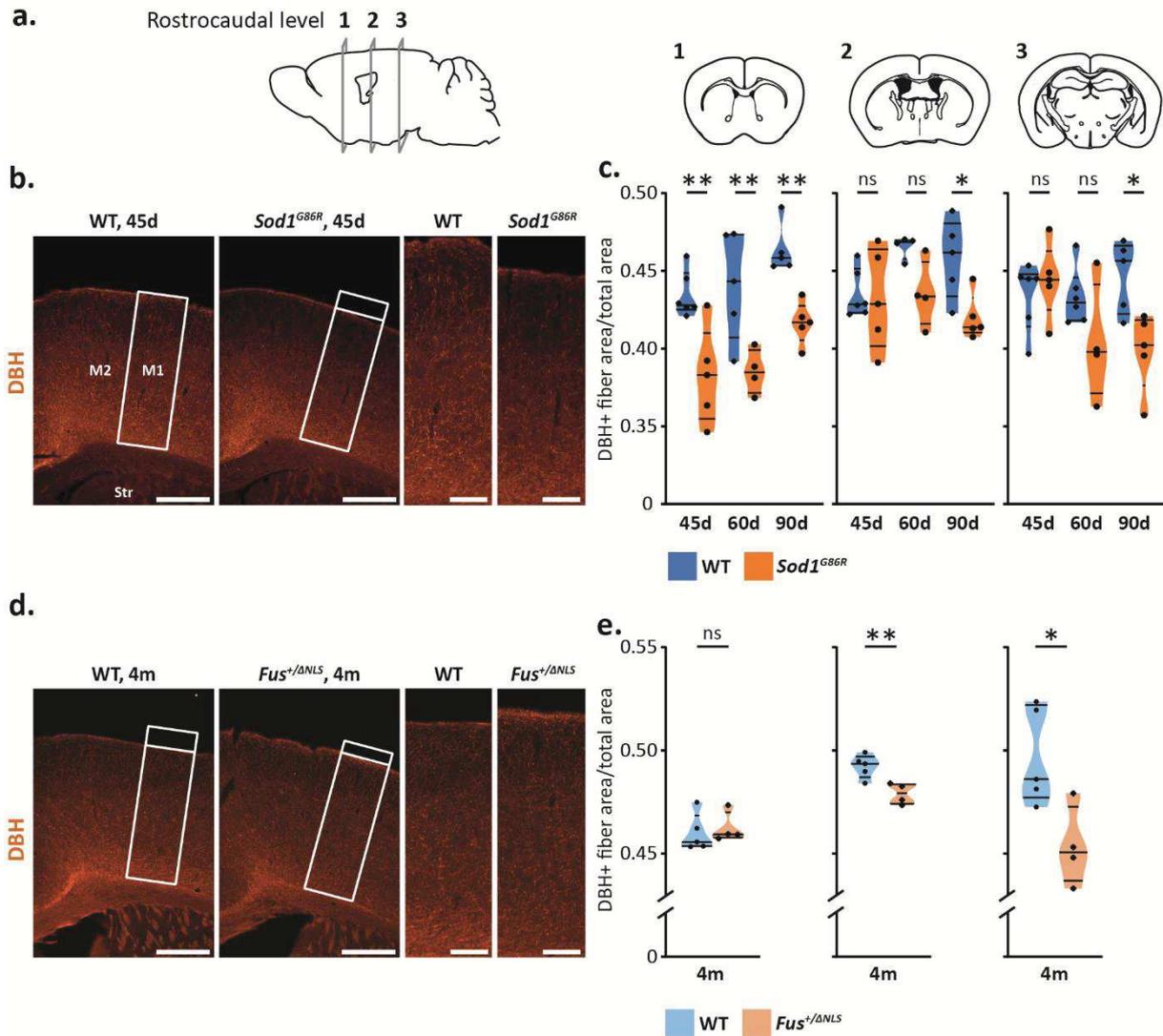


**Figure 4: *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice exhibit early decreased cortical noradrenaline level without modification of cortical glutamate/GABA ratio. a-b.** Mass spectrometry analyses on the motor cortex show no modification of cortical levels of glutamate, GABA or Glutamate/GABA ratio in 45, 60 and 90 days old *Sod1<sup>G86R</sup>* (a) nor 4 months old *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice (b). **c-d.** Cortical dopamine level is not affected in either *Sod1<sup>G86R</sup>* (c) nor *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice (d), serotonin level is reduced in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice only at 45, 60 and 90 days (c). Both *Sod1<sup>G86R</sup>* (c) and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice (d) exhibit decreased cortical levels of noradrenaline. n = 9, 10 and 8 WT, and 8, 10 and 8 *Sod1<sup>G86R</sup>* at 45, 60, 90 days old respectively. n = 8 WT and 8 *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Two-way ANOVA followed by multiple comparison test (a,c). Unpaired t test (b,d). \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

*Sod1<sup>G86R</sup> and Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup> mice display increased noradrenaline levels in the motor cortex*

In an attempt to unravel the cellular and molecular origins of cortical hyperexcitability in *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice, we conducted Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (LC-MS) analyses on micro-dissected motor cortex samples to measure the levels of the two main cortical neurotransmitters (glutamate and GABA) and selected neuromodulators (serotonin, dopamine, noradrenaline) for their ability to modulate the excitability of the motor cortex (reviewed in (Brunet et al., 2020)). In *Sod1<sup>G86R</sup>* mice compared to controls, GABA, glutamate and dopamine were found unchanged (**Figure 4a**). As already reported (Dentel et al., 2013b), serotonin was moderately decreased (genotype effect,  $p=0.0034$  in 2way ANOVA, and  $p=0.0324$  at 60 days in multiple comparisons, **Figure 4c**). In contrast, noradrenaline (NA) was strongly decreased by 30% in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice ( $p<0.0001$ , **Figure 4c**). Similar results were observed in the hippocampus and spinal cord of these mice (**Supplementary figure 1**). In *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice compared to controls, GABA, glutamate, dopamine and serotonin were found unchanged (**Figure 4b,d**), while NA was found decreased by 19% ( $p=0.0019$ , **Figure 4d**). However, the spinal noradrenergic levels seemed unchanged in the *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice compared to WT ( $p=0.0556$ , **Supplementary Figure 1**). Together, these data support the possibility that decreased levels of noradrenaline may contribute to the cortical network dysfunction revealed by PAC quantification, and PTZ susceptibility.

Brunet\*, Scekcic-Zahirovic\* et al., Figure 5

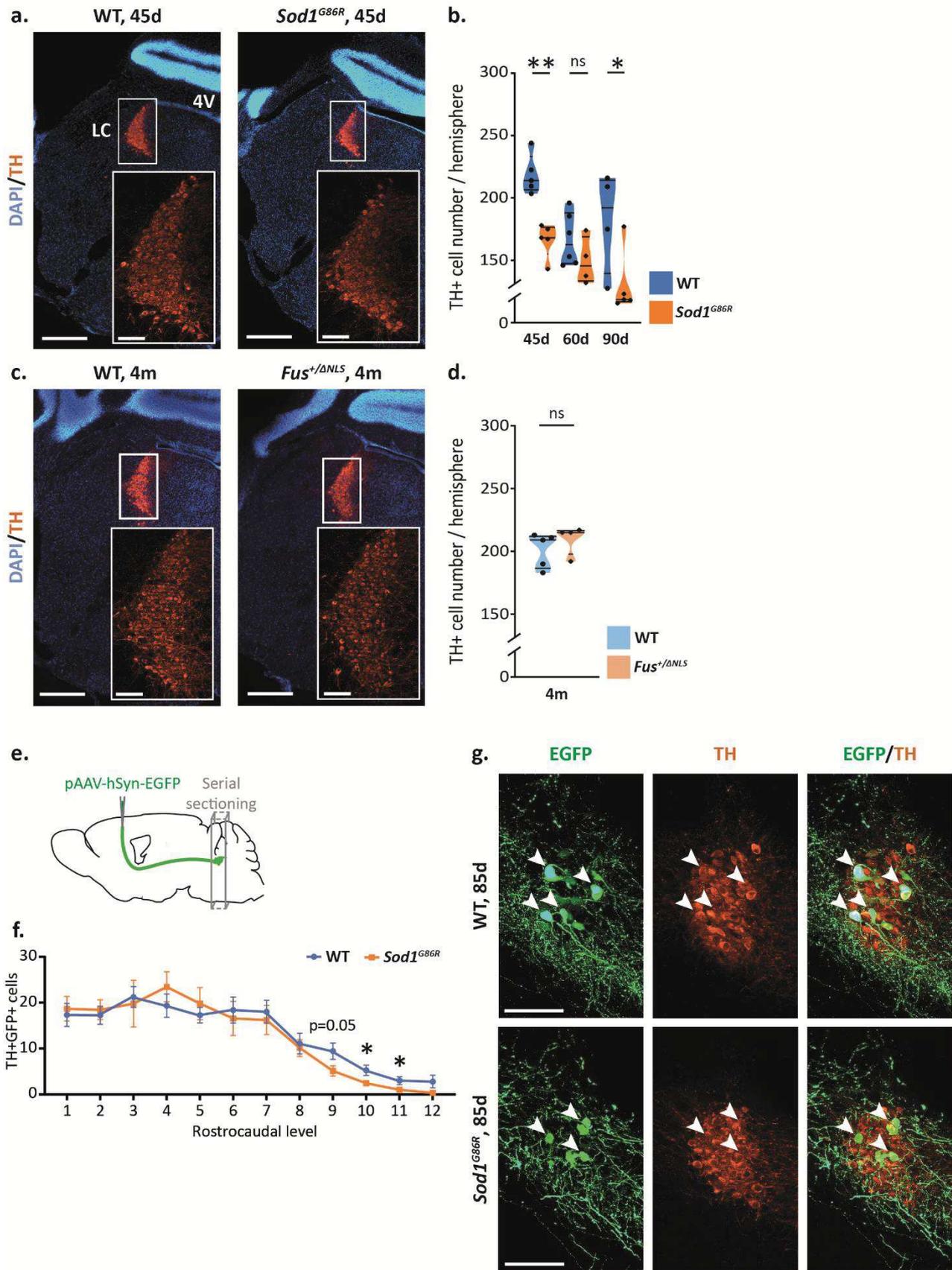


**Figure 5: *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ΔNLS</sup>* mice exhibit early decreased density of noradrenergic projections to the motor cortex.** Noradrenergic projections in 3 rostrocaudal part of the motor cortex (M1) (a) were analyzed following Dopamine β-hydroxylase (DBH) immunofluorescence labelling in 45, 60, 90 days old *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (b, c) and 4 months old *Fus<sup>+/ΔNLS</sup>* mice (d, e). While *Sod1<sup>G86R</sup>* mice exhibit decreased DBH+ fibers density mainly on the rostral part of the motor cortex at presymptomatic stages (45, 60d), the decrease in observed in all rostrocaudal levels at a symptomatic stage (90d). Presymptomatic *Fus<sup>+/ΔNLS</sup>* mice exhibit decreased DBH+ fiber density in the middle and caudal part of the motor cortex. n = 6, 4-6, 5 WT and 5, 4, 5 *Sod1<sup>G86R</sup>* at 45, 60, 90 days old respectively. n = 5 WT and 4 *Fus<sup>+/ΔNLS</sup>*. Two-way ANOVA followed by multiple comparison test (c). Unpaired t test (e). \*p<0.05; \*\*p<0.01. Scales: b, d. 500μm and 200μm for cropped images.

*Cortical noradrenergic projections are decreased in both mouse lines*

To decipher the origins of decreased cortical NA levels in *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice, we labelled and quantified the density of cortical noradrenergic projections using the immunoreactivity of the dopamine beta hydroxylase (DBH, **Figure 5**), that converts dopamine into NA and selectively labels noradrenergic neurons and noradrenergic projections. We observed a significant decrease in DBH+ fiber density in the most rostral part of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice motor cortex ( $p < 0.0001$ , **Figure 5b,c**). In the other hand, *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice show reduced noradrenergic projection density in the middle and caudal, and not the rostral, part of the motor cortex ( $p = 0.6807$ ,  $0.0081$  and  $0.0207$  respectively, **Figure 5d,e**). Together, these data indicate that decreased NA levels in ALS mouse models could arise, at least partly, from decreased noradrenergic cortical innervation.

Brunet\*, Scekic-Zahirovic\* et al., Figure 6

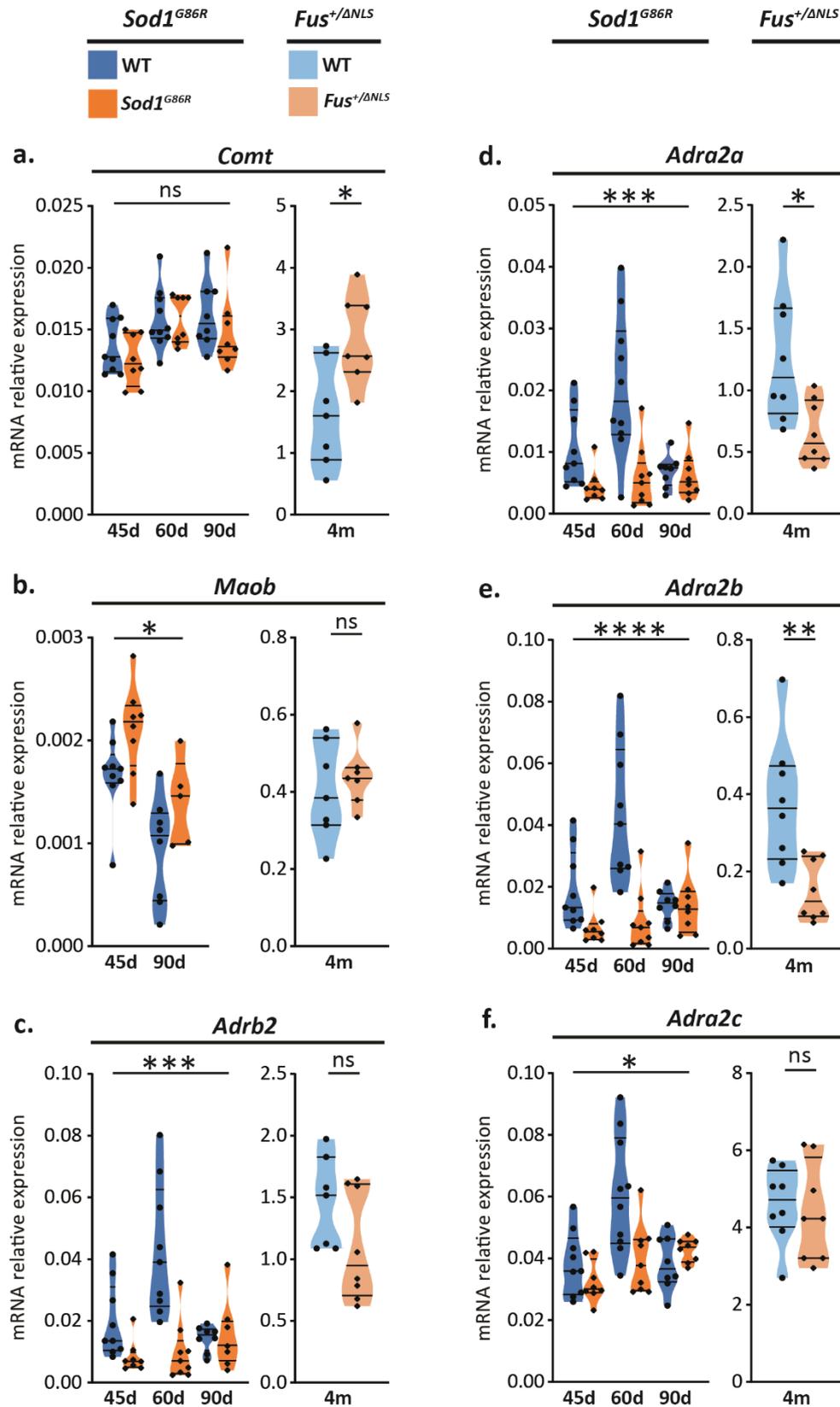


**Figure 6: *Sod1<sup>G86R</sup>* mice exhibit early decreased number of noradrenergic neurons and cortical projecting noradrenergic neurons in the locus coeruleus. a-d.** Tyrosine hydroxylase (TH) immunofluorescence labelling on in the locus coeruleus (LC) shows early decreased TH+ cell number in *Sod1<sup>G86R</sup>* (**a, b**) but not *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice (**c, d**). Two weeks after retrograde labelling from the motor cortex using pAAV-hSyn-EGFP (**e**), 85 days old *Sod1<sup>G86R</sup>* mice exhibit reduced TH+EGFP+ cell number in the caudal part of the LC (**f, g**). n = 5, 6, 6 and 4 WT, and 5, 4, 6 and 5 *Sod1<sup>G86R</sup>* at 45, 60, 85, 90 days old respectively. n = 5 WT and 4 *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Two-way ANOVA followed by multiple comparison test (**b**). Unpaired t test (**d**). Multiple t test (**f**). \*p<0.05; \*\*p<0.01. Scale: **a,c**. 500 $\mu$ m and 100 $\mu$ m for cropped images; **g**. 100 $\mu$ m. (left page)

*Sod1<sup>G86R</sup>* but not *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice present with decreased number of noradrenergic neurons in the locus coeruleus

The locus coeruleus (LC) is the main source of noradrenaline in the brain, and more particularly the cerebral cortex. We used Tyrosine hydroxylase (TH) immunofluorescence to label and quantify the number of LC neurons in *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice and their respective controls. We measured a significant decrease in TH+ cells in *Sod1<sup>G86R</sup>* (p=0.0001, **Figure 6a,b**), but not in *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* (p=0.3581, **Figure 6c,d**) mice compared to their respective WT littermates. *Sod1<sup>G86R</sup>* LC neurons numbers were stable over time, and size was not altered at any age (data not shown), ruling out the possibility of neurodegeneration of LC neurons. To confirm these results, we performed retrograde labelling of LC neurons using a retrograde AAV-hSyn-EGFP virus injected into the motor cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* and control mice, and quantified the number of GFP+ TH+ double positive neurons present in the LC (**Figure 6e-g**). Rostro-caudal sampling of the LC revealed significant reduction of GFP+ TH+ double positive neurons in the most caudal sections (**Figure 6f,g**). Taken together, these data suggest that in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, but not in *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice, decreased cortical noradrenergic projections may arise, at least partly, from decreased amounts of NA neurons in the LC, that may not be undergoing neurodegeneration.

Brunet\*, Scekcic-Zahirovic\* et al., Figure 7



**Figure 7: *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice motor cortex exhibit increased monoamine degradation enzyme and decreased adrenergic  $\alpha_2$  receptor gene expression.** Expression of genes encoding adrenergic receptors and monoamine degradation enzymes was measured using qPCR on 45, 60, 90 days old *Sod1<sup>G86R</sup>* and 4 months old *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice. While *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice exhibit increased expression of COMT (*Comt*) monoamine degradation enzyme (e), *Sod1<sup>G86R</sup>* mice show increased expression of MAO-B (*Maob*) enzyme (f). *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice motor cortex exhibit decreased expression of inhibitory  $\alpha_{2A}$  (*Adra2a*) and  $\alpha_{2B}$  (*Adra2b*) receptors (a, b). Only *Sod1<sup>G86R</sup>* mice show reduced expression of  $\alpha_{2C}$  (*Adra2c*) receptors (c) and excitatory  $\beta_2$  (*Adrb2*) receptors (d). n = 9, 10 and 8 WT, and 8, 9 and 8 *Sod1<sup>G86R</sup>* at 45, 60, 90 days old respectively. n = 8 WT and 8 *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Two-way ANOVA followed by multiple comparison test (a,c). Unpaired t test (b,d). \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001. (left page)

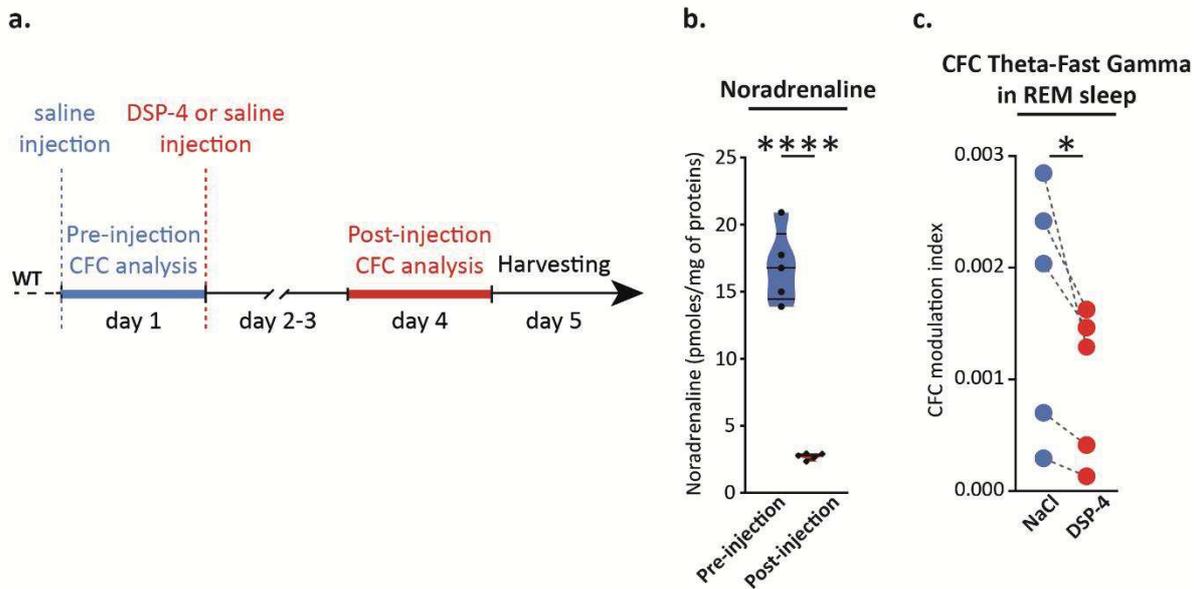
*Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* motor cortex show increased expression levels of genes encoding monoamine's degradation enzymes

Monoamines such as noradrenaline can be degraded through the action of Monoamine oxidase-A or B (MAO-A or MAO-B), also capable of degrading serotonin, or of Catechol-O-methyltransferase (COMT). Using qPCR on *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* motor cortex, we showed a significantly increased expression of *Comt* in *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* (p=0.0131, **Figure 7a**) and of *Maob* in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (p=0.0106, **Figure 7b**). These results suggest that in addition to decreased cortical noradrenergic innervation, decreased cortical NA levels could also arise from increased degradation, both in *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice.

*Inhibitory adrenergic receptors expression is decreased in *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice cortex*

Noradrenaline can have either an excitatory or inhibitory impact on its targets depending on the adrenergic receptors they express. While receptors  $\alpha_1$  and  $\beta$  are mainly excitatory,  $\alpha_2$  are inhibitory and can be expressed on both pre- and postsynaptic neurons as well as glial cells. Using qPCR on *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* motor cortex, we showed a significant decrease in  $\alpha_2$  coding genes and one subtype of  $\beta$  gene expression. *Adra2a*, *Adra2b*, *Adra2c* and *Adrb2* expressions were found decreased in the motor cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice compared to their WT littermates (p=0.0002, <0.0001, 0.0221, 0.0001 respectively, **Figure 7c-f**), and similarly, *Adra2a* and *Adra2b* expressions were decreased in *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice (p=0.0112 and 0.0042, **Figure 7d,e**). This reduced inhibitory  $\alpha_2$  receptor expression could possibly compensate for decreased cortical NA levels.

Brunet\*, Scekic-Zahirovic\* et al., Figure 8

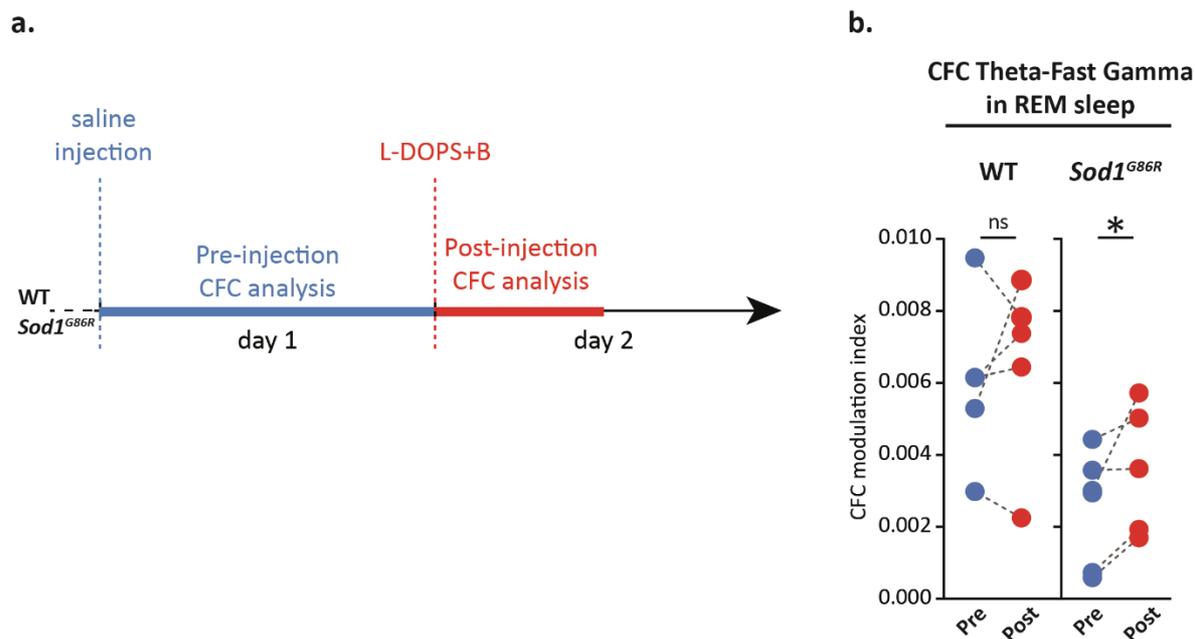


**Figure 8: Noradrenaline depletion is sufficient to induce cortical activity dysfunction in WT mice.** **a.** Noradrenaline depletion was induced by a single i.p. injection of N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) in 60 to 70 days old WT mice following baseline 24h ECoG recording. Two days post-injection, mice were recorded for 24h and tissues were collected. **b.** Mass spectrometry analysis on the motor cortex of NaCl and DSP-4 treated mice show significant reduction of noradrenaline levels. **c.** ECoG recordings pre- and post-DSP-4 injection show decreased cross frequency coupling (CFC) of Theta-Fast Gamma modulation index during REM sleep.  $n = 5$  NaCl and 5 DSP-4 treated WT mice. Unpaired t test (**b**). Paired t test (**c**). \* $p < 0.05$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

*Noradrenaline depletion is sufficient to decrease PAC*

To test whether decreased noradrenaline levels could be sufficient to induce cortical dysfunction such as evidenced in *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice, we used ECoG on WT animals, that we recorder prior to and two days after N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) injection (**Figure 8a**). DSP-4 is a neurotoxin selective of the noradrenergic neurons (Ross, 1976; Ross and Renyl, 1976; Jaim-Etcheverry and Zieher, 1980; Fritschy and Grzanna, 1991). First, we verified by LC-MS that DSP-4 induced a decrease of NA levels: two days after DSP-4 injection, cortical noradrenaline levels were significantly decreased by approximately 80% ( $p < 0.0001$ ) in treated compared to saline-injected controls (**Figure 8b**). PAC analysis further revealed that pharmacologically induced loss of NA is sufficient *per se* to trigger decreased MI ( $p = 0.0261$ , **Figure 8c**).

Brunet\*, Scekcic-Zahirovic\* et al., Figure 9



**Figure 9: Noradrenaline supplementation helps restoring cortical activity in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice.**  
**a.** Central noradrenaline supplementation was induced by a single i.p. injection of L-threo-dihydroxyphenylserine (L-DOPS) and benserazide (B) in 70 days old WT and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice following baseline 24h ECoG recording. Right after L-DOPS+B injection, mice were recorded for 12h. **b.** ECoG recordings pre- and post-L-DOPS+B injection show no modification in cross frequency coupling (CFC) of Theta-Fast Gamma modulation index during REM sleep in WT mice and increased CFC modulation index in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. n = 5 WT and 5 *Sod1<sup>G86R</sup>*. Paired t test. \*p<0.05.

*NA supplementation in  $Sod1^{G86R}$  mice contributes to restoring cortical PAC*

L-threo 3,4-Dihydroxyphenylserine (L-DOPS) is synthetic precursor of NA. Benserazide (B) is an inhibitor of aromatic acid decarboxylases. L-DOPS can cross the blood brain barrier while B cannot, which limits its action to the peripheral of aromatic acid decarboxylases. Thus the combination of L-DOPS and B allow selective central increase of NA levels (Thomas et al., 1998; Rommelfanger et al., 2007).  $Sod1^{G86R}$  mice and their WT littermates were recorded on ECoG prior to and immediately after a single injection of L-DOPS+B at 70 days of age (**Figure 9a**). PAC analyses revealed that the treatment had no effect on WT mice, while it increased the MI in treated  $Sod1^{G86R}$  mice ( $p=0.2896$  and  $0.0261$  respectively, **Figure 9b**). Therefore, central NA supplementation in  $Sod1^{G86R}$  mice seems to restore, at least partly, proper cortical activity.

## Discussion

### *ECoG, a useful tool to study network impairment in mice*

Cortical hyperexcitability is a common feature of ALS patients found early on during the course of the disease and negatively correlated to the survival of patients (Eisen et al., 2017).

In this study we use electrocorticography (ECoG) as a tool to study cortical activity in mice. This technic allows to assess multiple parameters of wave oscillations, including cross-frequency coupling and Theta-Gamma PAC, which is correlated to balanced excitation/inhibition (Buzsáki and Wang, 2012; Keeley et al., 2017). Here, we report that two mouse models of ALS and FTD, the *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice, present decreased Theta-Gamma PAC, that is altogether presymptomatic and maintained throughout the whole life expectancy of the animals whether short, or longer. Increased PTZ susceptibility in the same animals suggests that altered excitation/inhibition balance corresponds to increased excitation. This phenotype revealed by ECoG in rodents is highly reminiscent of the cortical hyperexcitability revealed by TMS in patients. To determine whether animal models of ALS and FTD recapitulate cortical hyperexcitability, TMS experiments could be envisaged in future studies (Vahabzadeh-Hagh et al., 2011).

### *Cortical Glutamate/GABA balance is maintained in ALS mouse models*

In the cerebral cortex, 80% of neurons are excitatory glutamatergic neurons, and 20% are inhibitory GABAergic interneurons (Lodato and Arlotta, 2015) making Glutamate and GABA the main excitatory and inhibitory neurotransmitters in this structure. A cortical hyperexcitability could therefore suggest an imbalance of the ratio between these two molecules. In this study we used mass spectrometry on the motor cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice and showed no modification of glutamate/GABA ratio, glutamate or GABA levels in either of these mouse model of ALS.

The approach we used only allow to assess the levels of these neurotransmitters at a given time and in the entire tissue. The presence of physiological levels of glutamate and GABA does not necessary suggest proper neurotransmission. Recently, Scekcic-Zahirovic and Sanjuan-Ruiz showed increased neuronal activity and defects of inhibitory synapses in *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice frontal cortex (Scekcic-Zahirovic et al., 2021a). Thus, alteration of the GABAergic system can occur without modification of cortical GABA levels nor glutamate/GABA ratio. Approaches like

synaptosome isolation and molecular analyses, electron microscopy, patch-clamp or even PET scan, recently used to show an early selective disruption of inhibitory synapses in an Alzheimer's disease mice model (Shimojo et al., 2020), could be used to study both glutamatergic and GABAergic neurotransmission in *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* but also *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. Results regarding synaptic functionality in these ALS mouse models would be interesting in the future to better understand the similarities and possible differences of cortical dysfunction.

#### *Noradrenergic system alterations in ALS mouse models*

The cerebral cortex receives a multitude of projections from distant structures that modulate its activity through neuromodulators that could contribute to cortical hyperexcitability in ALS (Brunet et al., 2020; Gunes et al., 2020).

In this study, we were able to assess cortical levels of dopamine, serotonin and noradrenaline in both *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice and showed a significant decrease in noradrenaline levels at an early stage, prior to any neuronal loss or motor phenotype (Scekic-Zahirovic et al., 2016; Marques et al., 2021). Although a decrease in serotonin level was observed in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, decreased noradrenaline level was the only alteration found in both ALS mouse model suggesting its contribution to their common cortical dysfunction. We found decreased noradrenergic projections to the motor cortex, associated with decreased noradrenergic neurons in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, including some of the one projecting to the motor cortex. Noradrenergic projections are present in the entire cerebral cortex (Fuxe and Ungerstedt, 1968; Jones and Moore, 1977; Jones et al., 1977; Audet et al., 1988) with, in some regions, a decreased distribution and noradrenaline levels following the rostrocaudal axis (Morrison et al., 1982; Bellesi et al., 2016). While in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, noradrenergic projection decrease in the motor cortex is more pronounced in the rostral part, in *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* it appears in the middle and caudal part of the motor cortex, suggesting different noradrenergic system alterations. In addition, the analyses of gene expression of different enzymes able to metabolise noradrenaline in the motor cortex showed an increase of *COMT* gene expression in *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* and *MAO-B* in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. Overall, these data demonstrate a global alteration of the noradrenergic system and highlight possible different mechanisms of alteration in both ALS mouse models.

In ALS patients, little is known regarding the noradrenergic system and its functionality. While some studies showed increased levels of noradrenaline in the cerebrospinal fluid (Ziegler et al., 1980; Barkhatova et al., 1996) or spinal cord (Bertel et al., 1991), others showed decreased levels (Sofic et al., 1991). TDP-43 inclusions studies by Brettschneider and collaborators did not show any signs of alterations in the locus coeruleus. But the work of Dentel and El Oussini on the serotonergic system alteration in ALS mouse models and patients (Dentel et al., 2013b; El Oussini et al., 2017) proved that neuronal alterations can be observed without signs of TDP-43 pathology in their site of origin.

In both Alzheimer and Parkinson's disease, alterations of the noradrenergic system has been found (Matthews et al., 2002; Masilamoni et al., 2017; Theofilas et al., 2018; Paredes-Rodriguez et al., 2020; Singh, 2020). In animal models of Alzheimer's disease, lesions of the locus coeruleus exacerbate tau and amyloid- $\beta$  plaque deposition and deplete noradrenaline levels in its target regions, inducing impaired cognitive function (Heneka et al., 2006; Chalermpanupap et al., 2018), while its activation restores them (Rorabaugh et al., 2017). In patients with Parkinson's disease, noradrenergic neurons lesion has been proposed to contribute to dopaminergic neurons degeneration through the release of interleukins and cytokines on microglial cells. Thus, the noradrenergic system, overlooked for a long time in the context of ALS, its contribution to cortical hyperexcitability shown here and broad action both in the brain and spinal cord, highlights its possible implication in different ALS pathology mechanisms.

#### *Noradrenaline modulation is sufficient to modify cortical activity*

In the cerebral cortex, noradrenaline can modulate neuronal excitability at different levels, directly, through noradrenergic synapses on excitatory and inhibitory neurons, or indirectly, on glutamatergic (Mather et al., 2016; Poe et al., 2020) and GABAergic synapses (Salgado et al., 2012). Furthermore, noradrenergic neurons, more specifically the one originating from the locus coeruleus, can project to multiple structures in the brain like the thalamus, the main afference to the cortex (Robertson et al., 2013; Waterhouse and Chandler, 2016) making this system capable of influencing cortical activity directly or by modulating other structures.

Overall, studies suggest a decreased glutamate excitatory response and enhances GABAergic inhibitory response to noradrenaline in the cortex (Salgado et al., 2016). Studies regarding

epilepsy support this idea by showing a protecting effect of noradrenaline on seizures (Libet et al., 1977; Weiss et al., 1990; Ferraro et al., 1994; Szot et al., 1999) suggesting a global inhibitory effect on cortical activity. On healthy subjects, a single dose of Yohimbine, an  $\alpha_2$ -adrenergic antagonist, increases the excitability of the cortico-motoneuronal system in TMS, suggesting that, not only noradrenaline contribute to cortical network functionality but that its modulation is sufficient to influence cortical activity.

Here we show that noradrenaline depletion is sufficient to decrease Theta-Fast Gamma PAC in wild type animals, while its supplementation in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice increases it. Taken together, these data suggest, not only that decreased noradrenaline levels contribute to cortical activity dysfunction, but also that increasing cortical noradrenaline can help restore it. It remains to be evaluated if a long-term noradrenaline supplementation in mouse models of ALS could improve motor phenotype and survival.

Noradrenergic effect is highly dependent on the adrenergic receptors expressed by the different components of the cerebral cortex. Here, we show a significant decrease in  $\alpha_2$  adrenergic receptor expression in the motor cortex of both *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice. These inhibitory receptors can be found pre- and post-synaptically with an important role as auto-receptors (Gyires et al., 2009). Although  $\alpha_2$  mRNA is predominantly found post-synaptically, it can also be present in the pre-synaptic element (Talley et al., 1996; Gyires et al., 2009). Therefore, decreased expression of  $\alpha_2$  adrenergic receptor mRNA observed in this study could reflect 1) the loss of cortical noradrenergic projections, 2) a decreased inhibition of the remaining noradrenergic projections in a sense of a compensatory mechanism to noradrenaline reduction but more certainly 3) a decreased inhibitory action of noradrenaline on cortical cells. The mechanism through which noradrenaline alteration affect cortical activity and contribute to cortical hyperexcitability in ALS remains to be determined, but this system offers a promising new pathway to modulate cortical network dysfunction.

In this study we provide the first evidence of an early cortical hyperexcitability in two mouse models of ALS using ECoG, and the contribution of decreased cortical noradrenaline level to this cortical activity dysfunction. Noradrenergic system alteration through reduced projections to the cortex, increased expression of gene encoding noradrenaline degradation enzymes and, in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, a reduction of noradrenergic neurons, all contribute to

noradrenaline depletion. We report here that this depletion is sufficient to induce the cortical activity dysfunction measured in both *Sod1*<sup>G86R</sup> and *Fus*<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup> mice, and that its supplementation, in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, allow the improvement of Theta-Fast Gamma PAC. Yet, the mechanism underlying noradrenaline contribution to this cortical hyperexcitability, and a potential effect of its supplementation on neuronal loss, disease onset, motor phenotype or survival of mouse model of ALS remains to be determined. The validation of electroencephalography as a tool to measure cortical hyperexcitability and the noradrenaline depletion in ALS patients will be explored to pave to way to the development of possible therapeutic approaches targeting cortical network dysfunction.

## **Acknowledgments**

The authors are extremely thankful to Annie Picchinenna, Claudia de Tapia and Marie-José Ruivo for technical assistance. The work has been supported by a European Research Council (ERC) starting grant #639737 to CR, and an ARSLA grant to CR and RG. JCZ was supported by a post-doctoral fellowship from the AFM-Telethon #21993, and AB by a PhD fellowship from the French Ministry of Research.

## Bibliography

Ahnaou A, Moechars D, Raeymaekers L, Biermans R, Manyakov NV, Bottelbergs A, Wintmolders C, Van Kolen K, Van De Casteele T, Kemp JA, Drinkenburg WH (2017) Emergence of early alterations in network oscillations and functional connectivity in a tau seeding mouse model of Alzheimer's disease pathology. *Sci Rep* 7:14189.

Audet MA, Doucet G, Oleskevich S, Descarries L (1988) Quantified regional and laminar distribution of the noradrenaline innervation in the anterior half of the adult rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 274:307–318.

Barkhatova VP, Zavalishin IA, Kostjuk AV, Demina EG, Moskvitina TA (1996) [Neurotransmitter changes in amyotrophic lateral sclerosis]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 96:78–85.

Bellesi M, Tononi G, Cirelli C, Serra PA (2016) Region-Specific Dissociation between Cortical Noradrenaline Levels and the Sleep/Wake Cycle. *Sleep* 39:143–154.

Bertel O, Malessa S, Sluga E, Hornykiewicz O (1991) Amyotrophic lateral sclerosis: changes of noradrenergic and serotonergic transmitter systems in the spinal cord. *Brain Res* 566:54–60.

Brunet A, Stuart-Lopez G, Burg T, Scekcic-Zahirovic J, Rouaux C (2020) Cortical Circuit Dysfunction as a Potential Driver of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurosci* 14:363.

Buzsáki G, Wang X-J (2012) Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci* 35:203–225.

Chalermphanupap T, Schroeder JP, Rorabaugh JM, Liles LC, Lah JJ, Levey AI, Weinschenker D (2018) Locus Coeruleus Ablation Exacerbates Cognitive Deficits, Neuropathology, and Lethality in P301S Tau Transgenic Mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 38:74–92.

de Hemptinne C, Ryapolova-Webb ES, Air EL, Garcia PA, Miller KJ, Ojemann JG, Ostrem JL, Galifianakis NB, Starr PA (2013) Exaggerated phase-amplitude coupling in the primary motor cortex in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4780–4785.

de Hemptinne C, Swann NC, Ostrem JL, Ryapolova-Webb ES, San Luciano M, Galifianakis NB, Starr PA (2015) Therapeutic deep brain stimulation reduces cortical phase-amplitude coupling in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 18:779–786.

Dentel C, Palamiuc L, Henriques A, Lannes B, Spreux-Varoquaux O, Gutknecht L, René F, Echaniz-Laguna A, Gonzalez de Aguilar J-L, Lesch KP, Meininger V, Loeffler J-P, Dupuis L (2013) Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* 136:483–493.

Devergnas A, Caiola M, Pittard D, Wichmann T (2019) Cortical Phase-Amplitude Coupling in a Progressive Model of Parkinsonism in Nonhuman Primates. *Cereb Cortex N Y N 1991* 29:167–177.

Dhir A (2012) Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci Chapter 9:Unit9.37*.

Eisen A, Braak H, Del Tredici K, Lemon R, Ludolph AC, Kiernan MC (2017) Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88:917–924.

El Oussini H, Scekcic-Zahirovic J, Vercruyssen P, Marques C, Dirrig-Grosch S, Dieterlé S, Picchiarelli G, Sinniger J, Rouaux C, Dupuis L (2017) Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 82:444–456.

Ferraro G, Sardo P, Sabatino M, La Grutta V (1994) Locus coeruleus noradrenaline system and focal penicillin hippocampal epilepsy: neurophysiological study. *Epilepsy Res* 19:215–220.

Fritschy JM, Grzanna R (1991) Selective effects of DSP-4 on locus coeruleus axons: are there pharmacologically different types of noradrenergic axons in the central nervous system? *Prog Brain Res* 88:257–268.

Fuxe K, Ungerstedt U (1968) Histochemical studies on the distribution of catecholamines and 5-hydroxytryptamine after intraventricular injections. *Histochem Histochem Histochim* 13:16–28.

Goodman MS, Kumar S, Zomorodi R, Ghazala Z, Cheam ASM, Barr MS, Daskalakis ZJ, Blumberger DM, Fischer C, Flint A, Mah L, Herrmann N, Bowie CR, Mulsant BH, Rajji TK (2018) Theta-Gamma Coupling and Working Memory in Alzheimer's Dementia and Mild Cognitive Impairment. *Front Aging Neurosci* 10:101.

Goutagny R, Gu N, Cavanagh C, Jackson J, Chabot J-G, Quirion R, Krantic S, Williams S (2013) Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before A $\beta$  overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 37:1896–1902.

Gunes ZI, Kan VWY, Ye X, Liebscher S (2020) Exciting Complexity: The Role of Motor Circuit Elements in ALS Pathophysiology. *Front Neurosci* 14:573.

Gyires K, Zádori ZS, Török T, Mátyus P (2009) alpha(2)-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochem Int* 55:447–453.

Heneka MT, Ramanathan M, Jacobs AH, Dumitrescu-Ozimek L, Bilkei-Gorzo A, Debeir T, Sastre M, Galldiks N, Zimmer A, Hoehn M, Heiss W-D, Klockgether T, Staufenbiel M (2006) Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26:1343–1354.

Ho YS, Liu RH, Nichols AW, Kumar SD (1990) Isotopic Analog as the Internal Standard for Quantitative Determination: Evaluation of Mass Spectra of Commonly Abused Drugs and Their Deuterated Analogs. *J Forensic Sci* 35:123–132.

Jaim-Etcheverry G, Zieher LM (1980) DSP-4: a novel compound with neurotoxic effects on noradrenergic neurons of adult and developing rats. *Brain Res* 188:513–523.

Jones BE, Halaris AE, McIlhany M, Moore RY (1977) Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenaline neurons. *Brain Res* 127:1–21.

Jones BE, Moore RY (1977) Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res* 127:25–53.

Kam K, Duffy ÁM, Moretto J, LaFrancois JJ, Scharfman HE (2016) Interictal spikes during sleep are an early defect in the Tg2576 mouse model of  $\beta$ -amyloid neuropathology. *Sci Rep* 6:20119.

Keeley S, Fenton AA, Rinzel J (2017) Modeling fast and slow gamma oscillations with interneurons of different subtype. *J Neurophysiol* 117:950–965.

Kiernan MC, Ziemann U, Eisen A (2019) Amyotrophic lateral sclerosis: Origins traced to impaired balance between neural excitation and inhibition in the neonatal period. *Muscle Nerve* 60:232–235.

Koryntová H, Kubová H, Tutka P, Mares P (2002) Changes of cortical epileptic afterdischarges under the influence of convulsant drugs. *Brain Res Bull* 58:49–54.

Kremer M et al. (2018) A Dual Noradrenergic Mechanism for the Relief of Neuropathic Allodynia by the Antidepressant Drugs Duloxetine and Amitriptyline. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 38:9934–9954.

Libet B, Gleason CA, Wright EW, Feinstein B (1977) Suppression of an epileptiform type of electrocortical activity in the rat by stimulation in the vicinity of locus coeruleus. *Epilepsia* 18:451–462.

Lodato S, Arlotta P (2015) Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 31:699–720.

Marques C, Burg T, Scekcic-Zahirovic J, Fischer M, Rouaux C (2021) Upper and Lower Motor Neuron Degenerations Are Somatotopically Related and Temporally Ordered in the Sod1 Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Sci* 11.

Masilamoni GJ, Groover O, Smith Y (2017) Reduced noradrenergic innervation of ventral midbrain dopaminergic cell groups and the subthalamic nucleus in MPTP-treated parkinsonian monkeys. *Neurobiol Dis* 100:9–18.

Masrori P, Van Damme P (2020) Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur J Neurol* 27:1918–1929.

Mather M, Clewett D, Sakaki M, Harley CW (2016) Norepinephrine ignites local hotspots of neuronal excitation: How arousal amplifies selectivity in perception and memory. *Behav Brain Sci* 39:e200.

Matthews KL, Chen CPL-H, Esiri MM, Keene J, Minger SL, Francis PT (2002) Noradrenergic changes, aggressive behavior, and cognition in patients with dementia. *Biol Psychiatry* 51:407–416.

Morrison JH, Foote SL, O'Connor D, Bloom FE (1982) Laminar, tangential and regional organization of the noradrenergic innervation of monkey cortex: dopamine-beta-hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Res Bull* 9:309–319.

