THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Neurosciences

École doctorale n°168 Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche INSERM U1298, Institut des Neurosciences de Montpellier

PATHOLOGIE MOLECULAIRE DE LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE

Présentée par Aleksandra CHUDINOVA
Le 22 octobre 2021

Sous la direction de Serge LUMBROSO

Devant le jury composé de

Sorana Ciura, CR, UMR-S 1163 IMAGINE IHU Imagine-Institut des Maladies Génétiques	Rapportrice
Patrick Vourc'h, PU-PH, UMR U 1253 iBrain Neurogénétique et Physiopathologie neuronale	Rapporteur
Adèle Faucherre, CR, UMR 5203, Institut de Génomique Fonctionnelle	Examinatrice
Serge Lumbroso, PU-PH, U1298, Institut des Neurosciences de Montpellier	Directeur de thèse
Mireille Rossel, MCF, UMR 1198, Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives	Invitée
Kévin Mouzat, MPU-PH, U1298, Institut des Neurosciences de Montpellier	Invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

« Car l'Homme j'en suis persuadé, est un chercheur, de lui-même, des autres, du monde, l'obstacle, lui est une chance. Dans les moments les plus difficiles, réduits à mes seuls reflexes je laisse parler ce qu'il y au plus profond de moi »

Mike Horn, Vouloir toucher les étoiles

A ma mère

Remerciements

Aux membres du Jury

Je remercie Monsieur le Professeur Serge Lumbroso : Merci Serge, pour m'avoir choisi pour ce projet et pour toute votre confiance tout au long de mes travaux ! Merci de m'avoir inclus dans l'équipe hospitalière, de m'avoir permis de participer aux STAFF et aux RCP et pour m'avoir guidé dans le monde hospitalier ! Ce lien clinique, réel et applicable, était un des moteurs majeurs de ma motivation. J'ai beaucoup appris à vos côtés aussi bien sur la génétique humaine, sur la SLA, mais aussi sur l'autisme et sur d'autres maladies génétiques. Merci pour votre patience, pour votre bienveillance, pour votre dynamisme et pour votre bonne humeur ! Merci pour votre direction, sous laquelle je me suis toujours sentie épaulée pour mes idées de recherche et capable d'affronter toute problématique scientifique !

Je remercie Monsieur le Professeur Patrick Vourc'h pour avoir accepté à présider ce Jury. J'ai une profonde admiration pour vos travaux sur TDP-43 et sur la génétique de la SLA. Je vous remercie pour nos conversations passionnantes lors des congrès scientifiques, qui ont inspirée de nouvelles idées pour ma propre recherche. Pour moi c'est un honneur que vous faites partie de mon Jury !

A Madame le Docteur Sorana Ciura, merci d'avoir accepté à faire partie de mon jury de thèse, même si l'on ne se connaît pas en personne, je suis avec grande intérêt vos travaux sur le gène *C9ORF72* et sur la génétique de la SLA, et je suis honorée par votre participation à mon jury de thèse !

A Docteur Adèle Faucherre, merci pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse et pour avoir acceptée d'être dans le jury de ma soutenance ! Merci pour m'avoir inclus dans le Zebraclub de Montpellier et pour tous les conseils scientifiques toujours pleins de bienveillance !

A Monsieur le Docteur Kévin Mouzat, merci pour m'avoir guidé tout au long du chemin de la thèse ! Grâce à toi, j'ai appris énormément sur le plan professionnel et scientifique, sur la génétique, sur les subtilités de la recherche clinique et de la recherche fondamentale, sur l'écriture de papiers, sur la préparation de congrès et sur les présentations, sur comment prioriser mes idées et les énoncer clairement et j'en passe ! J'ai particulièrement apprécié qu'en guise de récompense après nos discussions « sérieuses » tu me faisais toujours découvrir de nouveaux jeux de société ou tu avais toujours un curieux fait diverse à me raconter ! Merci d'avoir été là pour moi, toujours accessible et à l'écoute ! Dans les moments difficiles, quand une expérience ne fonctionnait pas ou quand j'étais stressée, tu as toujours su trouver les bons mots pour m'encourager et pour m'aider à surmonter ces difficultés ! Tu m'as beaucoup aidé pour apprendre à prendre du recul, à moins angoisser et à croire dans mes capacités. Merci pour m'avoir aidé avec tes corrections et commentaires sur ce manuscrit, merci pour ta patience, pour ta confiance, pour ta pédagogie et pour ta gentillesse !

A Madame le Docteur Mireille Rossel, merci pour m'avoir accueillie à la Plateforme de *zebrafish* de la Faculté de Montpellier, ce qui a rendu possible la mise en place de mon projet ! Merci, Mireille, de m'avoir pris sous ton aile comme si j'étais ta propre étudiante et de m'avoir aidée sur tous les aspects de mon projet : la conception, l'exécution, la communication et l'écriture de la thèse ! J'ai énormément appris de ton expérience et de tous tes conseils aussi bien sur le modèle *zebrafish,* que sur les neurosciences et la biologie moléculaire ! Tu étais là tous les jours, dans les hauts et dans les bas, à m'encourager à chaque pas et à fêter avec moi mes petites victoires, je n'oublierais jamais ton soutien ! Merci infiniment pour ton implication dans ce projet, sans quoi ma thèse n'aurait jamais été possible ! Merci pour ta disponibilité, pour ta bienveillance et pour ta générosité qui n'ont pas d'égales !

Aux membres du labo du Motoneurone

A Monsieur le Docteur Cédric Raoul, merci de m'avoir intégré dans l'équipe du Motoneurone à l'INM où j'ai pu démarrer le projet et où j'ai effectué une grande partie de mes expériences ! Merci de m'avoir accueilli et d'avoir assuré une base matérielle pour mon travail, de m'avoir permis de mettre ce projet « sur des rails », de m'avoir appris à remettre en question mes résultats et de m'avoir toujours poussé dans mes retranchements ! J'ai beaucoup apprécié ta

disponibilité et tes nombreux conseils scientifiques et j'ai appris énormément sur la physiopathologie de la SLA à tes cotés. Merci pour ta bonne humeur, pour ton ouverture d'esprit et pour ton soutien !

A Madame le Docteur Frédérique Scamps, merci pour m'avoir aidé avec les expériences de qPCR, merci pour ta rigueur qui m'a toujours inspirée, pour tes nombreux conseils scientifiques, pour avoir toujours été prête à aider avec ce que tu peux et pour ta bonne humeur !

A Monsieur le Docteur Laurent Soustelle et à Madame le Docteur Sophie Layalle, merci pour nos conversations passionnantes sur la génétique et sur les drosophiles, sur la SLA et la recherche en général ! Merci Laurent, pour m'avoir aidé avec la mise au point des Western Blots et merci à tous les deux pour vos nombreux conseils scientifiques et professionnels !

A Monsieur le Docteur Frank Aimond, merci pour nos échanges sur la science et sur la vie du chercheur, pour ta disponibilité et pour tes conseils, pour ton soutien, pour ton optimisme et pour ton grand sourire qui nous éclaire tous !

A Monsieur le Docteur Alex Mezghrani, merci pour tous les conseils scientifiques, j'ai toujours été impressionné par ta connaissance de la littérature scientifique, je te remercie pour nos discussions passionnantes sur les dernières découvertes scientifiques !

A Madame le Docteur Cécile Hilaire, merci pour tes conseils scientifiques lors des lab meetings et pour ta gentillesse !

A Madame le Docteur Laetitia They, un grand MERCI pour toute pour ton implication dans ce projet, pour tes nombreux conseils scientifiques, professionnels et personnels. Merci pour m'avoir guidée tout au long de l'écriture de ma thèse, pour m'avoir aidé m'organiser, pour me pousser à écrire, pour m'avoir soutenue tout le long… Je n'oublierais jamais toutes les corrections que tu m'as faite, les dimanches ou à 3h du matin… tu ne comptais pas ton temps pour moi ! Et puis, merci pour m'avoir préparée à ma soutenance, pour m'avoir fait répéter

plus que 15 fois, et quand j'étais épuisée, tu étais toujours là, à me soutenir et à me donner du courage ! Enfin, merci pour ton super sens d'humour qui égayait mes journées dans l'open space ! Sans toi je ne serais pas arrivée à rendre ce manuscrit et je te remercie pour ton aide! Je te souhaite plein de réussite pour ton postdoc à Harvard, comme je te l'ai déjà dit, ce sont eux qui ont de la chance de t'avoir !

Merci à Monsieur le Docteur Salim Benlefki, pour toutes nos discussions enrichissantes sur la thèse, sur les manips, sur la recherche et sur la vie ! A mon arrivée dans l'équipe, tu étais le premier des doctorants avec lequel j'ai pu discuter et grâce à toi je me suis sentie acceptée dans le groupe ! Merci pour ton support, pour tes innombrables conseils, pour ton soutien et pour m'avoir toujours donné du courage, pour avoir cru en moi ! Merci pour ta gaieté, pour ton amitié et pour ta charmante personnalité, ainsi que pour tous les moments passés ensemble ! Je te souhaite tous le meilleur pour l'avenir et je suis persuadée que tu vas tout réussir !

A Madame le Docteur Roxane Crabé, merci à toi, ma sœur de paillasse, d'avoir été à mes côtés tout au long de ces quatre ans ! Durant ce temps j'ai pu apprécier ta personne chaleureuse, accueillante et pleine d'attention, toujours prête à aider et pleine de bonne humeur ! Merci pour toutes nos conversations, pour tous tes conseils et pour avoir partagé tant d'émotions ensemble ! Merci pour m'avoir appris autant sur le système immunitaire et sur les astrocytes mais aussi sur le véganisme ! Merci pour les délicieux desserts que tu ramenais au labo, merci de nous avoir toujours accueilli chez toi pour passer du bon temps ensemble et merci pour ton amitié !

A Madame le Docteur Claire Soulard, merci Claire, d'avoir été là même si c'était que sur un an, j'ai adoré toutes nos conversations scientifiques et philosophiques ! Au palisir de te revoir bientôt !

Merci au futur Docteur Richard Younes, pour toutes nos conversations scientifiques autour de la SLA, la génétique, les *zebrafish*, les muscles et les neurones ! Merci de m'avoir appris à faire des dissections du muscle chez la souris adulte et de m'avoir montré les dissections de la moelle épinière des embryons ! Merci pour tous nos moments partagés sur la paillasse, pour ton intérêt envers mon projet, pour toutes tes questions et conseils et pour tous nos fous rires ! Merci pour

ta bienveillance et pour ton énorme gentillesse, pour tout ton amitié et pour toutes tes petites attentions et cadeaux que tu nous ramènes ! Je te souhaite du courage pour la suite, accroche-toi, ça va le faire !

Au futur docteur Philippe Gosset, merci beaucoup pour ton aide avec la qPCR et pour ton aide -lors de mes répétitions pour la soutenance ! Merci pour tes conseils scientifiques et pour nos conversations sur la *SOD1* lors desquelles j'ai appris beaucoup ! Merci pour nos conversations passionnantes autour de la musique et de l'art, pour ton ouverture d'esprit, pour ta bonne humeur et pour ton sens d'humour toujours très original à la pointe ! Merci pour ton amitié pour tous les moments partagés ensemble !

Merci au futur docteur Arthur Forget, pour avoir partagé mes derniers jours au labo avant mon départ et de prendre la suite de ce projet ! Merci pour tes questions et pour tes conseils, pour ton optimisme et positivisme débordants et pour ta bonne humeur ! Bon vent je suis sûre que tu vas réussir très bien ce projet !

Merci à Désiré Challuau et à Véronique Brugiotti pour avoir veillé sur notre bonne organisation au labo, pour nous aider avec les commandes et avec les manips, pour tous vos conseils et pour votre bienveillance !

Merci à tous les autres membres du labos actuels ou anciens pour la bonne ambiance dans l'équipe et à ceux que je n'ai pas pu nommer ici !

Aux personnes sans qui ce travail n'aurait pas été possible

A Nicolas Cubedo, merci Nico, pour m'avoir appris de manipuler des poissons à injecter les embryons de *zebrafish*. Merci pour t'être occupé de mes AB tout au long et d'avoir toujours fait tout ton possible pour me donner de si nombreux œufs dont j'avais besoin. Merci pour tous tes conseils scientifiques et en aquariophilie en général, merci aussi pour les crevettes que tu

m'avais offertes ! Merci pour ta gentillesse, pour ton soutien et pour avoir toujours été là quand j'avais besoin !

A Jérôme Sarniguet, merci pour tout ton aide avec les expériences de comportement et d'avoir mis autant d'efforts pour convertir mes données de la Zebrabox ! Merci pour ta bonne humeur et pour ton soutien !

A Madame le Docteur Anne Polge, merci pour m'avoir si gentiment accueilli à l'hôpital au tout début de ma thèse et de m'avoir initié au Glims et à Genetisit Assistant. Merci pour ta bonne humeur et pour ton aide précieux lors des STAFFS pour comprendre les concepts cliniques !

A Monsieur le Professeur Jean-Louis Bessereau, merci pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse et pour m'avoir toujours donné des conseils très pertinents aussi bien sur *C.elegans* que sur *zebrafish.*

A Madame le Docteur Annette Vergunst, merci de m'avoir accueilli dans ton labo au tout début de ma thèse, de m'avoir appris différentes façons d'injecter les embryons de *zebrafish* et que des fois c'est plus facile de na pas utiliser le micromanipulateur ! Merci de m'avoir donné un bureau dans ton labo et de m'avoir acceptée parmi tes étudiants pour ma formation. Merci de m'avoir suivi de loin et pour tous les conseils pertinents qui m'ont grandement aidé pour la mise en place de ce projet ! Merci pour ta bienveillance et pour ton soutien !