Ozdinler PH, Benn S, Yamamoto TH, Güzel M, Brown RH, Macklis JD (2011) Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G<sup>93A</sup> transgenic ALS mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31:4166–4177.

Paredes-Rodriguez E, Vegas-Suarez S, Morera-Herreras T, De Deurwaerdere P, Miguelez C (2020) The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol* 11:435.

Poe GR, Foote S, Eschenko O, Johansen JP, Bouret S, Aston-Jones G, Harley CW, Manahan-Vaughan D, Weinschenker D, Valentino R, Berridge C, Chandler DJ, Waterhouse B, Sara SJ (2020) Locus coeruleus: a new look at the blue spot. *Nat Rev Neurosci* 21:644–659.

Purves D, Augustin GJ, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia A, McNamara J and White L (2008). *Neuroscience*, 2008. De Boeck, Sinauer, Sunderland, Mass.

Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (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.

Robertson SD, Plummer NW, de Marchena J, Jensen P (2013) Developmental origins of central norepinephrine neuron diversity. *Nat Neurosci* 16:1016–1023.

Rommelfanger KS, Edwards GL, Freeman KG, Liles LC, Miller GW, Weinschenker D (2007) Norepinephrine loss produces more profound motor deficits than MPTP treatment in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13804–13809.

Rorabaugh JM, Chalermpananupap T, Botz-Zapp CA, Fu VM, Lembeck NA, Cohen RM, Weinschenker D (2017) Chemogenetic locus coeruleus activation restores reversal learning in a rat model of Alzheimer's disease. *Brain J Neurol* 140:3023–3038.

Ross SB (1976) Long-term effects of N-2-chlorethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride on noradrenergic neurones in the rat brain and heart. *Br J Pharmacol* 58:521–527.

Ross SB, Renyl AL (1976) On the long-lasting inhibitory effect of N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP 4) on the active uptake of noradrenaline. *J Pharm Pharmacol* 28:458–459.

Salgado H, Köhr G, Treviño M (2012) Noradrenergic “tone” determines dichotomous control of cortical spike-timing-dependent plasticity. *Sci Rep* 2:417.

Salgado H, Treviño M, Atzori M (2016) Layer- and area-specific actions of norepinephrine on cortical synaptic transmission. *Brain Res* 1641:163–176.

Scekic-Zahirovic J et al. (2016) Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J* 35:1077–1097.

Scekic-Zahirovic J et al. (2021a) Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects. *Nat Commun* 12:3028.

Scekic-Zahirovic J, Fischer M, Stuart-Lopez G, Burg T, Gilet J, Dirrig-Grosch S, Marques C, Birling M-C, Kessler P, Rouaux C (2021b) Evidence that corticofugal propagation of ALS pathology is not mediated by prion-like mechanism. *Prog Neurobiol* 200:101972.

Shefner JM et al. (2020) A proposal for new diagnostic criteria for ALS. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* 131:1975–1978.

Shimojo M, Takuwa H, Takado Y, Tokunaga M, Tsukamoto S, Minatohara K, Ono M, Seki C, Maeda J, Urushihata T, Minamihisamatsu T, Aoki I, Kawamura K, Zhang M-R, Suhara T, Sahara N, Higuchi M (2020) Selective Disruption of Inhibitory Synapses Leading to Neuronal Hyperexcitability at an Early Stage of Tau Pathogenesis in a Mouse Model. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 40:3491–3501.

Singh S (2020) Noradrenergic pathways of locus coeruleus in Parkinson's and Alzheimer's pathology. *Int J Neurosci* 130:251–261.

Sofic E, Riederer P, Gsell W, Gavranovic M, Schmidtke A, Jellinger K (1991) Biogenic amines and metabolites in spinal cord of patients with Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 3:133–142.

Szot P, Weinschenker D, White SS, Robbins CA, Rust NC, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (1999) Norepinephrine-deficient mice have increased susceptibility to seizure-inducing stimuli. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 19:10985–10992.

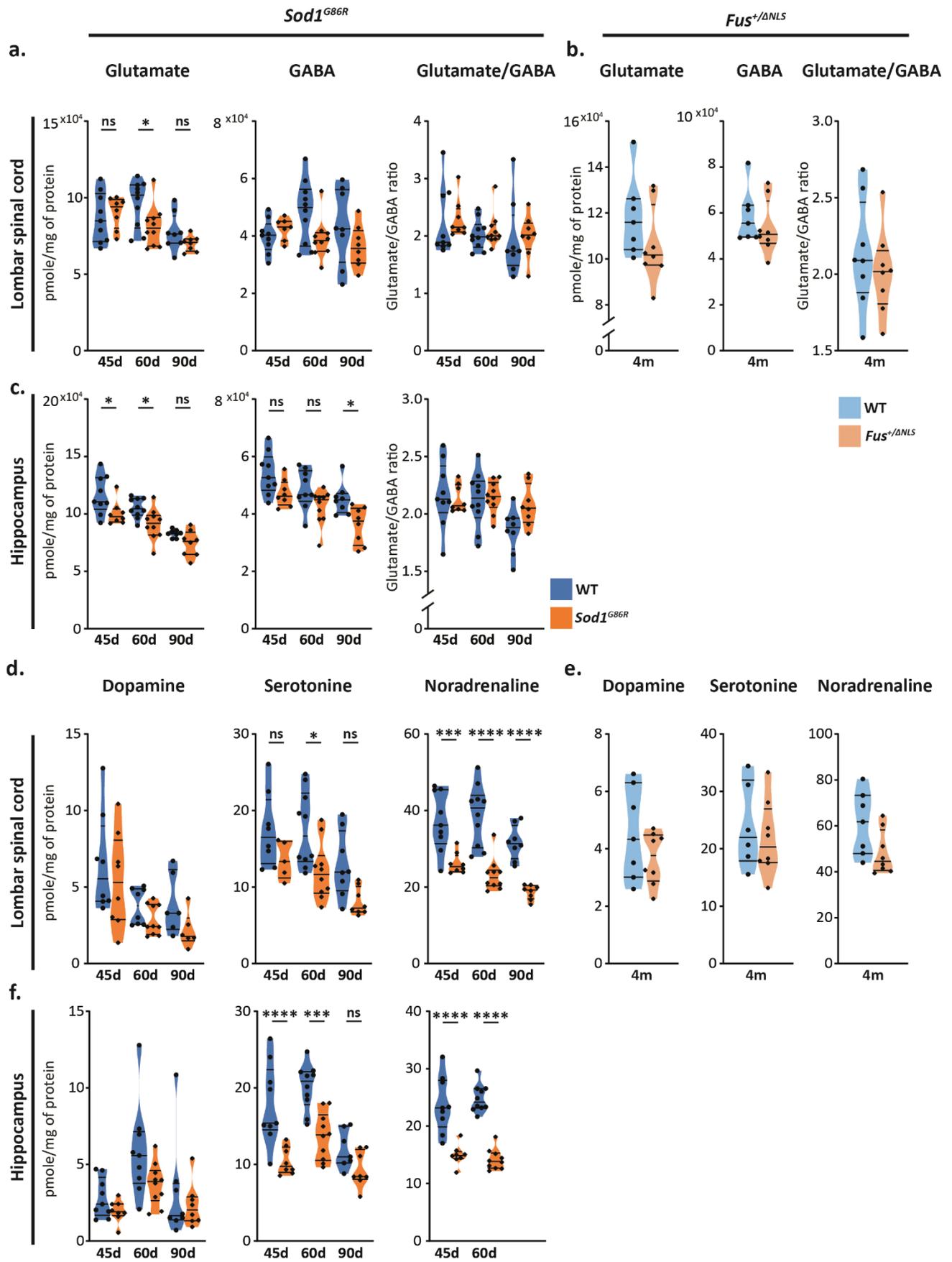
Talley EM, Rosin DL, Lee A, Guyenet PG, Lynch KR (1996) Distribution of alpha 2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 372:111–134.

Theofilas P et al. (2018) Probing the correlation of neuronal loss, neurofibrillary tangles, and cell death markers across the Alzheimer's disease Braak stages: a quantitative study in humans. *Neurobiol Aging* 61:1–12.

Thomas SA, Marck BT, Palmiter RD, Matsumoto AM (1998) Restoration of norepinephrine and reversal of phenotypes in mice lacking dopamine beta-hydroxylase. *J Neurochem* 70:2468–2476.

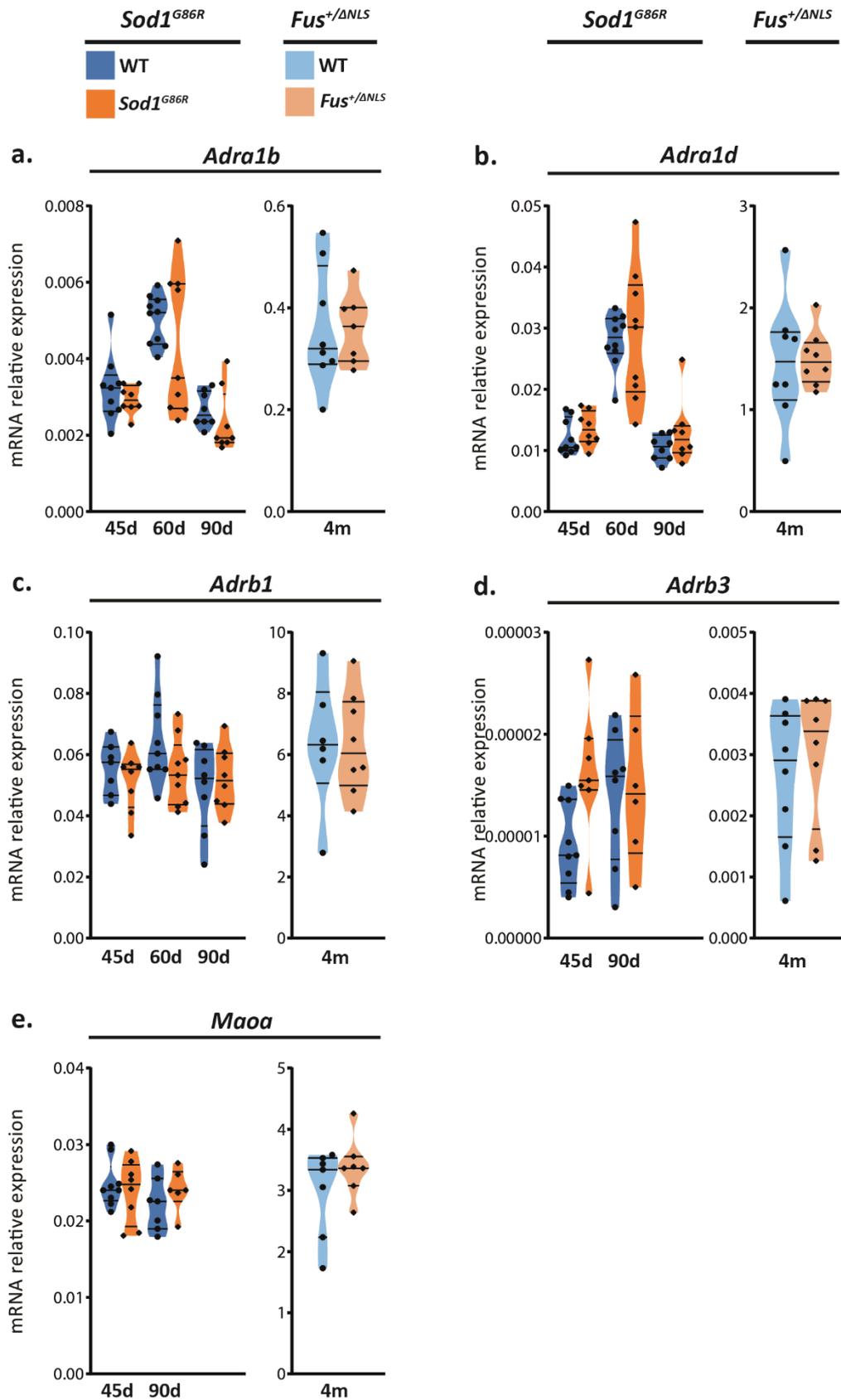
- Tort ABL, Komorowski R, Eichenbaum H, Kopell N (2010) Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. *J Neurophysiol* 104:1195–1210.
- Turner MR, Talbot K (2013) Mimics and chameleons in motor neurone disease. *Pract Neurol* 13:153–164.
- Vahabzadeh-Hagh AM, Muller PA, Pascual-Leone A, Jensen FE, Rotenberg A (2011) Measures of cortical inhibition by paired-pulse transcranial magnetic stimulation in anesthetized rats. *J Neurophysiol* 105:615–624.
- Van den Bos MAJ, Higashihara M, Geevasinga N, Menon P, Kiernan MC, Vucic S (2018) Imbalance of cortical facilitatory and inhibitory circuits underlies hyperexcitability in ALS. *Neurology* 91:e1669–e1676.
- Van Erum J, Valkenburg F, Van Dam D, De Deyn PP (2020) Pentylentetrazole-induced Seizure Susceptibility in the Tau58/4 Transgenic Mouse Model of Tauopathy. *Neuroscience* 425:112–122.
- Vernay A, Therreau L, Blot B, Risson V, Dirrig-Grosch S, Waegaert R, Lequeu T, Sellal F, Schaeffer L, Sadoul R, Loeffler J-P, René F (2016) A transgenic mouse expressing CHMP2Bintron5 mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet* 25:3341–3360.
- Vucic S, Ziemann U, Eisen A, Hallett M, Kiernan MC (2013) Transcranial magnetic stimulation and amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiological insights. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:1161–1170.
- Wang J, Fang Y, Wang X, Yang H, Yu X, Wang H (2017) Enhanced Gamma Activity and Cross-Frequency Interaction of Resting-State Electroencephalographic Oscillations in Patients with Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 9:243.
- Waterhouse BD, Chandler DJ (2016) Heterogeneous organization and function of the central noradrenergic system. *Brain Res* 1641:v–x.
- Weiss GK, Lewis J, Jimenez-Rivera C, Vigil A, Corcoran ME (1990) Antikindling effects of locus coeruleus stimulation: mediation by ascending noradrenergic projections. *Exp Neurol* 108:136–140.
- Zang DW, Cheema SS (2002) Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1(G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 332:99–102.
- Zhang X, Zhong W, Brankač J, Weyer SW, Müller UC, Tort ABL, Draguhn A (2016) Impaired theta-gamma coupling in APP-deficient mice. *Sci Rep* 6:21948.
- Ziegler MG, Brooks BR, Lake CR, Wood JH, Enna SJ (1980) Norepinephrine and gamma-aminobutyric acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 30:98–101.
- Zou Z-Y, Zhou Z-R, Che C-H, Liu C-Y, He R-L, Huang H-P (2017) Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88:540–549.

Brunet\*, Scekcic-Zahirovic\* et al., Supplementary figure 1



**Supplementary figure 1: Glutamate, GABA and monoamine levels in the lombar spinal cord of *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice and hippocampus of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. a-c.** Mass spectrometry analysis show no modification of Glutamate and GABA levels or Glutamate/GABA ratio in the lombar spinal cord of *Sod1<sup>G86R</sup>* (a) nor *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice (b) but a decrease in hippocampic glutamate levels in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (c). **d,f.** In *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, dopamine levels are not affected in either lombar spinal cord or hippocampus, while both serotonin and, to a greater extend, noradrenaline are decreased in these tissues. **e.** In *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice, none of these monoamine levels are affected in the lombar spinal cord. n = 9, 10 and 8 WT, and 8, 10 and 8 *Sod1<sup>G86R</sup>* at 45, 60, 90 days old respectively. n = 8 WT and 8 *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Two-way ANOVA followed by multiple comparison test (a,c,d,f). Unpaired t test (b,e). \*p<0.05; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

Brunet\*, Scekic-Zahirovic\* et al., Supplementary figure 2



**Supplementary figure 2: Gene expression of *Adra1b*, *Adra1d*, *Adrb1*, *Adrb3* and *Maoa* is not modified in the motor cortex of either *Sod1<sup>G86R</sup>* nor *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice. qPCR analysis show no modification of *Adra1b* (a), *Adra1d* (b), *Adrb1* (c), *Adrb3* (d) nor *Maoa* (e) gene expression in the motor cortex of 45, 60, 90 days old *Sod1<sup>G86R</sup>* or 4 months old *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice. n = 9, 10 and 8 WT, and 8, 9 and 8 *Sod1<sup>G86R</sup>* at 45, 60, 90 days old respectively. n = 8 WT and 8 *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Two-way ANOVA followed by multiple comparison test (*Sod1<sup>G86R</sup>*). Unpaired t test (*Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*).**

# Discussion

## Discussion

### 1. L'hyperexcitabilité corticale caractéristique des patients SLA est retrouvée dans des modèles murins de la maladie

Chez les patients SLA, une hyperexcitabilité corticale est retrouvée de façon précoce par utilisation de stimulation magnétique transcrânienne. Cette dernière met en évidence une réduction, voire une absence, d'inhibition intracorticale à intervalle court (SICI) et une augmentation de la facilitation intracorticale (ICF) reflétant l'altération de la balance excitation-inhibition corticale en faveur d'une hyperexcitabilité (Vucic and Kiernan, 2017). En plus d'être retrouvée précocement, parfois même pré-symptomatiquement chez les patients porteur de mutation *SOD1* (Vucic et al., 2008), l'hyperexcitabilité corticale est négativement corrélée à la survie (Shibuya et al., 2016) et l'évolution clinique des patients (Van den Bos et al., 2018b).

La stimulation magnétique transcrânienne, utilisée pour mettre en évidence ce trouble chez les patients, reste difficile à appliquer tout au long de la progression de la maladie, notamment du fait de la perte progressive des motoneurones bulbaires et spinaux. Bien que très explorée chez les patients, cette hyperexcitabilité corticale n'a donc pas été évaluée dans les modèles murins classiquement utilisés dans les études précliniques.

Une partie des travaux présentés ici, et réalisés par Jelena Scezic-Zahirovic au sein du laboratoire, utilisent l'électrocorticographie (ECoG) et le couplage inter-fréquence comme outils d'analyse de l'activité corticale des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*, ainsi que de leurs contrôles sauvages (Brunet, Scezic-Zahirovic et al., en préparation). Cette approche, souvent utilisée chez les rongeurs, permet l'étude des oscillations cérébrales et leurs interactions. Dans ces modèles murins de SLA, l'ECoG a permis la mise en évidence d'un découplage des

oscillations Theta-Fast Gamma, particulièrement visible durant la phase de sommeil paradoxale. Ce couplage représente l'équilibre de la balance excitation-inhibition corticale (Buzsáki and Wang, 2012; Keeley et al., 2017). Le découplage observé chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*, retrouvé de façon très précoce (45 jours pour les *Sod1<sup>G86R</sup>* et 3 mois pour les *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*) met en évidence une altération de l'excitabilité corticale (Brunet, Scekic-Zahirovic et al., en préparation). Une injection unique de pentylènetétrazole, un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> induisant une augmentation de l'activité corticale, à une dose subconvulsante, induit l'apparition de nombreux événements de décharge mesurable en ECoG. On observe ici que dans le cas des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* tout comme *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* le nombre de ces événements est plus important que chez leurs contrôles sauvages, démontrant ainsi une altération du fonctionnement cortical dans le sens d'une hyperexcitabilité corticale (Brunet, Scekic-Zahirovic et al., en préparation).

Ces résultats sont les premiers à démontrer l'existence d'une hyperexcitabilité corticale chez des modèles murins de SLA, ouvrant ainsi la possibilité de déterminer 1) comment cette dernière pourrait impacter ou être reflétée dans les neurones corticospinaux (NCS), 2) les mécanismes sous-tendant cette altération et 3) différentes approches permettant de moduler l'activité corticale dans des modèles de la maladie.

## 2. Les altérations intrinsèques des neurones corticospinaux de souris *Sod1<sup>G86R</sup>*

Mes travaux ont débuté avec l'exploitation de la base de données de séquençage des ARNm de neurones corticospinaux (NCS) purifiés de la couche V du cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et leurs contrôles (RNAseq\_NCS<sup>WT/*Sod1<sup>G86R</sup>*</sup>). Dans leur étude de 2019, Christine Marques et collaborateurs ont utilisé une approche sans *a priori* afin d'identifier des groupes

de gènes à l'expression particulièrement altérée et des mécanismes moléculaires mis en place avant (30 et 60 jours) et durant (90 et 105 jours) la dégénérescence des NCS dans la SLA (Marques et al., 2019). Afin de déterminer les altérations transcriptomiques spécifiques de ces NCS, ils ont purifié et séquencé les ARNm des neurones à projection calleuse (NPC) des couches II/III du cortex moteur, permettant ainsi de s'intéresser spécifiquement aux gènes et catégories de gènes dérégulés dans les NCS et non les NPC. Ils ont alors mis en évidence la dérégulation d'expression de gènes impliqués dans le fonctionnement mitochondrial, le repliement et le catabolisme des protéines mais aussi des gènes jouant un rôle dans le métabolisme de l'ARN (Marques et al., 2019). Ces altérations du métabolisme des ARN est caractéristique de la SLA. En effet, des gènes tels que *TARDBP* et *FUS*, associés à la SLA, codent des protéines liant l'ARN (Polymenidou et al., 2011; Lagier-Tourenne et al., 2012), et les mutations associées à *C9ORF72* induisent, quant à elles, des épissages alternatifs (Prudencio et al., 2015). Ainsi, les données de cette étude soulignent le rôle clé de l'altération du métabolisme des ARN dans la SLA et notamment l'atteinte des NCS. Les auteurs suggèrent d'ailleurs que l'altération d'épissage de transcrits tels que *Picalm* (protéine associée à la clathrine participant à l'endocytose), *Vldlr* (récepteur impliqué dans la capture des lipoprotéines à faible densité comme le cholestérol) ou *Macf1* (protéine associée aux microfilaments et microtubules), pourrait contribuer à l'altération dendritique, de transmission synaptique ou de l'excitabilité intrinsèque des NCS (Marques et al., 2019).

### 2.1. Les NCS surexpriment des gènes impliqués dans l'endo- et l'exocytose

Les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* présentent une hyperexcitabilité corticale précédant la perte des NCS mais aussi celle des motoneurons et des premiers signes moteurs (Brunet, Scekcic-

Zahirovic et al., en préparation). Ici, nous avons employé une approche avec *a priori* afin de déterminer ce qui, d'un point de vue transcriptomique, pouvait refléter ce désordre cortical dans les NCS. Après génération d'une liste de gènes impliqués dans l'excitabilité neuronale, nous avons confronté cette dernière à la base de données de séquençage des ARNm de NCS de souris sauvages et *Sod1<sup>G86R</sup>*. Cette approche complémentaire nous permet ainsi d'identifier des dérégulations transcriptomiques ignorées par l'analyse d'enrichissement de set de gènes utilisée par Christine et collaborateurs en 2019 (Marques et al., 2019).

Nous avons notamment pu mettre en évidence l'augmentation d'expression de gènes codant des protéines SNAP et SYNTAXINE qui, avec la SYNAPTOBREVINE et MUNC-18, forment le complexe SNARE jouant un rôle dans les processus d'endo- et exocytose, et notamment dans l'arrimage et la fusion des vésicules synaptiques (Yoon and Munson, 2018). Parmi les gènes dérégulés, on trouve *Snap25* et *Snap47*. La protéine SNAP-25 participe plus particulièrement au processus d'exocytose, mais intervient aussi dans l'internalisation des récepteurs glutamatergiques NMDA (Kádková et al., 2019). La protéine SNAP-47, elle, a des fonctions plus variées avec un rôle dans la formation des vésicules du réticulum endoplasmique, la formation des autophagolysosomes et donc l'homéostasie protéique, mais aussi l'internalisation des récepteurs glutamatergiques AMPA (Kádková et al., 2019). L'augmentation d'expression de *Snap25* et *Snap47* par les NCS pourrait donc refléter une augmentation du turn-over des récepteurs glutamatergiques. Il a été montré qu'un dysfonctionnement des Na-K ATPase, permettant le maintien du gradient ionique et de ce fait régulant l'excitabilité des neurones, induisait une diminution des récepteurs AMPA présents en surface membranaire et augmentait leur internalisation (Zhang et al., 2009).

Ainsi, les variations d'expression de gènes comme *Snap25* et *Snap47* pourrait refléter une augmentation de l'internalisation des récepteurs glutamatergiques, ou d'autres, en réponse à une altération de l'excitabilité des NCS. Nos analyses dans la couche V du cortex moteur retrouvent l'augmentation d'expression de *Snap47* sans celle de *Snap25*, suggérant que les dérégulations retrouvées dans les NCS comprendraient 1) des altérations affectant l'ensemble des cellules de la couches V, mais aussi 2) des dérégulations spécifiques comme l'augmentation d'expression de *Snap25*. SNAP-25 jouant un rôle clé dans le complexe SNARE et la libération des vésicules synaptiques, l'augmentation de l'expression de *Snap25* pourrait suggérer une augmentation de l'activité de libération glutamatergique par les NCS sur leurs cibles.

Notre laboratoire a mis en évidence la récapitulation de l'hyperexcitabilité corticale, caractéristique des patients SLA, chez des modèles murins de la maladie dont les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Les résultats discutés ci-dessus, pourraient suggérer une contribution des neurones corticospinaux, et d'autres neurones de la couche V du cortex moteur, à cette atteinte du fonctionnement cortical et cela via des altérations transcriptomiques affectant leur excitabilité neuronale.

## 2.2. Les NCS surexpriment des gènes impliqués dans le potentiel d'action

L'étude de la base de données RNAseq\_NCS<sup>WT/Sod1G86R</sup> a également mis en évidence l'augmentation d'expression de 2 gènes codant des sous-unités de canaux potassiques voltage-dépendant : *Kcnab3* et *Kcng2*. *Kcnab3* code la sous-unité  $\beta_3$  et, comme d'autres sous-unité  $\beta$  de canal potassique, a été montré comme induisant une inactivation de ces derniers (Rettig et al., 1994; Heinemann et al., 1995). Ainsi, l'augmentation d'expression de *Kcnab3* par

les NCS, mais aussi à l'échelle de la couche V du cortex moteur, pourrait refléter l'hyperexcitabilité corticale mise en évidence dans ce modèle *Sod1<sup>G86R</sup>* (Brunet, Scekcic-Zahirovic et al., en préparation). En effet, lors d'un potentiel d'action, à la suite de l'influx d'ions  $\text{Na}^{2+}$  qui induit la dépolarisation de la membrane, l'efflux d'ions  $\text{K}^+$  par les canaux potassiques permet la mise en place de la repolarisation. En cas d'inactivation de ces canaux, il peut y avoir une altération de la durée et fréquence des potentiels d'action des neurones (Kurata and Fedida, 2006) entraînant une perturbation de l'excitabilité des NCS et neurones de la couche V.

Ces données suggèrent, une fois encore, une altération de l'excitabilité des neurones de la couche V du cortex moteur et cela via différents mécanismes (l'endo- et exocytose et la génération du potentiel d'action), pouvant contribuer à l'hyperexcitabilité corticale.

### 2.3. Les NCS surexpriment des gènes codant des récepteurs GABAergiques

Enfin, l'analyse de la base de données RNAseq\_NCS<sup>WT/Sod1G86R</sup> a mis en évidence une augmentation d'expression de 4 sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> dans les NCS, et l'analyse de la couche V du cortex moteur a retrouvé l'augmentation d'expression de l'une d'entre elle : *Gabrg2*. Des mutations dans ce gène, codant la sous-unité  $\gamma 2$  du récepteur GABA<sub>A</sub>, ont été associées au développement d'épilepsies généralisées (Pedersen et al., 2019; Li et al., 2020). Dans une récente étude analysant l'impact du knock-out de *Gabrg2* dans des cellules hippocampiques de souris, ce dernier a induit une diminution de l'expression de *Gabra1* (Li et al., 2020), dont la perte de fonction a également été associée à l'épilepsie (Samarut et al., 2018). Dans notre étude, nous trouvons au contraire une augmentation d'expression de *Gabrg2* et *Gabra1* dans les NCS, suggérant une atteinte distincte de celle retrouvée dans

l'épilepsie par une potentielle altération de la composition des récepteurs GABA<sub>A</sub>. Ainsi, ces dérégulations pourraient traduire d'une modification de la sensibilité des récepteurs GABAergiques via une altération de leur composition.

D'un autre côté, les récepteurs GABA<sub>A</sub> post-synaptiques sont principalement composés des sous-unités  $\alpha_{1-3}$ ,  $\beta_{1-3}$  et  $\gamma_2$ . L'augmentation d'expression de 3 de ces sous-unités (*Gabra1*, *Gabra3* et *Gabrg2*) pourrait donc également refléter l'augmentation d'expression de récepteurs GABA<sub>A</sub>, potentiellement dans le cadre d'un mécanisme compensatoire afin de réguler l'excitabilité des NCS, retrouvés hyperexcités dans différents modèles murins de SLA (Pieri et al., 2009; Saba et al., 2016b; Zhang et al., 2016a; Kim et al., 2017b; Khademullah et al., 2020).

Une étude est maintenant nécessaire afin de déterminer comment ces dérégulations transcriptomiques des gènes codant des sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> se traduit au niveau protéique. Outre, la possibilité d'une modification de sensibilité de ces récepteurs par altération de leur composition ou d'une augmentation de la densité de ces derniers, ces analyses protéiques nous permettraient d'explorer la possibilité d'une altération de localisation de tels récepteurs dans les synapses de la couche V du cortex moteur. En effet, il a été montré que la variation d'expression des différentes sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> induisait une modification de la localisation de ces derniers (Perez-Velazquez and Angelides, 1993), pouvant donc conduire à une altération de la transmission GABAergique.

### 3. Les altérations intrinsèques et extrinsèques du cortex cérébral de modèles murins de

#### SLA

##### 3.1. Altération de la transmission GABAergique dans le cortex cérébral ?

Dans le cortex cérébral, 80% des neurones sont glutamatergiques et 20% GABAergiques, faisant du glutamate et du GABA les deux principaux neurotransmetteurs corticaux (Lodato and Arlotta, 2015). Dans ce contexte d'hyperexcitabilité corticale (Brunet, Scekcic-Zahirovic et al., en préparation), et après avoir mis en évidence la surexpression de gènes codant des sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> dans les NCS de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* via analyse de la base de données RNAseq\_NCS<sup>WT/Sod1<sup>G86R</sup></sup>, l'altération du système GABAergique semble être l'explication la plus évidente. En effet, en plus de ces dérégulations transcriptomiques concernant les récepteurs GABAergiques des NCS, j'ai mis en évidence une augmentation de l'expression de *Gad1*, l'enzyme de synthèse du GABA, dans les couches II/III du cortex moteur. Ces couches contiennent de nombreux interneurons participant à l'inhibition des neurones à projection des couches profondes sur la longue dendrite apicale de ces derniers (Tremblay et al., 2016). Cette augmentation d'expression de *Gad1* n'est pourtant associée à aucun changement de densité des interneurons GABAergiques (*Gad1+*, PV+, SST+, NPY+ ou CR+). De plus, notre analyse des niveaux corticaux de GABA, et du ratio Glutamate/GABA par spectrométrie de masse ne montrent aucune différence significative démontrant le maintien de GABA chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, mais aussi *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Mais ces résultats concernent les niveaux de GABA dans l'ensemble du tissu analysé, ici le cortex moteur. Ainsi, ils ne reflètent pas la libération globale de ce neurotransmetteur. Il est possible qu'une altération de la neurotransmission GABAergique puisse avoir lieu, sans modification des niveaux de GABA.

Dans une récente étude du laboratoire, Jelena Scekic-Zahirovic et Inmaculada Sanjuan-Ruiz ont mis en évidence une augmentation de l'activité neuronale dans le cortex frontal des souris *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* (Scekic-Zahirovic et al., 2021a). Elles montrent alors un dysfonctionnement des synapses GABA et glutamatergiques, plus marquée dans le cas des synapses inhibitrices avec notamment une accumulation de vésicules synaptiques (Scekic-Zahirovic et al., 2021a). Elles mettent également en évidence l'accumulation de FUS dans le synaptosome des souris *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* altérant les niveaux d'un ensemble d'ARN cibles comme *Gabra1* ou *Gabrb1*, codant des sous-unité de récepteur GABA<sub>A</sub> (Scekic-Zahirovic et al., 2021a).

Ainsi, il est possible que l'augmentation d'expression de *Gad1* dans le cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, associé à l'augmentation d'expression de sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub>, par les NCS notamment et au maintien des niveaux corticaux de GABA reflète une accumulation de GABA et de vésicules synaptiques dans les éléments pré-synaptiques GABAergiques (tel que retrouvé dans le cortex frontal des *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* (Scekic-Zahirovic et al., 2021a)) et un défaut de libération et transmission synaptique, conduisant à une perte d'inhibition et une hyperexcitabilité corticale. Cette hypothèse reste à explorer par 1) des approches de microscopie électronique, telles que celles réalisées par Scekic-Zahirovic et Sanjuan-Ruiz, dans le cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* à différents stade de la pathologie, 2) des mesures de l'excitabilité des neurones corticaux (NCS, autres neurones excitateurs et interneurones) par des approches de patch-clamp ou d'imagerie calcique à 2 photons, et 3) l'analyse de la libération de GABA, glutamate et autres neuromodulateurs par microdialyse *in vivo*. Dans le cas des souris *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* où l'accumulation de FUS dans le synaptosome a été mis en cause (Scekic-Zahirovic et al., 2021a), l'étude de l'impact de l'excision sélective du transgène *Fus <sup>$\Delta$ NLS</sup>* dans les interneurones sur l'hyperexcitabilité corticale

et l'ensemble des paramètres mentionnés précédemment, pourrait permettre de mieux appréhender la potentielle implication du système GABAergique dans cette altération du fonctionnement cortical.

### 3.2. Altérations du système noradrénergique

En plus des systèmes GABA et glutamatergiques, la balance excitation-inhibition du cortex cérébral est également sous le contrôle d'autres neurotransmetteurs et neuromodulateurs (Badawy et al., 2012; Vitrac and Benoit-Marand, 2017). En effet, le cortex reçoit de nombreuses afférences provenant de régions telles que le prosencéphale basal, le noyau raphé dorsal, l'aire tegmentale ventrale, le noyau tubéromamillaire ou encore le locus coeruleus. Ces structures projettent des axones vers le cortex cérébral et y libèrent respectivement de l'acétylcholine, sérotonine, dopamine, histamine et noradrénaline. Ainsi, il est important d'évaluer l'ensemble de ces systèmes afin d'obtenir une vision globale des modulations de l'activité corticale altérée dans le cadre de la SLA.

#### 3.2.1. Réduction des niveaux de noradrénaline

Dans cette étude, j'ai utilisé la spectrométrie de masse afin d'évaluer les niveaux corticaux de 3 de ces 5 neuromodulateurs : la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline, dans le cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. En effet, pour des raisons techniques, les niveaux d'acétylcholine et histamine n'ont pas pu être quantifiés, mais ceux obtenus pour les 3 autres molécules nous apportent de nombreuses informations pertinentes.

Tandis que les niveaux de dopamine ne sont affectés dans aucun des modèles murins de SLA étudiés, ceux de noradrénaline y sont diminués et cela aux âges étudiés soit dès 45

jours et de façon maintenue chez les *Sod1<sup>G86R</sup>* et à 4 mois chez les *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Ainsi, dans 2 modèles murins de la maladie, les niveaux corticaux de noradrénaline sont retrouvés significativement diminués et cela de façon très précoce, c'est-à-dire avant même la perte des NCS et/ou des motoneurones (Scekic-Zahirovic et al., 2016; Marques et al., 2021), et alors que l'hyperexcitabilité corticale est détectée (Brunet, Scekic-Zahirovic et al., en préparation). Concernant les niveaux de sérotonine, ces derniers ne sont diminués que dans le cortex des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et non *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. La baisse de noradrénaline étant, elle, retrouvée dans les 2 modèles présentant une hyperexcitabilité corticale, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à ce système.

De façon très intéressante, la baisse de noradrénaline semble moins marquée chez les souris *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* (environ 1/4 de leurs niveaux basaux) que chez les *Sod1<sup>G86R</sup>* (environ 1/3) qui présentent une hyperexcitabilité corticale (découplage Theta-Fast Gamma et susceptibilité accrue au PTZ) elle aussi plus marquée. En plus de l'atteinte corticale des niveaux de noradrénaline, ces derniers sont également significativement diminués dans la moelle épinière lombaire des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et non *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Ainsi, il pourrait exister un lien entre l'atteinte du système noradrénergique, et les niveaux de cette dernière dans le cortex cérébral, et le degré d'atteinte de l'activité corticale.

Il est également intéressant de noter l'augmentation d'expression de gènes distincts codant des enzymes capables de dégrader, entre autres, la noradrénaline et pouvant agir ensemble dans le processus métabolique. En effet, la réalisation de qPCR sur des tissus de cortex moteur montrent l'augmentation d'expression de *Maob* chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* dès 45 jours, et de *Comt* chez des *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* de 4 mois. La monoamine oxydase B (MAO-B) est principalement, mais non exclusivement, retrouvée dans les astrocytes (Levitt et al., 1982;

Westlund et al., 1985), pouvant suggérer ici l'implication de cette population cellulaire dans l'altération du système noradrénergique des souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Les monoamine oxydases sont liés à la membrane externe des mitochondries (Youdim et al., 2006). Ces dernières, déjà mis en cause dans l'atteinte des motoneurones (Carrì et al., 2017) et des muscles (Picchiarelli et al., en préparation) dans la SLA, pourraient également contribuer à l'altération du système noradrénergique. La Catechol-O-methyltransferase (COMT) participe également au métabolisme de la noradrénaline et est exprimée dans l'ensemble des populations cellulaires corticales (Karhunen et al., 1995b; Mori et al., 2002; Matsumoto et al., 2003; Schendzielorz et al., 2013) de façon soluble ou lié à des membranes cytosoliques (Myöhänen et al., 2010).

Si ces dérèglements d'expression de gènes se traduisent par une augmentation de l'activité enzymatique de COMT / MAO-B, détectable par dosage en chromatographie en phase liquide à haute performance (Käenmäki et al., 2009; Myöhänen et al., 2010; Herraiz et al., 2018), cela pourrait contribuer à la baisse de cette dernière dans le cortex moteur de ces deux modèles de SLA, et cela suivant des mécanismes distincts.

### 3.2.2. Réduction du nombre de neurones noradrénergiques du locus coeruleus

Dans le système nerveux central adulte, les neurones noradrénergiques sont localisés dans 6 noyaux du tronc cérébral. Le locus coeruleus, retrouvé de part et d'autre de la ligne médiane, représente le plus important de ces noyaux avec environ 3200 neurones noradrénergiques (Robertson et al., 2013). Les neurones du locus coeruleus projettent vers de multiples structures dont le cortex cérébral et la moelle épinière (Robertson et al., 2013).

Dans cette étude, une baisse significative du nombre de neurones noradrénergiques a été mise en évidence au niveau rostrocaudal présentant la plus grande densité de neurones dans le locus coeruleus de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* de 45, 60 et 90 jours. Cette réduction est maintenue dans le temps chez les *Sod1<sup>G86R</sup>* et, en l'absence de réduction de la taille des neurones, aucun signe de neurodégénérescence n'est observé. Ainsi, la baisse observée pourrait suggérer 1) une neurodégénérescence plus précoce encore, avant 45 jours, ou bien 2) un défaut développemental du système noradrénergique et un nombre réduit de cellules différenciées en neurones noradrénergiques du locus coeruleus dans ce modèle de SLA.

Pour ce qui est des souris *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*, à 4 mois et au même niveau rostrocaudal analysé, aucune différence de nombre de neurones noradrénergiques du locus coeruleus n'a été observée. Cependant l'atteinte noradrénergique étant moins importante que chez les *Sod1<sup>G86R</sup>*, il se pourrait 1) qu'une perte de neurones existe de façon subtile ne nous permettant pas de la quantifier en utilisant la même approche ou bien que 2) cette perte neuronale ait lieu dans une autre région du locus. En effet, les neurones noradrénergiques projetant vers le cortex cérébral sont retrouvés dans l'ensemble de ce noyau (Waterhouse et al., 1983) et une perte neuronale pourrait avoir lieu dans une sous-population de ces cellules localisée à un autre niveau rostrocaudal que celui analysé.

Ainsi, il serait à l'avenir intéressant de quantifier l'ensemble des neurones noradrénergiques du locus coeruleus de ces deux modèles murins sur la totalité de l'axe rostrocaudal et à différents stades postnatals, adultes présymptomatiques et symptomatiques afin de déterminer 1) si et/ou quand cette réduction du nombre de neurones se met en place et 2) si cette dernière affecte différentes sous-populations de neurones projetant vers le cortex cérébral ou d'autres régions dans les deux modèles.

Dans le cas des souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, le marquage rétrograde depuis le cortex moteur montrent une perte des neurones noradrénergiques projetant vers ce dernier uniquement dans les coupes les plus caudales du locus coeruleus suggérant que seule cette sous-population est atteinte et pourrait refléter la baisse des niveaux corticaux de noradrénaline. La réduction du nombre de neurones au niveau rostrocaudal mentionné précédemment est présente dans la zone du locus coeruleus ayant la plus grande densité de neurones. Il est possible que cette perte soit associée à une altération de l'innervation d'autres régions que le cortex cérébral comme la moelle épinière et l'hippocampe, où une baisse de noradrénaline a également pu être mise en évidence par spectrométrie de masse.

### 3.2.3. Réduction de la densité des projections noradrénergiques corticales

Les neurones noradrénergiques du locus coeruleus innervant le cortex cérébral envoient des prolongements dans l'ensemble du cortex (Fuxe and Ungerstedt, 1968; Jones et al., 1977; Audet et al., 1988) et des couches corticales (Morrison et al., 1982). Les résultats de différentes études suggèrent une décroissance des projections noradrénergiques corticales selon l'axe rostrocaudal (Morrison et al., 1982; Morrison and Foote, 1986; Agster et al., 2013; Bellesi et al., 2016) et une transmission majoritaire synaptique dans les couches profondes et non-synaptiques (varicosités) dans les couches superficielles.

Dans cette étude nous mettons en évidence une réduction significative de la densité de fibres noradrénergiques dans le cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*, et cela de façon maintenue dans les 3 âges considérés chez les *Sod1<sup>G86R</sup>*. Retrouvée dans la totalité de l'épaisseur corticale, cette perte suggère un impact, non seulement de l'action directe

(synaptique) de la modulation noradrénergique sur les neurones excitateurs et inhibiteurs, mais aussi indirecte (non-synaptique) via des varicosités et la modulation de synapses GABA et Glutamatergiques (Salgado et al., 2012; Mather et al., 2016; Poe et al., 2020).

Tandis que la réduction de densité de projections noradrénergiques est retrouvée dans la partie rostrale du cortex moteur chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, cette dernière est visible dans la zone médiane et caudale chez les *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Ainsi, en plus de présenter des niveaux de baisse de noradrénaline différents dans le cortex et la moelle épinière et des résultats distincts en termes de nombre de neurones noradrénergiques dans la partie du locus coeruleus examinée, ces données suggèrent des atteintes distinctes du système noradrénergique entre ces deux modèles murins de SLA.

#### 4. La baisse de noradrénaline contribue à l'hyperexcitabilité corticale

Dans cette étude, nous montrons qu'une déplétion noradrénergique dans le cortex cérébral de souris sauvages, par injection de la neurotoxine DSP-4, suffit à induire un découplage Theta-Fast Gamma et donc une altération de l'activité et de la balance excitation-inhibition corticale. Ces données suggèrent que l'altération du système noradrénergique et la réduction des niveaux corticaux de noradrénaline observées chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* pourraient contribuer, du moins en partie, à l'hyperexcitabilité corticale qui y est retrouvée. Mais par quel(s) mécanisme(s) l'altération du système noradrénergique pourrait-elle conduire à une telle perturbation d'activité corticale ?

#### 4.1. Baisse de noradréline responsable d'une atteinte du système GABAergique ?

De façon très intéressante, l'administration néonatale de 6-OHDA, une neurotoxine capable de léser les neurones noradrénergiques et dopaminergiques, a été montrée comme induisant une altération des neurones pyramidaux corticaux, et des récepteurs et synapses GABAergiques (Podkletnova et al., 2000).

Dans leur étude, Podkletnova et collaborateurs s'intéressent à l'impact de la déplétion des terminaisons noradrénergiques dans le cortex frontal et à l'hippocampe. Ils montrent alors que cette dernière induit une altération des dendrites des neurones pyramidaux du cortex frontal (matures à P15), sans impacter les neurones pyramidaux hippocampiques (matures à la naissance) (Podkletnova et al., 2000). Ces données suggèrent qu'une altération du système noradrénergique durant le développement, et notamment avant la maturation des neurones pyramidaux corticaux tels que les NCS, pourrait contribuer à leur atteinte et impacterait de façon différentielle ses régions cibles.

Les auteurs montrent également une réduction des terminaisons GABAergiques dans les couches supérieures du cortex frontal ainsi qu'une baisse d'expression de 2 sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> :  $\alpha_1$  (*Gabra1*) et  $\gamma_2$  (*Gabrg2*), après administration néonatale de 6-OHDA (Podkletnova et al., 2000). Ces 2 sous-unités sont parmi celles dont l'expression a été retrouvée dérégulée dans les NCS de souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Dans leur étude, ces altérations semblent transitoires, du fait de l'unique dose de 6-OHDA (Podkletnova et al., 2000).

Dans le cas de nos modèles murins de SLA, présentant tous deux une baisse des niveaux corticaux de noradréline, il serait donc particulièrement intéressant d'étudier le système noradrénergique, en parallèle du système GABAergique, durant le développement et la

période postnatale afin de déterminer si cette baisse de noradrénaline pourrait apparaître encore plus précocement (avant 45 jours ou 4 mois chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* respectivement) et influencer le développement du système GABAergique, pouvant ainsi contribuer à, voire être à l'origine de, l'hyperexcitabilité corticale retrouvée dans ces modèles.

#### 4.2. Implications de la réduction de récepteurs adrénergiques $\alpha_2$ corticaux ?

La noradrénaline est un neuromodulateur, c'est-à-dire une molécule capable de modifier l'activité neuronale, pouvant agir sur 3 types de récepteurs :  $\alpha_1$  et  $\beta$ , excitateurs, et  $\alpha_2$ , inhibiteurs. Ainsi, la modulation de l'activité des neurones par transmission synaptique noradrénergique est dépendante des récepteurs adrénergiques que ces derniers expriment. Les récepteurs  $\alpha_2$ , inhibiteurs, sont exprimés de façon pré- et post-synaptique et peuvent ainsi induire une inhibition de l'élément post-synaptique, ou bien agir en auto-récepteur afin de limiter la libération de noradrénaline par l'élément pré-synaptique.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une réduction significative de l'expression de récepteurs  $\alpha_2$  dans le cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Comme l'ARNm de ces derniers est retrouvé à la fois au niveau des éléments pré- et post-synaptiques (Talley et al., 1996; Gyires et al., 2009), la baisse d'expression de récepteurs  $\alpha_2$  pourrait refléter la perte de projections noradrénergiques corticales retrouvée chez ces deux modèles. Cependant, il ne peut être exclu que ces résultats puissent également refléter une réduction de tels récepteurs inhibiteurs dans les cellules corticales. Les données issues de la base de données de séquençage des ARNm de NCS de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et sauvages a d'ailleurs mis en évidence la diminution d'expression des récepteurs  $\alpha_{2B}$ , démontrant que la baisse de tels récepteurs à l'échelle du cortex moteur comprend, du moins en partie, celle dans les cellules et neurones

corticaux. Ainsi, cette altération pourrait contribuer à une baisse d'inhibition corticale, normalement modulée par la noradrénaline, dans ces modèles murins de SLA présentant une hyperexcitabilité corticale.

Une étude employant la stimulation magnétique transcrânienne chez des sujets après administration de Yohimbine, un antagoniste des récepteurs  $\alpha_2$ , a mis en évidence une augmentation de l'excitabilité du système cortico-motoneuronal (Plewnia et al., 2002), suggérant donc bien que la baisse de disponibilité de ces récepteurs pourrait contribuer à l'hyperexcitabilité corticale retrouvée dans nos modèles de SLA. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence une réduction de la densité des récepteurs adrénergique  $\alpha_2$  chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Shimohama et al., 1986; Kalaria and Andorn, 1991; Meana et al., 1992), eux aussi présentant une hyperexcitabilité corticale (Khedr et al., 2011) et une atteinte du système noradrénergique (Matthews et al., 2002; Theofilas et al., 2018; Singh, 2020).

Ainsi la contribution du système noradrénergique via une réduction de la densité des récepteurs  $\alpha_2$ , bien que restant à prouver au niveau protéique, pourrait être évalué en couplant l'ECOG et l'étude de couplage inter-fréquence à l'administration de molécules pharmaceutiques ciblant ces récepteurs. Des molécules telles que les antagonistes Atipamezole, Mirtazapine ou Idazoxan pourraient être étudiées chez des souris sauvages afin de modéliser une perte d'inhibition par ces derniers, et des agonistes comme la Clonidine ou Guanfacine chez nos modèles murins de SLA, présentant une réduction d'expression de ces récepteurs et une hyperexcitabilité corticale, afin de déterminer si cela suffirait à rétablir l'activité corticale.

#### 4.3. Implications de l'atteinte noradrénergique dans d'autres pathologies ?

De façon intéressante, des pathologies comme les maladies d'Alzheimer et Parkinson, ou encore l'épilepsie présentent, elles aussi, une hyperexcitabilité corticale (Ridding et al., 1995; Manganotti et al., 2001; Khedr et al., 2011; Badawy et al., 2013) ainsi qu'une altération du système noradrénergique (Taquet et al., 1982; Matthews et al., 2002; McMillan et al., 2011; Paredes-Rodriguez et al., 2020). Ici, nous montrons que la supplémentation noradrénergique dans le système nerveux central, par injection d'une combinaison de L-DOPS (molécule passant la barrière hémato-encéphalique et transformée en noradrénaline sous l'effet d'un acide aromatique décarboxylase) et Benserazide (ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique, la Benserazide est un inhibiteur d'acides aromatiques décarboxylases périphériques) chez des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* qui présentent un découplage Theta-Fast Gamma, permet de rétablir ce couplage. Ces résultats mettent clairement en avant l'implication du système noradrénergique dans le couplage Thêta-Fast Gamma, un couplage reflétant la balance entre excitation et inhibition corticale (Buzsáki and Wang, 2012; Keeley et al., 2017).

Il serait intéressant de déterminer si un tel résultat peut être obtenu dans le cadre de ces autres pathologies (Alzheimer, Parkinson, Epilepsie) afin d'établir si un mécanisme commun existe dans l'ensemble de ces dernières ou si, au contraire, l'hyperexcitabilité corticale est le résultat de diverses altérations. La compréhension des mécanismes impliqués dans la modulation de l'activité corticale par la noradrénaline pourrait alors permettre, non seulement le développement de stratégies thérapeutiques dans le cadre de la SLA, mais aussi potentiellement dans d'autres pathologies comme celles mentionnées ci-dessus.

Les découvertes concernant les conséquences de ces atteintes noradrénergiques dans ces pathologies, et notamment les maladies de Alzheimer et Parkinson, pourraient également nous permettre d'explorer de potentiels mécanismes physiopathologiques responsables de l'atteinte des NCS notamment. En effet, dans un modèle murin d'Alzheimer, une étude a montré que l'atteinte du locus coeruleus induit une réaction inflammatoire, l'altération de la migration de la microglie et de la phagocytose et, consécutivement, une atteinte de la dégradation de l'amyloïde- $\beta$  avec formation de plaques (Heneka et al., 2010). Similairement, dans un modèle murin de Parkinson, des chercheurs ont montré que la déplétion noradrénergique, par injection de DSP-4, induit une aggravation de l'atteinte des neurones dopaminergiques ainsi qu'une augmentation de la libération d'interleukines et cytokines, possiblement par altération de la microglie (Yao et al., 2015; Af Bjerkén et al., 2019).

Ainsi, en plus de contribuer à l'hyperexcitabilité corticale, la déplétion noradrénergique pourrait participer à la neurodégénérescence des NCS, mais aussi celle des motoneurones localisés dans la moelle épinière lombaire (où nous observons également une telle déplétion dans le modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>*), potentiellement par le biais d'une atteinte de la microglie, activée dans le cerveau des patients SLA et des modèles murins de la pathologie (Turner et al., 2004; Beers et al., 2011; Corcia et al., 2012; Gravel et al., 2016; Geloso et al., 2017). En effet, dans le cortex cérébral, la microglie, comme l'ensemble des cellules gliales, exprime des récepteurs adrénergiques (Hertz et al., 2010) et est sous le contrôle de la noradrénaline, notamment via les varicosités des prolongements noradrénergiques (Poe et al., 2020). Il pourrait donc être envisagé d'étudier l'impact d'une déplétion noradrénergique sur les différentes populations de neurones corticaux mais aussi de cellules gliales dans le cadre de la SLA.

#### 4.4. Le système noradrénergique, une voie thérapeutique ?

Chez les patients SLA, l'hyperexcitabilité corticale a été montrée par stimulation magnétique transcrânienne comme précoce, précédant dans certains cas familiaux le développement des symptômes, et négativement corrélée à l'évolution clinique des patients et leur survie (Vucic et al., 2008; Shibuya et al., 2016; Eisen et al., 2017; Vucic and Kiernan, 2017; Van den Bos et al., 2018b).

Dans cette étude, nous retrouvons une hyperexcitabilité corticale présymptomatique dans deux modèles murins de la pathologie, et cela via électrocorticographie. Une étude appliquant l'électroencéphalographie (non-invasive) réalisée chez des patients SLA pourrait nous permettre de déterminer si cette approche permet de retrouver la précocité et l'impact négatif de l'altération d'activité corticale sur la SLA telle que celle mise en évidence par stimulation magnétique transcrânienne, mais aussi de valider la transposabilité des données obtenues dans les modèles murins chez les patients SLA.

A l'heure actuelle, le système noradrénergique a été largement délaissé dans les études sur la SLA, y compris chez les patients (voir Introduction, Chapitre III, 5.6.). Il est donc nécessaire de valider nos découvertes sur des tissus de patients : la baisse des niveaux corticaux de noradrénaline, la perte de projections noradrénergiques corticales et de neurones du locus coeruleus. Contrairement aux résultats obtenus dans le modèle murins *SOD1<sup>G93A</sup>* (Waibel et al., 2004), le traitement à la Rasagiline, comme à la Selegiline, des inhibiteurs de l'enzyme de dégradation de monoamines MAO-B, n'ont montré aucun effet notable chez les patients (Mazzini et al., 1994; Lange et al., 1998; Ludolph et al., 2018; Statland et al., 2019). Mais cette approche ne permet pas une sélectivité de l'action du traitement sur

le système noradrénergique seul et impact les autres monoamines normalement dégradées par MAO-B.

Les premiers résultats obtenus ici à la suite d'une injection unique de L-DOPS+B nous montrent un effet bénéfique sur le couplage Theta-Fast Gamma et la balance excitation-inhibition corticale. Dans les modèles murins de SLA, des études à plus long terme avec un traitement prolongé au L-DOPS+B pourrait nous permettre de déterminer si ce dernier peut induire une amélioration, non seulement de l'activité corticale, mais aussi une réduction de la perte neuronale (des NCS et des motoneurones), des atteintes motrices, un retard de déclenchement et/ou une augmentation de la survie. Si tel est le cas, cela pourrait constituer un premier pas vers le développement d'une approche thérapeutique basée, non pas sur la réduction de la dégradation des monoamines, mais sur le rétablissement des niveaux corticaux de noradrénaline spécifiquement.

# Conclusions et Perspectives

## Conclusions et Perspectives

Mes travaux de thèse s'inscrivent à la suite de multiples études ayant mis en avant le rôle prépondérant du cortex cérébral dans la physiopathologie de la SLA. Les études concernant les mécanismes sous-tendant la neurodégénérescence ayant lieu dans cette maladie ont, pendant longtemps, été concentrées sur la moelle épinière et les motoneurones. Mais de nombreuses études cliniques, génétiques et histologiques ont récemment mis en lumière le cortex cérébral et son potentiel rôle dans le déclenchement et la progression de la SLA. La découverte de l'existence d'une hyperexcitabilité corticale précoce, parfois pré-symptomatique, négativement corrélée à l'évolution clinique et la survie des patients, et ici récapitulée dans des modèles murins de SLA, apparaît alors comme une altération dont la compréhension et la régulation pourrait permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Dans ce contexte, ma thèse a permis d'identifier, dans les NCS, des gènes candidats pouvant refléter ou contribuer à l'hyperexcitabilité corticale. L'exploration de la base de données de séquençage des ARNm de NCS issus de la couche V du cortex moteur de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et sauvages m'a permis d'identifier des dérégulations transcriptomiques de gènes codant 1) des sous-unités de canaux voltage dépendants participant à la génération et propagation du potentiel d'action, 2) des molécules d'arrimage et fusion de vésicules participant aux mécanismes d'endo- et exocytose, et 3) des sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub>. L'ensemble de ces données suggèrent une altération de l'excitabilité des NCS avec une altération de leur activité intrinsèque (génération d'un potentiel d'action et libération vésiculaire), mais aussi de leur sensibilité au GABA. En effet, l'augmentation d'expression de

sous-unités de récepteurs GABA<sub>A</sub> pourrait induire une modification de la sensibilité de ces récepteurs au GABA, une augmentation de leur densité ou encore leur délocalisation.

A l'échelle corticale, et chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, l'expression de l'enzyme de synthèse de GABA, les niveaux globaux de ce dernier et la densité des interneurones ne sont pas altérés. Pourtant la découverte récente par des membres de notre laboratoire d'une altération des synapses GABAergiques dans le cortex frontal des souris *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*, présentant elles aussi une hyperexcitabilité corticale et un maintien des niveaux corticaux de GABA, associé aux données collectées sur les NCS de souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, pourrait suggérer une atteinte subtile du système GABAergique cortical et de sa neurotransmission synaptique.

Une autre part de mon travail a consisté à déterminer les mécanismes pouvant soutenir l'hyperexcitabilité corticale mise en évidence avant mon arrivée chez les modèles murins *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* de SLA. L'analyse par spectrométrie de masse du cortex moteur de ces animaux a mis en évidence une déplétion des niveaux de noradrénaline, jusqu'alors jamais évalués. L'atteinte du système noradrénergique, plus marquée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, est associée à une altération d'activité corticale plus importante, pouvant suggérer un lien direct entre la baisse de noradrénaline et l'hyperexcitabilité corticale. La déplétion noradrénergique, à un stade néonatal, a été associée à une atteinte des synapses et récepteurs GABAergiques. Ici, et à un âge adulte, nous montrons que l'application de la neurotoxine DSP-4, induisant une déplétion des niveaux corticaux de noradrénaline, conduit à la mise en place d'un découplage Theta-Fast Gamma chez les souris traitées, reflétant l'altération de la balance excitation-inhibition corticale. Ainsi, l'éventualité d'une atteinte

noradrénergique dès le développement doit être explorée, et son potentiel rôle dans la maturation du système GABAergique évalué.

Dans différents contextes neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, une atteinte du système noradrénergique a été mise en évidence et associée à des mécanismes physiopathologiques, et l'atteinte de populations neuronales, dans des modèles murins de ces maladies, notamment par atteintes microgliales. Ainsi, la voie d'un potentiel rôle délétère de la déplétion noradrénergique sur les populations neuronales touchées dans la SLA, et notamment des NCS localisés dans le cortex cérébral, mériterait d'être explorée.

Enfin, le traitement au L-DOPS+B, induisant quant à lui une augmentation des niveaux de noradrénaline, chez des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* présentant un tel découplage, a permis d'améliorer le couplage Theta-Fast Gamma. Ainsi, mes travaux ont pu montrer que, non seulement la déplétion des niveaux corticaux de noradrénaline est suffisante pour induire une altération du fonctionnement cortical, mais sa supplémentation permet un ré-équilibre partiel de la balance excitation-inhibition corticale, ouvrant ainsi la voie à un ensemble d'études visant à explorer le potentiel thérapeutique du rétablissement de l'activité corticale chez des modèles murins de SLA, puis des patients atteints de cette pathologie.

# Annexes

## Annexes

[Marques et al. 2019 - Early alterations of RNA metabolism and slicing from adult corticospinal neurons in an ALS mouse model \(bioRxiv\)](#)

1 ***Early alterations of RNA metabolism and splicing from adult corticospinal neurons in***  
2 ***an ALS mouse model***

3

4 Christine Marques<sup>1,2</sup>, Mathieu Fischer<sup>1,3</sup>, Céline Keime<sup>4</sup>, Thibaut Burg<sup>1</sup>, Aurore Brunet<sup>1</sup>,  
5 Jelena Scekcic-Zahirovic<sup>1</sup> & Caroline Rouaux<sup>1\*</sup>

6

7

8

9 <sup>1</sup>Inserm UMR\_S 1118, Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence,  
10 Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

11 <sup>2</sup>Current address: Department of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA;  
12 Department of Neurology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA.

13 <sup>3</sup>Current address: Department of Paediatrics, John Radcliffe Hospital, University of Oxford,  
14 Oxford, UK.

15 <sup>4</sup>Inserm UMR\_S 1258, CRNS UMR\_S 7104, Université de Strasbourg, IGBMC, Strasbourg,  
16 France.

17

18 \*Correspondence should be addressed to: C.R. ([caroline.rouaux@inserm.fr](mailto:caroline.rouaux@inserm.fr))

## Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease clinically defined as the combined degeneration of corticospinal and corticobulbar neurons (CSN), and bulbar and spinal motor neurons (MN). A growing body of evidence points to the motor cortex, where CSN are located, as the potential initiation site of ALS. However, little is known about the spatiotemporal dynamics of CSN degeneration and the molecular pathways involved. Here, we show in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS that CSN loss precedes MN degeneration and that CSN and MN degenerations are somatotopically related, highlighting the relevance of CSN to ALS onset and progression. To gain insights into the molecular mechanisms that selectively trigger CSN degeneration, we purified CSN from the motor and somatosensory cortex of adult mice and analysed their transcriptome from presymptomatic ages to disease end-stage. Significant RNA metabolism and splicing alterations, novel in the context of *Sod1* mutation, were identified, including mis-splicing events that largely trigger genes involved in neuronal functions. Together, the data indicate that CSN dysfunction and degeneration upon mutant *Sod1* expression involve alterations of RNA metabolism and splicing, emphasizing shared mechanisms across various ALS-related genes.

ALS is an incurable and fatal neurodegenerative disease that mostly starts in adulthood with a rapidly progressing paralysis and death within only 2 to 5 years of diagnosis<sup>1,2</sup>. In clinics, ALS is defined as the combined degeneration of both corticospinal and corticobulbar neurons (CSN, or upper motor neurons) whose cell bodies are located in the cerebral cortex and that extend axons to the medulla and spinal cord, and of spinal and bulbar motor neurons (MN, or lower motor neurons) whose cell bodies are located in the medulla and spinal cord, and that connect to the skeletal muscles. If the cellular and molecular mechanisms behind MN degeneration are relatively well known, the numerous related clinical trials have unfortunately failed to translate into improved treatment of ALS<sup>1-4</sup>, a discrepancy that contributed to the emergence of the CSN and the overall cerebral cortex as alternative therapeutic targets.

A growing body of evidence points to the motor cortex as the likely initiation site of ALS<sup>5,6</sup>. A first series of arguments arose from the recent genetic, pathological and clinical evolution links established between ALS and FrontoTemporal Dementia (FTD), a neurodegenerative disease that affects solely the cerebral cortex and results in behavioural and cognitive deficits<sup>7</sup>. A second series of arguments emerged following extensive examination of the TDP-43 aggregates, a pathological hallmark of the disease in post-mortem brains from ALS patients, identifying the motor cortex as the most affected region of the brain, and leading to the corticofugal hypothesis<sup>8-10</sup> which proposes a sequential pattern of pathology spreading from the motor cortex to its projection sites. Finally, transcranial magnetic stimulation studies of ALS patients revealed typical hyperexcitability of the motor cortex that characterizes both sporadic and familial ALS patients, negatively correlates with survival, and manifests prior to disease onset<sup>11</sup>, further suggesting a primary involvement of the motor cortex in disease initiation. In this context, the CSN, that connect the motor cortex to its downstream targets and degenerate in ALS, appear as potentially very relevant cellular players of disease onset and progression.

So far, only a limited number of studies reported on the degeneration of CSN in mouse models of the disease. Early and progressive loss of CSN was initially demonstrated in the *SOD1<sup>G93A/G1H</sup>* and then the *SOD1<sup>G93A</sup>* mouse lines<sup>12-14</sup>. More recently, loss of CSN has been reported at symptom onset in the *Thy1::TDP43<sup>A315T</sup>* mice<sup>15</sup>. Finally *hPFNI<sup>G118V</sup>* mice<sup>16</sup> and *C9-BAC* mice<sup>17</sup> present respectively a loss of CTIP2-positive neurons or of large pyramidal cells within the layer V of the motor cortex, at disease end-stage. Together, these studies highly suggest that the mouse strains that best mimic ALS symptoms recapitulate CSN degeneration.

Here, we sought to unravel the signalling pathways that accompany CSN initial dysfunction and ultimate loss during the course of the disease, using the *Sod1<sup>G86R</sup>* mice that typically recapitulate ALS onset and progression, with first motor symptoms detected at around 90 days of age and premature death at around 110 days<sup>18,19</sup>. In the absence of specific reporter to label CSN, *i.e.* to discriminate them from the neighbouring and highly similar subcerebral projection neurons that populate the layer V of the motor and non-motor cerebral cortex, we performed series of retrograde labelling of this disease-relevant neuronal population. Rigorous sampling and counting method of CSN highlights their pre-symptomatic and progressive loss, and a somatotopic relationship between CSN and MN degenerations, which had not been previously reported in animal models. After purification of labelled CSN from the motor and somatosensory cortex of adult wild-type or *Sod1<sup>G86R</sup>* at two presymptomatic and two symptomatic ages, we conducted a longitudinal transcriptome analysis of this population under neurodegenerative conditions. We unravelled alterations of expression of genes involved in RNA metabolism, further confirmed by occurrences of RNA mis-splicing. These uncovered signalling pathways are highly reminiscent of those described for other, recently identified ALS-related genes known to regulate RNA metabolism, such as

*FUS* and *TARDBP*<sup>7</sup>, but are novel for *SOD1*, highlighting common, disease-relevant molecular pathways.

## Results

### CSN progressively degenerate in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice

To test whether *Sod1<sup>G86R</sup>* mice recapitulate a progressive loss of CSN, we performed a series of retrograde labelling of the whole CSN population from the cervical portion of the spinal cord of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, by injecting Fluorogold at two presymptomatic ages, 60 days (60d: n=5 WT and 6 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and 75 days (75d: n=6 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*), and two symptomatic ages, 90 days (90d: n=5 WT and 6 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and 105 days (105d: n=5 WT) or end-stage (ES: n=5 *Sod1<sup>G86R</sup>*) (Fig. 1a). Microscopy analysis of coronal sections revealed labelled pyramidal cells in the cerebral cortex, spanning from Bregma 2.10 mm to Bregma -2.30 mm (Supplementary Fig.1). As exemplified at the rostro-caudal level Bregma 0.74 mm, labelled cells located in cortical layer V span from the secondary motor cortex medially to the primary somatosensory cortex laterally, in both wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* animals (Fig. 1b). We observed a marked decrease of labelled CSN in the cerebral cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice over time (Fig. 1b,c).

To evaluate a potential gradual loss of the whole population of CSN in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, we quantified the number of labelled CSN present in both hemispheres of 8 coronal sections equally spaced along the rostro-caudal axis and matched between the two genotypes (Supplementary Fig. 1). The results show that the population of retrogradely-labelled CSN progressively decreased over time in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals compared to their wild-type littermates (Fig. 1d). This decrease became significant at the symptomatic age of 90 days, and reached a loss of 33.3% by the end of the disease (Fig. 1d).

To confirm these results and exclude the possibility that the loss of CSN could be due to a defective retrograde transport of Fluorogold by the axons of the *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN, we took advantage of the expression of the *mu-Crystallin* gene (*Crym*) by the CSN, along with other subcerebral projection neurons of the cortical layer V<sup>20</sup>. *In situ* hybridization for *Crym*

(Supplementary Fig. 2), was performed at one single rostro-caudal level (Bregma 0,14 mm) and within the layer V of the secondary and primary motor area and the most medial part of the primary sensorimotor areas only, at 60d (n=3 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 90d (n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 105d (n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and 115d/ES (n=3 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*). Quantification revealed a progressive reduction of *Crym*-positive neurons in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice compared to their wild-type littermates (Supplementary Fig. 2). While the data do not rule out the possibility that retrograde transport may be altered in CSN over time, they nevertheless confirm a progressive loss of the CSN population in *Sod1<sup>G86R</sup>*.

#### **CSN degeneration propagates in a caudo-rostral manner in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice**

In mice, CSN are topographically organized along the rostro-caudal and the medio-lateral axes, and project accordingly to different portions of the spinal cord<sup>21,22</sup>. Sampling the whole population of CSN along the rostro-caudal axis (Supplementary Fig. 1) enabled us to test whether their degeneration was homogeneous, or rather affected more selectively sub-populations. We thus quantified the number of CSN present on each of the 8 selected coronal sections (Fig. 2) of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* brains over time. Using this approach, we observed that the number of CSN was uneven along the rostro-caudal axis, and that CSN were overall more numerous in the most caudal sections (Fig. 2 and Supplementary Fig.1). At the presymptomatic ages 60d and 75d, *Sod1<sup>G86R</sup>* brains displayed less CSN than their wild-type counterparts, at every level analysed, but no significant difference could be detected between the two genotypes (Fig. 2). At 90d, we observed a significant reduction of CSN in the caudal sections only, and this reduction was uneven amongst these sections, with a greater decrease observed at the most caudal levels (section 5: 11,86% loss; 6: 19,23%; 7: 19,21%; 8: 29,59%; 9: 28,43%; Fig. 2). At 105d/ES, with the exception of section 3, the loss of CSN was significant at every level. Within the caudal part, section 9 remained the most severely

affected, with a loss of 44,48%, but overall, the most impacted section was the rostral section 2, with a loss of 68,67% (Fig. 2). Together, the data show that CSN degeneration is not even along the rostro-caudal axis in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice: it starts with the most caudally located ones, and progresses rostrally over time.

### **CSN and MN degenerations are temporally and somatotopically related**

Because CSN that innervate the lumbar spinal cord are mostly caudally located<sup>21,22</sup>, we reasoned that they might account for the majority of the neuronal loss observed in the most caudal sections we analysed. To test this hypothesis, we performed a second set of retrograde labelling and injected Fluorogold from the lumbar portion of the spinal cord of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, at the same presymptomatic ages (60d: n=4 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 75d: n=4 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and symptomatic ages (90d: n=5 WT and 5 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 105d: n=4 WT and ES: n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) (Fig. 3a). Microscopy analysis of coronal sections revealed labelled cortical cells, spanning from Bregma -0,46 mm to Bregma -1,70 mm (Supplementary Fig. 3). Each of the three levels considered (section 8, Bregma -1,06 mm, Fig.3, and sections 7 and 9, Bregma -0,46 and -1,70 mm respectively, data not shown), showed a marked loss of CSN from 60 days on (Fig. 3c). Sampling and counting the lumbar-projecting CSN revealed a marked loss of this subpopulation in the *Sod1<sup>G86R</sup>* mice compared to their wild-type littermates, which was significant from 60 days on, and intensified over time (Fig. 3b). Taken together, the data show that, in the *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, the loss of lumbar-projecting CSN starts earlier than that of the overall CSN population.

The paralysis that progressively affects the *Sod1<sup>G86R</sup>* mice typically starts in the hind limbs. In accordance with this, spinal motor neurons (MN) were shown to degenerate in the lumbar portion of the spinal cord<sup>18,19</sup>. In order to compare the time course of lumbar-projecting CSN degeneration to that of lumbar MN, we counted the number of ChAT-positive

neurons present in the ventral horn of the lumbar spinal cord of wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> animals over time (60d: n=5 WT and 6 *Sod1*<sup>G86R</sup>; 75d: n=6 WT 3 *Sod1*<sup>G86R</sup>; 90d: n=5 WT and 6 *Sod1*<sup>G86R</sup>; 105d/ES: n=5 WT 5 *Sod1*<sup>G86R</sup>; Fig. 3d,e,f). We failed to detect any significant difference between *Sod1*<sup>G86R</sup> and wild-type mice before end-stage of the disease ( $15,3 \pm 0,3$  vs  $19,3 \pm 0,6$  respectively, corresponding to a loss of 20,7%; Fig. 3e). To exclude the contribution of small, disease-resistant gamma motor neurons and restrict the counting to large, disease-vulnerable alpha motor neurons, we next counted the number of large ( $400\mu\text{m}^2$  or above) ventral ChAT-positive neurons (Fig. 3f). We observed an important and significant loss of large ChAT-positive neurons at end-stage of the disease (65,27%,  $p < 0,001$ ), and a milder and non-significant loss at 90 days of age (19,19%,  $p = 0,237$ ). Together, the data suggest that, in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, actual loss of lumbar MN following the shrinkage of their somas is a rather late event in comparison with the overall disease progression.

In mutant *Sod1* mouse models of ALS, MN undergo Wallerian degeneration, characterized by initial alteration of the neuromuscular junction (NMJ) and retrograde progression to the soma<sup>23</sup>. To determine when lumbar MN degeneration starts, we performed electromyography recordings in the tibialis anterior (Supplementary Fig. 4a,b) muscles of both hind limbs of the *Sod1*<sup>G86R</sup> mice and their control littermates prior to their harvesting. Using this technique, NMJ denervation was evident on 100% of *Sod1*<sup>G86R</sup> end-stage animals, and 66,66% of 90 day-old animals, but not on younger animals (Supplementary Fig. 4a,b). To confirm these results, we investigated the status of the NMJ of the tibialis anterior muscle by immunofluorescence (Supplementary Fig. 4c,d). In both wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> animals we observed healthy, innervated neuromuscular junctions, along with a small proportion of partly denervated NMJ that displayed discrete disconnections of the axonal terminal (Supplementary Fig.4d). The proportion of partly denervated NMJ was stable across ages and genotypes (Supplementary Fig.4c), indicating that their occurrence likely reflects a mild alteration of the

tissue during the process of bundles preparation. Importantly, in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals only, we detected fully denervated NMJ that had lost their axonal terminal (Supplementary Fig.4d). This phenotype was present only from 90 days on, and progressed over time (17,7% of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 90 days, 76,9% at end-stage, Supplementary Fig. 4c). Thus, the data indicate that lumbar MN degeneration starts after 75 days of age in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice.

Taken together, the data show that in a mouse model of ALS where paralysis starts in the hind limbs, CSN degeneration occurs in a somatotopic manner, with lumbar-projecting CSN being affected earlier than the rest of the CSN population. In addition, the data indicate that CSN loss occurs before the appearance of the first signs of MN degeneration. The spatiotemporal dynamics of CSN degeneration during the course of the disease in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice suggests that CSN are likely affected before the MN, further highlighting their clinical relevance.

#### **Purification of adult CSN under healthy and neurodegenerative conditions**

To investigate the molecular mechanisms behind CSN degeneration, we first developed an approach to purify this neuronal population from the cerebral cortex of adult wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. CSN were retrogradely labelled by injecting green fluorescent microspheres into the cervical portion of the dorsal funiculus at 25 days of age (Fig. 4a,b,c). Animals were harvested at two presymptomatic ages, 30 and 60 days, and two symptomatic ages, 90 and 105 days (Fig. 4b). CSN-containing cortical layers V were then microdissected and labelled CSN were dissociated and purified by FACS (Fig. 4a,c). In parallel, a second population of cortical neurons, the callosal projection neurons (CPN) located in the layers II/III of the cerebral cortex, above the labelled CSN, were also purified (Fig. 4a,c). CPN and CSN are close neuronal populations: they arise from a same pool of cortical progenitors, are excitatory projection neurons that use the glutamate as a neurotransmitter, and express some

common molecular markers. Yet, as opposed to CSN, CPN have not been reported to degenerate in ALS, and may thus represent a valuable control population of cortical excitatory neurons that overexpress the *Sod1<sup>G86R</sup>* transgene without degenerating. To confirm this, we took advantage of *Cux2* selective expression in upper layer CPN<sup>24</sup>, and measured the density of CUX2-positive nuclei in the cortical layers II/III of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* at 60, 75, 90 and 105 days of age or at disease end-stage. No decrease of CUX2-positive nuclei could be detected (Supplementary Fig. 5). Instead, we observed a significant increase of CUX2 density at disease end stage, which could potentially arise from an overall decrease of the cortical thickness. We reasoned that the comparison between the two neuronal populations, vulnerable CSN versus resistant CPN, would enable to distinguish genes dysregulated in CSN only, and likely to be involved in their degeneration, from genes dysregulated in both populations, and unlikely to have any detrimental effect on neuronal survival. Importantly, in most of the cases, CSN and CPN were purified from same animals (Fig. 4a,c). 64 samples were initially sequenced (n=4 biological replicated x 2 genotypes x 2 cell types x 4 ages), 7 were excluded because they did not expressed the expected markers or were altered, and a total of 57 samples were further processed (CSN: 30d: n=4 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 60d: n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 90d: n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 105d: n=4 WT and 2 *Sod1<sup>G86R</sup>*; CPN: 30d: n=4 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 60d: n=2 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 90d: n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 105d: n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*). Unsupervised hierarchical clustering of 45,337 mRNA transcripts in all samples clearly separated the two neuronal populations in distinct clusters (Fig. 4d). qPCR (data not shown) and RNAseq data (Fig. 4e) confirmed that purified CSN expressed markers typical of the cortical layer V subcerebral projection neurons, and did not express any marker typical of upper layer projection neurons<sup>20,24,25</sup>, and vice-versa (Fig. 4e). Together, the data indicate that subtypes of excitatory neuronal populations can be successfully co-purified from individual adult mouse cortices, under healthy or neurodegenerative conditions.

### **RNaseq analysis reveals early, CSN-specific transcriptional alterations in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice**

When performed separately on CSN or CPN samples, PCA globally distinguished the wild-type from the *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN (Fig. 5a, left panel), while no sub-groups were visible amongst the CPN samples (Fig. 5a, right panel). Taking all ages into account, analysis of differential gene expression between wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* samples indicated that numerous genes present a statistically significant differential expression within the CSN samples (Fig. 5b, left panel), as opposed to the CPN samples (Fig. 5a, right panel), in spite of similar strong up-regulation of the *Sod1* mRNA levels in both populations (Fig. 5a,b, inserts). Next, we evaluated age by age, the proportion and significance of differentially expressed genes between wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN samples. As illustrated by the volcano plots (Fig. 5c), the number of genes significantly dysregulated in *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN are more important in symptomatic than in pre-symptomatic ages. Finally, we compared the pools of genes significantly dysregulated between wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN samples, and between wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* CPN samples (Fig. 5d). Venn diagrams at four ages of interest (Fig. 5d) illustrate that important transcriptional dysregulations selectively occurred in CSN. These selective dysregulations started as early as 30 days of age and became more numerous as neurodegeneration progressed. In comparison, CPN transcriptional dysregulations are very modest. Importantly, very few common genes were found between the two neuronal populations. Thus, the data suggest that the two neuronal populations cope differently with the overexpression of the mutant *Sod1<sup>G86R</sup>* transgene, in accordance with the selective and progressive degeneration of the CSN and the maintenance of the CPN in the *Sod1<sup>G86R</sup>* animals over time.

## Gene set enrichment and network analyses resolve RNA metabolism dysregulation in *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN

To identify the molecular pathways that accompany CSN degeneration, we ran a Gene Set Enrichment Analysis<sup>26</sup> (GSEA) on a ranked list of 29,017 genes significantly and selectively dysregulated in CSN and not in CPN across ages (Fig. 6a, and Supplementary Table 1). As expected in a context of ALS, the first gene ontology (GO) terms for biological processes (BP), cellular components (CC) and molecular functions (MF) were linked to the mitochondria (Fig. 6a, and Supplementary Table 1), indicating that CSN degeneration, like MN degeneration, is accompanied with alteration of the mitochondrial functions. Interestingly, amongst the 24 most up-regulated GO terms for BP, 7 were associated with RNA metabolism and transcriptional initiation: Ribonucleoprotein complex biogenesis and assembly (Normalized Enrichment Score, NES=2.94; Size=66), Protein RNA complex assembly (NES=2.86; Size=51), Translational initiation (NES=2.85; Size=34), RNA processing (NES=2.77; Size=136), tRNA metabolic process (NES=2.75; Size=16), Regulation of Translation Initiation (NES=2.63; Size=27) and RNA splicing (NES=2.62; Size=66) (Fig. 6a, and Supplementary Table 1). This relatively important representation of the GO terms in relation with RNA metabolism was further emphasized on an Enrichment Map for the BP, where the terms in relation with RNA metabolism appeared as part of the first sub-network (Fig. 6b, and Supplementary Fig. 6). In accordance with this, GO for CC indicated up-regulations of the Ribonucleoprotein complex (NES=3.59; Size=117 genes), the Endoplasmic reticulum (NES=3.20; Size=224 genes) and the Spliceosome (NES=2.65; Size=40) (Supplementary Table 1). Similarly, GO for MF indicated up-regulations of the Translation Initiation Factor Activity (NES=2.63; Size=20 genes), the Translation Regulator Activity (NES=2.38; Size=33 genes) and the Translation Factor Activity / Nucleic Acid Binding (NES=2.35; Size=31) (Supplementary Table 1). Expression profiles of some of these

genes involved in RNA metabolism are shown for the pre-symptomatic and symptomatic ages of 30 and 90 days respectively (Fig. 6c). Remarkably, many of these genes are related either to motoneuron diseases such as Hereditary Spastic Paraplegia, Primary Lateral Sclerosis, Charcot-Marie-Tooth Disease, Spinal Muscular Atrophy, or to mental retardation and other related neurodevelopmental diseases, or both (Fig. 6c, asterisks, and Supplementary Table 2). We thus reasoned that some of these transcriptional alterations might occur very early on during the development and specification of the CSN. To test this possibility, we used microfluidics to run high-throughput qPCR validations on two groups of samples: cortical layers V microdissected from the motor cortex of 60 day-old wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, where the contribution of CSN to the overall variety of cell types is modest (Fig. 6d), and cortical plates from embryonic day (E) 14.5 wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* embryos, that are enriched in developing layers V and VI corticofugal neurons and include specifying CSN, and are mostly devoid of other cortical excitatory projection neurons, cortical inhibitory neurons, and glial cell types (Fig. 6e). High-throughput qPCR results indicated that several of the gene expression dysregulations identified in pure adult CSN populations could also be observed in whole adult cortical layer V (Fig. 6d), in spite of the large dilution of the CSN contribution to the overall samples, and to a larger extent in E14.5 cortical plates of *Sod1<sup>G86R</sup>* embryos in comparison with their wild-type littermates (Fig. 6e). Together, the data indicate that CSN degeneration in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice correlates with transcriptional alterations of genes involved in RNA metabolism. Interestingly, part of these transcriptional dysregulations are already present during corticogenesis, suggesting that CSN ultimate degeneration in the *Sod1<sup>G86R</sup>* mouse model of ALS could arise, at least partly, from neurodevelopmental alterations that may affect their proper specification, integration into neuronal circuits and functioning.

#### **RNA mis-splicing accompanies CSN degeneration**

The identification of broad transcriptional alterations of genes involved in RNA metabolism, and more particularly in RNA splicing, may translate into altered mRNA splicing profile of the *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN compared to the wild-type CSN population. To test this possibility, we employed rMATS<sup>27</sup> to detect alternative splicing events from the 90 day-old wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN (n=4 per group) and CPN (n=2 WT and 3 *Sod1*<sup>G86R</sup>) replicates (Fig. 7). A total of 1,707 CSN-selective alternative splicing events corresponding to 1,163 affected genes were identified as skipped exons (SE, 722 events, 42.3%), alternative 5' splice sites (A5SS, 241 events, 14.1%), alternative 3' splice sites (A3SS, 334 events, 19.6%), mutually exclusive exons (MXE, 224 events, 13.1%) and retained introns (RI, 186 events, 10.9%) (Fig. 7a). GSEA analysis ran on the affected genes revealed the overrepresentation of GO terms for biological processes related to Neuronal Differentiation, Synaptic Signalling and Neuronal Death (7 out of 20 significant GO terms) (Fig. 7b and Supplementary Table 3). Sashimi plots are shown for selected neuronal genes *Dynamin 1 (Dnm1)*, *Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein (Picalm)*, *Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 9A (Ppp1r9a)*, *EFR3 homolog A (Efr3a)*, *Very Low Density Lipoprotein Receptor (Vldlr)* and *Microtubule-Actin Crosslinking Factor 1 (Macf1)* (Fig. 7c). Interestingly, *Picalm*, *Vldlr* and *Macf1* amongst others, have been previously identified as alternatively spliced upon *Tardbp* or *Fus* knock-down in the mouse brain<sup>28,29</sup>. In addition, mis-splicing of *Picalm* has been reported in AD patients<sup>30</sup>, mutation-associated alternative splicing of *Dnm1* has been associated with epilepsy<sup>31</sup> and mutations of *Efr3a* have been linked to autism spectrum disorder<sup>32,33</sup>. Taken together, the data indicate that *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN undergo degeneration in a context of global RNA metabolism dysregulation and selective RNA splicing alterations that affect more particularly genes involved in proper neuronal development and function. These altered molecular pathways are reminiscent of other ALS-related genes which directly control RNA metabolism and splicing, *i.e.* *FUS* and *TARDBP* and point to common mechanisms

across causative genes and neuronal subtypes, in, and above ALS context.

## Discussion

In clinics, ALS diagnosis relies on evidences for combined degeneration of CSN and MN. While the origin and propagation of the disease between the two neuronal populations has always been debated<sup>34</sup>, number of studies reported on the somatotopic relationship between cortical and spinal impairments<sup>35-37</sup>, ruling out the possibility that CSN and MN degenerations are independent, and rather supporting a propagation from one neuronal population to the other, whether descendent, from the cerebral cortex to the spinal cord, or ascendant, from the spinal cord to the cerebral cortex (not to be confused with the Wallerian or retrograde degeneration of the MN, from their axonal terminals to their cell bodies). In spite of its classical text book definition, ALS is highly heterogeneous and, amongst other parameters, relative upper (CSN) and lower (MN) motor neuron involvement and site of disease onset greatly vary across ALS patients<sup>38</sup>. Notably, *SOD1* mutant carriers typically present with spinal onset, which for the vast majority of them corresponds to a lower limb onset, and mild upper motor neuron impairment<sup>38,39</sup>. Similarly, mutant *SOD1* mouse models typically present with initial hind limb impairment, and so do the *Sod1*<sup>G86R</sup> mice<sup>18,19</sup>. Here, we took advantage of this well characterized model of the disease to test whether mice could recapitulate the somatotopic relationship between CSN and MN, and contribute to unravel the origin of the degeneration.

Because hyperreflexia and hypertonia that characterize CSN degeneration in Human<sup>5,6</sup> are extremely difficult to assess in rodents, histology has become the standard to evaluate the CSN population in ALS mouse models<sup>12-17</sup>. Here, we chose retrograde labelling approaches to precisely label either the whole CSN population (Fig. 1, 2 and Supplementary Fig. 1), or the lumbar-projecting CSN subpopulation (Fig. 3 and Supplementary Fig. 3), as opposed to IHC, ISH or genetic approaches that allow for labelling of all cortical layer V subcerebral projection neurons amongst which CSN represent only a minority. When combined with

rigorous sampling and counting, retrograde labelling further enabled to test whether subpopulations of CSN, that in rodent are topographically organized along both the medio-lateral and the rostro-caudal axes<sup>21,22</sup>, may be more affected by the disease. We show here that *Sod1*<sup>G86R</sup> mice displayed progressive loss of the whole CSN population (Fig.1 and Supplementary Fig. 2), and that, along the rostro-caudal axis, CSN loss started caudally and progressed rostrally (Fig. 2). Caudally-located CSN mostly project to the lumbar spinal cord and control hind limb movements<sup>21,22</sup>. Quantification of the lumbar-projecting CSN in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice during the course of the disease indicated a significant loss as early as 60 days of age (Fig. 3), 45 days prior to MN cell bodies shrinkage and loss (Fig. 3 and Supplementary Fig. 4), 30 days prior to NMJ denervation, and 15 days prior to onset of weight loss, the first clinical symptom reported in this mouse line<sup>40</sup>. Together, the data indicate that, similarly to what has been reported for ALS patients, CSN and MN degeneration occur in a somatotopic manner in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, with CSN and MN involved in hind limb motor function being affected prior to the other subpopulations. In addition, CSN loss occurs before the first signs of MN degeneration (NMJ denervation), suggesting that, in this model, degeneration likely follows a descending propagation, from the motor cortex to the spinal cord. The data support the corticofugal hypothesis which arose from post-mortem histopathological analyses of brains from ALS patients, and alive DTI studies<sup>8-10</sup>. Interestingly, in spite of the early onset of CSN loss, as many as 66.7% of the whole CSN population and 62.9% of the lumbar-projecting population remain at disease end-stage, indicating the existence of both disease-resistant and disease-vulnerable CSN. In the context of the corticofugal hypothesis, an important question to address in future studies would be to determine which of the loss of the most vulnerable CSN or the maintenance of disease-resistance CSN is the most detrimental to downstream MN, in other words, whether disease propagation from the cerebral cortex to the spinal cord arises from the loss of beneficial input or rather the maintenance of toxic input.

Transcriptomics, amongst other techniques, has largely contributed to our understanding of the molecular pathways leading to MN degeneration<sup>41,42</sup>. Similarly, we reasoned that transcriptomic analysis of CSN purified from adult *Sod1*<sup>G86R</sup> and control mice would unravel the molecular signalling that accompanies CSN degeneration in ALS. To this end, we adapted a method of purification of embryonic and young postnatal cortical neurons<sup>20,25</sup> to adult cortical neurons under both healthy and neurodegenerative conditions, based on FAC Sorting of retrogradely labelled neurons (Fig. 4). We thus purified CSN and CPN from the cerebral cortex of wild type and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice at four disease-relevant adult ages, and conducted RNAseq analysis. To our knowledge, this is the first report on whole projection neuron population purification by FACS from the adult mouse cerebral cortex. In addition, the adapted methodology offers the advantage to utilise the neurons of individual mouse brains as true replicates, instead of pooling the neurons from several brains<sup>20,43</sup>, providing an adapted response to both ethical and statistical requirements. CPN isolated from same mouse brains were chosen as control, for their high similarity with CSN, and their resistance to degeneration (Supplementary Fig. 5) in spite of similar levels of *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene expression (Fig. 5b). Possible future applications of this current method may prove useful to compare gene signatures of affected CSN populations amongst various ALS mouse models, or to highlight the differences between ALS and primary lateral sclerosis (PLS) characterized by CSN degeneration without MN impairment, potentially shedding light on putative propagation mechanisms from CSN to MN in ALS. Beyond this first attempt to unravel CSN alterations in ALS at the level of the population, single cell approaches will be, in the future, instrumental in identifying the mechanisms that discriminate disease-vulnerable from disease-resistant CSN, and contribute to inform the development of therapeutic strategies aimed at maintaining pools of properly functioning CSN<sup>44</sup>.

Analysis of the transcriptomic data first confirmed the selective degeneration of the CSN population and the minor impact of the *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene expression on the CPN population (Fig. 5), in accordance with the histological quantifications (Fig. 1, 3, and Supplementary Fig. 2 and 5). Comprehensive analysis of gene expression data highlights pathways characteristic of ALS<sup>1,2</sup>, such as altered mitochondrial functions, protein folding and catabolism (Fig. 6a). Interestingly, the over-representation of RNA metabolism, including RNA splicing, amongst the most deregulated biological processes, cellular components and molecular functions, further confirmed by high throughput qPCR (Fig. 6) and splicing analysis (Fig. 7) is altogether expected in the context of ALS<sup>1,2</sup>, and novel for a *Sod1*<sup>G86R</sup> mutation. Indeed, altered RNA metabolism is reminiscent of other ALS-related genes which encode RNA binding proteins, such as *TARDBP* and *FUS* and whose knock-downs in the mouse brain are associated with altered RNA splicing<sup>28,29</sup>. Importantly, alternative splicing is also a hallmark of *C9ORF72*-associated mutations and of sporadic ALS<sup>45</sup>, and up-regulation of genes involved in mRNA processing and in RNA metabolic processes were also described in the cerebral cortex of sporadic ALS patients<sup>46</sup>. Gene set enrichment analysis of the statistically significant altered splicing events between WT and *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN unravelled a large representation of genes involved in neuronal development and differentiation, synaptic signalling and neuronal death (Fig. 7b). Again, some of the targeted genes are reminiscent of those affected by *TARDBP* and *FUS* mutations<sup>28,29</sup>, such as the representative *Picalm*, *Vldlr* and *Macf1* (Fig. 7), highlighting altered neuron-specific functions (Supplementary Table 3). The mis-splicing of these transcripts, amongst others, could contribute to altered dendritic shape, synaptic transmission and intrinsic excitability of the CSN/layer V subcerebral projection neurons, which have been reported in various mouse models of the disease<sup>14,16,17,47</sup>, and potentially to overall motor cortex hyperexcitability, an early feature of cortical

impairment in ALS patients<sup>11</sup>. Thus, beyond the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model, the data are relevant to ALS in its broad genetic heterogeneity. This very first molecular temporal sequence of degenerating CSN paves the way to the identification of new therapeutic targets to prevent CSN loss, maintain their proper functioning, and potentially hinder disease spreading to downstream MN.

## Online Methods

### *Animals*

All animal experiments were performed under the supervision of authorized investigators and approved by the local ethical committee of Strasbourg University (CREMEAS, agreements # 00766.01 and 1534-2015082617403748). BAC transgenic male mice with the G86R murine *Sod1* missense mutation<sup>18</sup> were obtained from the animal facility of the Faculty of Medicine, University of Strasbourg. Non-transgenic age-matched male littermates served as controls. Mice received water and regular rodent chow *ad libitum*. *Sod1*<sup>G86R</sup> animals were followed daily, and disease progression was rated according to a clinical scale going from score 4 to 0, as we previously described<sup>19</sup>. End-stage animals were harvested upon reaching score 0, *i.e.* when they were no longer able to roll over within 10 s after being gently placed on their back<sup>19</sup>.