A Monsieur le Professeur Simon Gallas et à Madame le Docteur Myriam Richaud, merci de m'avoir accepté dans votre laboratoire au sein de la faculté de Pharmacie de Montpellier pour travailler sur *C. elegans.* Merci pour tous vos conseils lors de la conception du projet et pour m'avoir fait découvrir les tardigrades !

Aux équipes qui m'ont accueilli

Merci à toute l'équipe du Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire du CHU de Nîmes, notamment à Claire Guissard et à Jovana Kantar. Merci à toute de l'équipe de la plateforme de *zebrafish* à la Faculté de Montpellier. Merci à toutes les personnes à l'Institut des Neurosciences de Montpellier, notamment Richard Duhamel pour ton aide avec l'informatique, Blandine Ouallet pour ton aide avec l'administration, et Artëm Diuba pour ton aide avec les micros lors de la soutenance !

A mes amis

A Aline et Jack, merci à vous qui êtes là depuis les bancs de la Fac à Lille ! Merci pour tout votre soutient, pour votre amitié, pour tous les moments inoubliables que l'on a passé ensemble à Lille, Paris, Strasbourg, Lyon, Marseille et Montpellier ! Quel plaisir de partager autant de souvenir merveilleux, pourvu que ça dure !

Vincent, Antoine, Gautier, Alex, Kévin, Rosy : Merci les amis, pour tout notre temps passé à la fac et à la coloc à Strasbourg ! En espérant vous retrouver bientôt !

A Gaby, merci d'avoir été là dès mon arrivée à l'INM, tu étais une des toutes premières personnes que j'ai découvertes à l'Institut et tu es devenue une amie proche ! Merci pour avoir réalisé mon autre rêve qui était d'aller à ce grand festival de musique, le plaisir était autant plus grand parce que je l'ai partagé avec toi ! Merci pour toutes nos discussions et pour nos petites balades le long du Lez et pour toute la bonne humeur !

A Laeti et à Paul – (certaines se retrouvent deux fois dans la liste des remerciements mais c'est comme ça), merci Laeti, pour tout ton amitié et pout tes petites attentions, pour ton support et pour ton amitié! Merci Paul pour toute ta gentillesse, je suis heureuse de te découvrir petit à petit et à te compter parmi mes amis proches !

A Alex et Anouchka, vous aimez la bonne nourriture, les fous rires, les voyages, les jeux, alors comment ne pas vous adorer !? Je suis heureuse de vous compter parmi mes amis proches, merci pour votre amitié, pour votre soutien et pour vos personnes attachantes et pleines de joie !

A Hossam, à Bertrand merci pour votre bonne humeur, pour votre amitié et pour votre esprit aventurier que je partage !

A Ève et à Pierre-Emmanuel : j'adore passer du temps avec vous, discuter sur les neurosciences ou sur la médecine, sur les chats ou sur l'astronomie, toujours dans la bonne humeur ! Merci pour votre amitié, au plaisir de vous retrouver bientôt !

A la troupe de la Cave de l'Improvisation : Mathieu, Vincent, Morgane, Caro, Pauline, Théo, Gilles, Céline, Laeti : quel bonheur est de jouer avec vous et de déconner autour d'une bière! Merci beacoup pour les merveilleux moments passés ensemble!

To my childhood friends: Slav, Koko, Mitko: thank you for this long friendship, for our common love of science and for our wonderful memories!

A ma famille

Thank you, mom, for my upbringing and for educating me to be curious about the world! Thank you for stimulating my imagination and for always encouraging me to follow my dreams! Thank you, Vicky, for telling me that numbers can be negative! Thank you for sparking in me the flame of science and the love of knowledge and critical thinking! Thank you both believing in me and for all your love!

Thank you to all my cousins, aunts and uncles, who supported me as well since the beginning!

Thank you Avi, Mimi, Lizi, Ici, Ioisi, for always believing in me and giving me so much support and love!

A Birgit, René, Nicolas, Nadège et Carole, merci pour votre bienveillance et pour votre accueil chaleureux, merci pour tous les merveilleux moments passés ensemble et merci pour votre soutien tout au long de cette dernière ligne droite et au-delà !

A Fabian, merci pour ton aide avec mon manuscrit, pour toutes tes corrections et pour tes explications sur l'anatomie du système nerveux ! Merci pour tout ton amitié et pour ton amour, partager la vie avec toi est un bonheur !

Résumé

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie fatale qui provoque la dégénérescence des motoneurones. Dans 90% des cas, la maladie arrive de manière sporadique (SLA spo) tandis que dans 10% des cas elle peut être héritée (SLA fam) La présence de variant causal peut expliquer jusqu'à 70% des cas de SLA fam et 10% des cas de SLA spo. Indépendamment de la forme qu'ils présentent, un diagnostic moléculaire est conseillé aux patients pour rechercher un variant causal. Ce diagnostic s'effectue sur un panel de gènes connus pour être associés à la SLA. Tous les variants sont analysés d'après un système international pour leur attribuer une classe de pathogénicité parmi les 5 classes suivantes: Bénin (B), Probablement Bénin (PB), Variant de signifiance indéterminé (VUS), Probablement Pathogène (PP) et Pathogène (P). Las variants rares retrouvés dans les séquences des patients se retrouvent souvent dans la classe des VUS. L'interprétation de la pathogénicité de ces variants représente un défi pour le diagnostic moléculaire. Il s'agit souvent de variants absents des bases de données cliniques et pour lesquelles il existe peu d'études fonctionnelles quant à leur implication dans la maladie. L'analyse fonctionnelle des variants est un moyen efficace pour surmonter ce défi et permet dans certains cas de redéfinir la classe de pathogénicité de ces variants.

Dans ce travail de thèse, nous avons réalisé une première étude de l'effet fonctionnel de la surexpression de 4 variants dans le gène *SOD1* et de 1 variant candidat dans le gène *OPTN* chez l'embryon du poisson zèbre ou *zebrafish (Danio rerio*). Le gène *SOD1* qui code pour l'enzyme superoxyde dismutase est responsable de 20% des cas de SLA familiale. Les mutations dans ce gène sont majoritairement de type gain de fonction et provoquent la formation d'agrégats protéiques toxiques pour la cellule. Enfin, le gène *SOD1* est une des cibles majeures de la thérapie génique par stratégie antisens. Les variants choisis dans ce gène sont : D126N, K137*, E134del et I150M. L'effet de leur surexpression est comparé avec les variants pathogènes A5V et G94A ainsi qu'avec le variant SOD1 WT. Le gène *OPTN* est un gène mineur de la SLA qui code pour une protéine impliquée dans le transport cellulaire, le maintien de l'intégrité de l'appareil de Golgi et la réaction inflammatoire par inhibition du facteur nucléaire NF-kappaB. Les formes mutées de ce gène alternent sa fonction et peuvent former des agrégats toxiques. Le variant candidat de ce gène est le L429R, il est comparé avec le variant pathogène E478G et le variant OPTN WT. La surexpression des variants candidats et des variants pathogènes chez le *zebrafish* induit des défauts locomoteurs à 2 jours post fécondation (jpf). Une diminution de l'activité motrice est également à 5jpf pour certains

variants. En outre, le phénotype locomoteur à 2jpf est associé avec un raccourcissement des axones des motoneurones, une augmentation des branchements axonaux et des perturbations de la jonction neuromusculaire. Cette étude montre que tous les variants candidats étudiés ont un effet pathogène ce qui suggère de les reclassifier dans la classe « Pathogène ». Enfin, cette étude montre que le *zebrafish* peut constituer un outil rapide pour cribler la pathogénicité des variants rares et démontre son potentiel pour le diagnostic moléculaire de la SLA.

Abstract

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease that leads to motoneuron degeneration. 90% of all ALS cases are sporadic (sALS) and in 10% of the cases the disease can be inherited (familial ALS, fALS). A single causative variant can be identified in up to 70% of fALS and in 10% of sALS. Molecular diagnosis is advised to all patients independently of the form they present. This molecular diagnosis is performed on a panel of ALS-associated genes. All variants are classified according to an international classification system, defining five pathogenic classes: Benign (B), Probably Benign (PB), and Variant of unknown Significance (VUS), Probably Pathogenic (PP) and Pathogenic (P). Rare variants found in patients' sequences as often classified as VUS. Interpretation of their pathogenicity represents a major challenge for molecular diagnosis. Often they are absent from disease-oriented databases and there is no functional evidence about their involvement in the disease. Functional analysis is an efficient way to overcome this challenge and in some cases it can allow to redefine the pathogenic class of those variants.

In the current thesis work, we analysed for the first time the functional effect induced by overexpression of 4 candidate variants from *SOD1* gene and 1 candidate variant *OPTN* gene in zebrafish *(Danio Rerio)* embryos. *SOD1* codes for the enzyme superoxyde dismutase 1 and is responsible for 20% of familial ALS cases. The pathogenic variants in *SOD1* lead mainly to gain of function, provoking aberrant aggregation of the proteins which is toxic for the cells. Lastly, *SOD1* is one of the major targets for antisense gene therapy. The candidate variants that we selected in that gene are: D126N, K137*, E134del and I150M. The effect of their overexpression is compared with the pathogenic variants A5V and G94A, as well as with the WT variant. The gene *OPTN* is a minor ALS gene that codes for a protein implicated in the cellular trafficking, in Golgi apparatus maintenance as well as in the inflammatory reaction by inhibiting NF- kappaB. The mutated variants of this gene alternate its function and also lead to formation of toxic aggregates. The candidate variant of this gene is L429R, its effect is compared with the pathogenic E478G and with the OPTN WT variant. Overexpression of

candidate and of pathogenic variants in zebrafish embryos induces locomotor impairments in 2-days post fertilization (dpf) Reduction of locomotor activity is seen for some larvae at 5dpf. In addition, locomotor phenotype from 2dpf is associated with shortening of the axonal projection, increased axonal branching of motoneurons and impairments of the neuromuscular junction. This study shows that candidate variants have a pathogenic effect and suggest to reclassify them in the Pathogenic class. Lastly, we demonstrate that zebrafish can be used as a rapid tool for pathogenicity screening of rare variants and underlies its potential for ALS molecular diagnosis.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION ____ *1*

I. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) ____ **2**

1. Découverte et contexte historique ____ 2
2. Épidémiologie de la SLA ____ 4
   2.1. Prévalence et incidence ____ 4
   2.2. Progression et survie ____ 5
   3. Étiologie de la SLA ____ 6
3. L'atteinte motrice dans la SLA ____ 7
   3.1. Le système moteur ____ 7
      3.1.1. Élaboration de la commande motrice ____ 7
      3.1.2. Les Voies descendantes directes ____ 10
      3.1.3. Les Voies descendantes indirectes ____ 12
      3.1.4. La moelle spinale ____ 13
      3.1.5. Les motoneurones spinaux ____ 15
      3.1.6. Transmission synaptique de la commande motrice ____ 17
   3.2. Modulation de l'activité des motoneurones spinaux ____ 19
      3.2.1. Modulation par les voies descendantes ____ 19
      3.2.2. Les interneurones spinaux ____ 20
2. Présentation clinique de la SLA ____ 20
   2.1. Formes de SLA ____ 20
   2.2 Diagnostic différentiel ____ 23
3. Physiopathologie de la SLA ____ 24
   3.1 Hypothèses sur le déclenchement de la SLA ____ 24
   3.2 Mécanismes cellulaires conduisant à la dégénérescence des motoneurones ____ 24
      3.2.1 Perturbations de l'homéostasie protéique ____ 25
      3.2.2. Perturbations du métabolisme des ARNs ____ 27
      3.2.3. Le transport axonal ____ 27
      3.2.4 L'excitotoxcicité ____ 27
      3.2.6. Stress oxydatif et dysfonctionnement mitochondriale ____ 28
      3.2.7. L'inflammation ____ 29
      3.2.8. Implication d'autres types cellulaires ____ 29
4. Traitements ____ 29
5. Récapitulatif ____ 30

II. Pathologie moléculaire de la SLA ____ **30**

1. Notions de génétique ____ 31

1.1. Le génome humain 31
1.2. Organisation et expression de l'information génétique 31
1.3. La variation au sein du génome 34
2. Notions de pathologie moléculaire 36
2.1. Les différents types de mutations 36
2.1.1. Les microlésions 37
2.1.2. Polymorphismes de répétition 38
2.1.3. Macrolésions dues aux réarrangements génomiques 39
2.2 Transmission des maladies mendéliennes 39
2.2.1. Transmission autosomique dominante 40
2.2.2. Transmission récessive 40
2.2.3. Transmission liée à l'X 40
2.3. Effet fonctionnel des mutations 40
2.3.1. La perte de fonction 40
2.3.2. L'haploinsufisance 41
2.3.3. Dominant négatif 41
2.3.4. Gain de fonction 41
2.4. La pénétrance 41
2.5. Les gènes de susceptibilité 42
2.6. Les gènes modificateurs 42
2.7. Les maladies complexes 42
2.8. Classification des variants génétiques 43
3. Génétique de la SLA 46
3.1 La notion de maladie familiale 46
3.2 Architecture génétique de la SLA 47
3.3 Les gènes majeurs de la SLA 49
3.3.1. *SOD1* 49
3.3.2. *C9ORF72* 53
3.3.3. TARDBP 54
3.3.4 FUS 55
3.4. Autres gènes de la SLA 56
3.4.1. OPTN 56
3.4.2. Autres gènes mineurs 57
4. Le diagnostic moléculaire de la SLA 57
4.1 Le fond génétique de la SLA en France 57
4.2. La classification des variants génétiques de la SLA 58