### *Retrograde labelling of CSN*

Mice were deeply anesthetized with intraperitoneal (i.p.) injection of Ketamine (Imalgène 1000®, Merial; 120 mg/kg body weight) and Xylazine (Rompun 2%®, Bayer; 16 mg/kg body weight) solution and placed on a heating pad. A precise laminectomy was performed in cervical (C3-C4) or lumbar (L1-L2) region of the spinal cord, depending on the experiment, and the animals were positioned below an injector (Nanoject II, Drummond Scientific, PA) mounted on a micromanipulator. Using pulled glass capillaries, the dura was punctured, the capillary lowered to the dorsal funiculus and five pressure microinjections of 23 nl of Fluorogold (Fluorochrome, CO) were performed on each side of the dorsal funiculus. Five days after Fluorogold injection, or upon reaching end stage of the disease, the animals were transcardially perfused with cold 0.01 M PBS, followed by cold 4% PFA in 0.01 M PBS and their brains, spinal cords, tibialis anterior and gastrocnemius muscles were collected.

### ***CSN quantification***

Brains from Fluorogold injected animals were cut in 40  $\mu\text{m}$  thick coronal sections on a Leica VT 1000S vibratome (Leica Biosystems) and mounted on slides with DPX mounting solution (SIGMA, 06522-100ML). Sections were imaged under an AxioImager.M2 fluorescence microscope (Zeiss) equipped with a structured illumination system (Apotome, Zeiss) and a highly sensitive black and white camera (Hamamatsu). Images were acquired using the ZEN 2 software (Zeiss). For mice injected in the cervical portion of the spinal cord, all FG-positive neurons present on both hemispheres of 8 equally spaced coronal sections, separated by 480  $\mu\text{m}$  and spanning from 2.10 to -1.70 relative to Bregma, were counted (Supplementary Fig. 1). For mice injected in the lumbar portion of the spinal cord, all FG-positive neurons present on both hemispheres of 3 equally spaced coronal sections, separated by 480  $\mu\text{m}$  and spanning from -0.46 to -1.70 relative to Bregma, were counted (Supplementary Fig. 2). CSN quantification was performed using a macro that we developed on ImageJ (1.48k, NIH) by two experimenters blinded to the age and genotype of the samples. In brief, this macro generates a reversed image and performs a noise reduction with the “Median filter” (radius=2). A Gaussian blur (sigma=25) filtered image is then created and subtracted from the non-blurred image. The result is handled by the “rolling ball radius Subtract Background” algorithm (rolling=18). The edges of the cells are sharpened and enhanced by the “Unsharp Mask filter” (radius=50 mask=0.6). The user then can adjust the automatically set threshold that will be used for the determination of black and white pixels of the binarized image version. The image is then binarized with the “Make Binary” function and subjected to several morphological operations to close (“Close-”) and fill holes (“Fill Holes”) in cells and eliminate small objects (“Erode” and “Dilate”) and separate touching cells by “Watershed” segmentation. If needed, the user can further separate touching cells

(white line drawing between cells), complete the filling of the holes (black brush drawing) and define a ROI around the whole cell population to avoid image border artefacts to be counted. Cells are then counted with the “Analyse particles” function. The macro automatically exports the results as a spreadsheet file and an image file.

The cDNA clone for *Crystallin-mu* (*Crym*) is a kind gift from the Arlotta lab. Riboprobes were generated as previously described<sup>20</sup>. Nonradioactive *in situ* hybridization was performed on 40 µm vibratome coronal brain sections 0.14 mm anterior to Bregma. Selected sections were mounted on superfrost slides and processed using reported methods<sup>48</sup>. Bright field 10X tiles images were acquired with a Nikon microscope equipped with a Nikon Digital Sight DS-U3 camera and run by the Nis Elements 4.0 software. *Crym*-positive neurons were manually counted, on both hemispheres, within layer V, from M2 medially to S1 laterally by two experimenters blinded to the age and genotype of the samples.

#### ***Spinal motor neurons quantification***

The L1-L4 lumbar level of the spinal cords were cut on a vibratome into coronal sections of 40 µm. 4 nonadjacent sections spaced by 320 µm were labelled by immunohistochemistry as previously described<sup>49</sup>, using a goat anti-choline acetyltransferase (ChAT) antibody (Millipore) and a biotinylated donkey anti-goat IgG (Jackson). Two images per section (one per ventral horn) were captured using an AxioImager.M2 microscope (Zeiss) equipped with a high-resolution B/W camera (Hamamatsu) and run by the ZEN 2 software (Zeiss). Cells bodies sizes were measured using ImageJ (NIH).

#### ***Electromyography***

Mice were anesthetized with a solution of Ketamine/Xylazine (100 mg/kg; 5 mg/kg) and kept under a heating mat to maintain a physiological muscle temperature ( $\pm 31^\circ\text{C}$ ).

Electrical activity was monitored on the muscles of both limbs for at least 2 min as previously described<sup>19</sup>.

### ***Neuromuscular junctions staining and morphological analysis***

Tibialis anterior muscles were dissected into bundles and processed for immunofluorescence with a rabbit anti-synaptophysin antibody, a rabbit anti-neurofilament antibody (Eurogentec) followed by Alexa-conjugated donkey anti-rabbit 488 (Jackson) and rhodamine-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (Sigma-Aldrich), as previously described<sup>49</sup>. Neuromuscular junctions (NMJs) analysis was performed by an independent age and genotype-blinded observer, directly under an AxioImager.M2 microscope (Zeiss) equipped with a high-resolution B/W camera (Hamamatsu) and run by the ZEN 2 software (Zeiss). On average 500 NMJs per animal were examined. NMJs were considered partially denervated when the presynaptic nerve terminal labelled with synaptophysin was partially observed from the postsynaptic region labelled with  $\alpha$ -bungarotoxin, and denervated when the presynaptic nerve terminal was totally absent. Representative NMJs were imaged using the same microscope setting.

### ***Statistical analyses***

Data are expressed as the means  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad, CA). Multiple t tests corrected for multiple comparisons using the Holm-Šídák method were used to analyse CSN and MN quantifications and occurrences of denervated NMJ and positive EMG recordings.

### ***CSN and CPN purification***

For FACS experiments, CSN from *Sod1*<sup>G86R</sup> mice and their wild-type littermates were

retrogradely labelled using Green IX Retrobeads (Lumafluor) injected at 25 days of age with the same protocol as for Fluorogold injection. Purification of CSN and CPN were performed in parallel from same WT or *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 30, 60, 90 and 105 days of age. Mice were deeply anesthetized with by an i.p. injection of Ketamine/Xylazine (100 mg/kg; 5 mg/kg) before decapitation. The brains were sectioned in a stainless steel coronal brain matrix (Harvard Apparatus, MA), and 1 mm-thick sections were transferred under a fluorescence SMZ18 microscope (Nikon). The layer V containing labelled CSN and the upper layer II/III above were microdissected from 4 coronal sections and collected in separate tubes filled with iced HABG (Hibernate A (BrainBits UK), B27, Glutamax (Gibco) and 0.1N NaOH ). The microdissected tissues were enzymatically digested with 34 U/ml papain at 37°C for 30 min. Cells were mechanically dissociated by gentle trituration in iced HABG, filtered through 70 µm cell strainer (BD Falcon) and subjected to density centrifugation through a three-density step gradient of Percoll (Sigma, MO) as previously described<sup>50</sup>. Upon centrifugation, the cell pellets were resuspended in cold 0.01 PBS and fixed with 70% EtOH for 30 min at 4°C. Fixed cells were centrifugated to eliminate EtOH and resuspended in 0.01 M PBS complemented with RNase inhibitors (Promega). Microsphere-labelled CSN were purified using the FACS AriaII (BD Biosciences), based on their fluorescence, size and granularity. Unlabelled CPN were purified by FACS, based on their size and granularity. Approximately 2 000 CSN and exactly 2 000 CPN were be obtained from each adult mouse brain and were used as individual biological replicates for RNA sequencing. Upon purification, neurons were centrifugated and frozen as cell pellets.

### ***RNA sequencing***

Full length cDNA were generated from frozen cell pellets using the SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit for Sequencing (Clontech, CA) according to the manufacturer's

instructions. 11 cycles of cDNA amplification were performed using the Seq-Amp polymerase. 600 ng of pre-amplified cDNA were then used as input for Tn5 transposon tagmentation by the Nextera XT kit (Illumina) followed by 12 cycles of library amplification. Following purification using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter), the size and concentration of the libraries were assessed on an Agilent 2100 Bioanalyzer. The libraries were then loaded in the flow cell at a concentration of 3 nM, clusters were generated by using the Cbot and sequenced on the Illumina HiSeq 4000 system as paired-end 2x50-base reads, following Illumina's instructions.

#### ***Data repository***

RNAseq data have been deposited in the ArrayExpress database at EMBL-EBI under accession number E-MTAB-7876 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-7876/>).

#### ***RNA sequencing, gene set enrichment, gene network and differential alternative splicing analyses***

Reads were mapped onto the mm10 assembly of mouse genome using Tophat v2.0.14<sup>51</sup> and bowtie v2.1.0 aligner. Gene expression was quantified using HTSeq v0.6.1<sup>52</sup> and gene annotations from Ensembl release 84. Hierarchical clustering of samples was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient as the distance measure<sup>53</sup>. Comparisons between the *Sod1*<sup>G86R</sup> and WT CSN, and between *Sod1*<sup>G86R</sup> and WT CPN samples across ages, and between *Sod1*<sup>G86R</sup> and WT CSN at each age were performed using the method proposed by Love et al.<sup>54</sup> implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.6.3). Thresholds of  $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$  and adjusted p value  $< 0.05$  were chosen to identify significantly

differentially expressed genes. GSEA<sup>26</sup> was performed on a pre-ranked list of 29,017 genes significantly dysregulated in CSN and not CPN, and with an FPKM >14 in more than 90% of samples, using  $-\log_{10}$  of the pvalue x sign of the  $\log_2$ Fold-Change as ranking metric, and the gene set database of Biological Process Ontology (version 2.5) from the MSigDB collections. Enrichment Maps were generated with Cytoscape<sup>55</sup>. Differential alternative splicing analysis was performed using rMATS version 3.2.5<sup>27</sup> on alignments performed with STAR 2.5.3a<sup>56</sup>, and splicing with reads that span splicing junctions were considered for further analysis, using the threshold of FDR < 0.05. GSEA analysis was performed on a list of 1,163 mis-spliced genes, using  $-\log_{10}$  of the FDR as ranking metric. Sashimi plots were generated with *rmats2sashimiplo*<sup>27</sup>.

#### ***Fluidigm Validation***

High-throughput qPCR validation was carried out on the Fluidigm's Biomark HD system, according to the manufacturer's protocol. Specifically, 100 ng of RNA were reverse-transcribed using the Reverse Transcription Master Mix Kit (Fluidigm). cDNA was then pre-amplified using 50 nM pooled primer mixture and the PreAmp Master Mix Kit (Fluidigm) for 14 cycles. Unincorporated primers were removed with 8U of Exonuclease I (NEB) and the reaction products were diluted 5-fold in TE Buffer. The treated cDNA's were combined with SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX (Bio-Rad) and loaded onto a 96.96 Dynamic Array integrated fluidic circuit (Fluidigm). Primers used were:

*Aars*, F: TGGTTTCTGGTGGACTTGCAG - R: AAGTCTCCTCGGGAACCTTAGC

*Dars*, F: TCGAGTTAAGGACCTGACAGT - R: CACTGCTTCCCTTTTGCTCT

*Ddx20*, F: TGCACAGCAGAGCTCAACAT - R: GCATCAAGGCGCTGATTCTG

*Eif2b5*, F: GCCACCAACAGGGTTCTTCA - R: CCTGGAACAGGCTCAATGGAA

*Eif3h*, F: AGATCGACGGCCTGGTAGTAT - R: CCTGAACAACCTCAGTGCCT

*Eif4a2*, F: TAGTATTGGCCCCCACCAGA - R: AGCATGACAAGTTGCTCCCA

*Eif4g2*, F: TTATGAAAAGCCAGGGGCTAAG - R: CCGAGGTGGCATATCCTTCG  
*Gemin8*, F: CAACTGGAGGGCTAGTGCAT - R: GCATCCAAAGCATTGCGTGAT  
*Kars*, F: AGCAAGAAGTGGTGGTAATCAGT - R: CCCTAACAAGCCTGACAGCA  
*Nsun2*, F: GAGCGATGCCTTCGAATCCT – R: GACGTTTGTTCACGGCATT  
*Ppprf31*, F: CAGCTCGTGTGGACAGCTT - R: GCTCAATCTCATCCTTTAGTTCGT  
*Sars*, F: CGTTTCTCTACACAGAACAAGTTGA - R: GGACAAACTCCACCTTCTTGG  
*Sf3bp4*, F: GGTGCTGCTGCTTAGAGACG – R: TACACCGTGGCATCCTGATT  
*Slbp*, F: CCTGAAAGCTTTACAACCTCCTGA – R: ATCTTCTTCAACTGCACTGGC  
*Snrpb*, F: CCCACCTCCAGGCATTATGG - R: TGCCTATAGGTGTCCCACGA  
*Trnt1*, F: GTAAGCGGGTCTTCGGAGTA – R: CGCCAATCACACATGCTGC

## References

1. Brown, R. H. & Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **377**, 162–172 (2017).
2. van Es, M. A. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* **390**, 2084–2098 (2017).
3. Taylor, J. P., Brown, R. H. & Cleveland, D. W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* **539**, 197–206 (2016).
4. Weishaupt, J. H., Hyman, T. & Dikic, I. Common Molecular Pathways in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Trends Mol. Med.* **22**, 769–783 (2016).
5. Eisen, A. *et al.* Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **88**, jnnp–2017–315573 (2017).
6. Geevasinga, N., Menon, P., Özdinler, P. H., Kiernan, M. C. & Vucic, S. Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat. Rev. Neurol.* 1–11 (2016).
7. Ling, S.-C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* **79**, 416–438 (2013).
8. Braak, H. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis—a model of corticofugal axonal spread. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 708–714 (2013).
9. Brettschneider, J. *et al.* Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* **74**, 20–38 (2013).
10. Kassubek, J. *et al.* Diffusion tensor imaging analysis of sequential spreading of disease in amyotrophic lateral sclerosis confirms patterns of TDP-43 pathology. *Brain* **137**, 1733–1740 (2014).
11. Vucic, S. & Kiernan, M. C. Transcranial Magnetic Stimulation for the Assessment of

- Neurodegenerative Disease. *Neurotherapeutics* 1–16 (2017).
12. Zang, D. W. & Cheema, S. S. Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1. *Neurosci. Lett.* **332**, 99–102 (2002).
  13. Ozdinler, P. H. *et al.* Corticospinal Motor Neurons and Related Subcerebral Projection Neurons Undergo Early and Specific Neurodegeneration in hSOD1G93A Transgenic ALS Mice. *J. Neurosci.* **31**, 4166–4177 (2011).
  14. Yasvoina, M. V. *et al.* eGFP Expression under UCHL1 Promoter Genetically Labels Corticospinal Motor Neurons and a Subpopulation of Degeneration-Resistant Spinal Motor Neurons in an ALS Mouse Model. *J. Neurosci.* **33**, 7890–7904 (2013).
  15. Handley, E. E. *et al.* Synapse Dysfunction of Layer V Pyramidal Neurons Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model of TDP-43 Proteinopathies. *Cerebral Cortex* **27**, 3630–3647 (2017).
  16. Fil, D. *et al.* Mutant Profilin1 transgenic mice recapitulate cardinal features of motor neuron disease. *Hum. Molecul. Genet.* **364**, ddw429 (2016).
  17. Liu, Y. *et al.* C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron* **90**, 521–534 (2016).
  18. Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H. & Gordon, J. W. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *PNAS* **92**, 689–693 (1995).
  19. Rouaux, C. *et al.* 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. *J. Neurosci.* **27**, 5535–5545 (2007).
  20. Arlotta, P. *et al.* Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor

- neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207–221 (2005).
21. Ayling, O. G. S., Harrison, T. C., Boyd, J. D., Goroshkov, A. & Murphy, T. H. Automated light-based mapping of motor cortex by photoactivation of channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Nat. Methods* **6**, 219–224 (2009).
  22. Kamiyama, T. *et al.* Corticospinal Tract Development and Spinal Cord Innervation Differ between Cervical and Lumbar Targets. *J. Neurosci.* **35**, 1181–1191 (2015).
  23. Fischer, L. R. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* **185**, 232–240 (2004).
  24. Molyneaux, B. J. *et al.* Novel subtype-specific genes identify distinct subpopulations of callosal projection neurons. *J. Neurosci.* **29**, 12343–12354 (2009).
  25. Ye, Z. *et al.* Instructing Perisomatic Inhibition by Direct Lineage Reprogramming of Neocortical Projection Neurons. *Neuron* **88**, 475–483 (2015).
  26. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS* **102**, 15545–15550 (2005).
  27. Shen, S. *et al.* rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *PNAS* **111**, E5593–E5601 (2014).
  28. Lagier-Tourenne, C. *et al.* Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat. Neuro.* **15**, 1488–1497 (2012).
  29. Polymenidou, M. *et al.* Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat. Neuro.* **14**, 459–468 (2011).
  30. Raj, T. *et al.* Integrative transcriptome analyses of the aging brain implicate altered splicing in Alzheimer’s disease susceptibility. *Nat. Genet.* **50**, 1584–1592 (2018).
  31. Boumil, R. M. *et al.* A Missense Mutation in a Highly Conserved Alternate Exon of

- Dynammin-1 Causes Epilepsy in Fitful Mice. *PLoS Genet.* **6**, e1001046 (2010).
32. Gupta, A. R. *et al.* Rare deleterious mutations of the gene EFR3A in autism spectrum disorders. **5**, 1–14 (2014).
  33. Marui, T. *et al.* Association of the neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) gene variants with autism. *Int. J. Neuropsychopharm.* **12**, 1 (2008).
  34. Ravits, J. M. & La Spada, A. R. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread. *Neurology* **73**, 805–811 (2009).
  35. Mochizuki, Y., Mizutani, T., Shimizu, T. & Kawata, A. Neuroscience Letters. *Neurosci. Lett.* **503**, 73–75 (2011).
  36. Ravits, J., Paul, P. & Jorg, C. Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology* **68**, 1571–1575 (2007).
  37. Zhang, Q. *et al.* Side of Limb-Onset Predicts Laterality of Gray Matter Loss in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–11 (2014).
  38. Swinnen, B. & Robberecht, W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 661–670 (2014).
  39. Millecamps, S. *et al.* SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J. Med. Genet.* **47**, 554–560 (2010).
  40. Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L. & Loeffler, J.-P. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *PNAS* 1–6 (2004).
  41. Caballero-Hernandez, D. *et al.* The ‘Omics’ of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Trends Mol. Med.* 1–15 (2015).

42. Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M. & Shaw, P. J. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 616–630 (2011).
43. Molyneaux, B. J. *et al.* DeCoN: Genome-wide Analysis of In Vivo Transcriptional Dynamics during Pyramidal Neuron Fate Selection in Neocortex. *Neuron* **85**, 275–288 (2014).
44. Kulkarni, A., Anderson, A. G., Merullo, D. P. & Konopka, G. ScienceDirectBeyond bulk: a review of single cell transcriptomics methodologies and applications. *Cur. Opin. Biotechnol.* **58**, 129–136 (2019).
45. Prudencio, M. *et al.* Distinct brain transcriptome profiles in C9orf72-associated and sporadic ALS. *Nat. Neurosci.* **18**, 1175–1182 (2015).
46. Andrés-Benito, P., Moreno, J., Aso, E., Povedano, M. & Ferrer, I. Amyotrophic lateral sclerosis, gene deregulation in the anterior horn of the spinal cord and frontal cortex area 8: implications in frontotemporal lobar degeneration. *Aging* **9**, 823–851 (2017).
47. Kim, J. *et al.* Changes in the Excitability of Neocortical Neurons in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis Are Not Specific to Corticospinal Neurons and Are Modulated by Advancing Disease. *J. Neurosci.* **37**, 9037–9053 (2017).
48. Lodato, S. *et al.* Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* **69**, 763–779 (2011).
49. Scekic-Zahirovic, J. *et al.* Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J.* **35**, 1077–1097 (2016).
50. Guez-Barber, D. *et al.* Journal of Neuroscience Methods. *J. Neurosci. Methods* **203**, 10–18 (2012).

51. Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* **14**, R36 (2013).
52. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq — A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
53. Schulze, S. K., Kanwar, R., Izenleuchter, M. G., Therneau, T. M. & Beutler, A. S. SERE: Single-parameter quality control and sample comparison for RNA-Seq. *BMC Genomics* **13**, 1–1 (2012).
54. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 31 (2014).
55. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome e Reserach* **13**, 2498–2504 (2003).
56. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2012).

### **Acknowledgements**

The work has been supported by an ERC starting grant #639737, a Marie Curie career integration grant #618764, an AFM-Telethon trampoline grant #16923 and a Neurex grant to CR, as well as an Inserm/Région Alsace PhD fellowship to CM. Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the “France Génomique” consortium (ANR-10-INBS-0009). The authors are thankful to Drs Luc Dupuis, Jose-Luis Gonzalez de Aguilar, Simona Lodato and Guillaume Tena for critical reading of the manuscript and insightful comments.

## Figure Legends

### Figure 1: CSN progressively degenerate in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice.

**a.** Schematic of the experimental design: CSN were retrogradely labelled upon Fluorogold (FG) injection into the cervical portion of the spinal cord. Ages of injection and harvesting are indicated. **b.** Representative negatives of fluorescence images of brain coronal sections (Bregma 0.74 mm) showing Fluorogold-labelled CSN in the cerebral cortex of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice of 60, 75, 90 and 105 days of age (d) or end stage (ES). Red shapes indicate the positions where close-ups were acquired. **c.** Close-ups showing the progressive loss of labelled CSN over time in the cerebral cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (lower panels) compared to their wild-type littermates (upper panels). **d.** Bar graph representing the average number of CSN present on 8 equally spaced coronal sections along the rostro-caudal axis, matched between *Sod1<sup>G86R</sup>* (orange) and wild-type mice (grey). Note the progressive loss of labelled CSN in the brain of *Sod1<sup>G86R</sup>* animals. \*\*\*  $p < 0.001$  in multiple t tests. Scale bars: 200  $\mu\text{m}$  in **b.** and 50  $\mu\text{m}$  in **c.**

### Figure 2: In *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, CSN degeneration starts caudally and progresses rostrally

Graphs representing the average number of Fluorogold-labelled CSN counted on both hemispheres of equally spaced coronal sections 2 (Bregma 2.10 mm) to 9 (Bregma -1.70 mm) of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) and their wild-type littermates (grey) at 60, 75, 90 and 105 days of age (d) or end stage (ES). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  in multiple t-tests.

### Figure 3: Lumbar-projecting CSN degenerate before lumbar MN

**a.** Schematic of the experimental design: CSN were retrogradely labelled upon Fluorogold (FG) injection into the lumbar portion of the spinal cord. Ages of injection and harvesting are indicated. **b.** Bars graph representing the average number of CSN present on 3 equally spaced

caudal coronal sections matched between *Sod1<sup>G86R</sup>* (orange) and wild-type mice (grey), at 60, 75, 90 and 105 days of age (d) or at end stage (ES). Note the early and progressive loss of labelled CSN in the brain of *Sod1<sup>G86R</sup>* animals. **c.** Representative negatives of fluorescence images of brain coronal sections (Bregma -1.06 mm) showing the decreased number of Fluorogold-labelled CSN in the cerebral cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 60 days of age and at end stage (ES) compared to their wild-type littermates. **d.** Representative images of coronal sections of the spinal cord of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 60 and 105 days (d) or end stage (ES), showing Choline AcetylTransferase-positive neurons (ChAT) present in the ventral horn of the spinal cord. Arrows indicate large ChAT-positive neurons, arrowheads indicate smaller or shrunk ChAT-positive neurons. **e.** Bar graph representing the average number of ChAT-positive neurons counted in the ventral horn of lumbar spinal cord sections of wild-type (grey) and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) at 60, 75, 90 and 105 days of age end stage (ES). **f.** Bar graph representing the average number of large ChAT-positive neurons, with an area  $\geq 400 \mu\text{m}^2$ , counted in the ventral horn of lumbar spinal cord sections from wild-type (grey) and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) at 60, 75, 90 and 105 days of age or end stage (ES). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  in multiple t-tests. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  in c. and 50  $\mu\text{m}$  in d.

**Figure 4: Isolation of CSN and CPN from individual adult wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mouse brains for RNAseq time course analysis**

**a.** Schematic representation of the experimental design: CSN were retrogradely labelled upon green fluorescent microbeads injection into the cervical portion of the spinal cord. The brains were then sectioned coronally to allow the microdissection of the layers II/III and V separately, followed by dissociation of the tissues and FACS purification of the CSN and CPN populations. **b.** Schematic representation of the ages of CSN labellings, and CSN and CPN harvestings. **c.** Representative fluorescence image of a brain coronal section upon CSN

retrograde labelling, showing green fluorescent microbeads-labelled CSN within the layer V of the motor and somatosensory areas, and indicating the two microdissected areas (left, green and grey boxes; scale bar: 200  $\mu$ m), along with representative FACS plots (right) of CPN (top) and CSN (bottom) purifications. RFP: Red Fluorescent protein; GFP: Green Fluorescent Protein; SSC: Side scatter; FSC: Forward scatter. **d.** Heatmap with unsupervised clustering of 45,337 mRNA transcripts in 57 samples calculated on the SERE coefficient that quantifies global RNA-seq sample differences. Shades of green or red identify wild-type versus *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN samples respectively across ages. Shades of blue or pink to identify wild-type versus *Sod1<sup>G86R</sup>* CPN samples respectively across ages. **e.** Heatmap of gene expression patterns for known subtype-specific genes confirms the identities of the two isolated neuronal populations, across genotypes and ages.

**Figure 5: Disease progression differentially affects the transcriptomes of CSN and CPN in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice**

**a.** Principal component analyses ran on 45,337 mRNA transcripts in  $n = 29$  CSN (left) and 28 CPN samples (right). Triangles represent CSN, with shades of green or red to identify wild-type versus *Sod1<sup>G86R</sup>* samples respectively. Circles represent CPN with shades of blue or pink to identify wild-type versus *Sod1<sup>G86R</sup>* samples respectively across ages. The dotted line highlights the segregation of *Sod1<sup>G86R</sup>* versus wild-type CSN. **b.** p-values histograms of CSN (green, left) versus CPN samples (grey, right), showing the large proportion of significantly dysregulated genes amongst CSN samples as opposed to CPN samples. Inserts represent the mean expression over replicate samples of *Sod1* mRNA across ages and genotypes for CSN (left) and CPN (right). **c.** Volcano plots of t-statistics, obtained upon exclusion of the overexpressed *Sod1* gene, showing the differential expression of genes between *Sod1<sup>G86R</sup>* and wild-type CSN at 30, 60, 90 and 105 days. For a better visualisation of these plots, *Sod1* and *Gm8566* genes have not been represented. Orange and blue dots respectively correspond to

significantly up- and down-regulated genes. **d.** Venn diagrams showing the relative numbers of significantly dysregulated genes in the two neuronal populations, CSN in green and CPN in grey, at each age analysed. Upper halves of the circles over the orange background correspond to up-regulated genes, lower halves over the blue background to down-regulated ones.

**Figure 6: Gene Set Enrichment Analysis of diseased CSN reveals altered RNA metabolism**

**a.** Gene set enrichment analysis (GSEA) of 29,017 ranked genes for GO terms of Biological Processes. The 15 most enriched positive (orange) and negative (blue) categories are listed according to their normalized enrichment score (NES) and False Discovery Rate (FDR), and the numbers of corresponding genes (Size) are indicated. Arrows indicate the redundancy and overrepresentation of GO terms related to RNA metabolism. **b.** Enrichment map representing the first sub-network identified with cytoscape. Nodes represent gene sets, and their size is proportional to the number of corresponding genes. Edges represent overlaps between gene sets, and their width is proportional to the number of overlapping genes. Node colour and intensity vary with the corresponding NES: orange for positive and blue for negative NES respectively, the darker the higher. Dotted blue line circles the GO terms linked to RNA metabolism. **c.** Heatmap of expression patterns of genes involved in RNA metabolism and identified by gene set enrichment analysis. Asterisks indicate genes related to motoneuron and/or neurodevelopmental diseases. **d.** Schematic representation of the microdissected layers V from 60 day-old wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mouse brains (left) and validation of candidate genes by high throughput qPCR (graph bar, right). **d.** Schematic representation of the microdissected cortical plate from E14.5 wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* embryos (left) and validation

of candidate genes by high throughput qPCR (graph bar, right). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  between wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* samples.

**Figure 7: *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN degeneration is correlated with numerous alternative splicing events that mostly affect neuronal genes.**

**a.** Schematic representation of the different alternative splicing events (left panel) identified between 90 day-old wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN samples, and the corresponding number of events for each type (right bar graph). **b.** Gene set enrichment analysis (GSEA) of 1,163 ranked genes for GO terms of Biological Processes. The 20 most enriched categories are listed according to their normalized enrichment score (NES) and p-value, and the numbers of corresponding genes (Size) are indicated. Arrows indicate the redundancy and overrepresentation of GO terms related to neuronal development and function. **c.** Sashimi plots representing alternative splicing events identified between wild-type (blue) and *Sod1<sup>G86R</sup>* (orange) CSN samples for four selected genes: *Dnm1*, *Picalm*, *Ppp1r9a*, *Efr3a*, *Vldlr* and *Macf1*. Chromosomal positions are indicated below each graph, and relevant exons are represented as black boxes. Arrows indicate significant alternative splicing event.

**Supplementary Figure 1: Retrograde labelling of CSN upon Fluorogold injection in the cervical portion of the spinal cord**

Representative negative fluorescence images of brain coronal sections numbered 1 (Bregma 2.58 mm) to 10 (Bregma -2.30 mm) showing Fluorogold-labelled CSN in the cerebral cortex of a 90 day-old wild-type mouse. Upon Fluorogold injection into the cervical portion of the dorsal funiculus, labelled CSN were consistently observed from section 2 (Bregma 2.10 mm) to 9 (Bregma -1.70 mm). Scale bar: 1 mm.

**Supplementary Figure 2: The population of *Crym*-positive neurons progressively disappears from the layer V of the motor cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice**

**a.** Representative images of *in situ* hybridization on brain coronal sections (Bregma 0.14 mm) of end stage *Sod1<sup>G86R</sup>* and 115 day-old wild-type control mice showing decreased *Crym* expression in the layer V of the cerebral cortex. Dotted red rectangles indicate the areas where *Crym*-positive neurons were counted. **b.** Close-ups of the M1 area. **c.** Bar graph representing the percentage of *Crym*-positive neurons in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) relative to their wild-type littermates (grey) at 60, 90, 105 and 115 days (d) of age or end stage (ES). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Scale Bar = 200 $\mu$ m in a. and 100 $\mu$ m in b.

**Supplementary Figure 3: Retrograde labelling of CSN upon Fluorogold injection in the lumbar portion of the spinal cord**

Representative negative fluorescence images of brain coronal sections numbered 1 (Bregma 2.58 mm) to 10 (Bregma -2.30 mm) showing Fluorogold-labelled CSN in the cerebral cortex of a 90 day-old wild-type mouse. Upon Fluorogold injection into the lumbar portion of the dorsal funiculus, labelled CSN were consistently observed from section 7 (Bregma -0.46 mm) to 9 (Bregma -1.70 mm). Scale bar: 1 mm.

**Supplementary Figure 4: In *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, NMJ denervation starts after 75 days**

**a.** Bar graph representing the proportion of animals with electromyography (EMG) recordings of denervated (orange) or innervated (grey) muscles. **b.** Representative electromyography recordings of innervated (left) and denervated (right) muscles. **c.** Bar graph representing the average proportions of innervated (grey), partly denervated (orange) or fully denervated (red) neuromuscular junctions (NMJ) upon staining and microscopy analysis of one tibialis anterior muscle of wild-type *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 60, 75, 90 and 105 days of age or end stage (ES). **d.**

Representative maximum intensity projection images of z-stacks of typical innervated, partly or fully denervated NMJ from 90 day-old *Sod1<sup>G86R</sup>* and wild-type mice. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  in multiple t-test. Scale Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

**Supplementary Figure 5: In *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, the number of CUX-2 positive CPN remains stable over time**

**a.** Representative fluorescence images of CUX2 staining on brain coronal sections from 60 day-old wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. **b.** Representative close-ups of CUX2 staining on brain coronal sections from wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice of 60, 75, 90 or 105 days (d) of age of end-stage (ES). **c.** Bar graph representing the average number of CUX2-positive nuclei on close-ups of matched brain coronal sections from *Sod1<sup>G86R</sup>* (orange) and wild-type mice (grey). \*\*\*  $p < 0.001$  in multiple t-tests. Scale bars: 200  $\mu\text{m}$  in a. and 50  $\mu\text{m}$  in c.

**Supplementary Figure 6: Enrichment map.**

Nodes represent gene sets, and their size is proportional to the number of corresponding genes. Edges represent overlaps between gene sets, and their width is proportional to the number of overlapping genes. Node colour and intensity vary with the corresponding NES: orange for positive and blue for negative NES respectively, the darker the higher. The dotted line circles the GO terms linked to RNA metabolism.

**Supplementary Table 1**

GSEA analysis of transcriptomic data: Gene Ontology (GO) terms for Biological Processes (BP), Cellular Components (CC) and Molecular Functions (MF).

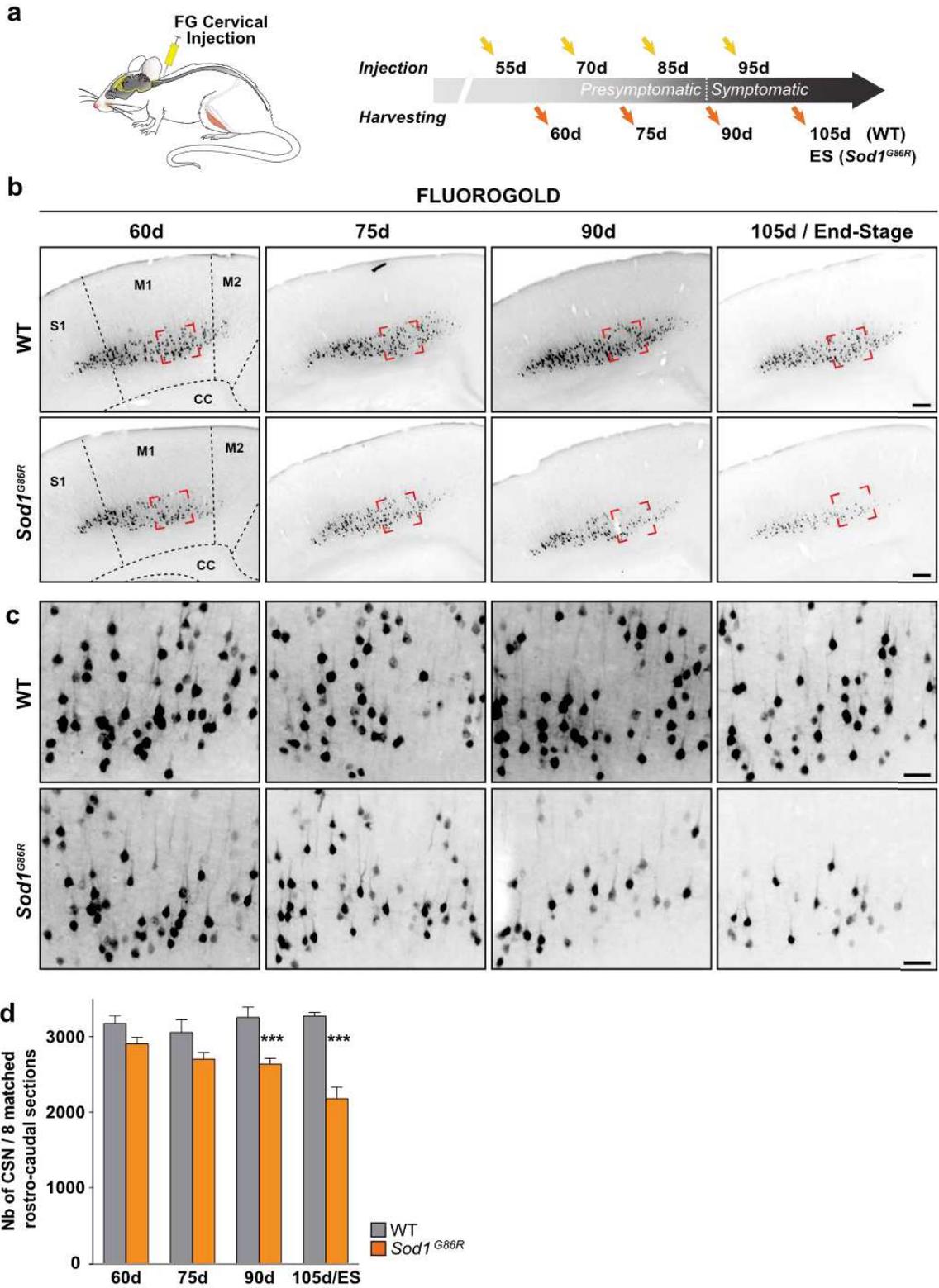
**Supplementary Table 2**

Genes involved in RNA metabolism and already linked to motoneuron and/or neurodevelopmental diseases.

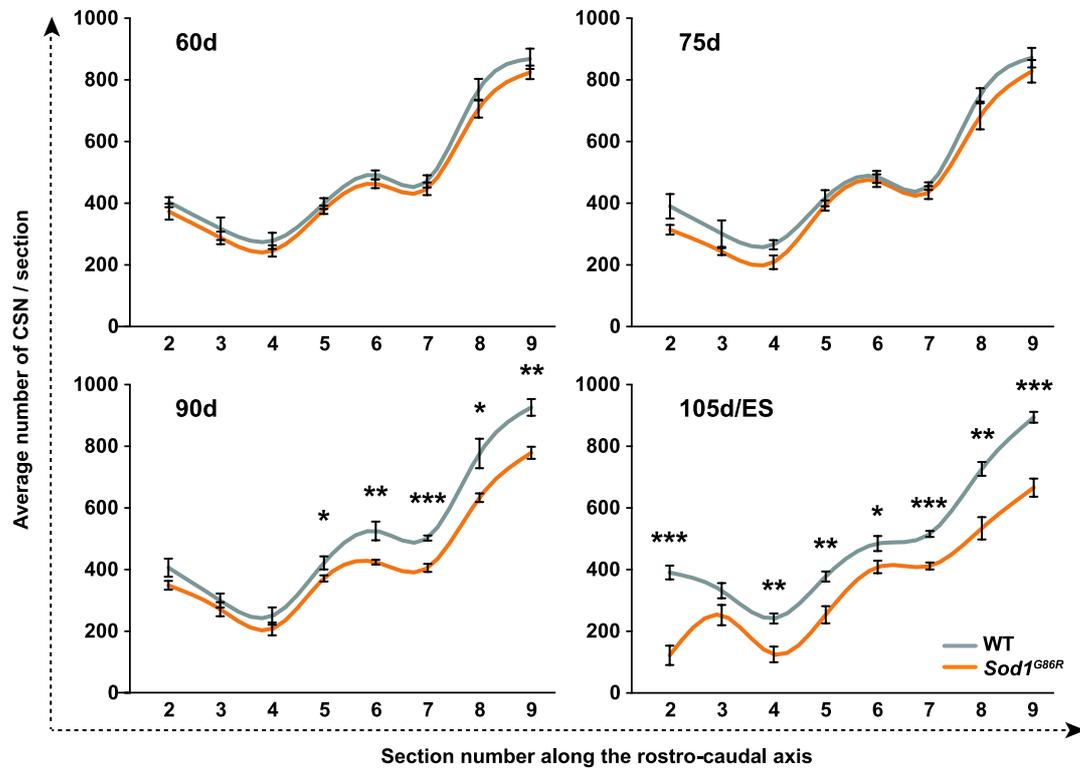
**Supplementary Table 3**

GSEA analysis of 1,163 ranked mis-spliced genes, for the GO terms Biological Process, Cellular Component and Molecular Function.