III. Le modèle *zebrafish* 59

1. Généralités 59
1.1. Cycle de vie 59
1.2. Conservation génétique avec l'Homme 60

1.3. Techniques d'édition génétique 60
1.4. Contribution du modèle *zebrafish* à la recherche 61
2. Système moteur du *zebrafish* 62
2.1. Organisation anatomique du système moteur 62
2.2. La locomotion durant les premier 48h et le réflexe TEER 64
2.3. La réponse motrice aux stimuli visuels et auditifs et le *startle* 65
3. Modélisation de la SLA dans *zebrafish* 66
3.1. Les modèles *zebrafish* du gène *SOD1* 66
3.2. Les modèles *zebrafish* du gène OPTN 67

IV. Présentation du projet de recherche du doctorat 68
1. Avant-propos 68
2. Contexte et objectifs de la thèse 69

MATERIEL ET METHODES* *72
1. Choix des variants génétiques 73
2. Constructions moléculaires 73
3. Transformation bactérienne par *heat shock* 74
4. Extraction d'ADN plasmidique 74
5. Synthèse et purification d'ARNm 75
6. Lignées *zebrafish* 75
7. Injection 76
8. Analyse morphologique des larves de *zebrafish* 76
10. Extraction protéique et Western Blot 76
11. Anticorps 77
12. Immunohistochimie 77
13. Microscopie 78
14. Analyse des projections axonales 78
15. Analyse de la Jonction Neuromusculaire 78
16. Analyse par VMR et ASR 78
17. Statistiques 80

RESULTATS* *81

I. Article 82
1. Résumé 82

II. Résultats complémentaires à l'article 98
1. Les larves surexprimant A5V, G94A et D126N présentent une diminution de l'activité en VMR à 5jpf 98

2. La surexpression des variants candidats dans le gène OPTN induit une diminution de l'accélération des larves à 2dpf 100

Conclusions et perspectives 102

1. Etude de l'effet de la surexpression des variants du gène *SOD1* sur la locomotion 103
3. Etude de la neurotoxcicité induite par la surexpression des variants candidats du gène *SOD1* 105
4. Etude de l'effet de la surexpression du variant candidat sur la locomotion 106
5. Utilisation du zebrafish pour l'analyse fonctionnelle des variants de la SLA 106

ANNEXXES 109

Review 110

Références bibliographiques 123

INTRODUCTION

I. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

Qu'est-ce que la SLA ? Ce chapitre répond à cette question et s'intéresse aux aspects cliniques de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Dans un premier temps, il traite de l'historique de la maladie et de l'évolution des connaissances à son sujet, puis présente des notions sur le système moteur nécessaires à la compréhension de la physiopathologie de la SLA. Ensuite, il s'intéresse aux chiffres épidémiologiques, à la physiopathologie et aux traitements de la maladie.

1. Découverte et contexte historique

L'étude de la SLA commence au 19e siècle à Paris. C'est à cette époque que Jean-Martin Charcot (Fig.1) pose les bases de la neurologie moderne et permet sa reconnaissance en tant que discipline médicale à part entière (Kumar et al., 2011). Il étudie la SLA, une maladie neurodégénérative rare qui provoque la mort des neurones moteurs et le décès des patients 2 à 3 ans après le diagnostic. Les symptômes observés par le Professeur Charcot chez les patients sont une faiblesse musculaire accompagnée d'une atrophie, d'une rigidité des musculaire, des fasciculations de la langue et des muscles des membres. L'ensemble de ces symptômes évolue progressivement vers une paralysie menant au décès du patient.



Figure 1 : Jean-Martin Charcot (1825-1893)

En analysant les personnes atteintes de SLA, Le Professeur Charcot invente une nouvelle méthode dite d'analyse anatomoclinique. Cette méthode permet de décrire précisément les lésions à l'origine de la maladie, en observant les tissus et les organes *post mortem* pour faire le lien avec les symptômes observés. Comme son nom d'indique, la SLA est une sclérose (*sklêros* signifiant dur en grec) c'est-à-dire que l'on observe « un tissu cicatriciel et dur » (Garnier, Delamare, 2009). Le terme *« latérale »* décrit une affectation des neurones de la partie latérale de la moelle épinière que Charcot a décrit anatomiquement pour la première fois (Garnier, Delamare, 2009). Il conclue que ce tissu sclérosé se forme suite à la disparition des neurones moteurs qui se situent sur la partie latérale de la moelle épinière. De plus, il observe la présence de tissu musculaire aminci et littéralement « affamé » (*a-myo-trophos*

signifiant sans nourriture pour le muscle) (Garnier, Delamare, 2009). En effet, les patients présentent un amaigrissement caractéristique, dû à la perte de masse musculaire, déjà décrit par d'autres de ses neurologues contemporains. (Dardiotis et al., 2018). La méthode d'analyse anatomoclinique s'avère irremplaçable et s'applique encore aujourd'hui à la caractérisation de nombreuses maladies neurologiques. En France et en Europe, l'éponyme « maladie de Charcot » est utilisé pour désigner la SLA en l'honneur des travaux décrits ci-dessus. Par la suite, le neurologue Fulgence Raymond complète la description des lésions dans la SLA en démontrant l'atteinte des motoneurones supérieurs et des motoneurones inférieurs.

Au début du 20ème siècle, la SLA se fait connaître du grand public suite au diagnostic du baseballeur américain Lou Gherig (1903-1941) (Fig. 2). Étant un des sportifs les plus admirés de son époque, il en est devenu le symbole aux États-Unies où la maladie porte son nom. Malgré une compréhension croissante des mécanismes physiopathologiques de la SLA, aucun traitement curateur n'existe à l'heure actuelle. Dès lors, en plus de la recherche, la prise en charge symptomatique, notamment l'assistance respiratoire et les soins de *nursing* sont essentiels et permettent parfois aux patients de continuer leur activité. Ceci est le cas du jazzman Charles Mingus et du guitariste de rock Jason Becker qui ont continué à composer de la musique malgré le handicap induit par leur SLA (Fig. 2).

Parmi les personnes qui contribuent à la médiatisation de la SLA, le rugbyman Patrick Quinn et son ami Pete Fartes (Fig. 2) popularisent le challenge du sceau d'eau glacée « The Ice Bucket Challenge » en 2014. Il consiste à se verser un sceau d'eau glacée sur la tête puis à inviter un de ses amis à faire un don pour la recherche sur la SLA. La personne nominée a 24h pour le faire, à défaut elle doit elle-aussi se verser un sceau d'eau glacée sur la tête. Le défi a été particulièrement suivi chez les célébrités, notamment Leonardo DiCaprio, David et Victoria Beckham, Kim Kardashian, Donatella Versace ou encore l'ancien président des États Unies George W. Bush. La campagne a permis de récolter plus de 220 millions de dollars dans le monde entier. Suite à ce succès, les associations américaines ont désigné le mois d'Aout comme « mois de la SLA » afin de sensibiliser tous les ans le public à cette maladie et appeler aux dons pour la recherche médicale.

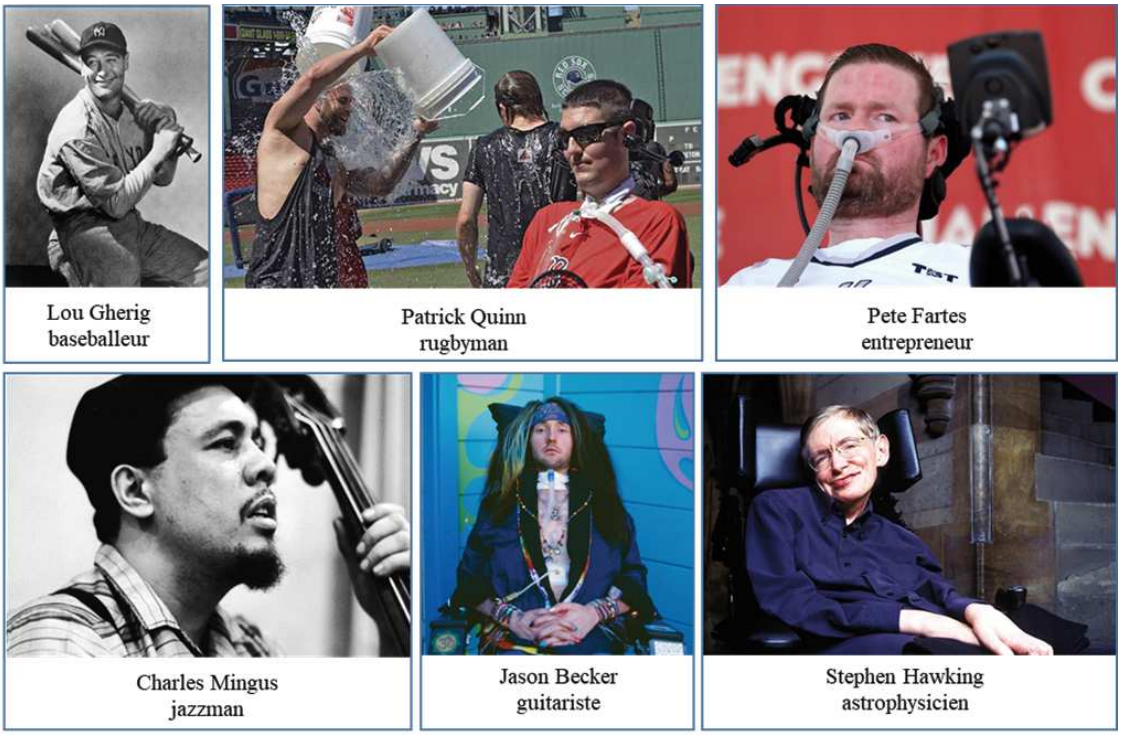


Figure 2 : Personnes célèbres atteints de la SLA.

L'astrophysicien britannique Stephen Hawking en est un autre exemple : il continua ses recherches scientifiques de son diagnostic en 1963 jusqu'à sa disparition en 2018. Il présentait une forme de SLA atypique évoluant au cours de 55 années et dont le diagnostic reste discutable auprès les spécialistes *(Westeneng et al., 2018)*.

Bien que cette pathologie bénéficie aujourd'hui d'une visibilité plus importante, elle reste une maladie peu étudiée. Les deux parties suivantes se focalisent sur l'épidémiologie et sur l'étiologie de la SLA.

2. Épidémiologie de la SLA

2.1. Prévalence et incidence

La SLA est la plus fréquente des maladies du motoneurone déclenchée à l'âge adulte *(Al-Chalabi and Hardiman, 2013)*. L'incidence en Europe est de 2 à 3 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes, ce qui en fait une maladie rare *(Masrori and Van Damme, 2020)*. La prévalence de la SLA en Europe, c'est-à-dire le nombre de personnes atteintes à un instant donné, est de 4 à 8 cas pour 100 000 personnes *(Masrori and Van Damme, 2020)*. Le ratio de la SLA en fonction du sexe des patients est de 1 homme pour 1.5 femmes (Volk et al., 2018).

D'après certaines études, les hormones sexuelles féminines pourraient avoir un effet protecteur, tandis que les hormones sexuelles masculines pourraient conférer un risque plus élevé *(Wang et al., 2017).* Le risque individuel pour développer une SLA est estimé à 1/357 pour les hommes et 1/436 pour les femmes (Ryan et al., 2019)

Les chiffres de l'incidence et de la prévalence varient en fonction de la région géographique et des cohortes utilisées dans les études. L'incidence mondiale se situe entre 1.5 et 3 pour 100 000 *(Al-Chalabi and Hardiman, 2013, Logroscino and Piccininni, 2019).* Plusieurs études témoignent d'une hétérogénéité géographique. Ainsi, il a été rapporté une incidence de 0.89 en Asie de l'Est et allant jusqu'à 2.29 en Nouvelle Zélande (Logroscino and Piccininni, 2019). Il existe une forme particulière de SLA à l'île de Guam, où l'incidence de cette maladie peut atteindre 60 pour 100 000 (Logroscino and Piccininni, 2019). Des études sur les populations locales ont démontré la présence d'une neurotoxine accumulée dans les tissus des patients, provenant probablement de leur alimentation *(cf* ***Erreur ! Source du renvoi introuvable.****)*. Aux É tats-Unis, il existe une corrélation entre les milieux socio-économiques élevés et la plus grande probabilité de développer une SLA *(Logroscino and Piccininni, 2019)*. De manière générale, l'incidence de la SLA paraît plus élevée dans les pays occidentaux qu'en Asie. Cependant, il est important de noter que les chiffres peuvent varier en fonction du développement des pays et de l'efficacité du dépistage. La majorité des études étant faites en Europe et dans les États-Unis, peu de données sont disponibles concernant les pays d'Asie, d'Afrique et d'Amérique Latine *(Logroscino and Piccininni, 2019).*

Le nombre de cas de SLA augmente à l'échelle mondiale, d'une part suite à la meilleure connaissance de la maladie et à son meilleur dépistage et d'autre part à cause du vieillissement de la population *(Rosenbohm et al., 2017).* Plusieurs études suggèrent que dans les années à venir, l'incidence de la SLA va continuer à croître pour atteindre jusqu'à 3.3 à 4.5 pour 100 000 dans le monde entier. *(Gowland et al., 2019 ; Longinetti and Fang, 2019 ; Rosenbohm et al., 2017).*

2.2. Progression et survie

La moyenne d'âge d'apparition des premiers symptômes est de 64 ans en France et de 60 ans dans le monde (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Couratier et al., 2016). Ils existent aussi des formes juvéniles avec un déclenchement avant 35 ans mais cela reste rare. Le délai de diagnostic peut aller de 10 à 27 mois après l'apparition des premiers symptômes *(Richards et*

al., 2020). La SLA classique évolue en 3 à 5 ans, avec une médiane de survie à 34 mois en France (Mouzat et al., 2016). L'évolution de la maladie varie en fonction de sa présentation clinique *(2. Présentation clinique)* La sévérité de la maladie est évaluée par le score ALSFRS, allant de 0 à 40 qui se base sur le degré d'atteinte des fonctions de déglutition, du mouvement, des capacités de communication et enfin de la respiration *(Wang et al., 2017)*. La progression de la maladie est divisée en 6 étapes, allant de 0 (pas d'atteinte fonctionnelle) à 5 (atteinte sévère), puis 6 (décès) *(Chiò et al., 2018)*.

3. Étiologie de la SLA

La SLA est une maladie complexe qui se développe de manière spontanée dans 90% des cas. Il existe également des formes familiales qui expliquent les 10% restant (le sujet de la génétique de la SLA sera discuté en détail plus loin, c*f. 3. Génétique de* la SLA*)*. En plus de la susceptibilité génétique, il existe de nombreux facteurs environnementaux associés à un risque plus élevé de développer la SLA. L'activité physique est parmi les facteurs de risque les plus cités *(Al-Chalabi and Hardiman, 2013)*. Les patients au début de leur SLA sont décrits comme plus athlétiques, ont un indice de masse corporelle plus bas et ont une plus grande préférence pour les loisirs sportifs que la moyenne *(Al-Chalabi and Hardiman, 2013)*. Ces études ne présentent pas d'évaluation de l'effet dose-dépendant entre le sport et la susceptibilité de développer la SLA. Même s'il ne semble pas y avoir un lien direct entre sport et SLA Cependant, même si un lien direct n'a pas été démontré, le sport semble être malgré tout un marqueur de risque élevé (Hardiman et al., 2017a).

Une méta-analyse de 2016 a repris les données de la littérature scientifique pour évaluer différents risques potentiels tels que l'exposition aux métaux lourds, aux solvants organiques, aux pesticides et le tabagisme *(Wang et al., 2017).* Elle conclue que les trois premiers facteurs sont associés à un sur-risque de développer la SLA. L'exposition au formaldéhyde à lui seul confère un risque 3 fois plus élevé *(Roberts et al., 2016)*. Le tabagisme confère un sur-risque chez les femmes *(Wang et al., 2017)*.

Certaines neurotoxines comme la β-méthylamine-L-alanine (BMAA) sont suspectées de contribuer au développent de la SLA chez les sujets à risque. Cette toxine est associée aux formes de SLA de l'île de Guam et du bassin de Thau. Elle peut être produite par des cyanobactéries présentes naturellement dans les bassins d'eau. Certaines études montrent une corrélation entre la BMAA et une incidence plus élevée de SLA dans ces zones, même s'il n'a

pas été démontré de lien direct *(Bradley et al., 2018; Masseret et al., 2013; Hardiman et al., 2017).*

Les facteurs de l'environnement n'agissent pas de manière isolée mais plutôt en synergie avec le fond génétique de chaque personne. La compréhension de ces interactions est fondamentale pour mieux comprendre les processus pathologiques et aider le développement de thérapies ciblées ou personnalisées.

3. L'atteinte motrice dans la SLA

3.1. Le système moteur

Pour comprendre l'atteinte motrice dans la SLA, il est nécessaire de parcourir les bases de l'organisation du système moteur. Le mouvement est un comportement complexe permettant aux organismes mobiles de se déplacer de manière active. Il leur est nécessaire pour la recherche de nourriture, pour échapper à un prédateur, pour communiquer ou pour se reproduire, assurant ainsi leur survie. A l'échelle humaine, le mouvement dépasse le simple contexte de survie, pour devenir un moyen d'expression et d'inspiration.

Au cours de l'évolution, le système moteur des différentes espèces s'organise de manière spécifique en fonction de leur environnement. Néanmoins, les mécanismes moléculaires restent grandement conservés. Le mouvement résulte du dialogue entre des circuits neuronaux et leurs muscles cibles. Chez les vertébrés, l'organisation de ces circuits est très similaire. De sorte, chez l'homme, le système moteur se divise fonctionnellement en partie une centrale - qui élabore la commande motrice - et en une partie périphérique - qui effectue la commande motrice.

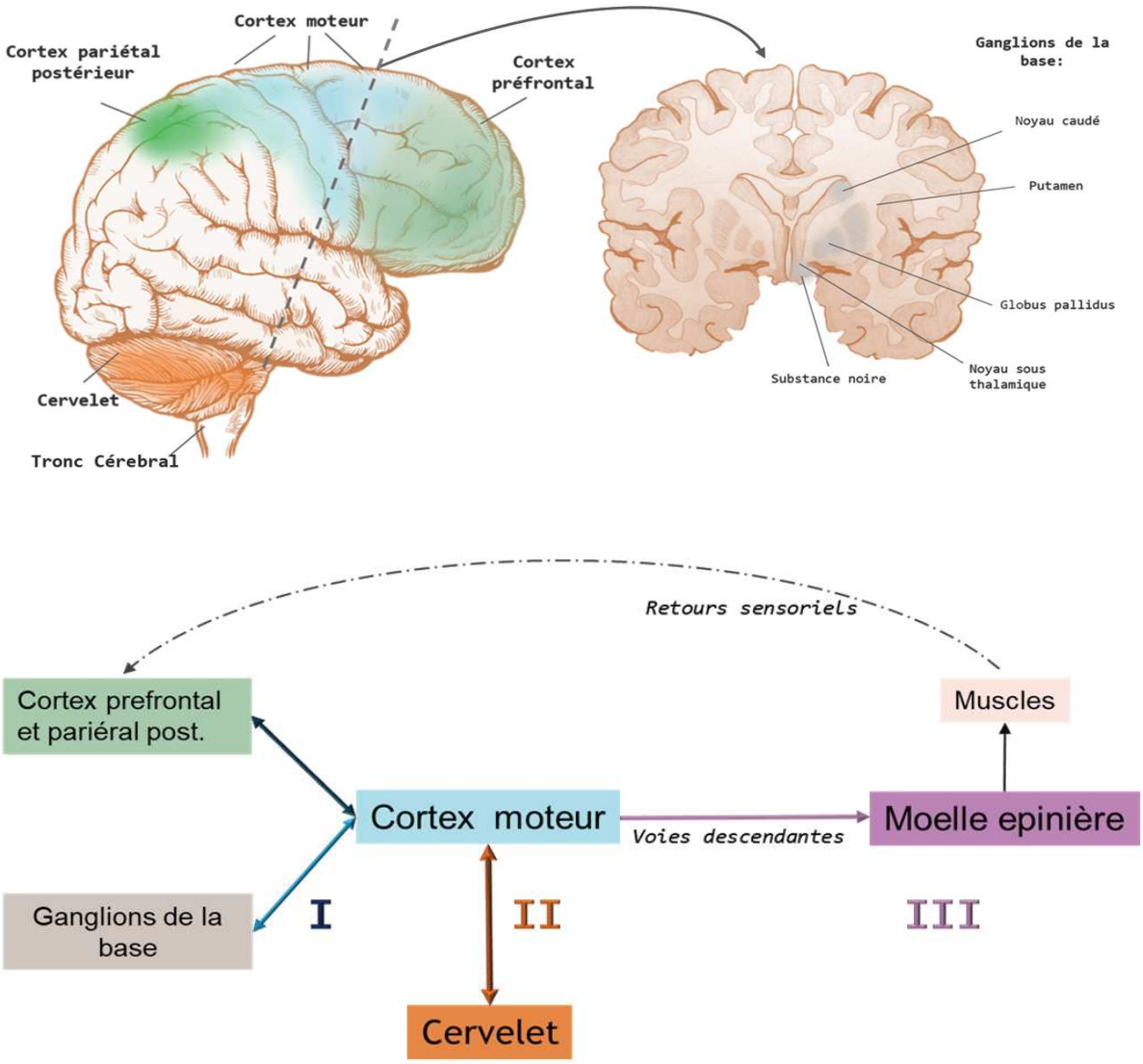
3.1.1. Élaboration de la commande motrice

Comment un joueur de tennis fait-il pour renvoyer la balle avec force et précision ? C'est la **commande motrice,** élaborée par le cerveau, qui permet au corps d'effectuer un mouvement. Elle est organisée de manière **hiérarchique** en impliquant plusieurs structures : le cortex, les ganglions de la base, le cervelet, les voies motrices descendantes, le tronc cérébral et enfin la moelle épinière (Fig 3) (Bear et al., 2016).

Le premier degré de contrôle du mouvement implique le cortex préfrontal, le cortex pariétal postérieur, **le cortex moteur** et les ganglions de la base. (Fig 3). Ces structures forment le réseau neuronal responsable de l'intégration de l'information sensorielle et de l'élaboration de la stratégie de la commande motrice. Si l'on reprend l'exemple plus haut, quand le joueur voit la balle arriver, l'information visuelle est réceptionnée par les yeux (organes sensoriels) et acheminée par les neurones sensoriels vers le cortex pariétal postérieur et le cortex préfrontal. L'information sensorielle est analysée pour savoir quelle décision prendre en réponse à l'arrivée de la balle. La stratégie de la réponse motrice est précisée dans le cortex moteur et les ganglions de la base (Fig3). Dans l'exemple du joueur, la stratégie à prendre est de soulever le bras tenant la raquette et de frapper la balle. La stratégie de la commande motrice est ensuite envoyée au cervelet.

Le cortex moteur et le **cervelet** forment le deuxième degré de contrôle de la commande motrice (Fig 3). (Purves, 2004).Ensemble, ils sont responsables de la définition précise de tous les paramètres pour répondre à la stratégie motrice de manière optimale, en spécifiant l'ordre des mouvements à effectuer, leur force, leur aspect spatiotemporel et leur coordination. Dans l'exemple plus haut, il s'agit alors de savoir quels muscles activer et à quel moment pour : courir vers la balle, soulever le bras ; frapper la balle avec la raquette ; retourner à sa position initiale. Une fois la commande motrice définie, elle est acheminée vers le tronc cérébral et la moelle épinière par les voies descendantes.

Le tronc cérébral et la **moelle épinière** constituent le troisième degré de contrôle de la commande motrice (Bear et al., 2016). C'est à ce niveau-là que les motoneurones spinaux reçoivent la commande motrice afin d'activer leurs muscles cibles pour exécuter le mouvement demandé



I : Décision de la stratégie motrice
II: Définitions des paramètres de mouvement
III: Exécution de la commande motrice

Figure 3 : Élaboration hiérarchique de la commande motrice adapté d'après (Purves, 2004)**.** Le premier niveau est constitué des structures corticales et des ganglions de la base, qui intègrent les informations sensorielles et élabore une stratégie de réponse motrice (I). Le cortex moteur et le cervelet définit ensuite les paramètres spatio-temporels de cette réponse (II). Enfin, les voies descendantes acheminent les informations motrices jusqu'aux muscles (III).

3.1.2. Les Voies descendantes directes

Les voies descendantes directes sont impliquées dans le contrôle des mouvements volontaires. On distingue la voie cortico-spinale et la voie cortico-nucléaire. Elles effectuent un lien monosynaptique entre un seul neurone du cortex moteur (motoneurone central) et un neurone situé à la périphérie (neurone périphérique). En fonction de la voie, ce dernier est soit un motoneurone spinal soit un neurone bulbaire.

La voie cortico-spinale rassemble les projections axonales issues de gros motoneurones appelés cellules pyramidales ou cellules de Betz (Bear et al., 2016). Dans cette voie, le motoneurone cortical est aussi appelé **I^{er} motoneurone** (Fig.4). La voie cortico-spinale est anciennement appelée **voie pyramidale**, à la fois à cause de la forme de ses cellules et car elle traverse la pyramide du bulbe rachidien (Fig.4). A la sortie du tronc cérébral, les axones de la voie pyramidale franchissent la ligne médiane (décussation pyramidale) et rejoignent le cordon latéral de la moelle épinière pour 90% d'entre eux. Le restant poursuit son chemin de façon homolatérale. La sclérose observée par le Professeur Charcot concerne le cordon latéral. En conséquence de la décussation pyramidale, l'hémisphère cérébrale droit contrôle les muscles de l'hémicorps gauche (controlatéral). Cette voie se termine au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière où se situent les motoneurones spinaux **(II^{ème} motoneurone**) (Fig.4).

La voie cortico-nucléaire (géniculé) est une voie adjacente à la voie cortico-spinale (Fig.4). Elle est constituée de faisceaux provenant également du cortex moteur, cependant elle décusse au niveau du tronc cérébral pour créer un relai avec les noyaux moteurs des nerfs crâniens. Au niveau du mésencéphale elle synapse avec les noyaux moteurs des nerfs III, IV et VI impliqués dans l'oculomotricité. Une partie du faisceau continue dans le pont où il décusse et synapse avec les nerfs V, VII puis IX, X, XI et XII, impliqués respectivement dans le contrôle des muscles de la mastication, du visage, de la déglutition, la phonation, du muscle trapèze et des muscles de la langue (Fig.4).

Le facteur clé permettant de distinguer la SLA des autres maladies du système moteur est la présence d'une atteinte à la fois du premier et du deuxième motoneurone (cf. 2.).