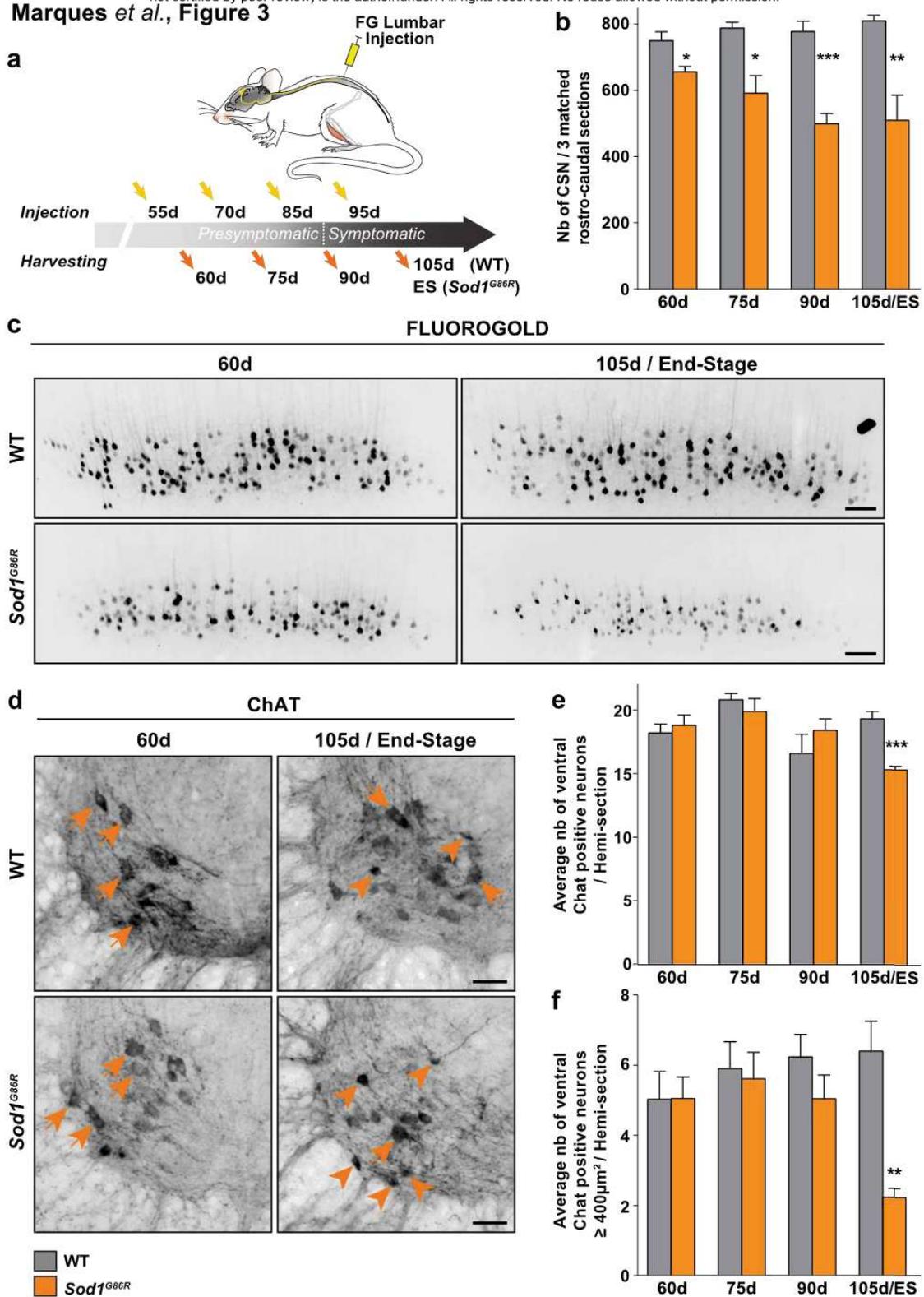
**Marques et al., Figure 1**



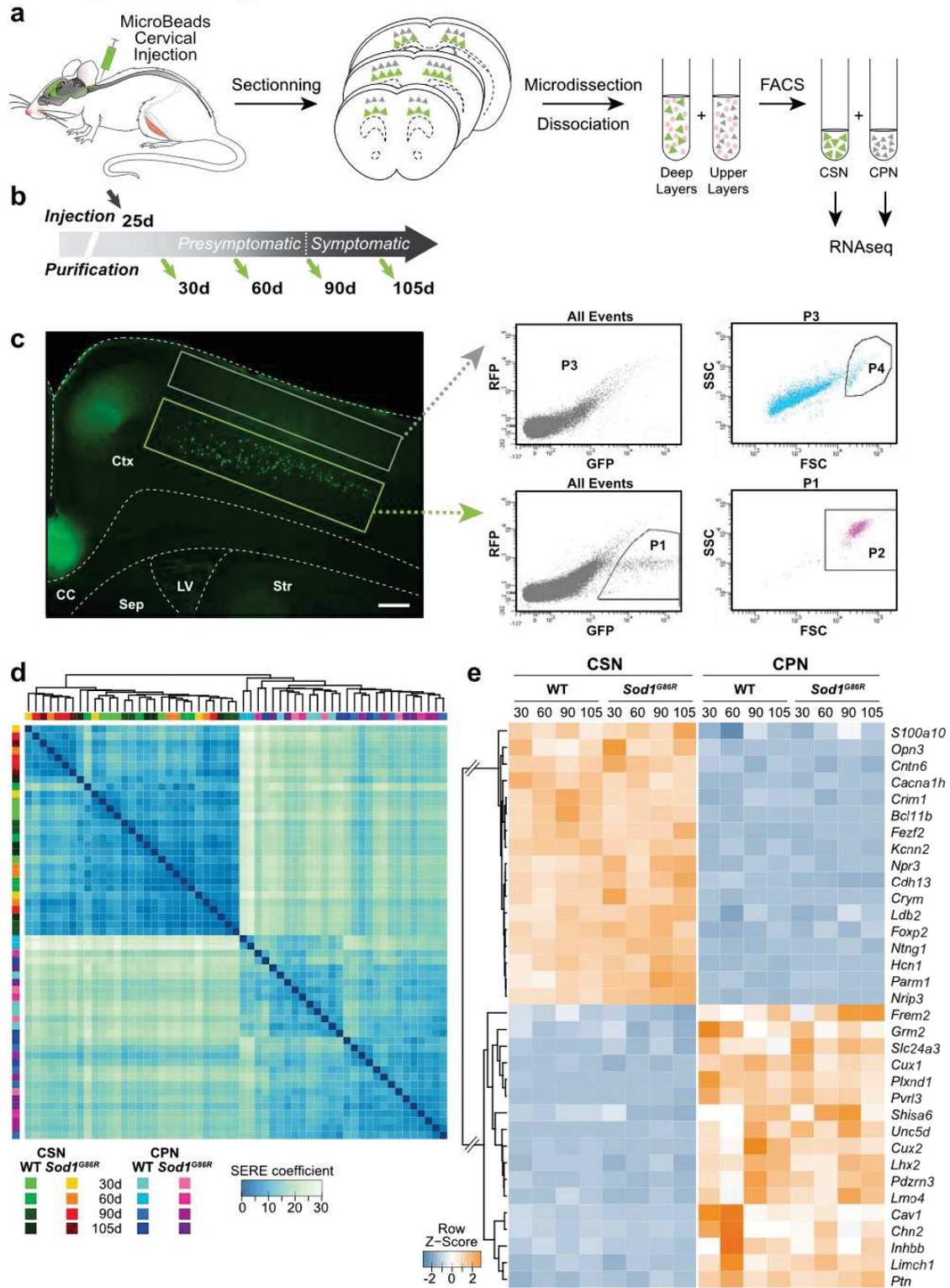
Marques *et al.*, Figure 2



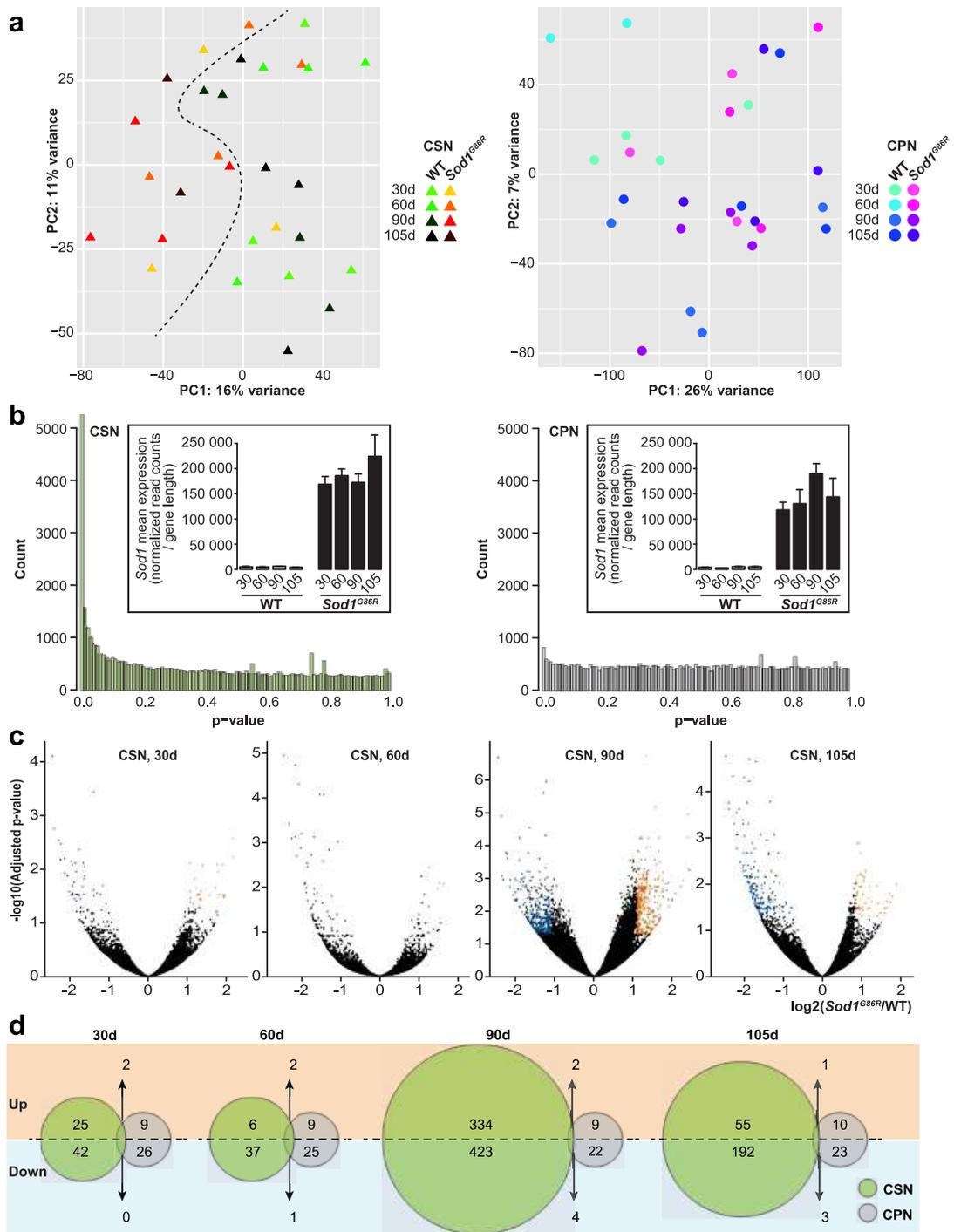
**Marques et al., Figure 3**



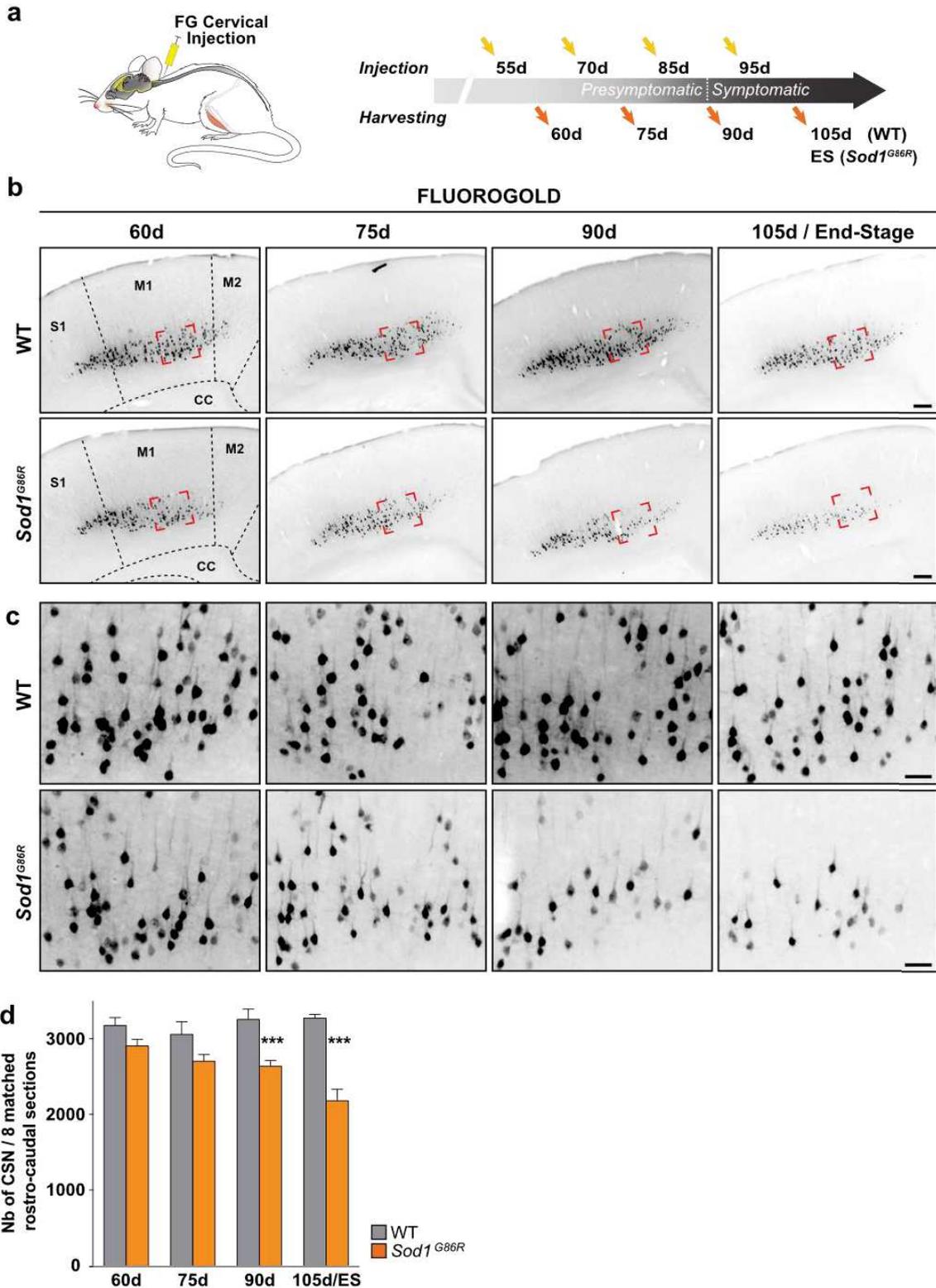
### Marques *et al.*, Figure 4



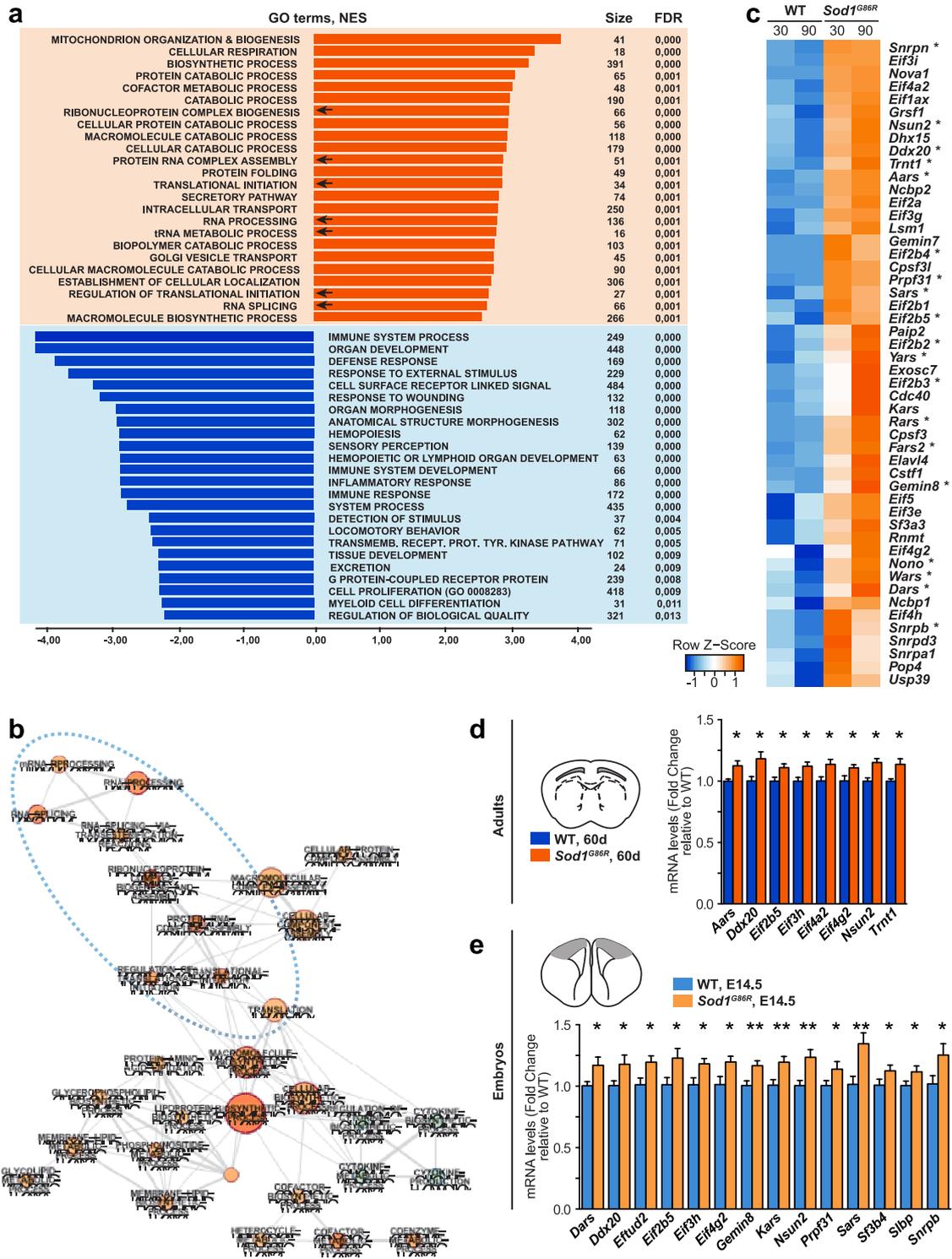
### Marques *et al.*, Figure 5



**Marques et al., Figure 1**



## Marques *et al.*, Figure 6



**Burg et al. 2020 – Absence of subcerebral projection neurons is beneficial in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis**

# Absence of Subcerebral Projection Neurons Is Beneficial in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Thibaut Burg, PhD <sup>1</sup>, Charlotte Bichara, MSc,<sup>2</sup> Jelena Scekic-Zahirovic, MD, PhD,<sup>1</sup> Mathieu Fischer, MSc <sup>1†</sup>, Geoffrey Stuart-Lopez, MSc,<sup>1</sup> Aurore Brunet, MSc,<sup>1</sup> François Lefebvre, MD, PhD,<sup>3</sup> Matilde Cordero-Erausquin, PhD,<sup>2</sup> and Caroline Rouaux, PhD <sup>1†</sup>

**Objective:** Recent studies carried out on amyotrophic lateral sclerosis patients suggest that the disease might initiate in the motor cortex and spread to its targets along the corticofugal tracts. In this study, we aimed to test the corticofugal hypothesis of amyotrophic lateral sclerosis experimentally.

**Methods:** *Sod1*<sup>G86R</sup> and *Fezf2* knockout mouse lines were crossed to generate a model that expresses a mutant of the murine *Sod1* gene ubiquitously, a condition sufficient to induce progressive motor symptoms and premature death, but genetically lacks corticospinal neurons and other subcerebral projection neurons, one of the main populations of corticofugal neurons. Disease onset and survival were recorded, and weight and motor behavior were followed longitudinally. Hyper-reflexia and spasticity were monitored using electromyographic recordings. Neurodegeneration and gliosis were assessed by histological techniques.

**Results:** Absence of subcerebral projection neurons delayed disease onset, reduced weight loss and motor impairment, and increased survival without modifying disease duration. Absence of corticospinal neurons also limited presymptomatic hyper-reflexia, a typical component of the upper motoneuron syndrome.

**Interpretation:** Major corticofugal tracts are crucial to the onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis. In the context of the disease, subcerebral projection neurons might carry detrimental signals to their downstream targets. In its entirety, this study provides the first experimental arguments in favor of the corticofugal hypothesis of amyotrophic lateral sclerosis.

ANN NEUROL 2020;88:688–702

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease characterized by rapidly progressing muscle atrophy and paralysis, leading to death within only 2 to 5 years of diagnosis. Clinically and histologically, ALS is defined as the progressive loss of two neuronal populations: corticospinal and corticobulbar neurons (CSN) in the motor cortex, and spinal and bulbar

motoneurons (MN) in the brainstem and spinal cord.<sup>1</sup> This duality has fostered a long-standing debate regarding the disease origin along the corticospinal axis.<sup>2</sup>

Jean-Martin Charcot, who first described ALS, suggested a cortical origin and a propagation from the motor cortex to the spinal cord.<sup>3</sup> Comprehensive clinical examination of patients unraveled signs highly suggestive

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.25833). DOI: 10.1002/ana.25833

Received Dec 6, 2019, and in revised form Jun 23, 2020. Accepted for publication Jun 23, 2020.

Address correspondence to Dr Caroline Rouaux, Inserm UMR\_S 1118, Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France. E-mail: [caroline.rouaux@inserm.fr](mailto:caroline.rouaux@inserm.fr)

<sup>†</sup>Current address: Department of Paediatrics, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, Oxford, UK.

From the <sup>1</sup>Inserm UMR\_S 1118, Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>2</sup>UPR 3212, Institut des neurosciences cellulaires et intégratives, UPR 3212 CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; and <sup>3</sup>GMRC, service de santé publique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Additional supporting information can be found in the online version of this article.

688 © 2020 The Authors. *Annals of Neurology* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American Neurological Association. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

of a cortical origin, such as the split hand syndrome and typical gait abnormalities.<sup>4</sup> Meanwhile, transcranial magnetic stimulation studies identified early hyperexcitability of the motor cortex that is negatively correlated with survival and manifests before disease onset, pointing again to a potentially initiating role of the motor cortex.<sup>5</sup> Cortical hyperexcitability has been proposed to translate into glutamatergic excitotoxicity to downstream targets of the CSN, ie, spinal and bulbar MN, providing a first possible mechanism for propagation.<sup>4</sup> More recently, staging of the TAR DNA binding protein (TARDBP; also known as TDP-43) pathology,<sup>6</sup> a histopathological burden that characterizes most ALS patients, led to the emergence of the so-called corticofugal hypothesis, which proposes a motor cortical origin of the disease and a direct, monosynaptic dissemination of misfolded TDP-43 proteins in a prion-like manner.<sup>7</sup> Although supported by several neuroimaging studies (reviewed by Brunet and colleagues<sup>8</sup>), corticofugal propagation cannot be assessed in patients. We thus reasoned that mouse genetics could prove useful to address a potential cortical origin and corticofugal propagation of ALS directly.

In rodents, as in humans, corticofugal projections arise from two populations: corticothalamic projection neurons and subcerebral projection neurons (SubCerPN) that include the disease-relevant CSN.<sup>9,10</sup> Although major differences exist between primates and rodents regarding the route of the corticospinal tract and the connectivity of CSN onto alpha motoneurons, many mouse models of ALS recapitulate CSN or SubCerPN degeneration (reviewed by Brunet and colleagues<sup>8</sup>). Likewise, we recently showed that *Sod1*<sup>G86R</sup> mice display presymptomatic CSN degeneration and a somatotopic relationship between CSN and spinal motoneuron degeneration,<sup>11</sup> as reported in ALS patients.<sup>12</sup>

Here, we sought to test the contribution SubCerPN to ALS by taking advantage of the *Fezf2* knockout mice that develop in the absence of SubCerPN.<sup>13</sup> These animals lack the gene encoding the transcription factor *Fezf2* (*Fez1*, *Zfp312*) that is both necessary<sup>14</sup> and sufficient to instruct birth and specification of CSN and other SubCerPN.<sup>15,16</sup> *Fezf2*<sup>-/-</sup> mice are hyperactive,<sup>13</sup> present defects of cortical interneuron lamination and unbalanced cortical activity,<sup>17</sup> and fail to feed on solid food.<sup>13</sup> However, when fed soft food, *Fezf2*<sup>-/-</sup> mice do not display any major motor phenotype: they walk and reproduce. We crossbred the *Sod1*<sup>G86R</sup> and *Fezf2*<sup>-/-</sup> mouse lines to generate a model ubiquitously expressing the *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene, a condition sufficient to develop an ALS-like phenotype,<sup>18</sup> but entirely lacking CSN and other SubCerPN, hence challenging the definition of ALS.

An initial report of the findings presented here was published as a preprint on bioRxiv.<sup>19</sup>

## Materials and Methods

### Animals

All animal experiments were performed by authorized investigators and approved by the local ethical committee of Strasbourg University (CREMEAS, agreement #00738.01). Animals, kept 2 to 5 per cages, were housed in the animal facility of the Faculty of Medicine of Strasbourg, with a regular 12 hour/12 hour light/dark cycle, in constant conditions (21 ± 1°C; 60% relative humidity). Food and water were accessible ad libitum. *Fezf2*<sup>-/-</sup> mice<sup>13</sup> were obtained from the Arlotta Laboratory. *Sod1*<sup>G86R</sup> males<sup>18</sup> were crossed with *Fezf2*<sup>-/-</sup> females, and F1 *Fezf2*<sup>-/-</sup>/*Sod1*<sup>G86R</sup> males were crossed with *Fezf2*<sup>-/-</sup>/*WT* females to obtain *Fezf2*<sup>-/-</sup>/*WT* (*WT*, n = 23); *Fezf2*<sup>-/-</sup>/*WT* (*KO*, n = 22); *Fezf2*<sup>-/-</sup>/*Sod1*<sup>G86R</sup> (*Sod1*, n = 14); and *Fezf2*<sup>-/-</sup>/*Sod1*<sup>G86R</sup> (*KO/Sod1*, n = 17). Males were used for survival, behavior, and histology. Males and females, in equal proportions, were used for H-reflex (n = 6 *WT*, n = 6 *KO*, n = *Sod1*, and n = *KO/Sod1*) and histology (75 days: n = 6 *WT*, n = 5 *KO*, n = 6 *Sod1*, and n = 3 *KO/Sod1*; and 105 days: n = 6 *WT*, n = 4 *KO*, n = 8 *Sod1*, and n = 5 *KO/Sod1*).

### Quantitative PCR Analyses

Tissue harvesting, RNA extraction, and qPCR were performed as described by Scekcic-Zahirovic and colleagues<sup>20</sup> using the following primers: *Gusb*, forward, 5'-CGAGTATGGAGCAGACGCA A-3' and reverse, 5'-AGCCTTCTGGTACTCCTCACT-3'; *Actb*, forward, 5'-ATGTGGATCAGCAAGCAGGA-3' and reverse, 5'-AGCTCAGTAACAGTCCGCT-3'; *Hsp90ab1*, forward, 5'-TACTACTCGGCTTTCCCGTCA-3' and reverse, 5'-CCTGAAAGGCAAAGGTCTCCA-3'; *Fezf2*, forward, 5'-GT GCGGCAAGGTGTTCAATG-3' and reverse, 5'-CAGACTTT GCACACAAACGGT-3'; *Sod1*, forward, 5'-GAGACCTGGGC AATGTGACT-3' and reverse, 5'-GTTTACTGCGCAATCCC AAT-3'; and *ChAT*, forward, 5'-CTGCCACCTACCTTC AGTG-3' and reverse, 5'-CCCCAAACCGCTTCAATG-3'.

### Motor Tests and Regression Analyses

Mice were trained from 5 to 8 weeks of age and followed from 9 weeks until death. Motor coordination, endurance, muscle strength, and mouse gait were assessed as previously described.<sup>20</sup> Multiple linear regression analyses were run on R v.3.4.3 with all the relevant packages to include weight and speed as confounding variables. Normality of distributions was tested using the Shapiro-Wilk or the Kolmogorov-Smirnov test and assessed graphically using a normal quantile plot.

### Electromyography, H-Reflex, and Tail Long Lasting Reflex Recordings

All recordings were performed with a standard electromyographic apparatus (Dantec Dynamics, Skovlunde, Denmark) as previously described.<sup>21</sup> Tail spasticity of end-stage mice was determined and quantified as previously described.<sup>22</sup> Signal intensities were measured before and after stimulation, using ImageJ (US,

National Institutes of Health, Bethesda, MD). The H-reflex was assessed on presymptomatic mice aged 80 and 105 days (first and second hindlimb, respectively), by modifying a previously described method,<sup>23</sup> with stimulation of the sciatic nerve and recording in the abductor digiti minimi muscles. The amplitude of the H-reflex, as the peak–trough value of the recording on a 1 millisecond window situated at the expected latency for the H-reflex, was measured between 5 and 8 milliseconds after stimulation. Mice were considered to display an H-reflex when at least 1 of the 2 hindlimbs was positive.

#### Retrograde Labeling of the CSN and Histological Procedures

CSN were retrogradely labeled with Fluorogold as previously described.<sup>14</sup> Animals were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) as described.<sup>20</sup> Nervous tissues were cut into 40- $\mu$ m-thick vibratome sections (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Sections were blocked for 30 minutes with 5% horse serum and 0.5% Triton X-100, incubated with primary antibody overnight, rinsed in phosphate-buffered saline and incubated for 2 hours with secondary antibody (1/500, Jackson Immuno-research, West Grove, PA).

For immunohistochemistry, sections were pretreated for 10 minutes in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and revealed upon 1 hour incubation in Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) with 0.075% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50mM Tris–HCl. Primary antibodies were as follows: goat anti-ChAT (AB144P, 1/50), mouse anti-parvalbumin (MAB1572,1/500), and goat anti-calretinin (AB1550,1/1000) (Millipore, Burlington, MA); rat anti-CTIP2 (AB18465, 1/100), mouse anti-P62 (AB56416, 1/100), goat anti-TPH2 (AB121013, 1/500), and goat anti-Iba1 (AB5076, 1/100) (Abcam, Cambridge, UK); rabbit anti-synaptophysin (578, 1/100) and rabbit anti-neurofilament (NF575, 1/100) (Eurogentec, Seraing, Belgium); mouse anti-CRYM (AA215-314,1/100, Abnova, Taipei, Taiwan); rabbit anti-GFAP (Z0334, 1/200, Dako, Agilent, Santa Clara, CA); rat anti-TDP-43 (10782-2-AP,1/500, Proteintech, Rosemont, IL); and mouse anti-calbindin (C9848,1/500) and rhodamine-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (T0195, 1/500) (Sigma-Aldrich). Lumbar MN were counted on six sections, interneurons on four sections, and serotonergic neurons on one coronal section (bregma –4.72mm). Approximately 100 NMJ were examined per animal. Images were captured using an AxioImager M2 microscope equipped with a structured illumination system (Aptome, Zeiss, Oberkochen, Germany) and a high-resolution B/W camera (Hamamatsu, Iwata, Shizuoka, Japan), and run by the ZEN 2 software (Zeiss).

#### Statistical Analysis

Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Analyses were performed in GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software, San Diego, CA), using Student *t* test, 1-way and 2-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test, the log-rank test (Mantel–Cox), Grubbs' test and Fischer's exact test. Results were considered significant when *p* < 0.05.

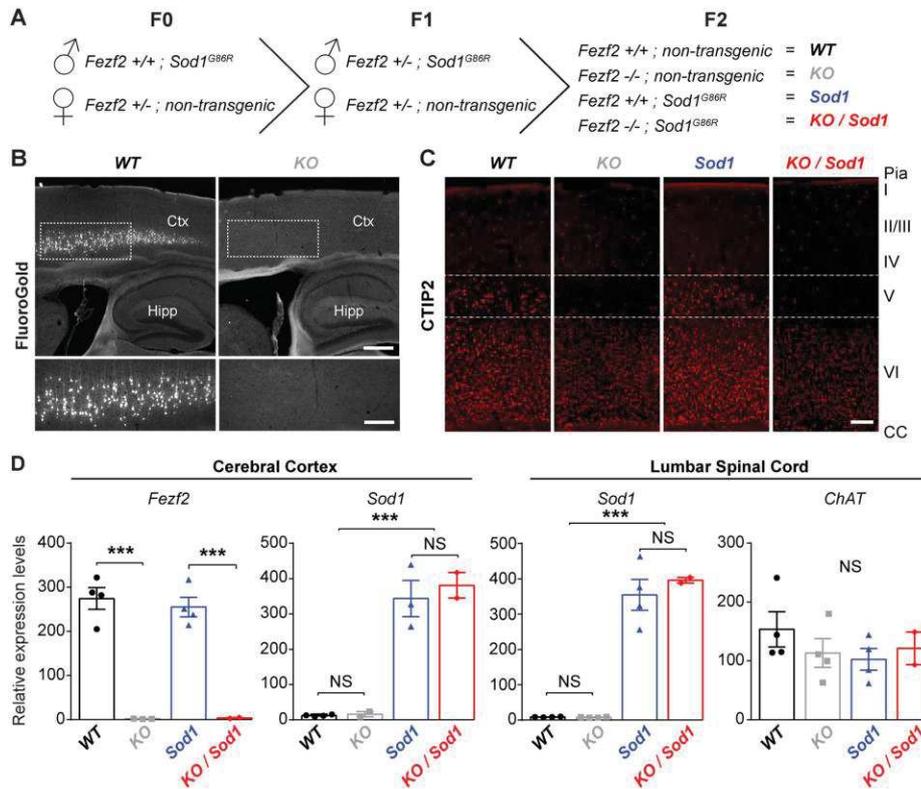
## Results

### Generation of the *Fezf2*<sup>-/-</sup>; *Sod1*<sup>G86R</sup> Mice

To test the contribution of the cerebral cortex to ALS, we generated a mouse line overexpressing the mutant *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene but lacking SubCerPN, by crossbreeding *Sod1*<sup>G86R</sup> to *Fezf2*<sup>-/-</sup> mice. We obtained four genotypes: *Fezf2*<sup>+/+</sup> and non-transgenic (*WT*), *Fezf2*<sup>-/-</sup> and non-transgenic (*KO*), *Fezf2*<sup>+/+</sup> and *Sod1*<sup>G86R</sup> (*Sod1*), and *Fezf2*<sup>-/-</sup> and *Sod1*<sup>G86R</sup> (*KO/Sod1*) (Fig 1). Fluorogold injection into the cervical portion of the dorsal funiculus confirmed the absence of retrogradely labeled CSN, a subpopulation of SubCerPN, in the motor cortex of *KO* mice compared with *WT*. Immunostaining of CTIP2 further confirmed the absence of layer V SubCerPN in *KO* and *KO/Sod1* animals compared with their *WT* and *Sod1* littermates. To verify that absence of *Fezf2* expression had no effect on *Sod1* expression or on spinal MN generation, we ran qPCR analyses. Upregulation of *Sod1* expression was verified in *Sod1* and *KO/Sod1* animals and did not differ between the two genotypes, neither in the cerebral cortex nor in the spinal cord. Expression of the motoneuronal marker *Chat* was not significantly different between any of the four genotypes. Together, the data suggest that *KO/Sod1* mice represent a good model to study the impact of SubCerPN on the onset and progression of the ALS-like phenotype, and to test the corticofugal hypothesis.

### Absence of SubCerPN Delays Disease Onset and Death

To examine the consequences of the absence of projections from the cerebral cortex to its main subcerebral targets, we followed *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their controls (Fig 2). The 75-day-old *KO* and *KO/Sod1* mice were lighter than *WT* and *Sod1* mice, but their body mass index was comparable (data not shown), indicating that *KO* and *KO/Sod1* mice were smaller but not thinner than their *WT* and *Sod1* littermates. As opposed to *WT* and *KO* mice, *Sod1* and *KO/Sod1* mice prematurely stopped gaining weight. Using weight peak as the disease onset, we observed that *KO/Sod1* mice presented a significant delay of disease onset compared with their *Sod1* littermates (median: 107.5 vs 159 days; *p* = 0.0070). Likewise, survival of the *KO/Sod1* mice was increased compared with that of *Sod1* mice (median: 130 vs 183 days; *p* = 0.0083), but the overall disease duration was not significantly different. Finally, the weight loss during the course of the disease was significantly smaller for the *KO/Sod1* mice than for the *Sod1* mice (36.45  $\pm$  1.82 vs 25.07  $\pm$  1.68%; *p* < 0.0001), in accordance with an arrest of weight gain rather than a clear weight loss and an increased survival.



**FIGURE 1:** Generation of a mouse model overexpressing the *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene but lacking all subcerebral projection neurons (SubCerPN), including the corticospinal neurons (CSN). (A) Schematic diagram of the crossbreeding of the *Sod1*<sup>G86R</sup> and *Fezf2*<sup>-/-</sup> mouse lines to generate four genotypes of interest: WT, KO, *Sod1*, and *KO/Sod1*. (B) Retrograde labeling of the CSN from the spinal cord of KO animals (right) and WT (left), showing absence of CSN in KO mice. *n* = 5 for all genotypes. (C) Representative images of brain coronal sections, at the level of the motor cortex, showing CTIP2 immunolabeling of layer V SubCerPN and of layer VI corticothalamic projection neurons (CTHPN) in WT and *Sod1* mice, and confirming the absence of cortical layer V SubCerPN from the KO and *KO/Sod1* animals. *n* = 3 for all genotypes. (D) Quantitative PCR analysis of *Fezf2*, *Sod1*, and *Chat* expression in the cerebral cortex and spinal cord of 75-day-old animals, indicating that absence of *Fezf2* does not affect *Sod1* or *Chat* expression; 2-way ANOVA; *n* = 4 WT, *n* = 4 KO, *n* = 4 *Sod1*, and *n* = 2 *KO/Sod1*; \*\*\**p* < 0.001. Scale bars: 400μm in upper panels and 200μm in lower panels of B; and 250μm in C. [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]

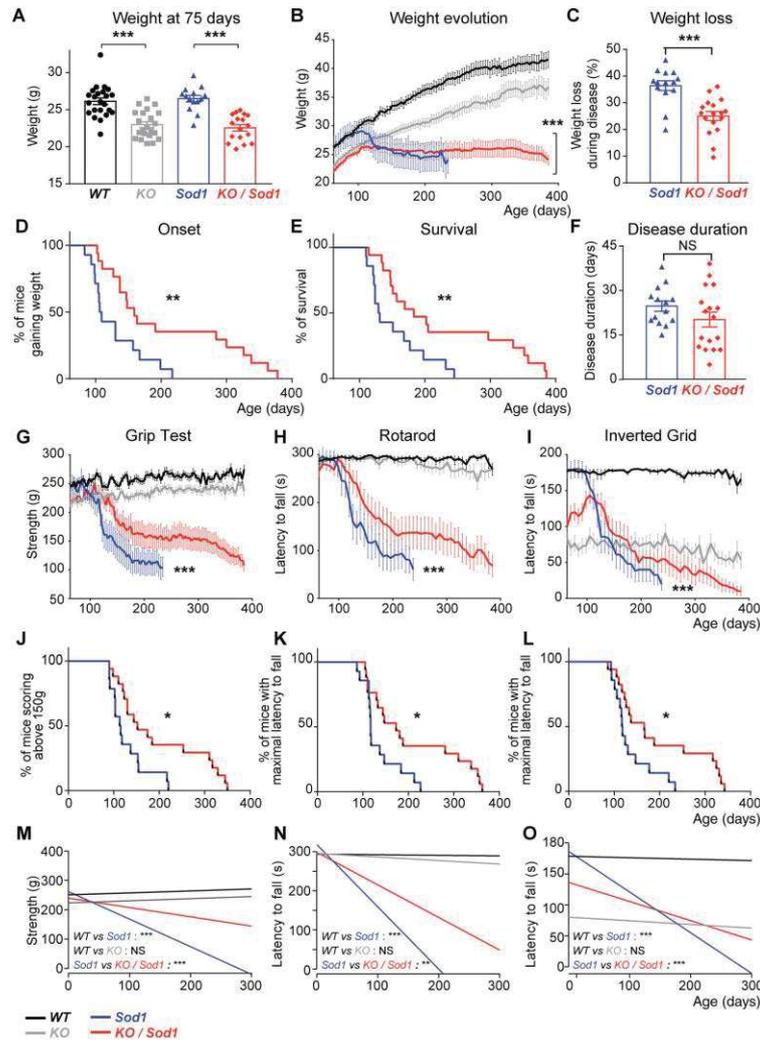
Together, the data indicate that in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS the absence of SubCerPN is beneficial.

#### Absence of SubCerPN Attenuates Motor Impairment

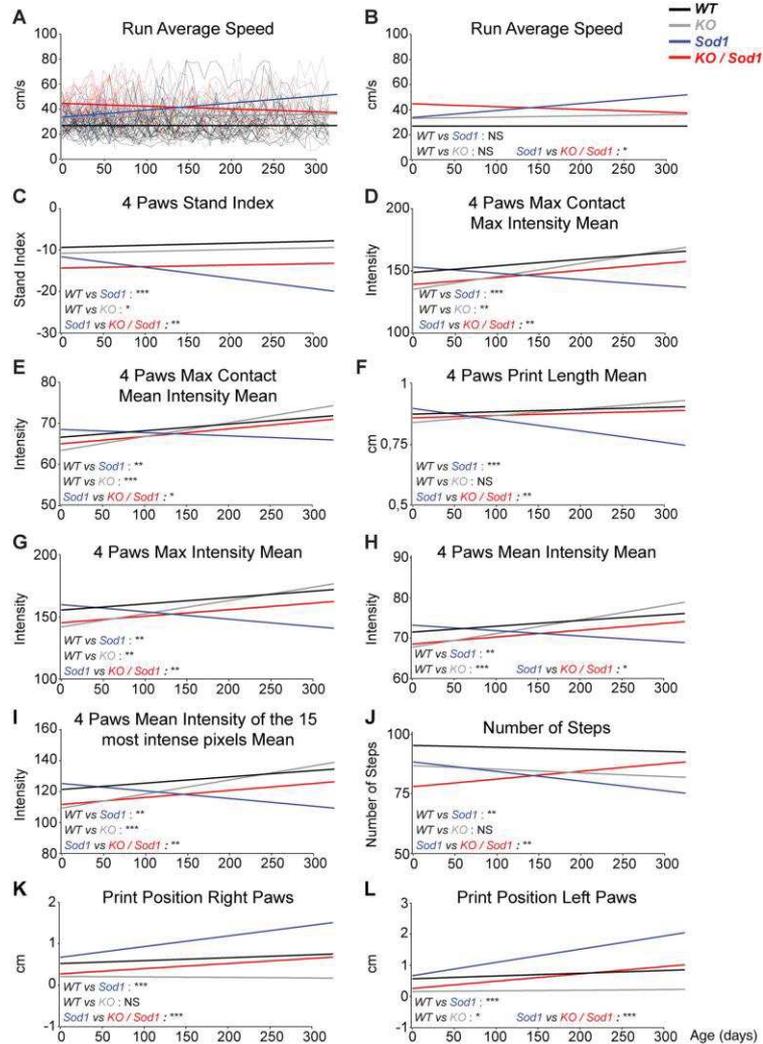
Next, we tested whether absence of SubCerPN could ameliorate motor performances and used linear regression analysis with the weight as a covariable to compare the animals both at the beginning and over the course of the experiment (origin and slope, respectively; Table S1). On the grip test and rotarod, *Sod1* and *KO/Sod1* mice rapidly showed reduced performances, but *KO/Sod1* mice were

affected later than their *Sod1* littermates and maintained higher performances over time than their *Sod1* littermates (Fig 2). On the inverted grid, *KO* and *KO/Sod1* mice initially displayed more difficulties in opposing their gravitational force compared with WT and *Sod1* mice. Yet, although WT and KO animals maintained their hanging time throughout all the repetitive assessments, *Sod1* and *KO/Sod1* gradually decreased their performances. However, this decrease occurred later and in a more moderate manner in *KO/Sod1* versus *Sod1* animals.

Linear regression analyses of the gait recorded on a CatWalk device using weight and speed as covariates



**FIGURE 2:** Absence of subcerebral projection neurons (SubCerPN) delays onset, prevents weight loss, prolongs survival, and slows the decline of motor capacities. (A) Bar graph representing the average weight of the four groups of mice at the beginning of the survival study (75 days); 1-way ANOVA. (B) Graphical representation of the evolution of the weight over time for the four genotypes. Note that although *Sod1* mice clearly lost weight, *KO/Sod1* mice instead stopped gaining weight; linear mixed effects model. (C) Bar graph representing the percentage of weight lost throughout the course of the disease; Student unpaired *t* test. (D, E) Kaplan–Meier plots of disease onset, defined as the time when animals stopped gaining weight (D), and survival (E) in days, for *Sod1* and *KO/Sod1* mice; log-rank test (Mantel–Cox). (F) Bar graph representing disease duration in days; Student unpaired *t* test. (G–I) Graphical representation of motor capacities over time, in days, on the grip strength test (G), the rotarod test (H), and the inverted grid test (I); linear mixed effects model. (J–L) Kaplan–Meier plots of grip strength score >150g (J) and maximal latency to fall from the rotarod (K) or from the inverted grid (L); log-rank test (Mantel–Cox). (M–O) Linear regression analysis conducted using the weight as covariate; the comparisons represented here are those of the slopes. For all data,  $n = 23$  WT,  $n = 22$  KO,  $n = 14$  *Sod1*, and  $n = 17$  *KO/Sod1*; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; NS, nonsignificant.



**FIGURE 3: Absence of subcerebral projection neurons (SubCerPN) ameliorates gait parameters recorded on CatWalk. (A–L)** Linear regression analyses were used to model overall evolution of the groups of animals, taking into account the individual progressions of each mouse over time. Weight was used as a covariate in A and B, and weight and speed were used as covariates in C–L. Individual mouse traces were removed from B–L to ease visualization of the regression curves (compare B with A). The comparisons represented here are those of the slopes. For all data, n = 23 WT, n = 22 KO, n = 14 Sod1, and n = 17 KO/Sod1; \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001; NS, nonsignificant.

identified 3 parameters significantly different between WT and KO animals over time, and not between WT and Sod1 animals, probably reflecting the consequences of the absence of CSN (WT versus KO; see Table S1). We also identified 15 parameters significantly altered in Sod1 versus WT mice during disease progression (see Table S1).

Amongst them, 10 were also significantly different in Sod1 versus KO/Sod1 animals (Fig 3). Of those, two parameters showed opposite effects between absence of *Fezf2* and overexpression of *Sod1<sup>G86R</sup>*, whereas eight parameters instead showed a genuine amelioration of the Sod1 phenotype in the absence CNS (KO/Sod1 vs Sod1). Overall,

CatWalk analysis indicated that the absence of CSN ameliorated a set parameters affected in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals as disease progressed. Together, the data confirmed the beneficial effects of the absence of SubCerPN on motor impairment in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice.

#### **Absence of CSN Minimizes Spinal MN Loss and Neuromuscular Junction Denervation without Modifying Other Pathological Hallmarks of ALS**

We also investigated the spinal cord of end-stage animals, for its relevance to ALS but also as the target of CSN. Staining for GFAP and IBA1 revealed astrogliosis and microgliosis in the lumbar spinal cord of *Sod1* and *KO/Sod1* animals, without any difference between the two genotypes (Fig 4). Labeling of the autophagy marker P62/SQTM1 revealed a healthy, homogeneous cytoplasmic staining in both *WT* and *KO* mice and large, stellate-like inclusions in *Sod1* and *KO/Sod1* mice, with similar occurrence and intensity. Immunolabeling and counting of the ChAT<sup>+</sup> MN revealed a mild decrease of their somas in *Sod1* mice, as reported,<sup>21</sup> and maintenance of a bigger pool of MN in *KO/Sod1* versus *Sod1* animals ( $8.456 \pm 0.49$  vs  $6.152 \pm 0.57$ ;  $p = 0.0306$ ). Neuromuscular junction (NMJ) labeling and rating indicated that *KO/Sod1* animals had 2 times as many innervated NMJ as *Sod1* animals by disease end-stage ( $23.8 \pm 4.87\%$  vs  $11.34 \pm 3.12\%$ ;  $p = 0.0239$ ). Overall, the data show that the absence of cortical afferents to the spinal cord partly protects against Wallerian degeneration of the MN without modifying levels of spinal gliosis and dysregulation of autophagy.

#### **Neither *Sod1<sup>G86R</sup>* Overexpression nor Absence of SubCerPN Modifies TDP-43 Subcellular Localization**

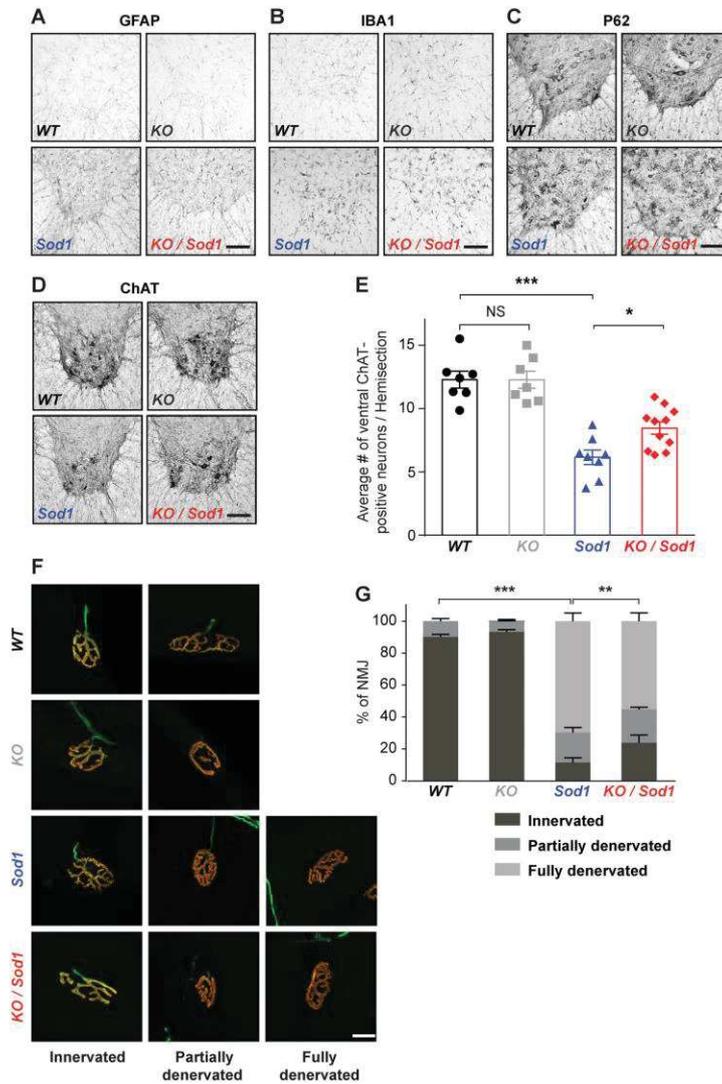
The corticofugal hypothesis of ALS was proposed upon staging of the TDP-43 pathology.<sup>6,7</sup> Although TDP-43 aggregates have not been reported in *SOD1* ALS patients,<sup>24</sup> their putative occurrence in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice has, to our knowledge, not been evaluated. To test whether increased survival and partial protection of MN in *KO/Sod1* animals was correlated with altered TDP-43 subcellular localization, we performed immunolabeling on end-stage animals and controls. Colocalization analyses in CRYM<sup>+</sup> SubCerPN of the motor cortex of *WT* and *Sod1* animals indicated that *Sod1<sup>G86R</sup>* overexpression was not associated with nuclear depletion of TDP-43 or occurrence of TDP-43<sup>+</sup> aggregates (Fig 5). No difference in TDP-43 immunoreactivity could be observed in the surrounding cortical environment either. In the spinal cord, we failed to detect any difference in TDP-43 immunoreactivity in CHAT<sup>+</sup> MN or in their surrounding

environment across genotypes. Together, the data suggest that in the *Sod1<sup>G86R</sup>* mouse model of ALS, the detrimental message carried along the corticofugal tracts probably does not take the form of TDP-43<sup>+</sup> aggregates.

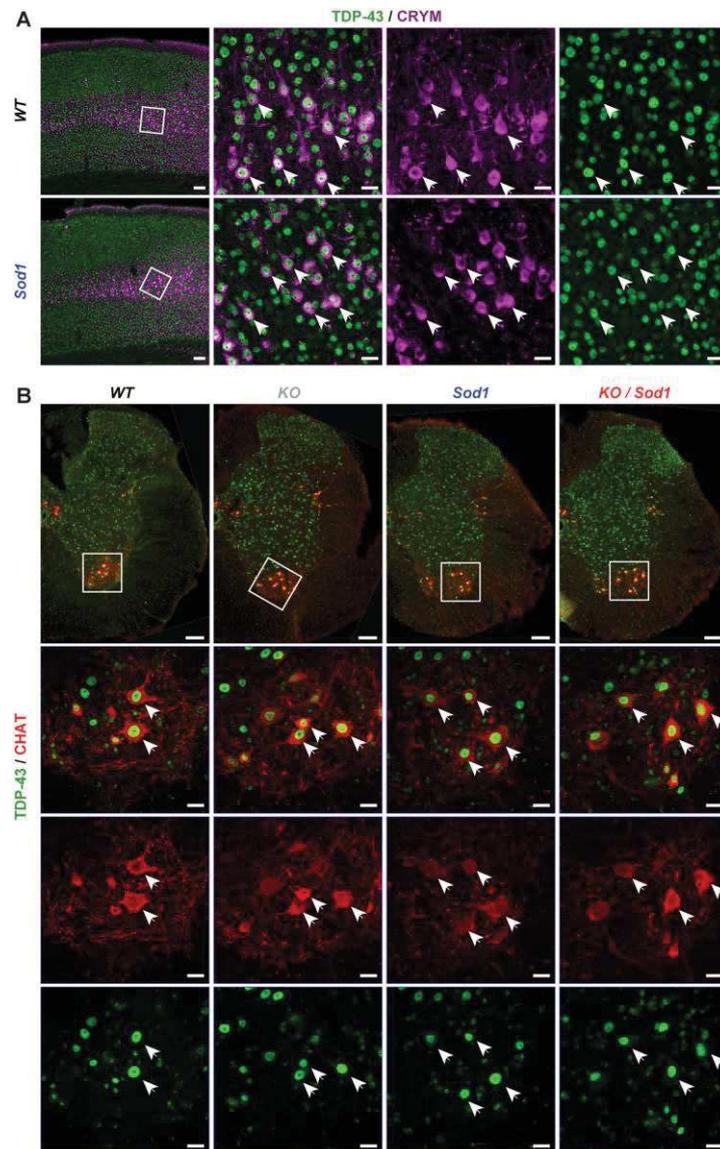
#### **Absence of CSN Positively Impacts Hyper-Reflexia but Not Spasticity**

In humans, degeneration or lesion of the corticospinal tract results in appearance of the upper motoneuron syndrome,<sup>25</sup> a series of signs that include muscular weakness, decreased motor control, hyper-reflexia, including spasticity, and clonus.<sup>26</sup> In ALS patients, spasticity is typically evaluated using the modified Ashworth Scale, which measures the resistance to a passive soft-tissue stretching performed by the physician.<sup>27</sup> Hyper-reflexia instead is observed clinically as a hyperactive deep tendon reflex and electrophysiologically as an increase of the monosynaptic spinal reflex activity revealed by an increase of the ratio between the short-latency Hoffman's reflex, or H-reflex, to compound muscle action potentials (H/M ratio).<sup>28</sup> In rodents, assessment of the tail long lasting reflex (LLR) after cutaneous stimulation is accepted as a simple method to assess spasticity in awake animals,<sup>29</sup> and the H/M ratio is used to evaluate hyper-reflexia and is correlated with spasticity.<sup>29,30</sup> We reasoned that the mouse line that we generated could contribute to evaluate the role of CSN in the modulation of spinal network excitability involved in hyper-reflexia and spasticity in an ALS-related context.

We ran electromyographic analyses on presymptomatic anesthetized mice to detect the H-reflex upon stimulation of the sciatic nerve and recording of the abductor digiti minimi muscle. We detected an H-reflex in fractions of *Sod1* and *KO/Sod1* groups of animals, but never in the *WT* or *KO* animals (Fig 6). Thus, the H-reflex developed only in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, independently of the presence of CSN and, counterintuitively, the absence of CSN, per se, was not sufficient to trigger an H-reflex. Evaluation of the proportions of animals presenting an H-reflex did not reveal any significant difference between *Sod1* and *KO/Sod1* at this age. However, measurement of the H/M ratio among the animals displaying an H-reflex showed a significant reduction in *KO/Sod1* animals compared with their *Sod1* littermates. This suggests that, at presymptomatic ages, absence of CSN limits hyper-reflexia. To further evaluate spasticity, we assessed the tail LLR in awake and fully paralyzed (end-stage) animals.<sup>22,29,31</sup> *Sod1* and *KO/Sod1* animals could be subdivided into spastic and nonspastic, but the relative proportions of each or intensity of the response to the stimulation were not significantly different between *Sod1* and *KO/Sod1* mice, suggesting that absence of CSN is not sufficient to prevent the manifestation of spasticity in



**FIGURE 4:** Absence of corticospinal neurons (CSN) partly prevents degeneration of the motoneuron (MN) cell bodies and neuromuscular junction (NMJ) dismantlement. (A–D) Representative immunostaining images of the ventral horn of the lumbar spinal cord from end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their age-matched *WT* and *KO* littermates labeled with GFAP (A), IBA1 (B), P62 (C), and choline acetyltransferase (ChAT; D). (E) Bar graph representing the average number of ventral ChAT<sup>+</sup> neurons per lumbar spinal cord hemi-section; 1-way ANOVA; n = 6 *WT*, n = 6 *KO*, n = 8 *Sod1*, and n = 10 *KO/Sod1*. (F) Representative maximum-intensity projection images of z-stacks of typically innervated, partly or fully denervated NMJs from end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their age-matched *WT* and *KO* littermates. (G) Bar graph representing the average proportions of innervated (dark gray), partly denervated (medium gray) and fully denervated (light gray) NMJs for each genotype; 2-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test; n = 6 animals per genotype. \*\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; NS, nonsignificant. Scale bars: 100µm in A–D; 20µm in F. [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]



**FIGURE 5:** TDP-43 subcellular localization is not modified in the absence of subcerebral projection neurons (SubCerPN) or with the expression of *Sod1*<sup>G86R</sup>. (A) Representative images of coronal sections of the motor cortex of end-stage *Sod1* and age-matched *WT* mice, showing nuclear localization of TDP-43<sup>+</sup> (green) in CRYM<sup>+</sup> (purple) SubCerPN. (B) Representative images of lumbar spinal cord hemi-sections of *Sod1* and *KO/Sod1* mice at end-stage and their age-matched *WT* and *KO* littermates, showing nuclear TDP-43 (green) within ChAT<sup>+</sup> (red) motoneurons. *n* = 5 per genotype. Scale bar: 100 and 20 $\mu$ m in close-ups.

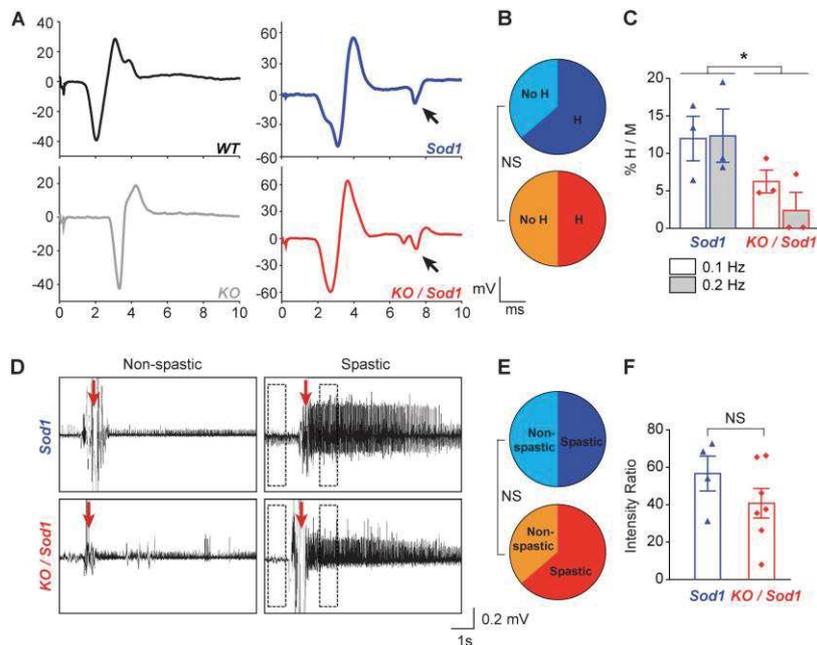
end-stage animals. Together, the data indicate that hyper-reflexia arises presymptomatically in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice and that absence of CSN decreases this particular feature of spasticity. In contrast, spasticity assessed by LLR in end-stage *Sod1<sup>G86R</sup>* animals does not appear to be modulated by CSN. In addition to the absence or the gradual loss of CSN, other mechanisms might account for the occurrence of hyper-reflexia and spasticity in mice.

#### End-Stage Spasticity is Correlated with Loss of Serotonergic Neurons and of Recurrent Inhibition onto MN

Emergence of spasticity could arise from altered supraspinal controls, and more particularly serotonergic inputs, and from spinal network rearrangements.<sup>22,31–33</sup> We thus tested whether absence of SubCerPN could affect the population of TPH2<sup>+</sup> neurons present in the raphe

nuclei throughout the course of the disease in *Sod1* and *KO/Sod1* animals compared with controls (Fig 7). As reported,<sup>31</sup> end-stage *Sod1* mice displayed significant loss of TPH2<sup>+</sup> neurons compared with *WT*. Likewise, we observed significant loss of TPH2<sup>+</sup> neurons in end-stage *KO/Sod1* mice compared with *WT*, but no significant difference between *Sod1* and *KO/Sod1* animals. At younger ages, no significant difference could be detected across the different groups of mice. Together, the data indicate that absence of CSN and other SubCerPN does not affect survival of the serotonergic neurons and that occurrence of LLR in end-stage animals could, at least in part, result from the late loss of serotonergic neurons.

To determine whether absence of CSN could affect the populations of inhibitory spinal IN in *KO* and *KO/Sod1* animals compared with controls, we labeled and quantified parvalbumin- (PV), calretinin- (CR) and



**FIGURE 6:** Absence of corticospinal neurons (CSN) minimizes presymptomatic hyper-reflexia but not end-stage spasticity. (A) Representative electromyographic traces of the muscular response of the abductor digiti minimi muscle upon sciatic nerve stimulation. Arrows indicate H-reflex in presymptomatic *Sod1* and *KO/Sod1* mice;  $n = 6$  *WT*,  $n = 6$  *KO*,  $n = 8$  *Sod1*, and  $n = 10$  *KO/Sod1*. (B) Pie charts representing the percentage of animals with an H-reflex amongst *Sod1* (top) and *KO/Sod1* (bottom) animals; Fischer exact test. (C) Bar graph representing the averaged ratios of the amplitude of the H-reflex and M-wave upon repeated stimulations at 0.1 and 0.2 Hz, in *Sod1* and *KO/Sod1* mice;  $n = 3$  *Sod1* and  $n = 3$  *KO/Sod1*; 2-way ANOVA. (D) Representative electromyographic recordings of the tail muscle upon stimulation of end-stage, fully paralyzed and awake *Sod1* mice. Spasticity-related tail long-lasting reflex (LLR; right panels) can be observed upon stimulation (red arrow) in subgroups of animals. (E) Pie charts representing the percentage with an LLR amongst *Sod1* (top) and *KO/Sod1* (bottom) animals; Fischer exact test;  $n = 8$  *Sod1* and  $n = 11$  *KO/Sod1*. (F) Signal-to-noise intensity ratios of the LLR calculated from measurements made in dotted boxes in D; Student unpaired *t* test;  $n = 4$  *Sod1* and  $n = 7$  *KO/Sod1*;  $*p < 0.05$ . [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]

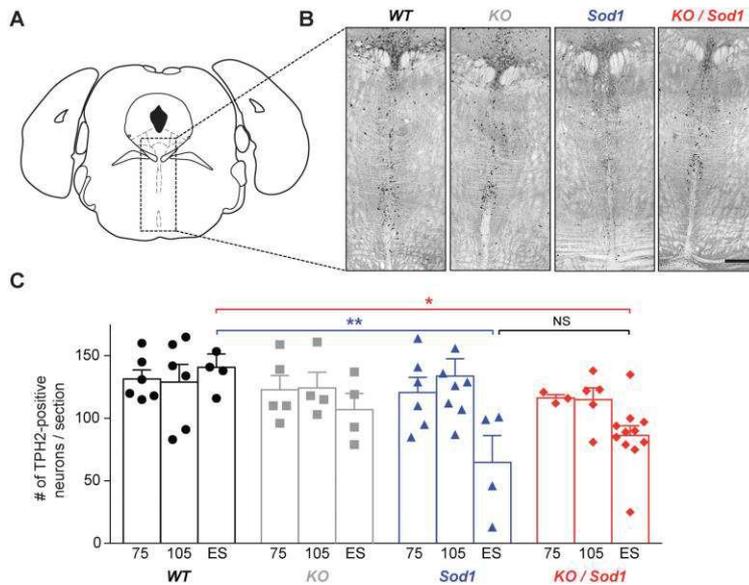
calbindin- (CB) positive IN present in the lumbar spinal cord of 105day-old and end-stage animals and their age-matched control littermates. The populations of PV<sup>+</sup> and CR<sup>+</sup> IN in laminae IV–IX were found to be unchanged across genotypes and ages (Fig 8A–D). In contrast, CB<sup>+</sup> IN present in the ventral horn of the spinal cord, which include the subpopulation of Renshaw cells that exert recurrent inhibition onto MN,<sup>34</sup> were decreased in end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* animals in comparison to their *WT* and *KO* littermates ( $p = 0.0110$  between *KO* and *KO/Sod1* and  $p = 0.0900$  between *WT* and *Sod1*; see Fig 8E,F). Overall, the results indicate that the absence of CSN does not modify the populations of spinal inhibitory IN and that *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene expression leads to a late loss of CB<sup>+</sup> IN, which could account for spasticity at late stages of the disease.

### Discussion

In this study, we demonstrated that absence of SubCerPN delayed disease onset, extended survival, and improved clinical conditions of a mouse model of ALS, providing the first experimental arguments in favor of the corticofugal hypothesis.

### Contribution of the Cerebral Cortex and its Outputs to ALS

Although the origin of ALS remains debated,<sup>2</sup> evidence from neurophysiological and pathological studies conducted on patients<sup>4,5</sup> are nourishing a revival of interest in Charcot's initial view of ALS as a primary cortical impairment.<sup>3</sup> Whether disease propagation relies on altered neuronal excitability and subsequent excitotoxicity<sup>5</sup> or on prion-like propagation of misfolded proteins,<sup>7</sup> both schools of thought agree on a common cortical origin and propagation along the corticofugal tracts.<sup>4</sup> However, the hypothesis cannot be tested directly in patients. Although the corticomotoneuronal system has undergone major modifications with evolution,<sup>4</sup> corticothalamic and SubCerPN populations are remarkably well conserved between mice and humans, as opposed to the commissural and associative projection neuron populations.<sup>35</sup> Further support for the appropriateness of rodents to study the cortical contributions to ALS is provided by their ability to recapitulate CSN or SubCerPN degeneration.<sup>8</sup> In the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model, CSN precedes MN degeneration and NMJ denervation.<sup>11</sup> Thus, rodent models and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice in particular seem suitable to assess the contribution of SubCerPN to ALS.

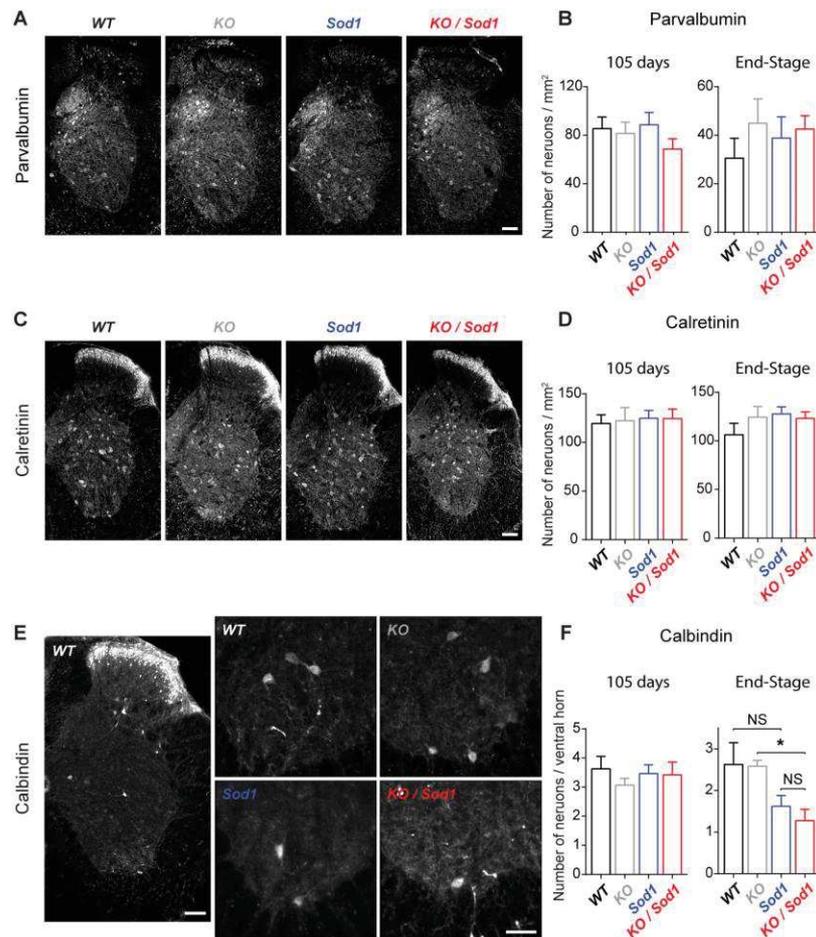


**FIGURE 7:** Absence of subcerebral projection neurons (SubCerPN) does not prevent the late loss of serotonergic neurons in the raphe nuclei. (A) Schematic diagram of the coronal section selected for TPH2<sup>+</sup> neuron labeling and counting. (B) Representative images of TPH2 immunoreactivity in the brainstem (dorsal and median raphe) of end-stage mice. (C) Bar graph representing the average number of TPH2<sup>+</sup> neurons, over time (75 and 105 days and end-stage [ES]), in *WT* ( $n = 6, 6, \text{ and } 4$ , respectively), *KO* ( $n = 5, 4, \text{ and } 4$ , respectively), *Sod1* ( $n = 6, 8, \text{ and } 4$ , respectively), and *KO/Sod1* ( $n = 3, 5, \text{ and } 11$ , respectively) mice; 2-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Scale bar: 300 $\mu\text{m}$ . [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]

**Absence of SubCerPN Delays Onset and Extends Survival without Increasing Disease Duration**

Crossbreeding of *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fezf2<sup>-/-</sup>* mouse lines generated animals ubiquitously expressing *Sod1<sup>G86R</sup>* but lacking SubCerPN, including CSN, hence challenging the definition of ALS. Absence of SubCerPN delayed disease

onset and increased survival without modifying disease duration. The results are highly reminiscent of an elegant study by Thomsen and colleagues,<sup>36</sup> who knocked down *SOD1<sup>G93A</sup>* in the posterior motor cortex of transgenic rats using AAV9-SOD1-shRNA injections and reported delayed disease onset, extended survival and unchanged disease duration. The similarity of these and our results is



**FIGURE 8:** Population of Renshaw cells decreases in end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice. (A, C, E) Representative images of lumbar spinal cord hemi-sections from end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their age-matched WT and KO littermates labeled with parvalbumin (A), calretinin (C), and calbindin (E) antibodies. (B, D) Bar graphs representing the average number of parvalbumin-positive (B) or calretinin-positive (D) inhibitory interneurons (IN) per square millimeter in laminae IV-IX of lumbar spinal cord of 105-day-old and end-stage animals. (F) Bar graph representing the average number of calbindin-positive IN in the ventral horn of lumbar spinal cord of 105-day-old and end-stage animals. For 105-day-old and end-stage WT (n = 6 and 5, respectively), KO (n = 4 and 6, respectively), *Sod1* (n = 7 and 7, respectively), and *KO/Sod1* (n = 6 and 11, respectively); 1-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test; \*p < 0.05. Scale bars: 100µm in A, C, and the left panel of E; 50µm in the close-ups of E. [Color figure can be viewed at [www.annalsneurology.org](http://www.annalsneurology.org)]

remarkable given the differences in the approaches. Together, the two studies suggest that absence of diseased CSN or instead maintenance of genetically corrected CSN might be equally beneficial and that *Sod1/SOD1* mutant transgene-expressing CSN might be detrimental to their downstream targets. Yet, it is worth mentioning that AAV9 is likely to have targeted all types of cortical excitatory and inhibitory neurons, potentially contributing to correct cortical circuit dysfunctions such as those reported in *Sod1<sup>G93A</sup>* and *TDP-43<sup>A315T</sup>* mouse models of ALS.<sup>8</sup> Cell type-specific genetic ablation experiments could provide further information on the contribution of individual neuronal and glial populations to cortical circuit dysfunction and consequences for corticofugal targets. Such approaches allow better definition of the contributions of MN, microglia, astrocytes, and muscles to ALS onset and progression.<sup>37</sup> Together, these studies and ours indicate that the cerebral cortex and SubCerPN might be involved in disease onset, whereas MN and glia might modulate disease progression.

#### Absence of CSN Improves Motor Performances and Minimizes MN Degeneration

Although *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice lack CSN and other SubCerPN and display altered cortical development,<sup>13,14,17</sup> they remarkably do not present any major motor phenotype. In mice, CSN make mostly indirect or polysynaptic connections and few direct or monosynaptic connections onto MN.<sup>38</sup> It is possible that in *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice the majority of indirect connections are less affected, or better compensated, and the minority of direct connections are more affected but translate into a phenotype that is harder to reveal. In the *Celsr3/Emx1* mice, CST genetic ablation is correlated with increased numbers of rubrospinal and monoaminergic projections to the spinal cord.<sup>39</sup> Although the *Celsr3/Emx1* mice display proper locomotion, they show difficulties in fine motor tests.<sup>39</sup> In the present study, we found that *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice, although smaller and lighter than controls, performed less well on the inverted grid test, possibly owing to defects in proper grip to the grid. In addition, the sensitive CatWalk gait analysis device revealed decreased performances of *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice. Together, these data indicate that *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice do present a discrete motor phenotype, which could possibly be further revealed by dedicated fine motor tests. Importantly, we found that absence of CSN and other SubCerPN improved the motor phenotype of the *Sod1<sup>G86R</sup>* mice and limited the denervation of the NMJ and ultimate loss of MN. This indicates that, although CSN might not be of great importance for locomotion in rodents, or their agenesis well compensated by other descending tracts, their presence in a context of ALS is

detrimental to their downstream MN targets, whether direct or indirect.

#### Absence of CSN Limits Hyper-Reflexia

Absence of SubCerPN in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice ameliorated hyper-reflexia, a feature of the upper motoneuron syndrome.<sup>26</sup> The absence of H-reflex recording in *WT* animals does not rule out the existence of a small-amplitude H-reflex in these animals, below the detection threshold, as already observed.<sup>30</sup> In contrast, the presence of an H-reflex in subgroups of presymptomatic *Sod1* animals suggests that hyper-reflexia precedes the appearance of motor symptoms in these animals and is correlated with the presymptomatic degeneration of the CSN.<sup>11</sup> Absence of an H-reflex in *KO* animals suggests that developmental absence of CSN and other SubCerPN could have been compensated by other supraspinal controls or by spinal network rearrangements, or both. Finally, decreased H/M ratios in *KO/Sod1* compared with *Sod1* animals indicate decreased hyper-reflexia and possible mitigation of the upper motoneuron syndrome in the absence of CSN and other SubCerPN. In contrast, LLR of the tail muscle of fully paralyzed end-stage mice was neither prevented nor even slightly modulated by absence of SubCerPN. But given that evaluation of the LLR can be performed only in paralyzed animals, our study did not allow us to test whether spasticity could have arisen later in *KO/Sod1* than in *Sod1* mice. Supraspinal controls, and more particularly serotonergic inputs, and spinal network rearrangements could account for the emergence of spasticity.<sup>22,31-33</sup> We failed to detect any difference in TPH2<sup>+</sup> serotonergic neurons in the raphe nuclei and in PV<sup>+</sup>, CR<sup>+</sup>, and CB<sup>+</sup> inhibitory spinal IN at the time when presymptomatic hyper-reflexia was detected. However, an altered contribution of these neuronal populations to spinal circuits at this presymptomatic age could take the form of neuronal plasticity, which we did not test. At disease end-stage, we observed decreased amounts of serotonergic neurons in the raphe nuclei and of CB<sup>+</sup> IN in the ventral spinal cord of *Sod1* mice, in accordance with formerly published work,<sup>22,30,31,34</sup> and no difference between *Sod1* and *KO/Sod1* mice, suggesting that both mechanisms could account for the emergence of the LLR in these transgenic animals.

#### Possible Propagation Mechanisms and Perspectives

We demonstrated that absence of SubCerPN was beneficial in a mouse model of ALS, suggesting that major corticofugal projections might be detrimental to their downstream targets in the context of ALS. But whether corticofugal propagation of the disease relies on prion-like

transmission of misfolded proteins<sup>7</sup> or on altered neuronal excitability and subsequent excitotoxicity<sup>5</sup> remains an open question. As opposed to most ALS patients and like *SOD1* patients, *Sod1*<sup>G86R</sup> mice do not seem to present any TDP-43 pathology. However, they do present P62<sup>+</sup> aggregates, and the presence of misfolded proteins remains possible. Nevertheless, we did not observe any difference in P62 staining between *KO/Sod1* and *Sod1* animals that could be correlated with the extended survival of the double transgenic mice. In a recent study, we genetically ablated the *SOD1*<sup>G37R</sup> transgene from corticofugal projection neurons. This was sufficient to prevent CSN degeneration in a cell-autonomous manner but had no impact on disease onset and survival, ruling out a major contribution of misfolded protein propagation from the corticofugal neurons to their targets on disease occurrence and progression in this mouse model.<sup>40</sup> On the contrary, knock-down of the *SOD1*<sup>G37A</sup> mutant transgene in the posterior motor cortex of a rat model of ALS using AAV9 delayed disease onset and extended survival.<sup>36</sup> It is possible that this beneficial effect arose from targeting cortical IN that modulate the excitability and activity of corticofugal neurons.<sup>41</sup> Given the reported alterations in excitability of cortical neuron populations in different mouse models of the disease,<sup>8,42</sup> comparison between silencing and genetic ablation of adult corticofugal neurons would be particularly informative to gain a better understanding of the mechanism by which these neurons might contribute to disease onset and progression. Finally, deep molecular analysis of CSN dysfunction in ALS<sup>11</sup> might in the future provide a better understanding of the role of the cerebral cortex and its outputs to ALS and potentially unravel new therapeutic targets.

### Acknowledgment

The work has been supported by a European Research Council (ERC) starting grant (#639737), a Marie Skłodowska-Curie career integration grant (#618764), an “Association Française contre les Myopathies” (AFM)-Telethon trampoline grant (#16923), a “Fédération pour la Recherche sur le Cerveau” (FRC) grant, and a Neurex grant to C.R., PhD fellowships from the French Ministry of Research to T.B., C.B., and A.B., and from the “Association de Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique” (ARSLA) to C.B., and by a postdoctoral fellowship from the AFM-Telethon to J.C.Z. (#21993).

We are extremely thankful to Véronique Marchand-Pauvert, Pascal Branchereau, Pierre Veinante, and Luc Dupuis for critical reading of the manuscript and insightful comments.

October 2020

### Author Contributions

T.B., C.B., M.C.-E., and C.R. contributed to the conception and design of the study; all authors contributed to the acquisition and analysis of the data; T.B., C.B., F.L., M.C.-E., and C.R. contributed to drafting the text and preparing the figures.

### Potential Conflicts of Interest

Nothing to report.

### References

1. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2017;377:162–172.
2. Ravits JM, La Spada AR. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread. *Neurology* 2009;73:805–811.
3. Charcot JM. *Sclérose latérale amyotrophique: oeuvres complètes*. Paris: Bureaux du Progrès Medical, 1874.
4. Eisen A, Braak H, Del Tredici K, et al. Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017; 88:917–924.
5. Vucic S, Kiernan MC. Transcranial magnetic Stimulation for the assessment of neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics* 2017; 14:91–106.
6. Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, et al. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2013;74: 20–38.
7. Braak H, Brettschneider J, Ludolph AC, et al. Amyotrophic lateral sclerosis—a model of corticofugal axonal spread. *Nat Rev Neurol* 2013;9:708–714.
8. Brunet A, Stuart-Lopez G, Burg T, et al. Cortical circuit dysfunction as a potential driver of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Neurosci* 2020;14:363.
9. Mancinelli S, Lodato S. ScienceDirectDecoding neuronal diversity in the developing cerebral cortex: from single cells to functional networks. *Curr Opin Neurobiol* 2018;53:146–155.
10. Tomassy GS, Lodato S, Trayer-Gibson Z, Arlotta P. Development and regeneration of projection neuron subtypes of the cerebral cortex. *Sci Prog* 2010;93:151–169.
11. Marques C, Fischer M, Keime C, et al. Early alterations of RNA metabolism and splicing from adult corticospinal neurons in an ALS mouse model. *bioRxiv* 2019. <https://doi.org/10.1101/667733>.
12. Zhang Q, Mao C, Jin J, et al. Side of limb-onset predicts laterality of gray matter loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–11.
13. Hirata T, Suda Y, Nakao K, et al. Zinc finger gene-like functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons. *Dev Dyn* 2004;230:546–556.
14. Molyneaux BJ, Arlotta P, Hirata T, et al. Fezl1 is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* 2005;47: 817–831.
15. Rouaux C, Arlotta P. Direct lineage reprogramming of post-mitotic callosal neurons into corticofugal neurons in vivo. *Nat Cell Biol* 2013; 15:214–221.
16. Rouaux C, Arlotta P. Fezf2 directs the differentiation of corticofugal neurons from striatal progenitors in vivo. *Nat Neurosci* 2010;13: 1345–1347.

701

17. Lodato S, Rouaux C, Quast KB, et al. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* 2011;69:763–779.
18. Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, et al. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *PNAS* 1995;92:689–693.
19. Burg T, Bichara C, Scekcic-Zahirovic J, et al. Absence of subcerebral projection neurons delays disease onset and extends survival in a mouse model of ALS. *bioRxiv* 2019. <https://doi.org/10.1101/849935>.
20. Scekcic-Zahirovic J, Oussini El H, Mersmann S, et al. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2017;133:887–906.
21. Rouaux C, Panteleeva I, Rene F, et al. 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. *J Neurosci* 2007;27:5535–5545.
22. Oussini El H, Scekcic-Zahirovic J, Vercauysse P, et al. Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2017;82:444–456.
23. Lee S, Toda T, Kiyama H, Yamashita T. Weakened rate-dependent depression of Hoffmann's reflex and increased motoneuron hyperactivity after motor cortical infarction in mice. *Cell Death Dis* 2014; e1007:1–9.
24. Mackenzie IRA, Bigio EH, Ince PG, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 2007;61:427–434.
25. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. *Neuroscience*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc, 2004.
26. Ivanhoe CB, Reistetter TA. Spasticity. *Am J Phys Med Rehabil* 2004; 83:S3–S9.
27. Ashworth NL, Satkunam LE, Deforge D. Treatment for spasticity in amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;2:CD004156.
28. Simon NG, Lin CSY, Lee M, et al. Segmental motoneuronal dysfunction is a feature of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* 2015;126:828–836.
29. Bennett DJ, Gorassini M, Sanelli L, et al. Spasticity in rats with sacral spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1999;16:69–84.
30. Modol L, Mancuso R, Ale A, et al. Differential effects on KCC2 expression and spasticity of ALS and traumatic injuries to motoneurons. *Front Cell Neurosci* 2014;8:7.
31. Dentel C, Palamiuc L, Henriques A, et al. Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* 2013;136:483–493.
32. Martin LJ, Chang Q. Inhibitory synaptic regulation of motoneurons: a new target of disease mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol* 2011;45:30–42.
33. Mukherjee A, Chakravarty A. Spasticity mechanisms – for the clinician. *Front Neurol* 2010;1:149.
34. Wootz H, FitzSimons-Kantamneni E, Larhammar M, et al. Alterations in the motor neuron-rensshaw cell circuit in the Sod1G93A mouse model. *J Comp Neurol* 2013;521:1449–1469.
35. Miller DJ, Bhaduri A, Sestan N, Kriegstein A. ScienceDirectShared and derived features of cellular diversity in the human cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* 2019;56:117–124.
36. Thomsen GM, Gowing G, Latter J, et al. Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci* 2014;34:15587–15600.
37. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 2009;187:761–772.
38. D'Acunzo P, Badaloni A, Ferro M, et al. A conditional transgenic reporter of presynaptic terminals reveals novel features of the mouse corticospinal tract. *Front Neuroanat* 2014;7:1–12.
39. Han Q, Cao C, Ding Y, et al. Plasticity of motor network and function in the absence of corticospinal projection. *Exp Neurol* 2015;267: 194–208.
40. Scekcic-Zahirovic J, Fischer M, Lopez GS, et al. Genetic ablation of SOD1<sup>G37R</sup> selectively from corticofugal projection neurons protects corticospinal neurons from degeneration without affecting ALS onset and progression. *bioRxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.01.09.900944>.
41. Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic interneurons in the Neocortex: from cellular properties to circuits. *Neuron* 2016;91:260–292.
42. Gunes ZI, Kan VVY, Ye XQ, Liebscher S. Exciting complexity: the role of motor circuit elements in ALS pathophysiology. *Front Neurosci* 2020;14:573.

## Bibliographie

- Abell CW, Kwan SW (2001) Molecular characterization of monoamine oxidases A and B. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 65:129–156.
- Af Bjerkén S, Stenmark Persson R, Barkander A, Karalija N, Pelegrina-Hidalgo N, Gerhardt GA, Virel A, Strömberg I (2019) Noradrenaline is crucial for the substantia nigra dopaminergic cell maintenance. *Neurochem Int* 131:104551.
- Agster KL, Mejias-Aponte CA, Clark BD, Waterhouse BD (2013) Evidence for a regional specificity in the density and distribution of noradrenergic varicosities in rat cortex. *J Comp Neurol* 521:2195–2207.
- Ahnaou A, Moechars D, Raeymaekers L, Biermans R, Manyakov NV, Bottelbergs A, Wintmolders C, Van Kolen K, Van De Castele T, Kemp JA, Drinkenburg WH (2017) Emergence of early alterations in network oscillations and functional connectivity in a tau seeding mouse model of Alzheimer's disease pathology. *Sci Rep* 7:14189.
- Al-Chalabi A, Fang F, Hanby MF, Leigh PN, Shaw CE, Ye W, Rijsdijk F (2010) An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:1324–1326.
- Al-Chalabi A, Hardiman O (2013) The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* 9:617–628.
- Alonso A, Logroscino G, Jick SS, Hernán MA (2010) Association of smoking with amyotrophic lateral sclerosis risk and survival in men and women: a prospective study. *BMC Neurol* 10:6.
- Andersen PM, Al-Chalabi A (2011) Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 7:603–615.
- Andrés-Benito P, Moreno J, Aso E, Povedano M, Ferrer I (2017) Amyotrophic lateral sclerosis, gene deregulation in the anterior horn of the spinal cord and frontal cortex area 8: implications in frontotemporal lobar degeneration. *Aging* 9:823–851.
- Anttila SA, Leinonen EV (2001) A review of the pharmacological and clinical profile of mirtazapine. *CNS Drug Rev* 7:249–264.
- Aoki C, Venkatesan C, Go CG, Forman R, Kurose H (1998) Cellular and subcellular sites for noradrenergic action in the monkey dorsolateral prefrontal cortex as revealed by the immunocytochemical localization of noradrenergic receptors and axons. *Cereb Cortex* 8:269–277.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351:602–611.
- Ardestani PM, Evans AK, Yi B, Nguyen T, Coutellier L, Shamloo M (2017) Modulation of neuroinflammation and pathology in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease using a biased and selective beta-1 adrenergic receptor partial agonist. *Neuropharmacology* 116:371–386.

- Aridegbe T, Kandler R, Walters SJ, Walsh T, Shaw PJ, McDermott CJ (2013) The natural history of motor neuron disease: assessing the impact of specialist care. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener* 14:13–19.
- Armstrong GAB, Drapeau P (2013) Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS. *Hum Mol Genet* 22:4282–4292.
- Arnsten AF (2000) Through the looking glass: differential noradrenergic modulation of prefrontal cortical function. *Neural Plast* 7:133–146.
- Arnsten AF, Contant TA (1992) Alpha-2 adrenergic agonists decrease distractibility in aged monkeys performing the delayed response task. *Psychopharmacology (Berl)* 108:159–169.
- Arnsten AFT (2006) Fundamentals of attention-deficit/hyperactivity disorder: circuits and pathways. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 8:7–12.
- Arnsten AFT (2011) Catecholamine influences on dorsolateral prefrontal cortical networks. *Biol Psychiatry* 69:e89-99.
- Aroca P, Lorente-Cánovas B, Mateos FR, Puelles L (2006) Locus coeruleus neurons originate in alar rhombomere 1 and migrate into the basal plate: Studies in chick and mouse embryos. *J Comp Neurol* 496:802–818.
- Arthur KC, Calvo A, Price TR, Geiger JT, Chiò A, Traynor BJ (2016) Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nat Commun* 7:12408.
- Ash PEA, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin W-L, DeJesus-Hernandez M, van Blitterswijk MM, Jansen-West K, Paul JW, Rademakers R, Boylan KB, Dickson DW, Petrucelli L (2013) Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77:639–646.
- Astick M, Vanderhaeghen P (2018) From Human Pluripotent Stem Cells to Cortical Circuits. *Curr Top Dev Biol* 129:67–98.
- Aston-Jones G (2005) Brain structures and receptors involved in alertness. *Sleep Med* 6 Suppl 1:S3-7.
- Aston-Jones G, Bloom FE (1981) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1:876–886.
- Aston-Jones G, Chiang C, Alexinsky T (1991) Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Prog Brain Res* 88:501–520.
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Kubiak P (1997) Conditioned responses of monkey locus coeruleus neurons anticipate acquisition of discriminative behavior in a vigilance task. *Neuroscience* 80:697–715.
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Kubiak P, Alexinsky T (1994) Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 14:4467–4480.

- Audet MA, Doucet G, Oleskevich S, Descarries L (1988) Quantified regional and laminar distribution of the noradrenaline innervation in the anterior half of the adult rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 274:307–318.
- Averill AJ, Kasarskis EJ, Segerstrom SC (2007) Psychological health in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis* 8:243–254.
- Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu Y-F, Petrucelli L, Buratti E, Baralle FE (2008) Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J Cell Sci* 121:3778–3785.
- Badawy RAB, Loetscher T, Macdonell RAL, Brodtmann A (2012) Cortical excitability and neurology: insights into the pathophysiology. *Funct Neurol* 27:131–145.
- Badawy RAB, Vogrin SJ, Lai A, Cook MJ (2013) Patterns of cortical hyperexcitability in adolescent/adult-onset generalized epilepsies. *Epilepsia* 54:871–878.
- Bahadorani S, Mukai ST, Rabie J, Beckman JS, Phillips JP, Hilliker AJ (2013) Expression of zinc-deficient human superoxide dismutase in *Drosophila* neurons produces a locomotor defect linked to mitochondrial dysfunction. *Neurobiol Aging* 34:2322–2330.
- Bajc Česnik A, Motaln H, Rogelj B (2020) The Impact of ALS-Associated Genes hnRNPA1, MATR3, VCP and UBQLN2 on the Severity of TDP-43 Aggregation. *Cells* 9.
- Baker GB, Coutts RT, McKenna KF, Sherry-McKenna RL (1992) Insights into the mechanisms of action of the MAO inhibitors phenelzine and tranylcypromine: a review. *J Psychiatry Neurosci* 17:206–214.
- Baker GB, Wong JTF, Yeung JM, Coutts RT (1991) Effects of the antidepressant phenelzine on brain levels of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). *J Affect Disord* 21:207–211.
- Baldwin KR, Godena VK, Hewitt VL, Whitworth AJ (2016) Axonal transport defects are a common phenotype in *Drosophila* models of ALS. *Hum Mol Genet* 25:2378–2392.
- Bandarabadi M, Boyce R, Herrera CG, Bassetti C, Williams S, Schindler K, Adamantidis A (2017) Dynamical modulation of theta-gamma coupling during REM sleep. *bioRxiv*:169656.
- Barber SC, Higginbottom A, Mead RJ, Barber S, Shaw PJ (2009) An in vitro screening cascade to identify neuroprotective antioxidants in ALS. *Free Radic Biol Med* 46:1127–1138.
- Barkhatova VP, Zavalishin IA, Kostjuk AV, Demina EG, Moskvitina TA (1996) [Neurotransmitter changes in amyotrophic lateral sclerosis]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 96:78–85.
- Batra R, Lee CW (2017) Mouse Models of C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansion in Amyotrophic Lateral Sclerosis/ Frontotemporal Dementia. *Front Cell Neurosci* 11:196.
- Bede P, Bokde A, Elamin M, Byrne S, McLaughlin RL, Jordan N, Hampel H, Gallagher L, Lynch C, Fagan AJ, Pender N, Hardiman O (2013) Grey matter correlates of clinical variables in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a neuroimaging study of ALS motor phenotype heterogeneity and cortical focality. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:766–773.

- Beers DR, Zhao W, Liao B, Kano O, Wang J, Huang A, Appel SH, Henkel JS (2011) Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. *Brain Behav Immun* 25:1025–1035.
- Bekar LK, He W, Nedergaard M (2008) Locus coeruleus alpha-adrenergic-mediated activation of cortical astrocytes in vivo. *Cereb Cortex N Y N* 18:2789–2795.
- Bellesi M, Tononi G, Cirelli C, Serra PA (2016) Region-Specific Dissociation between Cortical Noradrenaline Levels and the Sleep/Wake Cycle. *Sleep* 39:143–154.
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E (2012) The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry* 18:467–486.
- Benedetti L, Ghilardi A, Rottoli E, De Maglie M, Prosperi L, Perego C, Baruscotti M, Bucchi A, Del Giacco L, Francolini M (2016) INaP selective inhibition reverts precocious inter- and motoneurons hyperexcitability in the Sod1-G93R zebrafish ALS model. *Sci Rep* 6:24515.
- Berridge CW, Spencer RC (2016) Differential cognitive actions of norepinephrine  $\alpha_2$  and  $\alpha_1$  receptor signaling in the prefrontal cortex. *Brain Res* 1641:189–196.
- Bertel O, Malessa S, Sluga E, Hornykiewicz O (1991) Amyotrophic lateral sclerosis: changes of noradrenergic and serotonergic transmitter systems in the spinal cord. *Brain Res* 566:54–60.
- Biederman J (2005) Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry* 57:1215–1220.
- Birkmayer W, Riederer P, Ambrozi L, Youdim MBH (1977) IMPLICATIONS OF COMBINED TREATMENT WITH “MADOPAR” AND L-DEPRENIL IN PARKINSON’S DISEASE: A Long-term Study. *The Lancet* 309:439–443.
- Bittolo T, Raminelli CA, Deiana C, Baj G, Vaghi V, Ferrazzo S, Bernareggi A, Tongiorgi E (2016) Pharmacological treatment with mirtazapine rescues cortical atrophy and respiratory deficits in MeCP2 null mice. *Sci Rep* 6:19796.
- Blair IP, Williams KL, Warraich ST, Durnall JC, Thoeng AD, Manavis J, Blumbergs PC, Vucic S, Kiernan MC, Nicholson GA (2010) FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:639–645.
- Blokhuis AM, Koppers M, Groen EJN, van den Heuvel DMA, Dini Modigliani S, Anink JJ, Fumoto K, van Diggelen F, Snelting A, Soodaar P, Verheijen BM, Demmers JAA, Veldink JH, Aronica E, Bozzoni I, den Hertog J, van den Berg LH, Pasterkamp RJ (2016) Comparative interactomics analysis of different ALS-associated proteins identifies converging molecular pathways. *Acta Neuropathol (Berl)* 132:175–196.
- Bondarenko NS, Dilmukhametova LK, Kurina AY, Murtazina AR, Saprionova AY, Sysoeva AP, Ugrumov MV (2017) Plasticity of Central and Peripheral Sources of Noradrenaline in Rats during Ontogenesis. *Biochem Biokhimiia* 82:373–379.
- Borderies N, Bornert P, Gilardeau S, Bouret S (2020) Pharmacological evidence for the implication of noradrenaline in effort. *PLoS Biol* 18:e3000793.

- Bortel A (2014) Nature of DSP-4-Induced Neurotoxicity. In: Handbook of Neurotoxicity (Kostrzewa RM, ed), pp 219–236. New York, NY: Springer. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5836-4\\_75](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5836-4_75) [Accessed May 7, 2021].
- Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ, Sapp P, McKenna-Yasek D, Brown RH, Hayward LJ (2010) Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet* 19:4160–4175.
- Bourke SC, Tomlinson M, Williams TL, Bullock RE, Shaw PJ, Gibson GJ (2006) Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 5:140–147.
- Braak H, Brettschneider J, Ludolph AC, Lee VM, Trojanowski JQ, Del Tredici K (2013) Amyotrophic lateral sclerosis—a model of corticofugal axonal spread. *Nat Rev Neurol* 9:708–714.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson’s disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121–134.
- Bradley WG, Mash DC (2009) Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis* 10 Suppl 2:7–20.
- Bregman B, Le Saux F, Trottier S, Chauvel P, Maurin Y (1985) Chronic cobalt-induced epilepsy: noradrenaline ionophoresis and adrenoceptor binding studies in the rat cerebral cortex. *J Neural Transm* 63:109–118.
- Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS (1996) Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synap N Y N* 23:28–38.
- Brettschneider J et al. (2013) Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 74:20–38.
- Brown RH, Al-Chalabi A (2017) Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 377:162–172.
- Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327–338.
- Brunet A, Stuart-Lopez G, Burg T, Scekcic-Zahirovic J, Rouaux C (2020) Cortical Circuit Dysfunction as a Potential Driver of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurosci* 14:363.
- Burg T, Bichara C, Scekcic-Zahirovic J, Fischer M, Stuart-Lopez G, Brunet A, Lefebvre F, Cordero-Erausquin M, Rouaux C (2020a) Absence of Subcerebral Projection Neurons Is Beneficial in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* 88:688–702.
- Buzsáki G, Wang X-J (2012) Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci* 35:203–225.
- Caramia MD, Cicinelli P, Paradiso C, Mariorenzi R, Zarola F, Bernardi G, Rossini PM (1991) ‘Excitability changes of muscular responses to magnetic brain stimulation in patients with central motor disorders. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 81:243–250.