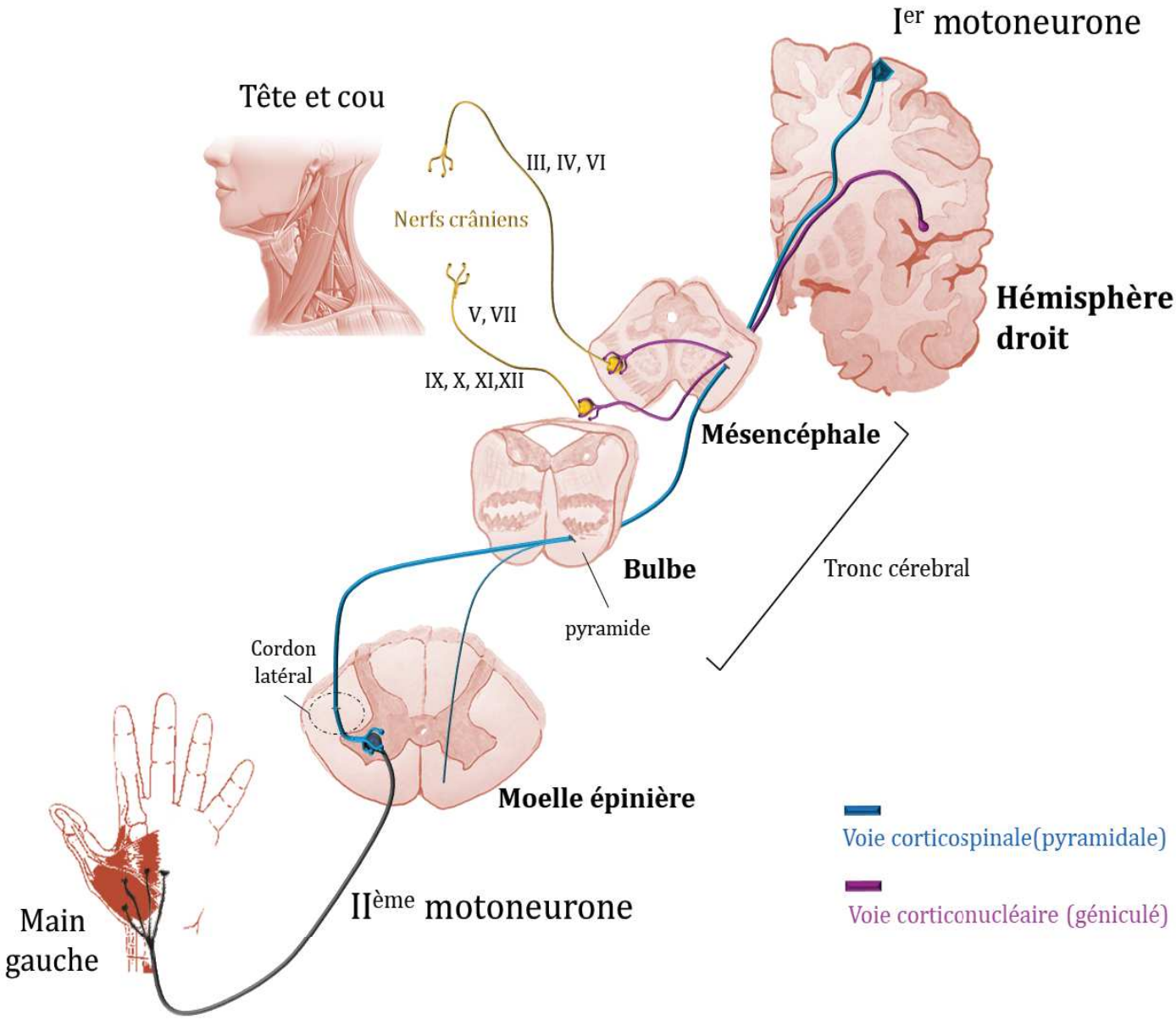


Figure 4 : Voies descendantes directes : voie cortico-spinale et voie cortico-nucléaire. La voie cortico-spinale (pyramidal) est constituée des projections axonales de gros motoneurones corticaux appelés cellules de Betz (Ier motoneurone). Elle décusse dans sa quasi-totalité au niveau sous-bulbaire, poursuivant son chemin dans le cordon latéral de la moelle épinière. Au niveau de la corne ventrale, elle fait synapse avec les motoneurones spinaux (IIème motoneurone). Les motoneurones spinaux envoient des projections pour innerver les muscles du tronc et des membres. Le Ier motoneurone de la voie cortico-nucléaire suit une trajectoire adjacente à la voie cortico-spinale. Il se termine à différents niveaux dans le tronc cérébral où il fait synapse avec les noyaux des nerfs crâniens. *Adapté d'après (Bear et al., 2016)*

3.1.3. Les Voies descendantes indirectes

Les voies indirectes sont également impliquées dans le contrôle des mouvements *via* des synapses avec des interneurones et des motoneurones au niveau spinal (Bear et al., 2016). Elles sont appelées **voies extrapyramidales** et ont une implication dans la modulation des mouvements volontaires et involontaires. Les voies indirectes sont constituées de plusieurs faisceaux:

- Le faisceau cortico-rubro-spinal prend son origine dans le noyau rouge du mésencéphale ; il rejoint également le cordon latéral en parallèle de la voie cortico-spinale dont il est considéré comme annexe. Le faisceau rubro-spinal se projette majoritairement sur des interneurones de la moelle épinière et dans une petite proportion sur les motoneurones de la corne ventrale. Il est impliqué dans le contrôle de certains mouvements des membres supérieurs comme ceux du poignet. L'implication de cette voie dans la motricité chez l'Homme reste peu étudiée. Il a été démontré qu'elle peut compenser une partie des déficits moteurs suite à une lésion de la voie cortico-spinale.

- Le faisceau réticulo-spinal commence à partir du tronc cérébral et comprend les noyaux bulbaires et les noyaux protubérantiels qui projettent leurs axones au niveau ventral de la moelle épinière. Ils ont des rôles opposés et coopèrent afin de maintenir la posture et le tonus musculaire.

- Le faisceau vestibulo-spinal commence au niveau des noyaux vestibulaires dans le bulbe. Ces derniers reçoivent une information sensorielle à partir de l'oreille interne quant à la position et aux mouvements de la tête et donc de l'équilibre du coprs. Le faisceau vestibulo-spinal rejoint le cordon ventro-latéral de la moelle épinière. Il participe au contrôle des mouvements du cou et au maintien de la position de la tête par rapport au corps.

- Le faisceau tecto-spinal prend son origine au niveau du Colliculus supérieur du mésencéphale, qui est une structure recevant des informations essentiellement visuelles

et auditives. Il projette des axones au niveau médian des parties cervicales de la moelle épinière. Il est responsable des mouvements du cou, des épaules et de la partie supérieure du tronc.

-

3.1.4. La moelle spinale

La moelle spinale constitue le lieu d'exécution de la commande motrice envoyée par les centres supra-spinaux *via* les voies descendantes (Bear et al., 2016). Elle se situe à l'intérieur de la colonne vertébrale et s'étend depuis le tronc cérébral jusqu'au cône médullaire au niveau des vertèbres lombaires (Fig.5).

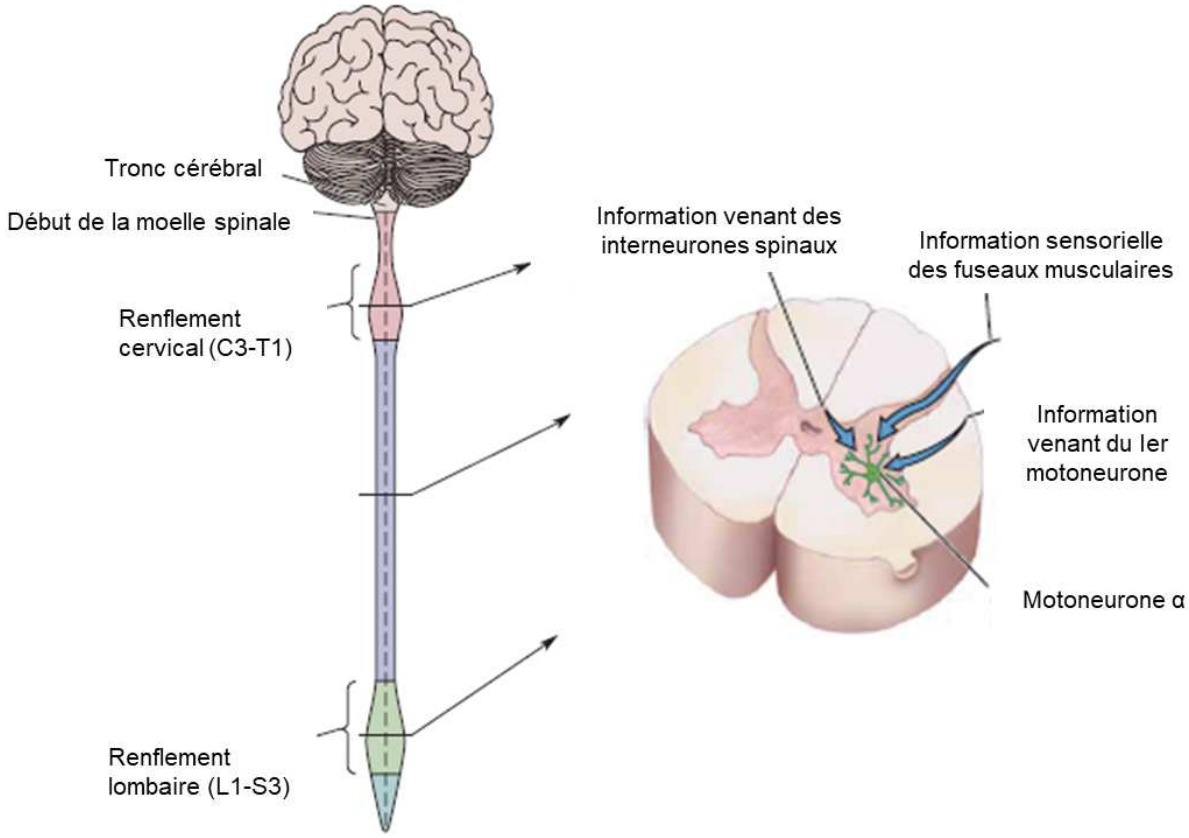


Figure 5 : La moelle spinale et le motoneurone α La moelle spinale, représentée dans sa totalité à gauche. Elle commence immédiatement après le tronc cérébral. Notez-le renflement cervical et lombaire, siège de nombreux neurones innervant respectivement les membres supérieurs et les membres inférieurs. A droite : coupe de la moelle épinière dans sa portion thoracique, représentant les différentes

connexions que reçoivent les motoneurones α. Ces derniers se trouvent au niveau de la corne ventrale de la moelle spinale et reçoivent des informations de la part des motoneurones corticaux, des interneurones et des neurones sensoriels au niveau des fuseaux musculaires. *Adapté d'après* (Bear et al., 2016).

La substance grise qui présente une forme de papillon au centre de la moelle épinière est constituée des corps cellulaires des neurones. La substance blanche en périphérie est constituée des projections axonales. Au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière se trouvent des noyaux sensitifs. Les corps des **motoneurones spinaux** se trouvent au niveau de la **corne ventrale** (Fig. 6). Différents types d'interneurones se trouvent dans la totalité de la substance grise. Ils ont tous un rôle modulateur de l'activité des motoneurones spinaux.

Les axones des motoneurones spinaux forment des faisceaux qui sortent de la moelle épinière au niveau ventral en formant la **racine ventrale**. Cette dernière s'associe avec la racine dorsale qui contient des noyaux sensoriels. Les deux racines forment ensemble un nerf spinal qui émerge au niveau de l'espace intervertébral. A chaque vertèbre est associée deux nerfs spinaux de part et d'autre, ce qui fait un total de 30 paires de nerfs spinaux le long de la colonne vertébrale. La moelle peut être subdivisée par analogie avec la colonne vertébrale en partie cervicale (C) de 1 à 8, thoracique (T) de 1 à 12, lombaire (L) de 1 à 5 et sacrée (S) de 1 à 5.

Les motoneurones se distribuent de manière inégale le long de la moelle épinière afin d'innerver leurs muscles cibles. De cette manière, l'innervation du membre supérieur provient des motoneurones allant du C3 au T1, tandis que le membre inferieur est innervé par ceux allant de L1 à L3. La corne ventrale de la moelle épinière présente un aspect plus large à ces niveaux et contient un nombre plus important de neurones car de nombreux muscles doivent être innervés. La corne ventrale est plus rétrécie au niveau thoracique, où il y a une prédominance de muscles axiaux. En outre, la position des corps des motoneurones spinaux au sein de la corne ventrale répond à la localisation anatomique des muscles qu'ils innervent. Ainsi, les motoneurones qui innervent les muscles distaux se situent sur l'extrémité latérale de la corne ventrale, tandis que ceux responsables de l'innervation des muscles axiaux se trouvent au niveau médian de celle-ci.

3.1.5. Les motoneurones spinaux

Les motoneurones spinaux reçoivent l'information de la commande motrice par les voies descendantes et innervent des fuseaux musculaires cibles. Il existe trois sous-types de motoneurones spinaux : les motoneurones α responsables des mouvements volontaires et les motoneurones γ et β responsables de la proprioception des muscles (Purves, 2004). Ils se situent tous dans la corne ventrale de la moelle épinière.

Les motoneurones α induisent la contraction des **muscles squelettiques** extrafusaux lors des mouvements volontaires (Fig. 6). Les fuseaux musculaires sont des structures au sein du muscle qui assurent la proprioception. Les fibres musculaires intrafusales sont innervées par des neurones sensitifs qui assurent la proprioception. Ils apportent de l'information quant à la longueur des muscles aux interneurones spinaux. Ces derniers activent les **motoneurones γ** qui induisent la contraction uniquement des fibres intrafusales.

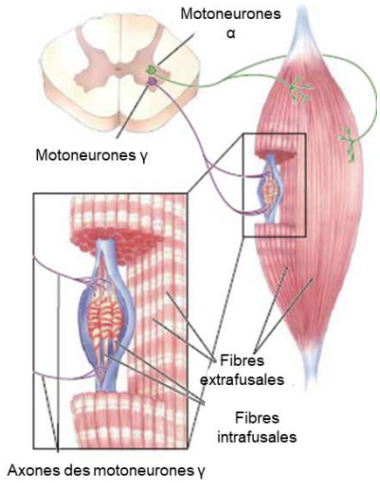


Figure 6 : Organisation du fuseau musculaire. Le fuseau musculaire est une structure proprioceptive Les fibres musculaires extrafusales se trouvent à l'extérieur du fuseau musculaire et sont innervés par les motoneurones α. Les fibres intrafusales sont à l'intérieur des fuseaux. Elles sont innervées par les motoneurones γ. *Adapté d'après* (Bear et al., 2016)

Les motoneurones α sont particulièrement susceptibles à la dégénérescence dans la SLA (Conradi and Ronnevi, 1993). Chaque motoneurone α est considéré comme le IIème motoneurone de la voix corticospinale, étant directement sous contrôle du Ier motoneurone. Ils sont responsables de la contraction musculaire. L'ensemble formé par le motoneurone α et les fibres musculaires (cellules musculaires) qu'il innerve, est appelé **unité motrice** (Fig. 7)

(Wilson et al., 2012). Chaque unité motrice est constituée d'un seul type de fibres musculaires tandis que le muscle entier comporte plusieurs types d'unités motrices. Il est possible de distinguer 3 types d'unités motrices en fonction de la vitesse de contraction de leurs fibres et de la fatigabilité de ces dernières : ce sont les unités motrices S, les unités motrices FR et les unités motrices FF (Fig. 7) (Purves, 2004)

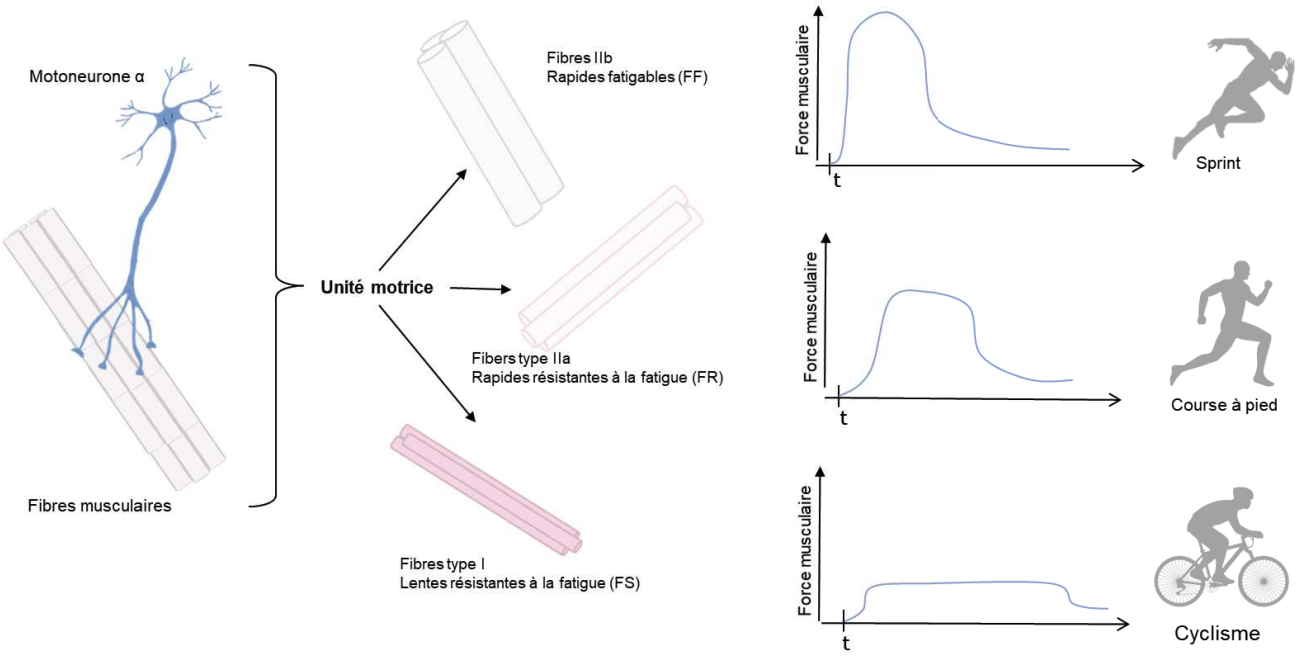


Figure 7 : L'unité motrice. L'unité motrice est constitué par l'ensemble du motoneurone α et des fibres musculaires qu'il innerve. Il existe trois types d'unité motrice qui ont des propriétés métaboliques et électrophysiologiques différentes. Les fibres rapides de type IIb sont capables de produire une grande force très rapidement après stimulation par un potentiel d'action. L'arrivée répétée de stimulations à haute fréquence induit cependant la fatigabilité de ces fibres et une diminution de la force musculaire au cours du temps. Ce type de fibres sont recrutées pendant une activité physique très intense comme le sprint. Les fibres de type IIa sont des fibres rapides qui produisent une force plus petite que les fibres IIb et peuvent soutenir leur activité plus longtemps, elles sont moins fatigables. Elles sont recrutées lors d'une activité d'intensité intermédiaire comme la course à pied ou la musculation. Les fibres de type I sont lentes et résistantes à la fatigue. Elles produisent une force plus petite mais qui peut être soutenue au cours du temps. Ce type de fibre est recrutée lors des entraînements d'endurance comme le cyclisme et le marathon et sont aussi responsables pour le maintien de la posture du corps.

Les unités motrices S (de l'anglais *slow*) sont constituées de fibres musculaires à contraction lente, résistantes à la fatigue. Les fibres lentes sont de type I, elles sont riches en mitochondries et utilisent un métabolisme oxydatif(Wilson et al., 2012). Elles sont peu nombreuses et forment les muscles rouges, appelés ainsi à cause de leur aspect morphologique sombre. Les motoneurones α qui innervent les fibres lentes sont de petite taille et exercent des stimulations continues de basse fréquence, de 10 à 20 potentiels d'action (PA) par seconde (Purves, 2004).

Les unités motrices FR (de l'anglais *fast resistant*) sont constituées de fibres musculaires à contraction rapide qui sont résistantes à la fatigue. Les fibres rapides sont de type IIa. Elles ont un métabolisme mixte, glycolytique et oxydatif, et présentent un aspect morphologique plus clair (muscle blanc) (Wilson et al., 2012). Elles sont plus nombreuses que les fibres lentes. Les motoneurones α qui innervent les fibres rapides résistantes sont plus volumineux et effectuent des décharges continues de 20 à 30 PA par seconde (Purves, 2004).

Les unités motrices FF (de l'anglais *fast fatigable*) sont constituées de fibres musculaires à contraction très rapide qui sont rapidement fatigables. Les fibres rapides fatigables sont de type IIb/x, elles ont un métabolisme glycolytique et constituent également les muscles blancs. Elles sont très nombreuses et ce sont les fibres musculaires les plus volumineuses (Wilson et al., 2012). Les motoneurones α qui innervent les fibres FF et effectuent des décharges fortes et épisodiques de fréquence entre 30 et 60 PA par seconde (Purves, 2004).

Des études sur l'identité des fibres musculaires ont démontré que le type de fibre est dépendant du type de motoneurones qui l'innerve. Ainsi, si les propriétés électriques d'un motoneurone changent, le type de la fibre change en conséquence.

Les motoneurones β innervent à la fois des fibres intrafusales et des fibres extrafusales. Leur action et leur fonctionnement sont peu connus chez l'humain.

3.1.6. Transmission synaptique de la commande motrice

Les motoneurones corticaux sont pour la majorité des neurones glutamatergiques ; induisant l'excitation des neurones spinaux. Les motoneurones spinaux sont des neurones cholinergiques, ils forment une synapse spécialisée avec la cellule musculaire, appelée

jonction neuromusculaire (Bear et al., 2016)**.** A l'arrivée dans le muscle, l'axone du neurone moteur forme des branchements pour innerver plusieurs fibres musculaires. Une fibre musculaire ne peut être innervée que par un seul motoneurone. La jonction neuromusculaire est une synapse chimique ; elle comprend la membrane pré-synaptique de l'axone (terminaison axonale), la membrane post-synaptique de la fibre musculaire et la cellule de Schwann péri-synaptique (Fig.8). L'ACh est synthétisée dans le soma du motoneurone, puis elle est emmagasinée dans des vésicules synaptiques qui sont transportées le long de l'axone et stockées dans l'espace pré-synaptique. L'arrivée d'un PA au niveau de la terminaison axonale provoque l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants, ce qui mène à une entrée de Ca^{2+} dans l'espace pré-synaptique. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire induit la fusion entre les vésicules synaptiques et la membrane de l'axone et la libération de l'ACh dans la fente synaptique (exocytose). Les récepteurs nicotiniques de la membrane post-synaptique fixent l'ACh, ce qui provoque l'entrée d'ions Na^{2+} et la dépolarisation locale de la membrane. Lorsque le courant cationique dépasse un seuil de dépolarisation, ceci engendre un potentiel d'action musculaire. Il s'agit d'un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE), appelé ici potentiel de plaque motrice (ppm). Le ppm provoque une séquence de contraction-relaxation (twich) de la fibre musculaire. Les motoneurones effectuent des décharges répétées de plusieurs PA qui s'additionnent en provoquant plusieurs twich ce qui maintient la totalité du muscle dans un état de tension. Lorsqu'il n'y a plus de PA neuronal, la libération d'ACh cesse, tandis que celle qui a été libérée dans la fente synaptique est dégradée ou réintégrée dans des vésicules synaptiques. La membrane post-synaptique se repolarise et les fibres musculaires retournent à leur état initial : le muscle est relâché.

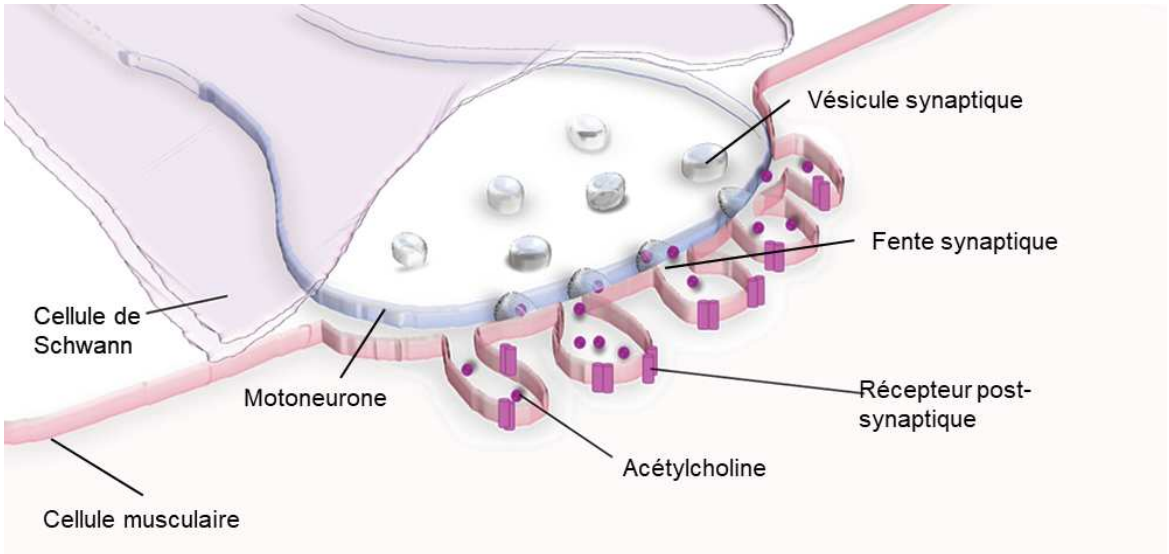


Figure 8: La jonction neuromusculaire. La partie gauche de l'image correspond à la terminaison de l'axone du motoneurone. La fente synaptique de la jonction neuromusculaire est entourée de la cellule de Schwann. La droite de l'image correspond à la fibre musculaire. En bleu sont représentées les vésicules synaptiques, qui libèrent les molécules d'Acétylcholine (en fuchsia). Lorsqu'un potentiel d'action motoneuronal se propage jusqu'au bouton terminal, la dépolarisation induit un influx calcique en activant les canaux calciques dépendants du voltage. Cet influx permet l'exocytose des vésicules synaptiques d'acétylcholine. Le neurotransmetteur se fixe sur ses récepteurs nicotiniques post-synaptiques et produit un potentiel de plaque motrice par un influx ionique dans la cellule musculaire.

3.2. Modulation de l'activité des motoneurones spinaux

3.2.1. Modulation par les voies descendantes

Une partie des voies descendantes indirectes module l'activité des motoneurones spinales de manière indirecte. Il s'agit des neurones des noyaux du raphé, sources de sérotonine (ou 5-hydroxytryptamine, 5-HT), des neurones du locus coeruleus, qui synthétise de la noradrénaline (NA), et des neurones de la substance noire, source de dopamine (DA) (Bear et al., 2016). Quand ces neurotransmetteurs se fixent sur leur récepteurs post-synaptiques, elles ont pour effet de diminuer le seuil de déclenchement du potentiel d'action dans le motoneurone. Ainsi elles potentialisent l'activation de celui-ci.4.3.2. Modulation par les afférences sensorielles

Le motoneurone α reçoit de l'information proprioceptive par des afférences glutamatergiques de type mono- ou poly-synaptique. Les afférences monosynaptiques provenant des fibres sensorielles Ia et II situées dans le fuseau musculaire. Elles détectent la longueur et l'étirement du muscle et relayent cette information au niveau du motoneurone α et au motoneurone cette boucle est à l'origine du reflexe myotatique. Les fibres sensoriels Ib font partie de l'organe tendineux de Golgi. Elles s'entrelacent avec des fibres de collagène recouvrant la surface des muscles. Lorsque le muscle se contracte, les fibres de collagène se tendent et compriment les fibres sensorielles Ib, induisant ainsi leur activation. Les fibres Ib ne projettent pas directement sur les motoneurones, mais synapses avec des interneurones inhibiteurs. Cette boucle est à l'origine du reflexe myotatique inverse.