- Carrì MT, D'Ambrosi N, Cozzolino M (2017) Pathways to mitochondrial dysfunction in ALS pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 483:1187–1193.
- Carvalho M, Schwartz MS, Swash M (1995) Involvement of the external anal sphincter in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 18:848–853.
- Cenas (n.d.) Les différentes phases de sommeil - Centre du sommeil CENAS. Cenas Available at: <https://www.cenas.ch/le-sommeil/comprendre-le-sommeil/phases-du-sommeil/> [Accessed April 27, 2021].
- Chalermपालानुप T, Schroeder JP, Rorabaugh JM, Liles LC, Lah JJ, Levey AI, Weinshenker D (2018) Locus Coeruleus Ablation Exacerbates Cognitive Deficits, Neuropathology, and Lethality in P301S Tau Transgenic Mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 38:74–92.
- Chandler DJ, Gao W-J, Waterhouse BD (2014) Heterogeneous organization of the locus coeruleus projections to prefrontal and motor cortices. *Proc Natl Acad Sci* 111:6816–6821.
- Chang J-C, Hazelett DJ, Stewart JA, Morton DB (2014) Motor neuron expression of the voltage-gated calcium channel cacophony restores locomotion defects in a *Drosophila*, TDP-43 loss of function model of ALS. *Brain Res* 1584:39–51.
- Chang Q, Martin LJ (2016) Voltage-gated calcium channels are abnormal in cultured spinal motoneurons in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Neurobiol Dis* 93:78–95.
- Charcot JM (1886) Oeuvres complètes de J.-M. Charcot v. 1, 1886. Bureaux du Progrès Médical.
- Chen R, Tam A, Bütefisch C, Corwell B, Ziemann U, Rothwell JC, Cohen LG (1998) Intracortical inhibition and facilitation in different representations of the human motor cortex. *J Neurophysiol* 80:2870–2881.
- Chiò A, Bottacchi E, Buffa C, Mutani R, Mora G (2006) Positive effects of tertiary centres for amyotrophic lateral sclerosis on outcome and use of hospital facilities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:948–950.
- Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, Traynor BG, Consortium OB of the E (2009) Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler* 10:310–323.
- Chou C-M, Huang C-J, Shih C-M, Chen Y-P, Liu T-P, Chen C-T (2005) Identification of three mutations in the Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) gene with familial amyotrophic lateral sclerosis: transduction of human Cu,Zn-SOD into PC12 cells by HIV-1 TAT protein basic domain. *Ann N Y Acad Sci* 1042:303–313.
- Chou SM, Norris FH (1993) Amyotrophic lateral sclerosis: lower motor neuron disease spreading to upper motor neurons. *Muscle Nerve* 16:864–869.
- Chung YH, Joo KM, Nam RH, Cho MH, Kim DJ, Lee WB, Cha CI (2005) Decreased expression of calretinin in the cerebral cortex and hippocampus of SOD1G93A transgenic mice. *Brain Res* 1035:105–109.
- Ciura S, Lattante S, Le Ber I, Latouche M, Tostivint H, Brice A, Kabashi E (2013) Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 74:180–187.

- Clark RM, Blizzard CA, Young KM, King AE, Dickson TC (2017) Calretinin and Neuropeptide Y interneurons are differentially altered in the motor cortex of the SOD1G93A mouse model of ALS. *Sci Rep* 7:44461.
- Clark RM, Brizuela M, Blizzard CA, Dickson TC (2018) Reduced Excitability and Increased Neurite Complexity of Cortical Interneurons in a Familial Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Cell Neurosci* 12:328.
- Clayton EC, Rajkowski J, Cohen JD, Aston-Jones G (2004) Phasic activation of monkey locus ceruleus neurons by simple decisions in a forced-choice task. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24:9914–9920.
- Cleveland DW, Laing N, Hulse PV, Brown RH (1995) Toxic mutants in Charcot’s sclerosis. *Nature* 378:342–343.
- Cohen TJ, Hwang AW, Restrepo CR, Yuan C-X, Trojanowski JQ, Lee VMY (2015) An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity. *Nat Commun* 6:5845.
- Cooper-Knock J, Walsh MJ, Higginbottom A, Robin Highley J, Dickman MJ, Edbauer D, Ince PG, Wharton SB, Wilson SA, Kirby J, Hautbergue GM, Shaw PJ (2014) Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. *Brain J Neurol* 137:2040–2051.
- Corbo M, Hays AP (1992) Peripherin and neurofilament protein coexist in spinal spheroids of motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:531–537.
- Corcia P, Tauber C, Vercoillie J, Arlicot N, Prunier C, Praline J, Nicolas G, Venel Y, Hommet C, Baulieu J-L, Cottier J-P, Roussel C, Kassiou M, Guilloteau D, Ribeiro M-J (2012) Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7:e52941.
- Cornaglia M, Krishnamani G, Mouchiroud L, Sorrentino V, Lehnert T, Auwerx J, Gijs MAM (2016) Automated longitudinal monitoring of in vivo protein aggregation in neurodegenerative disease *C. elegans* models. *Mol Neurodegener* 11:17.
- Coull JT, Sahakian BJ, Hodges JR (1996) The alpha(2) antagonist idazoxan remediates certain attentional and executive dysfunction in patients with dementia of frontal type. *Psychopharmacology (Berl)* 123:239–249.
- Couratier P, Corcia P, Lautrette G, Nicol M, Preux P-M, Marin B (2016) Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Rev Neurol (Paris)* 172:37–45.
- Cowan AI, Stricker C (2004) Functional Connectivity in Layer IV Local Excitatory Circuits of Rat Somatosensory Cortex. *J Neurophysiol* 92:2137–2150.
- Cragnez L, Klima R, De Conti L, Romano G, Feiguin F, Buratti E, Baralle M, Baralle FE (2015) An age-related reduction of brain TBPH/TDP-43 levels precedes the onset of locomotion defects in a *Drosophila* ALS model. *Neuroscience* 311:415–421.
- Cui S-Y, Song J-Z, Cui X-Y, Hu X, Ma Y-N, Shi Y-T, Luo Y, Ge Y-R, Ding H, Ye H, Zhang Y-H (2018) Intracerebroventricular streptozotocin-induced Alzheimer’s disease-like sleep disorders in

- rats: Role of the GABAergic system in the parabrachial complex. *CNS Neurosci Ther* 24:1241–1252.
- Cutsem P van, Dewil M, Robberecht W, Bosch L van den (2005) Excitotoxicity and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis* 2:147–159.
- Da Costa MMJ, Allen CE, Higginbottom A, Ramesh T, Shaw PJ, McDermott CJ (2014) A new zebrafish model produced by TILLING of SOD1-related amyotrophic lateral sclerosis replicates key features of the disease and represents a tool for in vivo therapeutic screening. *Dis Model Mech* 7:73–81.
- Dahlstroem A, Fuxe K (1964) EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol Scand Suppl:SUPPL 232:1-55*.
- David Johnson J (2003) Noradrenergic control of cognition: global attenuation and an interrupt function. *Med Hypotheses* 60:689–692.
- de Boer TH, Nefkens F, van Helvoirt A, van Delft AM (1996) Differences in modulation of noradrenergic and serotonergic transmission by the alpha-2 adrenoceptor antagonists, mirtazapine, mianserin and idazoxan. *J Pharmacol Exp Ther* 277:852–860.
- de Hemptinne C, Ryapolova-Webb ES, Air EL, Garcia PA, Miller KJ, Ojemann JG, Ostrem JL, Galifianakis NB, Starr PA (2013) Exaggerated phase-amplitude coupling in the primary motor cortex in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4780–4785.
- de Hemptinne C, Swann NC, Ostrem JL, Ryapolova-Webb ES, San Luciano M, Galifianakis NB, Starr PA (2015) Therapeutic deep brain stimulation reduces cortical phase-amplitude coupling in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 18:779–786.
- de Noordhout AM, Rapisarda G, Bogacz D, Gérard P, De Pasqua V, Pennisi G, Delwaide PJ (1999) Corticomotoneuronal synaptic connections in normal man: an electrophysiological study. *Brain J Neurol* 122 ( Pt 7):1327–1340.
- DeJesus-Hernandez M et al. (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72:245–256.
- del Campo N, Chamberlain SR, Sahakian BJ, Robbins TW (2011) The Roles of Dopamine and Noradrenaline in the Pathophysiology and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 69:e145–e157.
- Delestrée N, Manuel M, Iglesias C, Elbasiouny SM, Heckman CJ, Zytnicki D (2014) Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 592:1687–1703.
- Dentel C, Palamiuc L, Henriques A, Lannes B, Spreux-Varoquaux O, Gutknecht L, René F, Echaniz-Laguna A, Gonzalez de Aguilar J-L, Lesch KP, Meininger V, Loeffler J-P, Dupuis L (2013a) Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain J Neurol* 136:483–493.

- Desiato MT, Bernardi G, Hagi H A, Boffa L, Caramia MD (2002) Transcranial magnetic stimulation of motor pathways directed to muscles supplied by cranial nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* 113:132–140.
- Desport JC, Preux PM, Magy L, Boirie Y, Vallat JM, Beaufrère B, Couratier P (2001) Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr* 74:328–334.
- Desport JC, Preux PM, Truong TC, Vallat JM, Sautereau D, Couratier P (1999) Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. *Neurology* 53:1059–1063.
- Devergnas A, Caiola M, Pittard D, Wichmann T (2019) Cortical Phase-Amplitude Coupling in a Progressive Model of Parkinsonism in Nonhuman Primates. *Cereb Cortex N Y N 1991* 29:167–177.
- Dharmadasa T, Matamala JM, Howells J, Vucic S, Kiernan MC (2020) Early focality and spread of cortical dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis: A regional study across the motor cortices. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* 131:958–966.
- Dhir A (2012) Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci Chapter 9:Unit9.37*.
- Di Lazzaro V, Manganelli F, Dileone M, Notturmo F, Esposito M, Capasso M, Dubbioso R, Pace M, Ranieri F, Minicuci G, Santoro L, Uncini A (2012) The effects of prolonged cathodal direct current stimulation on the excitatory and inhibitory circuits of the ipsilateral and contralateral motor cortex. *J Neural Transm Vienna Austria* 119:1499–1506.
- Di Lazzaro V, Ranieri F, Profice P, Pilato F, Mazzone P, Capone F, Insola A, Oliviero A (2013) Transcranial direct current stimulation effects on the excitability of corticospinal axons of the human cerebral cortex. *Brain Stimulat* 6:641–643.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321:1218–1221.
- Ding F, O'Donnell J, Thrane AS, Zeppenfeld D, Kang H, Xie L, Wang F, Nedergaard M (2013)  $\alpha$ 1-Adrenergic receptors mediate coordinated  $Ca^{2+}$  signaling of cortical astrocytes in awake, behaving mice. *Cell Calcium* 54:387–394.
- Dinh L, Nguyen T, Salgado H, Atzori M (2009) Norepinephrine homogeneously inhibits alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate- (AMPA-) mediated currents in all layers of the temporal cortex of the rat. *Neurochem Res* 34:1896–1906.
- Diop L, Brière R, Grondin L, Reader TA (1987) Adrenergic receptor and catecholamine distribution in rat cerebral cortex: binding studies with [ $^3H$ ]prazosin, [ $^3H$ ]idazoxan and [ $^3H$ ]dihydroalprenolol. *Brain Res* 402:403–408.
- Domyancic AV, Morilak DA (1997) Distribution of alpha1A adrenergic receptor mRNA in the rat brain visualized by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 386:358–378.

- Donaldson IM, Dolphin A, Jenner P, Marsden CD, Pycock C (1976) The involvement of noradrenaline in motor activity as shown by rotational behaviour after unilateral lesions of the locus coeruleus. *Brain J Neurol* 99:427–446.
- Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, Than ME, Mackenzie IRA, Capell A, Schmid B, Neumann M, Haass C (2010) ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J* 29:2841–2857.
- Douaud G, Filippini N, Knight S, Talbot K, Turner MR (2011) Integration of structural and functional magnetic resonance imaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J Neurol* 134:3470–3479.
- Drory VE, Goltsman E, Reznik JG, Mosek A, Korczyn AD (2001) The value of muscle exercise in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 191:133–137.
- Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S, Tassin J-P (2002) Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 22:2873–2884.
- Dudley MW, Howard BD, Cho AK (1990) The interaction of the beta-haloethyl benzylamines, xylamine, and DSP-4 with catecholaminergic neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:387–403.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar J-L, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Seilhean D, Hauw J-J, Lacomblez L, Loeffler J-P, Meininger V (2008) Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70:1004–1009.
- Dupuis L, Oudart H, René F, Gonzalez de Aguilar J-L, 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.
- Dupuis L, Pradat P-F, Ludolph AC, Loeffler J-P (2011) Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 10:75–82.
- Duty S, Jenner P (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol* 164:1357–1391.
- Easton N, Steward C, Marshall F, Fone K, Marsden C (2007) Effects of amphetamine isomers, methylphenidate and atomoxetine on synaptosomal and synaptic vesicle accumulation and release of dopamine and noradrenaline in vitro in the rat brain. *Neuropharmacology* 52:405–414.
- Eisen A, Braak H, Del Tredici K, Lemon R, Ludolph AC, Kiernan MC (2017) Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88:917–924.
- Eisen A, Kim S, Pant B (1992) Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve* 15:219–224.
- Eisen A, Pant B, Stewart H (1993) Cortical excitability in amyotrophic lateral sclerosis: a clue to pathogenesis. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol* 20:11–16.
- Ekblom J, Aquilonius SM, Jossan SS (1993) Differential increases in catecholamine metabolizing enzymes in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 123:289–294.

- El Oussini H, Scekcic-Zahirovic J, Vercruyssen P, Marques C, Dirrig-Grosch S, Dieterlé S, Picchiarelli G, Sinniger J, Rouaux C, Dupuis L (2017) Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 82:444–456.
- Eschenko O, Magri C, Panzeri S, Sara SJ (2012) Noradrenergic neurons of the locus coeruleus are phase locked to cortical up-down states during sleep. *Cereb Cortex N Y N* 1991 22:426–435.
- Esler M, Eikelis N, Schlaich M, Lambert G, Alvarenga M, Kaye D, El-Osta A, Guo L, Barton D, Pier C, Brenchley C, Dawood T, Jennings G, Lambert E (2008) Human Sympathetic Nerve Biology. *Ann N Y Acad Sci* 1148:338–348.
- Esmaili MA, Panahi M, Yadav S, Hennings L, Kiaei M (2013) Premature death of TDP-43 (A315T) transgenic mice due to gastrointestinal complications prior to development of full neurological symptoms of amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Exp Pathol* 94:56–64.
- Evans BA, Papaioannou M, Hamilton S, Summers RJ (1999) Alternative splicing generates two isoforms of the beta3-adrenoceptor which are differentially expressed in mouse tissues. *Br J Pharmacol* 127:1525–1531.
- Ferraro G, Sardo P, Sabatino M, La Grutta V (1994) Locus coeruleus noradrenaline system and focal penicillin hippocampal epilepsy: neurophysiological study. *Epilepsy Res* 19:215–220.
- Finberg JPM (2014) Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacol Ther* 143:133–152.
- Finberg JPM, Youdim MBH (2002) Pharmacological properties of the anti-Parkinson drug rasagiline; modification of endogenous brain amines, reserpine reversal, serotonergic and dopaminergic behaviours. *Neuropharmacology* 43:1110–1118.
- Fogarty MJ, Klenowski PM, Lee JD, Driberg-Thompson JR, Bartlett SE, Ngo ST, Hilliard MA, Bellingham MC, Noakes PG (2016) Cortical synaptic and dendritic spine abnormalities in a presymptomatic TDP-43 model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* 6:37968.
- Fornai F, Ruffoli R, Giorgi FS, Paparelli A (2011) The role of locus coeruleus in the antiepileptic activity induced by vagus nerve stimulation. *Eur J Neurosci* 33:2169–2178.
- Franowicz JS, Arnsten AF (1999) Treatment with the noradrenergic alpha-2 agonist clonidine, but not diazepam, improves spatial working memory in normal young rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 21:611–621.
- Fratta P, Mizielinska S, Nicoll AJ, Zloh M, Fisher EMC, Parkinson G, Isaacs AM (2012) C9orf72 hexanucleotide repeat associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia forms RNA G-quadruplexes. *Sci Rep* 2:1016.
- Fray AE, Ince PG, Banner SJ, Milton ID, Usher PA, Cookson MR, Shaw PJ (1998) The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 10:2481–2489.
- Fritschy JM, Grzanna R (1991) Selective effects of DSP-4 on locus coeruleus axons: are there pharmacologically different types of noradrenergic axons in the central nervous system? *Prog Brain Res* 88:257–268.

- Fujimori K, Ishikawa M, Otomo A, Atsuta N, Nakamura R, Akiyama T, Hadano S, Aoki M, Saya H, Sobue G, Okano H (2018) Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat Med* 24:1579–1589.
- Fujita Y, Okamoto K (2005) Golgi apparatus of the motor neurons in patients with amyotrophic lateral sclerosis and in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol* 25:388–394.
- Fumagalli E, Funicello M, Rauen T, Gobbi M, Mennini T (2008) Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *Eur J Pharmacol* 578:171–176.
- Fuxe K, Ungerstedt U (1968) Histochemical studies on the distribution of catecholamines and 5-hydroxytryptamine after intraventricular injections. *Histochem Histochem Histochim* 13:16–28.
- Gallo V et al. (2013) Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis: the EPIC cohort. *Neurology* 80:829–838.
- Garcia LC, Alcântara CC, Santos GL, Monção JVA, Russo TL (2019) Cryotherapy Reduces Muscle Spasticity But Does Not Affect Proprioception in Ischemic Stroke: A Randomized Sham-Controlled Crossover Study. *Am J Phys Med Rehabil* 98:51–57.
- Geevasinga N, Menon P, Özdinler PH, Kiernan MC, Vucic S (2016) Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat Rev Neurol* 12:651–661.
- Geloso MC, Corvino V, Marchese E, Serrano A, Michetti F, D'Ambrosi N (2017) The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front Aging Neurosci* 9 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2017.00242/full> [Accessed April 8, 2021].
- Genton L, Viatte V, Janssens J-P, Héritier A-C, Pichard C (2011) Nutritional state, energy intakes and energy expenditure of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *Clin Nutr Edinb Scotl* 30:553–559.
- Geraciotti TD, Baker DG, Ekhaton NN, West SA, Hill KK, Bruce AB, Schmidt D, Rounds-Kugler B, Yehuda R, Keck PE, Kasckow JW (2001) CSF norepinephrine concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 158:1227–1230.
- Giorgi FS, Ferrucci M, Lazzeri G, Pizzanelli C, Lenzi P, Alessandri MG, Murri L, Fornai F (2003) A damage to locus coeruleus neurons converts sporadic seizures into self-sustaining limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci* 17:2593–2601.
- Gobert A, Rivet JM, Cistarelli L, Melon C, Millan MJ (1997) Alpha2-adrenergic receptor blockade markedly potentiates duloxetine- and fluoxetine-induced increases in noradrenaline, dopamine, and serotonin levels in the frontal cortex of freely moving rats. *J Neurochem* 69:2616–2619.
- Goetz CG (2000) Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve* 23:336–343.

- Gois AM, Mendonça DMF, Freire MAM, Santos JR (2020) IN VITRO AND IN VIVO MODELS OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: AN UPDATED OVERVIEW. *Brain Res Bull* 159:32–43.
- Gonatas NK, Stieber A, Gonatas JO (2006) Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *J Neurol Sci* 246:21–30.
- Gonatas NK, Stieber A, Mourelatos Z, Chen Y, Gonatas JO, Appel SH, Hays AP, Hickey WF, Hauw JJ (1992) Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 140:731–737.
- Goodman MS, Kumar S, Zomorodi R, Ghazala Z, Cheam ASM, Barr MS, Daskalakis ZJ, Blumberger DM, Fischer C, Flint A, Mah L, Herrmann N, Bowie CR, Mulsant BH, Rajji TK (2018) Theta-Gamma Coupling and Working Memory in Alzheimer’s Dementia and Mild Cognitive Impairment. *Front Aging Neurosci* 10:101.
- Gottesmann C (2008) Noradrenaline involvement in basic and higher integrated REM sleep processes. *Prog Neurobiol* 85:237–272.
- Goutagny R, Gu N, Cavanagh C, Jackson J, Chabot J-G, Quirion R, Krantic S, Williams S (2013) Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before A $\beta$  overproduction in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Eur J Neurosci* 37:1896–1902.
- Gowland A, Opie-Martin S, Scott KM, Jones AR, Mehta PR, Batts CJ, Ellis CM, Leigh PN, Shaw CE, Sreedharan J, Al-Chalabi A (2019) Predicting the future of ALS: the impact of demographic change and potential new treatments on the prevalence of ALS in the United Kingdom, 2020–2116. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener* 20:264–274.
- Grad LI, Pokrishevsky E, Cashman NR (2017) Intercellular Prion-Like Conversion and Transmission of Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) in Cell Culture. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1658:357–367.
- Gravel M, Béland L-C, Soucy G, Abdelhamid E, Rahimian R, Gravel C, Kriz J (2016) IL-10 Controls Early Microglial Phenotypes and Disease Onset in ALS Caused by Misfolded Superoxide Dismutase 1. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 36:1031–1048.
- Grzanna R, Molliver ME (1980) The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience* 5:21–40.
- Gunes ZI, Kan VWY, Ye X, Liebscher S (2020) Exciting Complexity: The Role of Motor Circuit Elements in ALS Pathophysiology. *Front Neurosci* 14:573.
- Gupta MK, Papay RS, Jurgens CWD, Gaivin RJ, Shi T, Doze VA, Perez DM (2009)  $\alpha$ 1-Adrenergic Receptors Regulate Neurogenesis and Gliogenesis. *Mol Pharmacol* 76:314–326.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772–1775.
- Gutiérrez IL, González-Prieto M, Caso JR, García-Bueno B, Leza JC, Madrigal JLM (2019) Reboxetine Treatment Reduces Neuroinflammation and Neurodegeneration in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer’s Disease: Role of CCL2. *Mol Neurobiol* 56:8628–8642.

- Gyawali A, Kang Y-S (2021) Transport Alteration of 4-Phenyl Butyric Acid Mediated by a Sodium- and Proton-Coupled Monocarboxylic Acid Transporter System in ALS Model Cell Lines (NSC-34) Under Inflammatory States. *J Pharm Sci* 110:1374–1384.
- Gyires K, Zádori ZS, Török T, Mátyus P (2009) alpha(2)-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochem Int* 55:447–453.
- Hammer RP, Tomiyasu U, Scheibel AB (1979) Degeneration of the human Betz cell due to amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 63:336–346.
- Handley EE, Pitman KA, Dawkins E, Young KM, Clark RM, Jiang TC, Turner BJ, Dickson TC, Blizzard CA (2017) Synapse Dysfunction of Layer V Pyramidal Neurons Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model of TDP-43 Proteinopathies. *Cereb Cortex N Y N 1991* 27:3630–3647.
- Hannestad J, Gallezot J-D, Planeta-Wilson B, Lin S-F, Williams WA, van Dyck CH, Malison RT, Carson RE, Ding Y-S (2010) Clinically relevant doses of methylphenidate significantly occupy norepinephrine transporters in humans in vivo. *Biol Psychiatry* 68:854–860.
- Hatcher-Martin JM, Armstrong KA, Scorr LM, Factor SA (2016) Propranolol therapy for Tardive dyskinesia: A retrospective examination. *Parkinsonism Relat Disord* 32:124–126.
- Hayashi Y, Homma K, Ichijo H (2016) SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. *Adv Biol Regul* 60:95–104.
- Heal DJ, Bristow LM, Hurst EM, Elliott JM, Buckett WR (1989) Sex-related differences in central adrenergic function and responsiveness to repeated administration of desipramine or electroconvulsive shock. *Br J Pharmacol* 97:111–118.
- Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC (1984) Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* 311:467–469.
- Heinemann SH, Rettig J, Wunder F, Pongs O (1995) Molecular and functional characterization of a rat brain Kv beta 3 potassium channel subunit. *FEBS Lett* 377:383–389.
- Heneka MT, Nadrigny F, Regen T, Martinez-Hernandez A, Dumitrescu-Ozimek L, Terwel D, Jardanhazi-Kurutz D, Walter J, Kirchhoff F, Hanisch U-K, Kummer MP (2010) Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6058–6063.
- Heneka MT, Ramanathan M, Jacobs AH, Dumitrescu-Ozimek L, Bilkei-Gorzo A, Debeer T, Sastre M, Galldik N, Zimmer A, Hoehn M, Heiss W-D, Klockgether T, Staufenbiel M (2006) Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26:1343–1354.
- Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A (2017) The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurol Engl Ed* 32:533–539.
- Herraiz T, Flores A, Fernández L (2018) Analysis of monoamine oxidase (MAO) enzymatic activity by high-performance liquid chromatography-diode array detection combined with an assay of

- oxidation with a peroxidase and its application to MAO inhibitors from foods and plants. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1073:136–144.
- Hertz L, Lovatt D, Goldman SA, Nedergaard M (2010) Adrenoceptors in brain: Cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and  $[Ca^{2+}]_i$ . *Neurochem Int* 57:411–420.
- Herwig U, Bräuer K, Connemann B, Spitzer M, Schönfeldt-Lecuona C (2002) Intracortical excitability is modulated by a norepinephrine-reuptake inhibitor as measured with paired-pulse transcranial magnetic stimulation. *Psychopharmacology (Berl)* 164:228–232.
- Hewamadduma CAA, Grierson AJ, Ma TP, Pan L, Moens CB, Ingham PW, Ramesh T, Shaw PJ (2013) Tardbp splicing rescues motor neuron and axonal development in a mutant tardbp zebrafish. *Hum Mol Genet* 22:2376–2386.
- Hicks GG, Singh N, Nashabi A, Mai S, Bozek G, Klewes L, Arapovic D, White EK, Koury MJ, Oltz EM, Van Kaer L, Ruley HE (2000) Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nat Genet* 24:175–179.
- Hill SJ, Mordes DA, Cameron LA, Neuberger DS, Landini S, Eggan K, Livingston DM (2016) Two familial ALS proteins function in prevention/repair of transcription-associated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E7701–E7709.
- Hillary FG, Roman CA, Venkatesan U, Rajtmajer SM, Bajo R, Castellanos ND (2015) Hyperconnectivity is a fundamental response to neurological disruption. *Neuropsychology* 29:59–75.
- Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G (1984) Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:471–480.
- Ho YS, Liu RH, Nichols AW, Kumar SD (1990) Isotopic Analog as the Internal Standard for Quantitative Determination: Evaluation of Mass Spectra of Commonly Abused Drugs and Their Deuterated Analogs. *J Forensic Sci* 35:123–132.
- Hobson EV, McDermott CJ (2016) Supportive and symptomatic management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 12:526–538.
- Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189:55–58.
- Hu H, Real E, Takamiya K, Kang M-G, Ledoux J, Hagan RL, Malinow R (2007) Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell* 131:160–173.
- Hübers A, Just W, Rosenbohm A, Müller K, Marroquin N, Goebel I, Högel J, Thiele H, Altmüller J, Nürnberg P, Weishaupt JH, Kubisch C, Ludolph AC, Volk AE (2015) De novo FUS mutations are the most frequent genetic cause in early-onset German ALS patients. *Neurobiol Aging* 36:3117.e1-3117.e6.
- Huisman MHB, Seelen M, de Jong SW, Dorresteyn KRIS, van Doormaal PTC, van der Kooij AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, van den Berg LH, Veldink JH (2013) Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:976–981.

- Huisman MHB, Seelen M, van Doormaal PTC, de Jong SW, de Vries JHM, van der Kooij AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, van den Berg LH, Veldink JH (2015) Effect of Presymptomatic Body Mass Index and Consumption of Fat and Alcohol on Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol* 72:1155–1162.
- Ionov ID (2007) Survey of ALS-associated factors potentially promoting Ca<sup>2+</sup> overload of motor neurons. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis* 8:260–265.
- Isa T, Kinoshita M, Nishimura Y (2013) Role of Direct vs. Indirect Pathways from the Motor Cortex to Spinal Motoneurons in the Control of Hand Dexterity. *Front Neurol* 4:191.
- Iyer PM, Egan C, Pinto-Grau M, Burke T, Elamin M, Nasserolelami B, Pender N, Lalor EC, Hardiman O (2015) Functional Connectivity Changes in Resting-State EEG as Potential Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* 10:e0128682.
- Jäckel S, Summerer AK, Thömmes CM, Pan X, Voigt A, Schulz JB, Rasse TM, Dormann D, Haass C, Kahle PJ (2015) Nuclear import factor transportin and arginine methyltransferase 1 modify FUS neurotoxicity in *Drosophila*. *Neurobiol Dis* 74:76–88.
- Jahn CI, Gilardeau S, Varazzani C, Blain B, Sallet J, Walton ME, Bouret S (2018) Dual contributions of noradrenaline to behavioural flexibility and motivation. *Psychopharmacology (Berl)* 235:2687–2702.
- Jaim-Etcheverry G, Zieher LM (1980) DSP-4: a novel compound with neurotoxic effects on noradrenergic neurons of adult and developing rats. *Brain Res* 188:513–523.
- Jaiswal MK, Zech W-D, Goos M, Leutbecher C, Ferri A, Zippelius A, Carrì MT, Nau R, Keller BU (2009) Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci* 10:64.
- Jawaid A, Murthy SB, Wilson AM, Qureshi SU, Amro MJ, Wheaton M, Simpson E, Harati Y, Strutt AM, York MK, Schulz PE (2010) A decrease in body mass index is associated with faster progression of motor symptoms and shorter survival in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis* 11:542–548.
- Jelsone-Swain L, Persad C, Votruba KL, Weisenbach SL, Johnson T, Gruis KL, Welsh RC (2012) The Relationship between Depressive Symptoms, Disease State, and Cognition in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Psychol* 3:542.
- Jerlicz M, Kostowski W, Bidziński A, Hauptman M, Dymecki J (1978) Audiogenic seizures in rats: relation to noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Acta Physiol Pol* 29:409–412.
- Ji X-H, Cao X-H, Zhang C-L, Feng Z-J, Zhang X-H, Ma L, Li B-M (2008) Pre- and postsynaptic beta-adrenergic activation enhances excitatory synaptic transmission in layer V/VI pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex of rats. *Cereb Cortex N Y N* 1991 18:1506–1520.
- Jiang J et al. (2016) Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron* 90:535–550.

- Jiang J, Cleveland DW (2016) Bidirectional Transcriptional Inhibition as Therapy for ALS/FTD Caused by Repeat Expansion in C9orf72. *Neuron* 92:1160–1163.
- Jones BE, Halaris AE, McIlhenny M, Moore RY (1977) Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenaline neurons. *Brain Res* 127:1–21.
- Jones BE, Moore RY (1977) Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res* 127:25–53.
- Jossan SS, Ekblom J, Aquilonius SM, Oreland L (1994) Monoamine oxidase-B in motor cortex and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis studied by quantitative autoradiography. *J Neural Transm Suppl* 41:243–248.
- Joyce JN, Lexow N, Kim SJ, Artymyshyn R, Senzon S, Lawrence D, Cassanova MF, Kleinman JE, Bird ED, Winokur A (1992) Distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in human post-mortem brain: alterations in limbic regions of schizophrenics. *Synapse* 10:228–246.
- Kádková A, Radecke J, Sørensen JB (2019) The SNAP-25 Protein Family. *Neuroscience* 420:50–71.
- Käenmäki M, Tammimäki A, Garcia-Horsman JA, Myöhänen T, Schendzielorz N, Karayiorgou M, Gogos JA, Männistö PT (2009) Importance of membrane-bound catechol-O-methyltransferase in L-DOPA metabolism: a pharmacokinetic study in two types of Comt gene modified mice. *Br J Pharmacol* 158:1884–1894.
- Kahle KT, Rinehart J, de Los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I, Lifton RP (2005) WNK3 modulates transport of Cl<sup>-</sup> in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16783–16788.
- Kalaria RN, Andorn AC (1991) Adrenergic receptors in aging and Alzheimer's disease: decreased alpha 2-receptors demonstrated by [3H]p-aminoclonidine binding in prefrontal cortex. *Neurobiol Aging* 12:131–136.
- Kalinin S, Polak PE, Lin SX, Sakharkar AJ, Pandey SC, Feinstein DL (2012) The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33:1651–1663.
- Kam K, Duffy ÁM, Moretto J, LaFrancois JJ, Scharfman HE (2016) Interictal spikes during sleep are an early defect in the Tg2576 mouse model of  $\beta$ -amyloid neuropathology. *Sci Rep* 6:20119.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum S and Hudspeth A (2012). *Principles of neural science*, Vol 4. New York, NY : The McGraw-Hill Companies.
- Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothstein JD, Bergles DE (2013) Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 16:571–579.
- Karandreas N, Papadopoulou M, Kokotis P, Papapostolou A, Tsivgoulis G, Zambelis T (2007) Impaired interhemispheric inhibition in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis* 8:112–118.

- Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Panula P (1995a) Neuronal and non-neuronal catechol-O-methyltransferase in primary cultures of rat brain cells. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci* 13:825–834.
- Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Panula P (1995b) Catechol-O-methyltransferase (COMT) in rat brain: immunoelectron microscopic study with an antiserum against rat recombinant COMT protein. *Neurosci Lett* 187:57–60.
- Kassubek J, Müller H-P, Del Tredici K, Brettschneider J, Pinkhardt EH, Lulé D, Böhm S, Braak H, Ludolph AC (2014) Diffusion tensor imaging analysis of sequential spreading of disease in amyotrophic lateral sclerosis confirms patterns of TDP-43 pathology. *Brain J Neurol* 137:1733–1740.
- Katsouri L, Vizcaychipi MP, McArthur S, Harrison I, Suárez-Calvet M, Lleo A, Lloyd DG, Ma D, Sastre M (2013) Prazosin, an  $\alpha(1)$ -adrenoceptor antagonist, prevents memory deterioration in the APP23 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34:1105–1115.
- Kawahara Y, Kawahara H, Westerink BHC (1999) Tonic regulation of the activity of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of the conscious rat studied by dual-probe microdialysis. *Brain Res* 823:42–48.
- Keeley S, Fenton AA, Rinzel J (2017) Modeling fast and slow gamma oscillations with interneurons of different subtype. *J Neurophysiol* 117:950–965.
- Kesiktas N, Paker N, Erdogan N, Gülsen G, Biçki D, Yilmaz H (2004) The use of hydrotherapy for the management of spasticity. *Neurorehabil Neural Repair* 18:268–273.
- Khademullah CS, Aqrabawi AJ, Place KM, Dargaei Z, Liang X, Pressey JC, Bedard S, Yang JW, Garand D, Keramidis I, Gasecka A, Côté D, De Koninck Y, Keith J, Zinman L, Robertson J, Kim JC, Woodin MA (2020) Cortical interneuron-mediated inhibition delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J Neurol* 143:800–810.
- Khedr EM, Ahmed MA, Darwish ES, Ali AM (2011) The relationship between motor cortex excitability and severity of Alzheimer's disease: a transcranial magnetic stimulation study. *Neurophysiol Clin Clin Neurophysiol* 41:107–113.
- Kiernan JA, Hudson AJ (1991) Changes in sizes of cortical and lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J Neurol* 114 ( Pt 2):843–853.
- Kiernan MC, Ziemann U, Eisen A (2019) Amyotrophic lateral sclerosis: Origins traced to impaired balance between neural excitation and inhibition in the neonatal period. *Muscle Nerve* 60:232–235.
- Kim B, Kocsis B, Hwang E, Kim Y, Strecker RE, McCarley RW, Choi JH (2017a) Differential modulation of global and local neural oscillations in REM sleep by homeostatic sleep regulation. *Proc Natl Acad Sci* 114:E1727–E1736.
- Kim HJ, Taylor JP (2017) Lost in Transportation: Nucleocytoplasmic Transport Defects in ALS and Other Neurodegenerative Diseases. *Neuron* 96:285–297.
- Kim J, Hughes EG, Shetty AS, Arlotta P, Goff LA, Bergles DE, Brown SP (2017b) Changes in the Excitability of Neocortical Neurons in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis Are Not Specific to

Corticospinal Neurons and Are Modulated by Advancing Disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 37:9037–9053.

King AE, Woodhouse A, Kirkcaldie MTK, Vickers JC (2016) Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? *Exp Neurol* 275 Pt 1:162–171.

Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Akagi T, Hashikawa T, Doi H, Takumi T, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N (2015) FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* 3:24.

Klomjai W, Katz R, Lackmy-Vallée A (2015) Basic principles of transcranial magnetic stimulation (TMS) and repetitive TMS (rTMS). *Ann Phys Rehabil Med* 58:208–213.

Kobayashi M, Imamura K, Sugai T, Onoda N, Yamamoto M, Komai S, Watanabe Y (2000) Selective suppression of horizontal propagation in rat visual cortex by norepinephrine. *Eur J Neurosci* 12:264–272.

Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng H-J, Terpstra ML, Zundel CAC, Vieira de Sá R, Schellevis RD, Waite AJ, Blake DJ, Veldink JH, van den Berg LH, Pasterkamp RJ (2015) C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann Neurol* 78:426–438.

Koryntová H, Kubová H, Tutka P, Mares P (2002) Changes of cortical epileptic afterdischarges under the influence of convulsant drugs. *Brain Res Bull* 58:49–54.

Kraemer BC, Schuck T, Wheeler JM, Robinson LC, Trojanowski JQ, Lee VMY, Schellenberg GD (2010) Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathol (Berl)* 119:409–419.

Kreiner G, Rafa-Zabłocka K, Barut J, Chmielarz P, Kot M, Bagińska M, Parlato R, Daniel WA, Nalepa I (2019) Stimulation of noradrenergic transmission by reboxetine is beneficial for a mouse model of progressive parkinsonism. *Sci Rep* 9:5262.

Kremer M et al. (2018) A Dual Noradrenergic Mechanism for the Relief of Neuropathic Allodynia by the Antidepressant Drugs Duloxetine and Amitriptyline. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 38:9934–9954.

Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, Wroe S, Asselman P, Marsden CD (1993) Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J Physiol* 471:501–519.

Kuo H-I, Paulus W, Batsikadze G, Jamil A, Kuo M-F, Nitsche MA (2017) Acute and Chronic Noradrenergic Effects on Cortical Excitability in Healthy Humans. *Int J Neuropsychopharmacol* 20:634–643.

Kurata HT, Fedida D (2006) A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 92:185–208.

Kuroda M, Sok J, Webb L, Baechtold H, Urano F, Yin Y, Chung P, de Rooij DG, Akhmedov A, Ashley T, Ron D (2000) Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(-/-) mice. *EMBO J* 19:453–462.

Kurt A, Nijboer F, Matuz T, Kübler A (2007) Depression and anxiety in individuals with amyotrophic lateral sclerosis: epidemiology and management. *CNS Drugs* 21:279–291.

- Kwiatkowski TJ et al. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323:1205–1208.
- Lagier-Tourenne C et al. (2012) Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat Neurosci* 15:1488–1497.
- Laitinen KS, Tuomisto L, MacDonald E (1995) Effects of a selective alpha 2-adrenoceptor antagonist, atipamezole, on hypothalamic histamine and noradrenaline release in vivo. *Eur J Pharmacol* 285:255–260.
- Lance JW (1980) The control of muscle tone, reflexes, and movement: Robert Wartenberg Lecture. *Neurology* 30:1303–1313.
- Lange DJ, Murphy PL, Diamond B, Appel V, Lai EC, Younger DS, Appel SH (1998) Selegiline is ineffective in a collaborative double-blind, placebo-controlled trial for treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 55:93–96.
- Law-Tho D, Crepel F, Hirsch JC (1993) Noradrenaline decreases transmission of NMDA- and non-NMDA-receptor mediated monosynaptic EPSPs in rat prefrontal neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 5:1494–1500.
- Leão AHFF, Sarmiento-Silva AJ, Santos JR, Ribeiro AM, Silva RH (2015) Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. *Brain Pathol Zurich Switz* 25:377–390.
- Lederer CW, Torrisi A, Pantelidou M, Santama N, Cavallaro S (2007) Pathways and genes differentially expressed in the motor cortex of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics* 8:26.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang P-W, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD (2012) Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487:443–448.
- Lee Y-B et al. (2013) Hexanucleotide repeats in ALS/FTD form length-dependent RNA foci, sequester RNA binding proteins, and are neurotoxic. *Cell Rep* 5:1178–1186.
- Lefort S, Tamm C, Floyd Sarria J-C, Petersen CCH (2009) The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. *Neuron* 61:301–316.
- Lemon RN (2008) Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci* 31:195–218.
- Léna I, Parrot S, Deschaux O, Muffat-Joly S, Sauvinet V, Renaud B, Suaud-Chagny M-F, Gottesmann C (2005) Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep-wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *J Neurosci Res* 81:891–899.
- Leonard BE (1997a) The role of noradrenaline in depression: a review. *J Psychopharmacol Oxf Engl* 11:339-47.
- Leonard BE (1997b) Noradrenaline in basic models of depression. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol* 7 Suppl 1:S11-16; discussion S71-73.

- Leroy F, Lamotte d'Incamps B, Imhoff-Manuel RD, Zytnicki D (2014) Early intrinsic hyperexcitability does not contribute to motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *eLife* 3.
- Levitt P, Pintar JE, Breakefield XO (1982) Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. *Proc Natl Acad Sci* 79:6385–6389.
- Lewis DA, Campbell MJ, Foote SL, Goldstein M, Morrison JH (1987) The distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers in primate neocortex is widespread but regionally specific. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 7:279–290.
- Li BM, Mao ZM, Wang M, Mei ZT (1999) Alpha-2 adrenergic modulation of prefrontal cortical neuronal activity related to spatial working memory in monkeys. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 21:601–610.
- Li X, Guo S, Liu K, Zhang C, Chang H, Yang W, Rong S, Hu Q, Cui J, Wang F, Sun T (2020) GABRG2 Deletion Linked to Genetic Epilepsy with Febrile Seizures Plus Affects the Expression of GABAA Receptor Subunits and Other Genes at Different Temperatures. *Neuroscience* 438:116–136.
- Li Y, Jiao Q, Du X, Bi M, Han S, Jiao L, Jiang H (2018) Investigation of Behavioral Dysfunctions Induced by Monoamine Depletions in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Front Cell Neurosci* 12:241.
- Liachko NF, Guthrie CR, Kraemer BC (2010) Phosphorylation promotes neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:16208–16219.
- Libet B, Gleason CA, Wright EW, Feinstein B (1977) Suppression of an epileptiform type of electrocortical activity in the rat by stimulation in the vicinity of locus coeruleus. *Epilepsia* 18:451–462.
- Likhtik E, Johansen JP (2019) Neuromodulation in circuits of aversive emotional learning. *Nat Neurosci* 22:1586–1597.
- Lillo P, Hodges JR (2009) Frontotemporal dementia and motor neurone disease: overlapping clinic-pathological disorders. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas* 16:1131–1135.
- Lindvall O, Barry DI, Kikvadze I, Brundin P, Bolwig TG, Björklund A (1988) Intracerebral grafting of fetal noradrenergic locus coeruleus neurons: evidence for seizure suppression in the kindling model of epilepsy. *Prog Brain Res* 78:79–86.
- Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79:416–438.
- Liu Y, Liang X, Ren W-W, Li B-M (2014) Expression of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptors in different subtypes of interneurons in the medial prefrontal cortex of mice. *Neuroscience* 257:149–157.
- Liu Y, Pattamatta A, Zu T, Reid T, Bardhi O, Borchelt DR, Yachnis AT, Ranum LPW (2016) C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron* 90:521–534.
- Lloyd CM, Richardson MP, Brooks DJ, Al-Chalabi A, Leigh PN (2000) Extramotor involvement in ALS: PET studies with the GABA(A) ligand [(11)C]flumazenil. *Brain J Neurol* 123 ( Pt 11):2289–2296.

- Lodato S, Arlotta P (2015) Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 31:699–720.
- Lodato S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, Hensch TK, Arlotta P (2011) Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* 69:763–779.
- Logroscino G, Piccininni M (2019) Amyotrophic Lateral Sclerosis Descriptive Epidemiology: The Origin of Geographic Difference. *Neuroepidemiology* 52:93–103.
- Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B (2002) The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* 59:1077–1079.
- Longinetti E, Fang F (2019) Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Curr Opin Neurol* 32:771–776.
- Loughlin SE, Foote SL, Grzanna R (1986) Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18:307–319.
- Lübke J, Egger V, Sakmann B, Feldmeyer D (2000) Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 20:5300–5311.
- Luchtman DW, Shao D, Song C (2009) Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson’s disease. *Physiol Behav* 98:130–138.
- Ludolph AC et al. (2018) Safety and efficacy of rasagiline as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 17:681–688.
- Ludolph AC et al. (2020) Effect of High-Caloric Nutrition on Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* 87:206–216.
- Lulé D, Diekmann V, Kassubek J, Kurt A, Birbaumer N, Ludolph AC, Kraft E (2007) Cortical plasticity in amyotrophic lateral sclerosis: motor imagery and function. *Neurorehabil Neural Repair* 21:518–526.
- Lumsden A, Krumlauf R (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274:1109–1115.
- Luna J et al. (2019) Clinical features and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis in Africa: the TROPALS study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 90:20–29.
- Lutz C (2018) Mouse models of ALS: Past, present and future. *Brain Res* 1693:1–10.
- Majcher V, Goode A, James V, Layfield R (2015) Autophagy receptor defects and ALS-FTLD. *Mol Cell Neurosci* 66:43–52.
- Manganotti P, Tamburin S, Zanette G, Fiaschi A (2001) Hyperexcitable cortical responses in progressive myoclonic epilepsy: a TMS study. *Neurology* 57:1793–1799.
- Marcuzzo S, Terragni B, Bonanno S, Isaia D, Cavalcante P, Cappelletti C, Ciusani E, Rizzo A, Regalia G, Yoshimura N, Ugolini GS, Rasponi M, Bechi G, Mantegazza M, Mantegazza R, Bernasconi P,

- Minati L (2019) Hyperexcitability in Cultured Cortical Neuron Networks from the G93A-SOD1 Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Mouse and its Molecular Correlates. *Neuroscience* 416:88–99.
- Marin B, Desport JC, Kajeu P, Jesus P, Nicolaud B, Nicol M, Preux PM, Couratier P (2011) Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82:628–634.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793–807.
- Marques C, Burg T, Scekic-Zahirovic J, Fischer M, Rouaux C (2021) Upper and Lower Motor Neuron Degenerations Are Somatotopically Related and Temporally Ordered in the Sod1 Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Sci* 11.
- Marques C, Fischer M, Keime C, Burg T, Brunet A, Scekic-Zahirovic J, Rouaux C (2019) Early alterations of RNA metabolism and splicing from adult corticospinal neurons in an ALS mouse model. [bioRxiv:667733](https://doi.org/10.1101/667733).
- Martínez-Silva M de L, Imhoff-Manuel RD, Sharma A, Heckman CJ, Shneider NA, Roselli F, Zytnicki D, Manuel M (2018) Hypoexcitability precedes denervation in the large fast-contracting motor units in two unrelated mouse models of ALS. *eLife* 7.
- Maruyama W, Akao Y, Carrillo MC, Kitani K, Youdium MBH, Naoi M (2002) Neuroprotection by propargylamines in Parkinson's disease: Suppression of apoptosis and induction of prosurvival genes. *Neurotoxicol Teratol* 24:675–682.
- Masilamoni GJ, Groover O, Smith Y (2017) Reduced noradrenergic innervation of ventral midbrain dopaminergic cell groups and the subthalamic nucleus in MPTP-treated parkinsonian monkeys. *Neurobiol Dis* 100:9–18.
- Mason ST, Corcoran ME (1979) Depletion of brain noradrenaline, but not dopamine, by intracerebral 6-hydroxydopamine potentiates convulsions induced by electroshock. *J Pharm Pharmacol* 31:209–211.
- Mason ST, Fibiger HC (1979) Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 187:703–724.
- Masrori P, Van Damme P (2020) Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur J Neurol* 27:1918–1929.
- Mastrocola AS, Kim SH, Trinh AT, Rodenkirch LA, Tibbetts RS (2013) The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. *J Biol Chem* 288:24731–24741.
- Mather M, Clewett D, Sakaki M, Harley CW (2016) Norepinephrine ignites local hotspots of neuronal excitation: How arousal amplifies selectivity in perception and memory. *Behav Brain Sci* 39:e200.

- Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hyde TM, Herman MM, Kleinman JE, Weinberger DR (2003) Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* 116:127–137.
- Matthews KL, Chen CPL-H, Esiri MM, Keene J, Minger SL, Francis PT (2002) Noradrenergic changes, aggressive behavior, and cognition in patients with dementia. *Biol Psychiatry* 51:407–416.
- Mazzini L, Testa D, Balzarini C, Mora G (1994) An open-randomized clinical trial of selegiline in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 241:223–227.
- McAlary L, Plotkin SS, Yerbury JJ, Cashman NR (2019) Prion-Like Propagation of Protein Misfolding and Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci* 12:262.
- McCarley RW, Hobson JA (1975) Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science* 189:58–60.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049–6055.
- McCune SK, Voigt MM, Hill JM (1993) Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain. *Neuroscience* 57:143–151.
- McDonald ER, Wiedefeld SA, Hillel A, Carpenter CL, Walter RA (1994) Survival in amyotrophic lateral sclerosis. The role of psychological factors. *Arch Neurol* 51:17–23.
- McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27:1–28.
- McGuire V, Longstreth WT Jr, Nelson LM, Koepsell TD, Checkoway H, Morgan MS, van Belle G (1997) Occupational Exposures and Amyotrophic Lateral Sclerosis. A Population-based Case-Control Study. *Am J Epidemiol* 145:1076–1088.
- McMillan PJ, White SS, Franklin A, Greenup JL, Leverenz JB, Raskind MA, Szot P (2011) Differential response of the central noradrenergic nervous system to the loss of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Brain Res* 1373:240–252.
- Meana JJ, Barturen F, Garro MA, García-Sevilla JA, Fontán A, Zarranz JJ (1992) Decreased density of presynaptic alpha 2-adrenoceptors in postmortem brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 58:1896–1904.
- Meier JM, van der Burgh HK, Nitert AD, Bede P, de Lange SC, Hardiman O, van den Berg LH, van den Heuvel MP (2020) Connectome-Based Propagation Model in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* 87:725–738.
- Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, Akkari PA (2019) ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front Neurosci* 13:1310.
- Menke RAL, Proudfoot M, Wu J, Andersen PM, Talbot K, Benatar M, Turner MR (2016) Increased functional connectivity common to symptomatic amyotrophic lateral sclerosis and those at genetic risk. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87:580–588.

- Menon P, Geevasinga N, Yiannikas C, Howells J, Kiernan MC, Vucic S (2015a) Sensitivity and specificity of threshold tracking transcranial magnetic stimulation for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *Lancet Neurol* 14:478–484.
- Menon P, Kiernan MC, Vucic S (2015b) Cortical hyperexcitability precedes lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clin Neurophysiol* 126:803–809.
- Nestler E, Hyman SE, Holtzman DM and Malenka RC (2015). *Molecular neuropharmacology : A foundation for clinical neuroscience*, 3rd Edn. New York, NY : The McGraw-Hill Companies.
- Milan L, Barrière G, De Deurwaerdère P, Cazalets J-R, Bertrand SS (2014) Monoaminergic control of spinal locomotor networks in SOD1G93A newborn mice. *Front Neural Circuits* 8
- Miller RG, Mitchell JD, Moore DH (2012) Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*:CD001447.
- Mills KR, Nithi KA (1997) Corticomotor threshold is reduced in early sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 20:1137–1141.
- Mishra PK, Burger RL, Bettendorf AF, Browning RA, Jobe PC (1994) Role of norepinephrine in forebrain and brainstem seizures: chemical lesioning of locus ceruleus with DSP4. *Exp Neurol* 125:58–64.
- Mitchell BD, Macklis JD (2005) Large-scale maintenance of dual projections by callosal and frontal cortical projection neurons in adult mice. *J Comp Neurol* 482:17–32.
- Mitchell JC, McGoldrick P, Vance C, Hortobagyi T, Sreedharan J, Rogelj B, Tudor EL, Smith BN, Klasen C, Miller CCJ, Cooper JD, Greensmith L, Shaw CE (2013) Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol (Berl)* 125:273–288.
- Mizielinska S et al. (2014) C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in *Drosophila* through arginine-rich proteins. *Science* 345:1192–1194.
- Mori K, Ozaki E, Zhang B, Yang L, Yokoyama A, Takeda I, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J (2002) Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology* 43:1026–1034.
- Mori K, Weng S-M, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, Schmid B, Kretschmar HA, Cruts M, Van Broeckhoven C, Haass C, Edbauer D (2013) The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLD/ALS. *Science* 339:1335–1338.
- Morris J (2015) Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Related Motor Neuron Diseases: An Overview. *Neurodiagnostic J* 55:180–194.
- Morrison JH, Foote SL (1986) Noradrenergic and serotonergic innervation of cortical, thalamic, and tectal visual structures in Old and New World monkeys. *J Comp Neurol* 243:117–138.
- Morrison JH, Foote SL, O'Connor D, Bloom FE (1982) Laminar, tangential and regional organization of the noradrenergic innervation of monkey cortex: dopamine-beta-hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Res Bull* 9:309–319.

- Mourelatos Z, Hirano A, Rosenquist AC, Gonatas NK (1994) Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Clinical studies in ALS of Guam and experimental studies in deafferented neurons and in beta,beta'-iminodipropionitrile axonopathy. *Am J Pathol* 144:1288–1300.
- Murakami T, Yang S-P, Xie L, Kawano T, Fu D, Mukai A, Bohm C, Chen F, Robertson J, Suzuki H, Tartaglia GG, Vendruscolo M, Kaminski Schierle GS, Chan FTS, Moloney A, Crowther D, Kaminski CF, Zhen M, St George-Hyslop P (2012) ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism. *Hum Mol Genet* 21:1–9.
- Murayama S, Bouldin TW, Suzuki K (1992) Immunocytochemical and ultrastructural studies of upper motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 83:518–524.
- Murchison CF, Schutsky K, Jin S-H, Thomas SA (2011) Norepinephrine and  $\beta_1$ -adrenergic signaling facilitate activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons during contextual memory retrieval. *Neuroscience* 181:109–116.
- Myöhänen TT, Schendzielorz N, Männistö PT (2010) Distribution of catechol-O-methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice. *J Neurochem* 113:1632–1643.
- Nakamura H, Kitagawa H, Kawaguchi Y, Tsuji H (1997) Intracortical facilitation and inhibition after transcranial magnetic stimulation in conscious humans. *J Physiol* 498 ( Pt 3):817–823.
- Nassif M, Woehlbier U, Manque PA (2017) The Enigmatic Role of C9ORF72 in Autophagy. *Front Neurosci* 11:442.
- Nayyar T, Bubser M, Ferguson MC, Neely MD, Shawn Goodwin J, Montine TJ, Deutch AY, Ansah TA (2009) Cortical serotonin and norepinephrine denervation in parkinsonism: preferential loss of the beaded serotonin innervation. *Eur J Neurosci* 30:207–216.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130–133.
- Nguyen HP, Van Broeckhoven C, van der Zee J (2018) ALS Genes in the Genomic Era and their Implications for FTD. *Trends Genet* 34:404–423.
- Nieto-Gonzalez JL, Moser J, Lauritzen M, Schmitt-John T, Jensen K (2011) Reduced GABAergic inhibition explains cortical hyperexcitability in the wobbler mouse model of ALS. *Cereb Cortex N Y N* 1991 21:625–635.
- Nihei K, Kowall NW (1993) Involvement of NPY-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurosci Lett* 159:67–70.
- Nihei K, McKee AC, Kowall NW (1993) Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol (Berl)* 86:55–64.

- Nolan M, Talbot K, Ansorge O (2016) Pathogenesis of FUS-associated ALS and FTD: insights from rodent models. *Acta Neuropathol Commun* 4:99.
- Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DMA, Akiyama H, Hasegawa M (2013) Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 4:124–134.
- Nozaki M, Otomo A, Mitsui S, Ono S, Shirakawa R, Chen Y, Hama Y, Sato K, Chen X, Suzuki T, Shang H-F, Hadano S (2021) SQSTM1L341V variant that is linked to sporadic ALS exhibits impaired association with MAP1LC3 in cultured cells. *eNeurologicalSci* 22:100301.
- Okamoto K, Hirai S, Amari M, Iizuka T, Watanabe M, Murakami N, Takatama M (1993) Oculomotor nuclear pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 85:458–462.
- Olivares-Moreno R, Moreno-Lopez Y, Concha L, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M, Cordero-Erausquin M, Rojas-Piloni G (2017) The rat corticospinal system is functionally and anatomically segregated. *Brain Struct Funct* 222:3945–3958.
- Oliver DJ, Campbell C, O'Brien T, Sloan R, Sykes N, Tallon C, Taylor-Horan J, Udoma M (2010) Medication in the last days of life for motor neuron disease/amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis* 11:562–564.
- Ono H, Fukuda H (1995) Pharmacology of descending noradrenergic systems in relation to motor function. *Pharmacol Ther* 68:105–112.
- O'Rourke JG et al. (2015) C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD. *Neuron* 88:892–901.
- Ozdinler PH, Benn S, Yamamoto TH, Güzel M, Brown RH, Macklis JD (2011) Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G<sup>93A</sup> transgenic ALS mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31:4166–4177.
- Paganoni S, Deng J, Jaffa M, Cudkowicz ME, Wills A-M (2011) Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 44:20–24.
- Pamphlett R, Kril J, Hng TM (1995) Motor neuron disease: a primary disorder of corticomotoneurons? *Muscle Nerve* 18:314–318.
- Paredes-Rodriguez E, Vegas-Suarez S, Morera-Herreras T, De Deurwaerdere P, Miguelez C (2020) The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol* 11:435.
- Park RM, Schulte PA, Bowman JD, Walker JT, Bondy SC, Yost MG, Touchstone JA, Dosemeci M (2005) Potential occupational risks for neurodegenerative diseases. *Am J Ind Med* 48:63–77.
- Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, Brown RH (2004) Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 43:19–30.
- Patel CN, George JJ, Modi KM, Narechania MB, Patel DP, Gonzalez FJ, Pandya HA (2018) Pharmacophore-based virtual screening of catechol-o-methyltransferase (COMT) inhibitors to combat Alzheimer's disease. *J Biomol Struct Dyn* 36:3938–3957.

- Pedersen BK (2019) Chapter 15 - Physical Exercise in Chronic Diseases. In: Nutrition and Skeletal Muscle (Walrand S, ed), pp 217–266. Academic Press. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128104224000142> [Accessed May 15, 2021].
- Pedersen M, Kowalczyk M, Omidvarnia A, Perucca P, Gooley S, Petrou S, Scheffer IE, Berkovic SF, Jackson GD (2019) Human GABRG2 generalized epilepsy: Increased somatosensory and striatothalamic connectivity. *Neurol Genet* 5:e340.
- Perez-Velazquez JL, Angelides KJ (1993) Assembly of GABAA receptor subunits determines sorting and localization in polarized cells. *Nature* 361:457–460.
- Peters OM et al. (2015) Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Neuron* 88:902–909.
- Pickles S, Semmler S, Broom HR, Destroismaisons L, Legroux L, Arbour N, Meiering E, Cashman NR, Vande Velde C (2016) ALS-linked misfolded SOD1 species have divergent impacts on mitochondria. *Acta Neuropathol Commun* 4:43.
- Pieri M, Carunchio I, Curcio L, Mercuri NB, Zona C (2009) Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 215:368–379.
- Pifl C, Kish SJ, Hornykiewicz O (2012) Thalamic noradrenaline in Parkinson's disease: deficits suggest role in motor and non-motor symptoms. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 27:1618–1624.
- Pinto S, Cunha C, Barbosa M, Vaz AR, 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.
- Plewnia C, Hoppe J, Hiemke C, Bartels M, Cohen LG, Gerloff C (2002) Enhancement of human cortico-motoneuronal excitability by the selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine. *Neurosci Lett* 330:231–234.
- Plowman EK (2015) Is There a Role for Exercise in the Management of Bulbar Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis? *J Speech Lang Hear Res JSLHR* 58:1151–1166.
- Podkletnova I, Mäkelä R, Korpi ER, Lüddens H, Helen P, Alho H (2000) Neonatal 6-hydroxydopamine treatment affects GABA(A) receptor subunit expression in the frontal cortex but not the hippocampus of rats during postnatal development. *Dev Neurosci* 22:296–302.
- Poe GR, Foote S, Eschenko O, Johansen JP, Bouret S, Aston-Jones G, Harley CW, Manahan-Vaughan D, Weinschenker D, Valentino R, Berridge C, Chandler DJ, Waterhouse B, Sara SJ (2020) Locus coeruleus: a new look at the blue spot. *Nat Rev Neurosci* 21:644–659.
- Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, Ling S-C, Sun E, Wancewicz E, Mazur C, Kordasiewicz H, Sedaghat Y, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Yeo GW, Cleveland DW (2011) Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci* 14:459–468.

- Proudfoot M, Rohenkohl G, Quinn A, Colclough GL, Wu J, Talbot K, Woolrich MW, Benatar M, Nobre AC, Turner MR (2017) Altered cortical beta-band oscillations reflect motor system degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Brain Mapp* 38:237–254.
- Prudencio M et al. (2015) Distinct brain transcriptome profiles in C9orf72-associated and sporadic ALS. *Nat Neurosci* 18:1175–1182.
- Pupillo E, Messina P, Logroscino G, Beghi E, SLALOM Group (2014) Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Ann Neurol* 75:287–297.
- Purves D, Augustin GJ, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia A, McNamara J and White L (2008). *Neuroscience*, 2008. De Boeck, Sinauer, Sunderland, Mass.
- Rabkin JG, Gordon PH, McElhiney M, Rabkin R, Chew S, Mitsumoto H (2009) Modafinil treatment of fatigue in patients with ALS: a placebo-controlled study. *Muscle Nerve* 39:297–303.
- Rajkowski J, Kubiak P, Aston-Jones G (1994) Locus coeruleus activity in monkey: phasic and tonic changes are associated with altered vigilance. *Brain Res Bull* 35:607–616.
- Ransom RW, Kammerer RC, Cho AK (1982) Chemical transformations of xylamine (N-2'-chloroethyl-N-ethyl-2-methylbenzylamine) in solution. Pharmacological activity of the species derived from this irreversible norepinephrine uptake inhibitor. *Mol Pharmacol* 21:380–386.
- Ratovitski T, Corson LB, Strain J, Wong P, Cleveland DW, Culotta VC, Borchelt DR (1999) Variation in the biochemical/biophysical properties of mutant superoxide dismutase 1 enzymes and the rate of disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis kindreds. *Hum Mol Genet* 8:1451–1460.
- Ratti A, Buratti E (2016) Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J Neurochem* 138 Suppl 1:95–111.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Scott RW, Snider WD (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13:43–47.
- Renton AE et al. (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72:257–268.
- Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O (1994) Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* 369:289–294.
- Ridding MC, Inzelberg R, Rothwell JC (1995) Changes in excitability of motor cortical circuitry in patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 37:181–188.
- Riekkinen M, Jäkälä P, Kejonen K, Riekkinen P (1999) The alpha2 agonist, clonidine, improves spatial working performance in Parkinson's disease. *Neuroscience* 92:983–989.
- Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM, Schulz PE (2005) Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* 65:586–590.

- Rippon GA, Scarneas N, Gordon PH, Murphy PL, Albert SM, Mitsumoto H, Marder K, Rowland LP, Stern Y (2006) An observational study of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 63:345–352.
- Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (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.
- Rivara C-B, Sherwood CC, Bouras C, Hof PR (2003) Stereologic characterization and spatial distribution patterns of Betz cells in the human primary motor cortex. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 270:137–151.
- Robbins TW, Arnsten AFT (2009) The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci* 32:267–287.
- Robertson SD, Plummer NW, de Marchena J, Jensen P (2013) Developmental origins of central norepinephrine neuron diversity. *Nat Neurosci* 16:1016–1023.
- Rodrigues FB, Ferreira JJ (2017) Opicapone for the treatment of Parkinson’s disease. *Expert Opin Pharmacother* 18:445–453.
- Rommelfanger KS, Edwards GL, Freeman KG, Liles LC, Miller GW, Weinschenker D (2007) Norepinephrine loss produces more profound motor deficits than MPTP treatment in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13804–13809.
- Rooney J, Byrne S, Heverin M, Tobin K, Dick A, Donaghy C, Hardiman O (2015) A multidisciplinary clinic approach improves survival in ALS: a comparative study of ALS in Ireland and Northern Ireland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86:496–501.
- Rorabaugh JM, Chalermpananupap T, Botz-Zapp CA, Fu VM, Lembeck NA, Cohen RM, Weinschenker D (2017) Chemogenetic locus coeruleus activation restores reversal learning in a rat model of Alzheimer’s disease. *Brain J Neurol* 140:3023–3038.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O’Regan JP, Deng HX (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59–62.
- Rosin DL, Talley EM, Lee A, Stornetta RL, Gaylann BD, Guyenet PG, Lynch KR (1996) Distribution of alpha 2C-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 372:135–165.
- Ross SB (1976) Long-term effects of N-2-chlorethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride on noradrenergic neurones in the rat brain and heart. *Br J Pharmacol* 58:521–527.
- Ross SB, Renyl AL (1976) On the long-lasting inhibitory effect of N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP 4) on the active uptake of noradrenaline. *J Pharm Pharmacol* 28:458–459.
- Rossini PM et al. (2015) Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: Basic principles and procedures for routine clinical and research

application. An updated report from an I.F.C.N. Committee. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* 126:1071–1107.

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73–84.

Rouaux C, Panteleeva I, René F, Gonzalez de Aguilar J-L, Echaniz-Laguna A, Dupuis L, Menger Y, Boutillier A-L, 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. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27:5535–5545.

Rouleau GA, Clark AW, Rooke K, Pramatarova A, Krizus A, Suchowersky O, Julien JP, Figlewicz D (1996) SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39:128–131.

Roux J-C, Villard L (2010) Biogenic amines in Rett syndrome: the usual suspects. *Behav Genet* 40:59–75.

Rowland LP, Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344:1688–1700.

Rudich P, Snoznik C, Watkins SC, Monaghan J, Pandey UB, Lamitina ST (2017) Nuclear localized C9orf72-associated arginine-containing dipeptides exhibit age-dependent toxicity in *C. elegans*. *Hum Mol Genet* 26:4916–4928.

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011) Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71:45–61.

Saba L, Viscomi MT, Caioli S, Pignataro A, Bisicchia E, Pieri M, Molinari M, Ammassari-Teule M, Zona C (2016a) Altered Functionality, Morphology, and Vesicular Glutamate Transporter Expression of Cortical Motor Neurons from a Presymptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cereb Cortex N Y N 1991* 26:1512–1528.

Saba L, Viscomi MT, Caioli S, Pignataro A, Bisicchia E, Pieri M, Molinari M, Ammassari-Teule M, Zona C (2016b) Altered Functionality, Morphology, and Vesicular Glutamate Transporter Expression of Cortical Motor Neurons from a Presymptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cereb Cortex N Y N 1991* 26:1512–1528.

Şahin A, Held A, Bredvik K, Major P, Achilli T-M, Kerson AG, Wharton K, Stilwell G, Reenan R (2017) Human SOD1 ALS Mutations in a *Drosophila* Knock-In Model Cause Severe Phenotypes and Reveal Dosage-Sensitive Gain- and Loss-of-Function Components. *Genetics* 205:707–723.

Salgado H, Köhr G, Treviño M (2012) Noradrenergic “tone” determines dichotomous control of cortical spike-timing-dependent plasticity. *Sci Rep* 2:417.

Salgado H, Treviño M, Atzori M (2016) Layer- and area-specific actions of norepinephrine on cortical synaptic transmission. *Brain Res* 1641:163–176.

Samarut É, Swaminathan A, Riché R, Liao M, Hassan-Abdi R, Renault S, Allard M, Dufour L, Cossette P, Soussi-Yanicostas N, Drapeau P (2018)  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor alpha 1 subunit loss of function causes genetic generalized epilepsy by impairing inhibitory network neurodevelopment. *Epilepsia* 59:2061–2074.

- Sampaio TB, Marques NF, Binder LB, Tasca CI, Prediger RD (2020) Role of Prefrontal Cortex on Recognition Memory Deficits in Rats following 6-OHDA-Induced Locus Coeruleus Lesion. *Oxid Med Cell Longev* 2020:8324565.
- Sances S, Bruijn LI, Chandran S, Eggan K, Ho R, Klim JR, Livesey MR, Lowry E, Macklis JD, Rushton D, Sadegh C, Sareen D, Wichterle H, Zhang S-C, Svendsen CN (2016) Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Nat Neurosci* 19:542–553.
- Santana N, Mengod G, Artigas F (2013) Expression of  $\alpha(1)$ -adrenergic receptors in rat prefrontal cortex: cellular co-localization with 5-HT(2A) receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:1139–1151.
- Sara SJ (2015) Locus Coeruleus in time with the making of memories. *Curr Opin Neurobiol* 35:87–94.
- Sasaki S, Iwata M (1996) Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47:535–540.
- Sasaki S, Komori T, Iwata M (2000) Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 100:138–144.
- Sasaki S, Shibata N, Iwata M (2001) Neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 101:351–357.
- Scekic-Zahirovic J et al. (2016) Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J* 35:1077–1097.
- Scekic-Zahirovic J et al. (2020) Cytoplasmic accumulation of FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and defects in inhibitory synapses. [bioRxiv:2020.06.09.141556](https://doi.org/10.1101/2020.06.09.141556).
- Scekic-Zahirovic J et al. (2021a) Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects. *Nat Commun* 12:3028.
- Scekic-Zahirovic J, Fischer M, Stuart-Lopez G, Burg T, Gilet J, Dirrig-Grosch S, Marques C, Birling M-C, Kessler P, Rouaux C (2021b) Evidence that corticofugal propagation of ALS pathology is not mediated by prion-like mechanism. *Prog Neurobiol* 200:101972.
- Scekic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, Wagner M, Sun Y, Allmeroth K, Dieterlé S, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, René F, Dormann D, Haass C, Ludolph AC, Lagier-Tourenne C, Storkebaum E, Dupuis L (2017) Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 133:887–906.
- Schatzberg AF (2000) Clinical efficacy of reboxetine in major depression. *J Clin Psychiatry* 61 Suppl 10:31–38.
- Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, Schambra UB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Fremeau RT (1994) Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 21:133–149.
- Schendzielorz N, Oinas J-P, Myöhänen TT, Reenilä I, Raasmaja A, Männistö PT (2013) Catechol-O-methyltransferase (COMT) protein expression and activity after dopaminergic and noradrenergic lesions of the rat brain. *PLoS One* 8:e61392.

- Schneider JS, Tinker JP, Decamp E (2010) Clonidine improves attentional and memory components of delayed response performance in a model of early Parkinsonism. *Behav Brain Res* 211:236–239.
- Schulthess I, Gorges M, Müller H-P, Lulé D, Del Tredici K, Ludolph AC, Kassubek J (2016) Functional connectivity changes resemble patterns of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* 6:38391.
- Schutsky K, Ouyang M, Castelino CB, Zhang L, Thomas SA (2011) Stress and glucocorticoids impair memory retrieval via  $\beta$ 2-adrenergic, Gi/o-coupled suppression of cAMP signaling. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31:14172–14181.
- Schwarz LA, Luo L (2015) Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Curr Biol CB* 25:R1051–R1056.
- Schwarz LA, Miyamichi K, Gao XJ, Beier KT, Weissbourd B, DeLoach KE, Ren J, Ibanes S, Malenka RC, Kremer EJ, Luo L (2015) Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenaline circuit. *Nature* 524:88–92.
- Scotter EL, Chen H-J, Shaw CE (2015) TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics* 12:352–363.
- Sepede G, Corbo M, Fiori F, Martinotti G (2012) Reboxetine in clinical practice: a review. *Clin Ter* 163:e255-262.
- Shefner JM et al. (2020) A proposal for new diagnostic criteria for ALS. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* 131:1975–1978.
- Shi KY, Mori E, Nizami ZF, Lin Y, Kato M, Xiang S, Wu LC, Ding M, Yu Y, Gall JG, McKnight SL (2017) Toxic PRn poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeat expansion block nuclear import and export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E1111–E1117.
- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S, Kobayashi M (2001) Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* 917:97–104.
- Shibuya K, Park SB, Geevasinga N, Menon P, Howells J, Simon NG, Huynh W, Noto Y-I, Götz J, Kril JJ, Ittner LM, Hodges J, Halliday G, Vucic S, Kiernan MC (2016) Motor cortical function determines prognosis in sporadic ALS. *Neurology* 87:513–520.
- Shiihashi G, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Ebine T, Suzuki N (2016) Mislocated FUS is sufficient for gain-of-toxic-function amyotrophic lateral sclerosis phenotypes in mice. *Brain J Neurol* 139:2380–2394.
- Shimohama S, Taniguchi T, Fujiwara M, Kameyama M (1986) Biochemical characterization of alpha-adrenergic receptors in human brain and changes in Alzheimer-type dementia. *J Neurochem* 47:1295–1301.
- Shimojo M, Takuwa H, Takado Y, Tokunaga M, Tsukamoto S, Minatohara K, Ono M, Seki C, Maeda J, Urushihata T, Minamihisamatsu T, Aoki I, Kawamura K, Zhang M-R, Suhara T, Sahara N, Higuchi M (2020) Selective Disruption of Inhibitory Synapses Leading to Neuronal Hyperexcitability at

- an Early Stage of Tau Pathogenesis in a Mouse Model. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 40:3491–3501.
- Singh S (2020) Noradrenergic pathways of locus coeruleus in Parkinson's and Alzheimer's pathology. *Int J Neurosci* 130:251–261.
- Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Rueckert D, Nichols TE, Mackay CE, Watkins KE, Ciccarelli O, Cader MZ, Matthews PM, Behrens TEJ (2006) Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *NeuroImage* 31:1487–1505.
- Soeda Y, Yoshikawa M, Almeida OFX, Sumioka A, Maeda S, Osada H, Kondoh Y, Saito A, Miyasaka T, Kimura T, Suzuki M, Koyama H, Yoshiike Y, Sugimoto H, Ihara Y, Takashima A (2015) Toxic tau oligomer formation blocked by capping of cysteine residues with 1,2-dihydroxybenzene groups. *Nat Commun* 6:10216.
- Sofic E, Riederer P, Gsell W, Gavranovic M, Schmidtke A, Jellinger K (1991) Biogenic amines and metabolites in spinal cord of patients with Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 3:133–142.
- Song S, Wang Q, Jiang L, Oyarzabal E, Riddick NV, Wilson B, Moy SS, Shih Y-YI, Hong J-S (2019) Noradrenergic dysfunction accelerates LPS-elicited inflammation-related ascending sequential neurodegeneration and deficits in non-motor/motor functions. *Brain Behav Immun* 81:374–387.
- Spataro R, Bono V, Marchese S, La Bella V (2012) Tracheostomy mechanical ventilation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: clinical features and survival analysis. *J Neurol Sci* 323:66–70.
- Spivak B, Strous RD, Shaked G, Shabash E, Kotler M, Weizman A (2006) Reboxetine versus fluvoxamine in the treatment of motor vehicle accident-related posttraumatic stress disorder: a double-blind, fixed-dosage, controlled trial. *J Clin Psychopharmacol* 26:152–156.
- Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le Forestier N, Marouan A, Dib M, Meininger V (2002) Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci* 193:73–78.
- St Onge E, Vanderhoof M, Miller S (2020) Ongentys (Opicapone): A New COMT Inhibitor for the Treatment of Parkinson's Disease. *Ann Pharmacother*:1060028020974560.
- Staiger JF, Flaggmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kötter R, Luhmann HJ (2004) Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. *Cereb Cortex N Y N* 1991 14:690–701.
- Stallings NR, Puttaparthi K, Dowling KJ, Luther CM, Burns DK, Davis K, Elliott JL (2013) TDP-43, an ALS linked protein, regulates fat deposition and glucose homeostasis. *PLoS One* 8:e71793.
- Statland JM et al. (2019) Rasagiline for amyotrophic lateral sclerosis: A randomized, controlled trial. *Muscle Nerve* 59:201–207.

- Stavroulakis T, Baird WO, Baxter SK, Walsh T, Shaw PJ, McDermott CJ (2016) The impact of gastrostomy in motor neurone disease: challenges and benefits from a patient and carer perspective. *BMJ Support Palliat Care* 6:52–59.
- Sutedja NA, Veldink JH, Fischer K, Kromhout H, Heederik D, Huisman MHB, Wokke JHJ, van den Berg LH (2009) Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis* 10:302–309.
- Swadlow HA (2003) Fast-spike interneurons and feedforward inhibition in awake sensory neocortex. *Cereb Cortex N Y N* 1991 13:25–32.
- Swanson LW (1976) The locus coeruleus: a cytoarchitectonic, Golgi and immunohistochemical study in the albino rat. *Brain Res* 110:39–56.
- Swinnen B, Bento-Abreu A, Gendron TF, Boeynaems S, Bogaert E, Nuyts R, Timmers M, Scheveneels W, Hersmus N, Wang J, Mizielińska S, Isaacs AM, Petrucelli L, Lemmens R, Van Damme P, Van Den Bosch L, Robberecht W (2018) A zebrafish model for C9orf72 ALS reveals RNA toxicity as a pathogenic mechanism. *Acta Neuropathol (Berl)* 135:427–443.
- Swinnen B, Robberecht W (2014) The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10:661–670.
- Szot P, Weinshenker D, White SS, Robbins CA, Rust NC, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (1999) Norepinephrine-deficient mice have increased susceptibility to seizure-inducing stimuli. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 19:10985–10992.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.
- Talley EM, Rosin DL, Lee A, Guyenet PG, Lynch KR (1996) Distribution of alpha 2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 372:111–134.
- Tan H-Y, Cho H, Lee LP (2021) Human mini-brain models. *Nat Biomed Eng* 5:11–25.
- Taquet H, Javoy-Agid F, Cesselin F, Hamon M, Legrand JC, Agid Y (1982) Microtopography of methionine-enkephalin, dopamine and noradrenaline in the ventral mesencephalon of human control and Parkinsonian brains. *Brain Res* 235:303–314.
- Tarsy D, Parkes JD, Marsden CD (1975) Clonidine in Parkinson disease. *Arch Neurol* 32:134–136.
- Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW (2016) Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 539:197–206.
- Theofilas P et al. (2018) Probing the correlation of neuronal loss, neurofibrillary tangles, and cell death markers across the Alzheimer's disease Braak stages: a quantitative study in humans. *Neurobiol Aging* 61:1–12.

- Therrien M, Rouleau GA, Dion PA, Parker JA (2013) Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in *C. elegans*. *PLoS One* 8:e83450.
- Thiele A, Bellgrove MA (2018) Neuromodulation of Attention. *Neuron* 97:769–785.
- Thomas SA, Marck BT, Palmiter RD, Matsumoto AM (1998) Restoration of norepinephrine and reversal of phenotypes in mice lacking dopamine beta-hydroxylase. *J Neurochem* 70:2468–2476.
- Tokutake Y, Yamada K, Ohata M, Obayashi Y, Tsuchiya M, Yonekura S (2015) ALS-Linked P56S-VAPB Mutation Impairs the Formation of Multinuclear Myotube in C2C12 Cells. *Int J Mol Sci* 16:18628–18641.
- Tort ABL, Komorowski R, Eichenbaum H, Kopell N (2010) Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. *J Neurophysiol* 104:1195–1210.
- Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91:260–292.
- Trottier S, Lindvall O, Chauvel P, Björklund A (1988) Facilitation of focal cobalt-induced epilepsy after lesions of the noradrenergic locus coeruleus system. *Brain Res* 454:308–314.
- Tsuchiya K, Takahashi M, Shiotsu H, Akiyama H, Haga C, Watabiki S, Taki K, Nakano I, Ikeda K (2002) Sporadic amyotrophic lateral sclerosis with circumscribed temporal atrophy: a report of an autopsy case without dementia and with ubiquitinated intraneuronal inclusions. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol* 22:308–316.
- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CCJ, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB (2004) Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15:601–609.
- Turner MR, Talbot K (2013) Mimics and chameleons in motor neurone disease. *Pract Neurol* 13:153–164.
- Uchida A et al. (2012) Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain J Neurol* 135:833–846.
- Vaccaro A, Patten SA, Aggad D, Julien C, Maios C, Kabashi E, Drapeau P, Parker JA (2013) Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity in vivo. *Neurobiol Dis* 55:64–75.
- Vaccaro A, Tauffenberger A, Aggad D, Rouleau G, Drapeau P, Parker JA (2012) Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans*. *PLoS One* 7:e31321.
- Vahabzadeh-Hagh AM, Muller PA, Pascual-Leone A, Jensen FE, Rotenberg A (2011) Measures of cortical inhibition by paired-pulse transcranial magnetic stimulation in anesthetized rats. *J Neurophysiol* 105:615–624.
- Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L (2017) Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Dis Model Mech* 10:537–549.

- Van den Bos MAJ, Higashihara M, Geevasinga N, Menon P, Kiernan MC, Vucic S (2018a) Imbalance of cortical facilitatory and inhibitory circuits underlies hyperexcitability in ALS. *Neurology* 91:e1669–e1676.
- Van den Bos MAJ, Menon P, Howells J, Geevasinga N, Kiernan MC, Vucic S (2018b) Physiological Processes Underlying Short Interval Intracortical Facilitation in the Human Motor Cortex. *Front Neurosci* 12:240.
- van Dis V, Kuijpers M, Haasdijk ED, Teuling E, Oakes SA, Hoogenraad CC, Jaarsma D (2014) Golgi fragmentation precedes neuromuscular denervation and is associated with endosome abnormalities in SOD1-ALS mouse motor neurons. *Acta Neuropathol Commun* 2:38.
- Van Erum J, Valkenburg F, Van Dam D, De Deyn PP (2020) Pentylentetrazole-induced Seizure Susceptibility in the Tau58/4 Transgenic Mouse Model of Tauopathy. *Neuroscience* 425:112–122.
- Van Langenhove T, van der Zee J, Van Broeckhoven C (2012) The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Ann Med* 44:817–828.
- Vance C et al. (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323:1208–1211.
- Vance C, Scotter EL, Nishimura AL, Troakes C, Mitchell JC, Kathe C, Urwin H, Manser C, Miller CC, Hortobágyi T, Dragunow M, Rogelj B, Shaw CE (2013) ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. *Hum Mol Genet* 22:2676–2688.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.
- Varazzani C, San-Galli A, Gilardeau S, Bouret S (2015) Noradrenaline and dopamine neurons in the reward/effort trade-off: a direct electrophysiological comparison in behaving monkeys. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 35:7866–7877.
- Ventura R, Alcaro A, Puglisi-Allegra S (2005) Prefrontal cortical norepinephrine release is critical for morphine-induced reward, reinstatement and dopamine release in the nucleus accumbens. *Cereb Cortex N Y N* 1991 15:1877–1886.
- Ventura R, Cabib S, Alcaro A, Orsini C, Puglisi-Allegra S (2003) Norepinephrine in the prefrontal cortex is critical for amphetamine-induced reward and mesoaccumbens dopamine release. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23:1879–1885.
- Vernay A, Therreau L, Blot B, Risson V, Dirrig-Grosch S, Waegaert R, Lequeu T, Sellal F, Schaeffer L, Sadoul R, Loeffler J-P, René F (2016) A transgenic mouse expressing CHMP2Bintron5 mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet* 25:3341–3360.
- Vetulani J, Sulser F (1975) Action of various antidepressant treatments reduces reactivity of noradrenergic cyclic AMP-generating system in limbic forebrain. *Nature* 257:495–496.

- Vicente MC, Almeida MC, Bicego KC, Carrettiero DC, Gargaglioni LH (2018) Hypercapnic and Hypoxic Respiratory Response During Wakefulness and Sleep in a Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease in Rats. *J Alzheimers Dis JAD* 65:1159–1174.
- Vinceti M, Nacci G, Rocchi E, Cassinadri T, Vivoli R, Marchesi C, Bergomi M (2000) Mortality in a population with long-term exposure to inorganic selenium via drinking water. *J Clin Epidemiol* 53:1062–1068.
- Vitrac C, Benoit-Marand M (2017) Monoaminergic Modulation of Motor Cortex Function. *Front Neural Circuits* 11:72.
- Vogl C, Mochida S, Wolff C, Whalley BJ, Stephens GJ (2012) The Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligand Levetiracetam Inhibits Presynaptic Ca<sup>2+</sup> Channels through an Intracellular Pathway. *Mol Pharmacol* 82:199–208.
- Von Euler US (1946) Sympathin in adrenergic nerve fibres. *J Physiol* 105:26.
- Vucic S, Kiernan MC (2006) Novel threshold tracking techniques suggest that cortical hyperexcitability is an early feature of motor neuron disease. *Brain J Neurol* 129:2436–2446.
- Vucic S, Kiernan MC (2017) Transcranial Magnetic Stimulation for the Assessment of Neurodegenerative Disease. *Neurother J Am Soc Exp Neurother* 14:91–106.
- Vucic S, Nicholson GA, Kiernan MC (2008) Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J Neurol* 131:1540–1550.
- Vucic S, Ziemann U, Eisen A, Hallett M, Kiernan MC (2013) Transcranial magnetic stimulation and amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiological insights. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:1161–1170.
- Waibel S, Reuter A, Malessa S, Blaugrund E, Ludolph AC (2004) Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. *J Neurol* 251:1080–1084.
- Wang J, Fang Y, Wang X, Yang H, Yu X, Wang H (2017) Enhanced Gamma Activity and Cross-Frequency Interaction of Resting-State Electroencephalographic Oscillations in Patients with Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 9:243.
- Wang S-J, Wang K-Y, Wang W-C (2004) Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* 125:191–201.
- Wang W-Y, Pan L, Su SC, Quinn EJ, Sasaki M, Jimenez JC, Mackenzie IRA, Huang EJ, Tsai L-H (2013) Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nat Neurosci* 16:1383–1391.
- Wang X, Hao L, Saur T, Joyal K, Zhao Y, Zhai D, Li J, Pribadi M, Coppola G, Cohen BM, Buttner EA (2016) Forward Genetic Screen in *Caenorhabditis elegans* Suggests F57A10.2 and *acp-4* As Suppressors of C9ORF72 Related Phenotypes. *Front Mol Neurosci* 9:113.
- Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD (2001) Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 8:933–941.

- Waterhouse BD, Chandler DJ (2016) Heterogeneous organization and function of the central noradrenergic system. *Brain Res* 1641:v–x.
- Waterhouse BD, Lin CS, Burne RA, Woodward DJ (1983) The distribution of neocortical projection neurons in the locus coeruleus. *J Comp Neurol* 217:418–431.
- Watson MR, Lagow RD, Xu K, Zhang B, Bonini NM (2008) A drosophila model for amyotrophic lateral sclerosis reveals motor neuron damage by human SOD1. *J Biol Chem* 283:24972–24981.
- Weinreb O, Amit T, Bar-Am O, Youdim MBH (2010) Rasagiline: A novel anti-Parkinsonian monoamine oxidase-B inhibitor with neuroprotective activity. *Prog Neurobiol* 92:330–344.
- Weinshenker D, Szot P (2002) The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. *Pharmacol Ther* 94:213–233.
- Weiss GK, Lewis J, Jimenez-Rivera C, Vigil A, Corcoran ME (1990) Antikindling effects of locus coeruleus stimulation: mediation by ascending noradrenergic projections. *Exp Neurol* 108:136–140.
- Weiss MD, Macklin EA, Simmons Z, Knox AS, Greenblatt DJ, Atassi N, Graves M, Parziale N, Salameh JS, Quinn C, Brown RH, Distad JB, Trivedi J, Shefner JM, Barohn RJ, Pestronk A, Swenson A, Cudkovicz ME, Mexiletine ALS Study Group (2016) A randomized trial of mexiletine in ALS: Safety and effects on muscle cramps and progression. *Neurology* 86:1474–1481.
- Weisskopf MG, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Cudkovicz M, Ascherio A (2004) Prospective study of cigarette smoking and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol* 160:26–33.
- Westlund KN, Denney RM, Kochersperger LM, Rose RM, Abell CW (1985) Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science* 230:181–183.
- White SR, Neuman RS (1980) Facilitation of spinal motoneurone excitability by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Brain Res* 188:119–127.
- Williamson TL, Cleveland DW (1999) Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2:50–56.
- Woerner AC, Frottin F, Hornburg D, Feng LR, Meissner F, Patra M, Tatzelt J, Mann M, Winklhofer KF, Hartl FU, Hipp MS (2016) Cytoplasmic protein aggregates interfere with nucleocytoplasmic transport of protein and RNA. *Science* 351:173–176.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14:1105–1116.
- Worms PM (2001) The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci* 191:3–9.
- Writing Group, Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group (2017) Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 16:505–512.

- Xiao Z, Deng P-Y, Rojanathammanee L, Yang C, Grisanti L, Permpoonputtana K, Weinshenker D, Doze VA, Porter JE, Lei S (2009) Noradrenergic depression of neuronal excitability in the entorhinal cortex via activation of TREK-2 K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 284:10980–10991.
- Xu L, Liu T, Liu L, Yao X, Chen L, Fan D, Zhan S, Wang S (2020) Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol* 267:944–953.
- Xu X, Roby KD, Callaway EM (2010) Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol* 518:389–404.
- Yao N, Wu Y, Zhou Y, Ju L, Liu Y, Ju R, Duan D, Xu Q (2015) Lesion of the locus coeruleus aggravates dopaminergic neuron degeneration by modulating microglial function in mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res* 1625:255–274.
- Yehuda R, Siever LJ, Teicher MH, Levengood RA, Gerber DK, Schmeidler J, Yang RK (1998) Plasma norepinephrine and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol concentrations and severity of depression in combat posttraumatic stress disorder and major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 44:56–63.
- Yenkoyan K, Fereshetyan K, Matinyan S, Chavushyan V, Aghajanov M (2018) The role of monoamines in the development of Alzheimer's disease and neuroprotective effect of a proline rich polypeptide. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 86:76–82.
- Ying H, Yue BYJT (2016) Optineurin: The autophagy connection. *Exp Eye Res* 144:73–80.
- Yoon T-Y, Munson M (2018) SNARE complex assembly and disassembly. *Curr Biol CB* 28:R397–R401.
- Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7:295–309.
- Zanette G, Tamburin S, Manganotti P, Refatti N, Forgione A, Rizzuto N (2002) Different mechanisms contribute to motor cortex hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* 113:1688–1697.
- Zang DW, Cheema SS (2002) Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1(G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 332:99–102.
- Zarrindast M-R, Bahreini T, Adl M (2002) Effect of imipramine on the expression and acquisition of morphine-induced conditioned place preference in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 73:941–949.
- Zhang D, Hou Q, Wang M, Lin A, Jarzylo L, Navis A, Raissi A, Liu F, Man H-Y (2009) Na,K-ATPase activity regulates AMPA receptor turnover through proteasome-mediated proteolysis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:4498–4511.
- Zhang K et al. (2015) The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* 525:56–61.

- Zhang L, Ouyang M, Ganellin CR, Thomas SA (2013) The slow afterhyperpolarization: a target of  $\beta$ 1-adrenergic signaling in hippocampus-dependent memory retrieval. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:5006–5016.
- Zhang W, Zhang L, Liang B, Schroeder D, Zhang Z-W, Cox GA, Li Y, Lin D-T (2016a) Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci* 19:557–559.
- Zhang X, Zhong W, Brankač J, Weyer SW, Müller UC, Tort ABL, Draguhn A (2016b) Impaired theta-gamma coupling in APP-deficient mice. *Sci Rep* 6:21948.
- Zhou J (2004) Norepinephrine transporter inhibitors and their therapeutic potential. *Drugs Future* 29:1235–1244.
- Zhuang J, Stoelzel CR, Bereshpolova Y, Huff JM, Hei X, Alonso J-M, Swadlow HA (2013) Layer 4 in primary visual cortex of the awake rabbit: contrasting properties of simple cells and putative feedforward inhibitory interneurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:11372–11389.
- Ziegler MG, Brooks BR, Lake CR, Wood JH, Enna SJ (1980) Norepinephrine and gamma-aminobutyric acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 30:98–101.
- Ziemann U, Bruns D, Paulus W (1996) Enhancement of human motor cortex inhibition by the dopamine receptor agonist pergolide: evidence from transcranial magnetic stimulation. *Neurosci Lett* 208:187–190.
- Zinszner H, Sok J, Immanuel D, Yin Y, Ron D (1997) TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 110 ( Pt 15):1741–1750.
- Zou Z-Y, Cui L-Y, Sun Q, Li X-G, Liu M-S, Xu Y, Zhou Y, Yang X-Z (2013) De novo FUS gene mutations are associated with juvenile-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis in China. *Neurobiol Aging* 34:1312.e1-8.
- Zou Z-Y, Zhou Z-R, Che C-H, Liu C-Y, He R-L, Huang H-P (2017) Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88:540–549.

## Évaluation de la contribution noradrénergique à l'hyperexcitabilité corticale dans des modèles murins de sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones corticospinaux, localisés dans le cortex cérébral, et des motoneurons bulbaires et spinaux, localisés dans le tronc cérébral et la moelle épinière. Les patients atteints de SLA présentent une hyperexcitabilité corticale précoce, voire pré-symptomatique, et négativement corrélée à leur survie. Une étude du laboratoire a permis de mettre en évidence la présence d'une hyperexcitabilité corticale dans des modèles murins de la maladie : les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>*. Les travaux présentés dans cette thèse ont eu pour but de déterminer des mécanismes pouvant sous-tendre l'altération de cette balance entre excitation et inhibition corticale dans ces mêmes modèles. Nous avons mis en évidence une déplétion des niveaux de noradrénaline, une diminution des projections noradrénergiques et de l'expression de récepteurs adrénergiques inhibiteurs dans le cortex cérébral de ces modèles associées, chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, à une réduction du nombre de neurones noradrénergiques. Chez des souris sauvages, la déplétion noradrénergique suffit à induire un déséquilibre de la balance excitation-inhibition corticale, tandis qu'une supplémentation en noradrénaline dans le modèle *Sod1<sup>G86R</sup>* permet un rétablissement de cette dernière. Ainsi, la déplétion des niveaux corticaux de noradrénaline contribuerait à l'hyperexcitabilité corticale et la régulation de ces derniers pourrait permettre un rééquilibrage de la balance excitation-inhibition corticale.

**Mots clés** : Sclérose latérale amyotrophiques ; Hyperexcitabilité corticale ; Cortex cérébral ; Noradrénaline

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterised by the loss of corticospinal neurons, localised in the cerebral cortex, and bulbar and spinal motoneurons, localised in the brainstem and spinal cord. ALS patients exhibit an early cortical hyperexcitability, pre-symptomatic in some cases, and negatively correlated to their survival. A study in our lab demonstrated a cortical hyperexcitability in mouse models of the disease: *Sod1<sup>G86R</sup>* and *Fus<sup>+/ $\Delta$ NLS</sup>* mice. The work presented in this thesis aimed to determine the underlying mechanisms of the cortical excitation-inhibition imbalance in these models. We demonstrated a depletion of noradrenaline levels, decreased noradrenergic projections and inhibitory adrenergic receptors in the cerebral cortex of these mice with, in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, a reduction of noradrenergic neurons. In wild-type mice, noradrenergic depletion is sufficient to induce a cortical excitation-inhibition imbalance, while noradrenaline supplementation in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice helps restoring it. Therefore, cortical noradrenergic depletion contributes to cortical hyperexcitability and its regulation might allow a rebalancing of the cortical excitation-inhibition balance.

**Keywords**: Amyotrophic lateral sclerosis; Cortical hyperexcitability; Cerebral cortex; Noradrenaline