3.2.2. Les interneurones spinaux

Les interneurones spinaux assurent de multiples rôles : recevoir de l'information sensorimotrice des centres supraspinaux ; transmettre l'information neurosensorielle à partir de la moelle épinière vers les centres supra spinaux par les voies ascendantes ; moduler l'activité des motoneurones ; relayer l'information entre les différents niveaux de la moelle épinière et de part et d'autre de celle-ci. De plus, certains interneurones peuvent moduler l'activité des motoneurones indépendamment du contrôle supra spinal au sein de générateurs de programme moteur. Un générateur central de programme moteur, de l'anglais *Central Pattern Generator* (CPG), est un réseau de contrôle spinal comprenant l'ensemble des neurones spinaux impliqués dans les mouvements rythmiques tels que la locomotion, la respiration ou la mastication. Les interneurones V1 expriment le facteur de transcription En1 et comprennent deux sous-populations inhibitrices: l'une constituée des interneurones GABAergiques et l'autre formée par les interneurones glycinérgiques Ia. Une étude récente chez la souris montre que les motoneurones α FF reçoivent d'avantage des connexions synaptiques par les interneurones V1 glycinérgiques et que dans le cadre de la SLA, ces interneurones dégénèrent en parallèle aux motoneurones(Allodi et al., 2021,).

2. Présentation clinique de la SLA

2.1. Formes de SLA

La SLA se caractérise par une grande hétérogénéité clinique. Des différences sont observées aussi bien dans les phénotypes moteurs que dans l'âge de début de la maladie, le site de début et la vitesse à laquelle la maladie progresse. Cette hétérogénéité nécessite la distinction de différentes formes de SLA (Tableau i). En clinique, se pose la question de savoir si la SLA est une maladie unique ou s'il s'agit plutôt de plusieurs maladies distinctes du motoneurone. Il n'y a pas de consensus sur cette question.

Dans une **SLA classique**, la maladie se déclare au niveau d'un site unique et c'est dans les stades plus avancés qu'elle se propage dans le reste du système moteur. Une SLA **atypique** regroupe toute forme de SLA qui ne peut être définie comme classique, de par la présentation d'une atteinte motrice inhabituelle et/ou d'une évolution différente.

Dans 20% des cas de SLA, les patients développent aussi une Démence Fronto-Temporale (DFT). La DFT est la deuxième démence la plus souvent déclenchée à l'âge adulte après la maladie d'Alzheimer. Elle se caractérise par des troubles de la mémoire, du langage et du comportement. Également, jusqu'à 50% des patients atteints de SLA peuvent présenter des atteintes cognitives qui ne rentrent pas dans les critères diagnostiques de la DFT (Tunca et al., 2020). Le recouvrement clinique entre ces deux maladies a été appuyé par des recherches en génétique *(Burrell et al., 2016)*. Ces dernières montrent qu'elles font partie du même spectre clinique avec d'une part la DFT pure et d'autre part la **SLA pure** ainsi que des formes intermédiaires.

En fonction **du site du début** de la SLA, il est possible de distinguer les **formes bulbaires** des **formes spinales** *(Masrori and Van Damme, 2020b)*. Une atteinte bulbaire se caractérise par une dysarthrie (trouble de la parole), une dysphagie (trouble de la déglutition), une dysphonie (trouble de la voix) ainsi que des fasciculations de la langue. Elles ont une évolution plus rapide que les formes spinales. Les formes spinales commencent habituellement au niveau d'un membre, avec une atteinte distale et unilatérale. Les signes cliniques d'une atteinte du motoneurone spinal sont une faiblesse musculaire progressive, une spasticité et une lenteur des mouvements, des fasciculations et une atrophie musculaire *(Dardiotis et al., 2018; Masrori and Van Damme, 2020b).*

Il est possible de distinguer différentes formes de SLA également en fonction **du type de motoneurone principalement atteint** ; ainsi sont identifiées des formes centrales et des formes périphériques. Parmi les signes majeurs d'une atteinte du premier motoneurone sont observés : une voix lente, une hyper salivation, des rires spasmodiques, des bâillements fréquents, des réflexes ostéo-tendineux vifs, une faiblesse musculaire, une hypertonie pyramidale, un signe de Hoffman, un réflexe palmo-mentonier positif. Dans ce rares cas, il est possible d'observer un réflexe de Babinski. Les signes évocateurs d'une atteinte du second motoneurone sont les fasciculations diffuses et/ou linguales, ainsi que la perte de masse musculaire (atrophie) distale d'une main ou d'un pied.

Concernant l'histoire familiale sont distingués la **SLA sporadique** où il n'y a pas d'antécédent de SLA dans la famille et la **SLA familiale** où plusieurs membres de la famille sont touchés. Même si la majorité des cas de SLA sont sporadiques, il est important de noter qu'il est souvent difficile de reconstituer l'arbre généalogique complet du patient.

Tableau i : Formes cliniques de la SLA

FORME CLINIQUE	SIGNES ÉVOCATEURS
SLA CLASSIQUE	- début dans un site unique - début bulbaire ou spinal - évolution en 3 à 5ans - pas d'atteinte cognitive (SLA pure) - peut être sporadique ou familiale
SLA ATYPIQUE	- toute SLA qui ne rentre pas dans la catégorie classique, notamment par la vitesse de progression de la maladie et/ou l'atteinte d'autres partie du système moteur ou sensoriel
SLA/DFT et formes intermédiaires	-Présence d'une atteinte cognitive de type DFT
SLA début BULBAIRE	- dysarthrie, dysphonie, dysphagie - difficulté respiratoire - troubles de la déglutition - fasciculations de la langue
SLA début SPINAL	- faiblesse musculaire - spasticité, rigidité - lenteur des mouvements
SLA prédominance CENTRALE	- Voix lente, hyper-salivation, rire et pleure spasmodiques - Faiblesse musculaire, spasticité - Reflexes ostéo-tendineux vifs et palmo-mentonier vif, signe de Hoffman, signe de Babinski
SLA prédominance PÉRIPHÉRIQUE	-Atrophie distale d'une main ou d'un pied

	- Asymétrie de début - Fasciculations diffuses ou linguales - Crampes
SLA SPORADIQUE	Le patient ne présente aucune histoire de la maladie dans sa famille
SLA FAMILIALE	Présence de la SLA dans la famille
SLA LENTE	Évolution > 5 ans
SLA FOUDROYANTE	Évolution < 2ans

La progression de la SLA peut varier considérablement en fonction du site du début et des phénotypes moteurs. Ainsi, un début bulbaire, un âge de début plus avancé, la présence d'une mutation causale sont tous des facteurs en faveur d'une évolution rapide *(Al-Chalabi and Hardiman, 2013)*. Les formes spinales, avec un âge de début plus bas ainsi qu'une prédominance périphérique, peuvent évoluer pendant de longues années comme dans le cas de Stephen Hawking *(Westeneng et al., 2018)*. Une SLA est qualifiée de lente si sa progression dépasse les 5 ans, tandis qu'elle est qualifiée de foudroyante si elle évolue en moins de 2 ans. Dès lors, il est essentiel d'avoir une connaissance fine des signes cliniques pour une meilleure prise en charge des patients.

2.2 Diagnostic différentiel

Vu la grande hétérogénéité clinique de la SLA, l'étude des diagnostics différentiels est essentielle pour pouvoir la distinguer des autres atteintes du système moteur. Il existe plusieurs systèmes visant à aider au diagnostic différentiel de la SLA, dont les plus utilisés sont les critères El Escorial, le système Awaji et les critères King's. Ils suggèrent d'étudier un ensemble de critères qui contribuant au diagnostic positif d'une SLA. Le critère majeur permettant d'identifier une SLA est la présence **à la fois** d'une **atteinte centrale** et d'une **atteinte périphérique** *(Masrori and Van Damme, 2020b).* Il y peut y avoir des signes cliniques dans plusieurs territoires (étage bulbaire, cervical, lombo-sacré). En plus de l'examen clinique, les

neurologues s'aident d'un électro-neuro-myogramme (ENMG) pour évaluer entre autres l'atteinte du second motoneurone et le taux de dénervation des muscles. La confirmation du diagnostic se fait avec l'évolution des symptômes dans le temps et l'élimination des diagnostics différentiels.

En pratique quotidienne, les cliniciens ne s'appuient pas toujours sur les critères diagnostics décrits ci-dessus, mais raisonnent de façon plus globale et personnalisée devant chaque patient *Masrori and Van Damme, 2020)*. Ces systèmes sont en revanche très utiles pour classer les patients au cours des essais thérapeutiques ou pour la recherche scientifique *(Masrori and Van Damme, 2020)*.

3. Physiopathologie de la SLA

3.1 Hypothèses sur le déclenchement de la SLA

L'origine de la SLA est un sujet de débat dans le monde scientifique. En effet, les données sur la physiopathologie de la SLA chez l'homme proviennent de tissus prélevés post-mortem. Dès lors, il est difficile de savoir si les perturbations observées sont la cause ou la conséquence du processus pathologique. Il existe trois hypothèses pour expliquer l'origine et la progression de la SLA *(Bae et al., 2013)*. D'après **l'hypothèse *dying-forward*,** ce sont les motoneurones corticaux qui dégénèrent en premier, sous l'effet excitotoxique provoqué par une accumulation anormale de glutamate. **L'hypothèse *dying-back*** suggère au contraire un début périphérique, avec la perte de la jonction neuromusculaire et le transport rétrograde de molécules toxiques vers les motoneurones spinaux, provoquant ainsi leur dégénérescence. Une troisième hypothèse propose que la dégénérescence survient de façon indépendante à différents niveaux du système moteur et de manière aléatoire *(Bae et al., 2013)*.

3.2 Mécanismes cellulaires conduisant à la dégénérescence des motoneurones

L'étude des fonctions connues des gènes causaux de la SLA a permis d'identifier des processus moléculaires clé pour la physiopathologie de la SLA *(Gregory et al., 2020).* En effet, il existe des mécanismes pathologiques intrinsèques au motoneurone et des mécanismes extrinsèques à

celui-ci. La contribution exacte de chaque processus est cependant difficile à déterminer, d'une part à cause de leur grand nombre et de leur complexité, et d'autre part puisqu'il n'est pas toujours évident de savoir s'ils sont la cause ou la conséquence de la maladie. Par ailleurs, la question principale à laquelle la recherche peine à répondre est comment tous ces processus conduisent à la susceptibilité sélective des motoneurones. Cependant, il se trouvent que plusieurs gènes de la SLA . Parmi eux, les processus intrinsèques sont : les perturbations de l'homéostasie protéique, les perturbations du métabolisme des ARN, les défauts du transport axonal et le stress oxydatif (Fig.9) (Gregory et al., 2020; Le Gall et al., 2020). Quant aux processus extrinsèques, ce sont notamment l'inflammation et les perturbations du fonctionnement d'autres types cellulaires.

3.2.1 Perturbations de l'homéostasie protéique

La formation d'agrégats protéiques dans les neurones est un phénomène fréquemment observé dans les maladies neurodégénératives. L'homéostasie protéique implique des étapes contrôlées, depuis la synthèse d'une protéine jusqu'à sa dégradation. Pour que les protéines puissent fonctionner correctement, il est primordial qu'elles ne présentent pas de défauts structuraux. Le réticulum endoplasmique est l'organelle où s'effectuent la maturation protéique et le contrôle de leur qualité. En présence de protéines mal repliées, la cellule déclenche le stress du réticulum endoplasmique responsable de la réponse **UPR de l'anglais « *unfolded protein response* »**. Celle-ci vise à augmenter la quantité de protéines chaperones pour stimuler la réparation des protéines nouvellement synthétisées. En cas de surcharge en protéines défectueuses, elles sont marquées pour **la dégradation** *(Masrori and Van Damme, 2020)*. Dans la dégradation classique, les protéines sont adressées **au protéasome** par un marquage cellulaire à l'ubiquitine, tandis que dans la dégradation par **autophagie**, elles se lient à la **protéine p62** *(Masrori and Van Damme, 2020).* Si les protéines malformées ne peuvent pas être éliminées, elles s'accumulent dans des **inclusions toxiques**, conduisant la cellule à déclencher la mort cellulaire par apoptose.

Des études post-mortem sur des tissus des patients atteints de SLA montrent la présence d'inclusions protéiques marqués par l'ubiquitine. Elles sont observées dans le cytoplasme des motoneurones spinaux et dans les motoneurones du cortex cérébral (Hardiman et al., 2017a). Les observations *in vitro* sur des cellules en culture montrent également une accumulation d'oligopeptides et la présence de protéines mal repliées *(Le Gall et al., 2020)*. Plusieurs mutations liées à la SLA se trouvent dans des gènes impliqués dans la réparation et la dégradation des protéines *(Cf. Les gènes majeurs de la SLA)*.

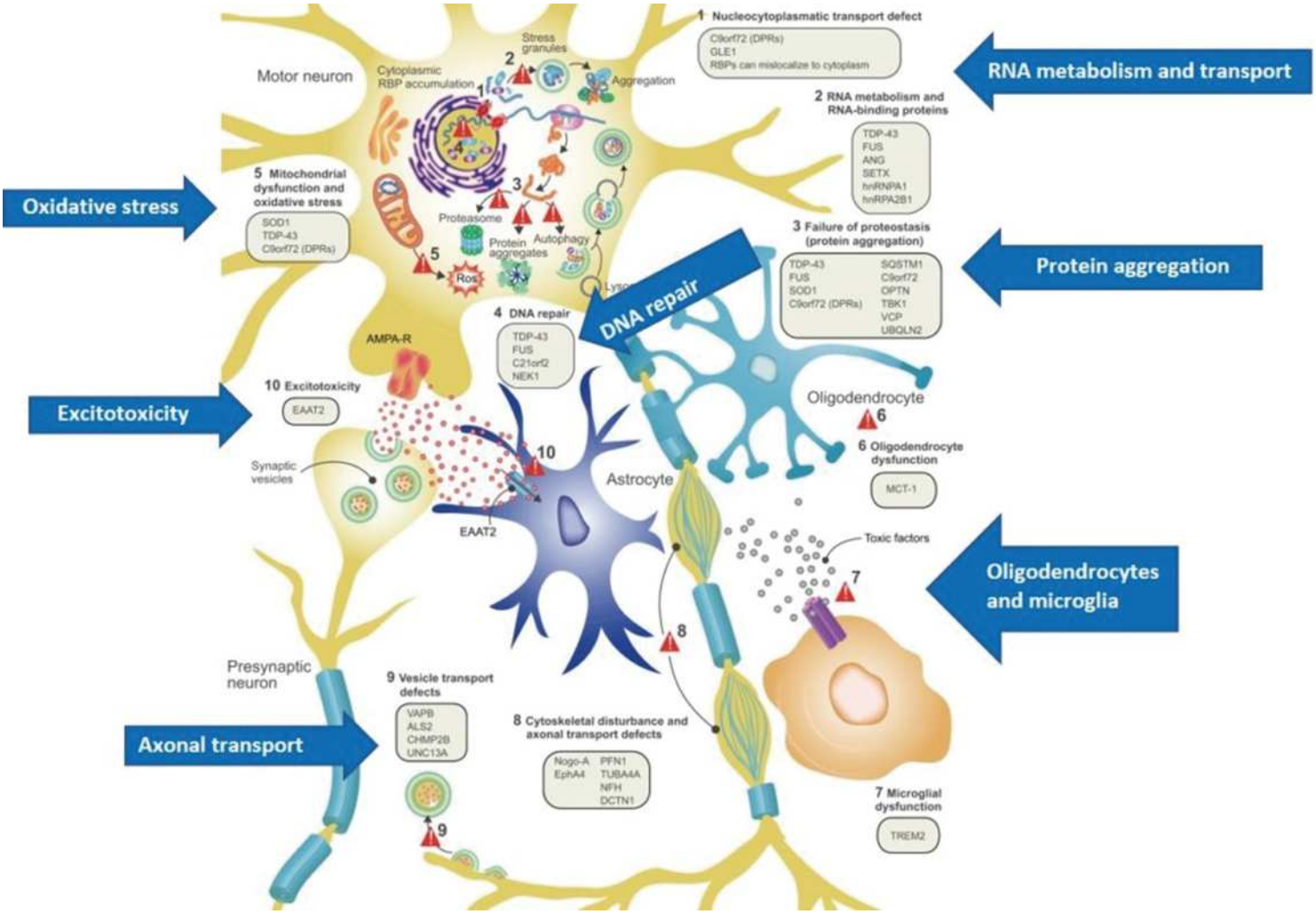


Figure 9 Processus physiopathologiques impliqués dans la SLA Plusieurs processus peuvent contribuer à la dégénérescence des motoneurones dans la SLA. En effet la maladie présente une physiopathologie très complexe avec des perturbations dans l'homéostasie protéique, la régulation des ARNs, le transport axonal, le fonctionnement des mitochondries et la transmission électrique. (Masrori and Van Damme, 2020a).

3.2.2. Perturbations du métabolisme des ARNs

Les perturbations du métabolisme et de la régulation des molécules d'ARN sont considérés comme des mécanismes centraux dans la phytopathologie de la SLA (Butti and Patten, 2019) En effet, dans la moelle épinière des patients il est observé une accumulation d'ARN (foci) au niveau du cytoplasme des motoneurones et des cellules gliales (Cooper-Knock et al., 2015). Les foci d'ARN sont susceptibles de séquestrer des protéines qui se lient à l'ARN et d'engendrer ainsi leur accumulation dans des granules de stress. En effet, de nombreux gènes de la SLA sont impliqués dans le métabolisme des ARN comme les gènes *TARDBP (Tar DNA binding protein)* et *FUS(fused in sarcoma)(cf. 3.3Les gènes majeurs de la SLA)*. Ces deux gènes sont impliqués dans l'épissage des ARNm et la régulation de la transcription, ainsi que dans la biogénèse des micro ARNs (Butti and Patten, 2019). De plus, le transport axonal des ARN est également déficitaire dans le cadre de la SLA.

3.2.3. Le transport axonal

La régulation du transport axonal est un autre processus potentiellement perturbé dans certains cas de SLA. En effet, il nécessite la mise en place d'un réseau de microtubules qui servent comme support pour transporter différents cargos comme des ARNm, des protéines, des vésicules ou des organelles *via* des protéines de transport. Dans le cas de la SLA il existe des perturbations dans la maintenance des réseaux de transport axonal suite à une diminution de la stabilité des microtubules ou à cause des perturbant dans les protéines du transport cellulaire(Masrori and Van Damme, 2020a). Plusieurs gènes mineurs de la SLA sont impliqués dans ces processus (cf. 3.4. Autres gènes de la SLA)

3.2.4 L'excitotoxcicité

Une hyperexcitabilité est observée aussi bien au niveau corticale et qu'au niveau périphérique chez les patients atteints de SLA. Il se peut qu'il y ait des perturbations dans l'excitabilité intrinsèque ou extrinsèque des motoneurones. Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur permettant d'activer les motoneurones spinaux via des récepteurs canaux ionotropiques, NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ou AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolen propionic acid). La fixation du glutamate sur ses récepteurs entraîne l'entrée de sodium (Na+) et de calcium (Ca2+) et la dépolarisation du neurone ce qui a pour effet la génération d'un potentiel d'action. Néanmoins, le récepteur AMPA peut contenir une sous-unité appelée GluR

qui le rend imperméable au courant calcique. La transmission par le glutamate est un processus hautement régulé, qui implique un contrôle fin des quantités de glutamate extracellulaire. (Van Den Bosch et al., 2006). Il se peut l'excitotoxcicité dans la SLA implique une diminution de la sous-unité GluR des récepteurs AMPA, rendant ainsi le motoneurone plus perméables aux ions Ca2+ (Van Den Bosch et al., 2006). Un autre mécanisme induisant une excitotoxcicité est l'altération de l'excitabilité intrinsèque des motoneurones par une altération des courants Na2+ et K+ (King et al., 2016).

3.2.6. Stress oxydatif et dysfonctionnement mitochondriale

Des biopsies de muscles et de moelle épinière des patients symptomatiques montrent **des mitochondries anormales**, comportant de nombreuses vacuoles et une désorganisation des crêtes mitochondriales. *(Boillée et al., 2006)*. Ces défauts provoquent le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, ce qui a pour conséquence de diminuer la production d'ATP et d'augmenter le stress oxydatif. En effet, chez certains patients une augmentation des molécules oxydées (protéines, lipides et acides nucléiques) est trouvée dans les tissus neuronaux, le liquide céphalo-rachidien et dans l'urine *(Le Gall et al., 2020)*. Les motoneurones sont parmi les cellules qui les plus énergivores dans l'organisme, de par leur grande taille (axones pouvant dépasser 1m) et leur métabolisme actif lié à la neurotransmission (*3.1.5. Les motoneurones spinaux)*. En effet, le transport des métabolites le long de l'axone, le fonctionnement de la synapse, le maintien du potentiel membranaire de repos et de l'homéostasie cellulaire, sont tous des processus nécessitant l'apport important en ATP. Par ailleurs, une étude de modélisation de la dégénérescence *in silico*, suggère que la diminution de l'ATP dans les motoneurones activerait une boucle de rétrocontrôle provoquant leur (Le Masson et al., 2014). En outre, cette étude montre une susceptibilité différente en fonction du sous-type de motoneurone. Les motoneurones innervant les fibres FF (fast fatigable) sont ceux qui possèdent le soma de plus grande taille, beaucoup de ramifications dendritiques et un grand nombre de synapses, ce qui fait qu'ils ont aussi un métabolisme plus actif. Lors de la diminution de l'apport en ATP, ce sont les motoneurones FF qui dégénèrent en premier, suivis par les motoneurones associés au fibres FR et enfin ceux associés aux fibres S *(Cf.3.1.5. Les motoneurones spinaux.)*.

3.2.7. L'inflammation

En plus de la dégénérescence des motoneurones, sont observés une augmentation de la neuroinflammation et de l'inflammation systémique. La neuroinflammation est médiée par les cellules gliales (astrocytes, microglie oligodendrocytes). Les cellules gliales ont un rôle protecteur et trophique pour tous les neurones du système nerveux. Lors des processus inflammatoires, les cellules gliales libèrent des facteurs inflammatoires pour recruter des leucocytes sur le site de l'inflammation (Coque et al., 2019). Dans la moelle épinière et les cerveaux des patients sont observées des astrocytes et des microglies anormalement activées. De plus, le tissu nerveux est infiltré par des cellules immunitaires circulantes telles que des cellules T, des macrophages et des mastocytes. Dans des modèles murins, la présence de leucocytes dans le SNC s'accompagne d'une destruction de l'intégrité de la barrière hémato encéphalique. Des études chez des modèles murins montrent qu'au cours de la progression de la maladie les astrocytes présentent un phénotype et des rôles différents. En début des symptômes, les astrocytes sont de type M2 et exercent un rôle protecteur envers les motoneurones (Díaz-Amarilla et al., 2011). Aux stades plus avancés, ils deviennent anormalement activées (AbA ou M2) et ont un effet toxique sur le motoneurone par une augmentation de la neuroinflammation (Gregory et al., 2020).

3.2.8. Implication d'autres types cellulaires

L'implication d'autres types cellulaires dans la SLA a également été décrit (Crabé et al., 2020). En effet il existe des perturbations dans la microglie les oligodendrocytes, les neurones sensoriels ainsi que dans les interneurones.

4. Traitements

De par la grande complexité de la maladie et l'implication de plusieurs processus cellulaires, le développement de thérapies ciblées reste un défi. A l'heure actuelle il n'y a pas de traitement curateur de la SLA. Il existe deux traitements palliatifs : le riluzole et l'edavarone, qui permettent de ralentir la progression de la maladie (Jaiswal, 2019). Le riluzole est un antagoniste du glutamate et pourrait conduire à une diminution de l'excitotoxcicité par inactivation du courant sodique. Dans certains cas il peut augmenter la survie des patients de 6 -7 mois (Miller et al., 2012). L'edavarone est un composé antioxydant qui pourrait conduire à

une diminution du stress oxydatif et de la mort cellulaire. Son effet thérapeutique reste discuté, néanmoins s'il est commencé dès les premier symptômes, il pourrait retarder la détérioration des motoneurones (Jaiswal, 2019).

Plusieurs traitements sont actuellement en phase clinique 2 ou 3 et montrent des résultats prometteurs. Le masitinib est un composé testé en combinaison avec le riluzole. C'est un inhibiteur de tyrosine kinase qui cible les cellules gliales et les macrophages. L'effets combiné des deux médicaments induirait une diminution de la vitesse de progression de la maladie (Mora et al., 2020). Le succès récent de la thérapie génique dans le traitement de l'amyotrophie spinale (SMA) a ouvert de nouvelles pistes de recherche pour utiliser cette approche également pour la SLA et d'autres maladies neurodégénératives. En effet, des études cliniques de thérapie génique par stratégie antisens contre le gène *SOD1* (superoxyde dismutase 1) sous le nom Tofersen sont désormais en phase III. L'effet observé chez les patients est une diminution des agrégats *SOD1* dans le liquide céphalo rachidien et une amélioration des capacités respiratoires et de la force musculaire (Miller et al., 2020).

5. Récapitulatif

Nous avons vu que la SLA est une maladie neurodégénérative rare et incurable. Elle induit la dénervation de la jonction neuromusculaire, et la mort spécifique des motoneurones corticaux et des motoneurones spinaux. Sur le plan clinique, la dégénérescence des motoneurones provoque une faiblesse musculaire, qui évolue vers une paralysie progressive. La SLA présente une grande hétérogénéité clinique et peut être subdivisée en plusieurs formes. Cette complexité est retrouvée également au niveau cellulaire, avec l'implication de multiples processus intrinsèques et extrinsèques aux motoneurones. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curateur pour la SLA. La thérapie génique présente tout de même un grand potentiel thérapeutique pour certaines formes génétiques. En conséquence, une meilleure connaissance de la génétique de la SLA permettra de guider le développement de ce type de thérapies.

II. Pathologie moléculaire de la SLA

Ce chapitre aborde la pathologie moléculaire de la SLA. Il présente la notion de variant génétique et l'importance de la génétique pour la compréhension de la physiopathologie de la

SLA. Puis, il se focalise sur le diagnostic moléculaire de la SLA, en présentant le système de classification des variants. Enfin, il aborde l'importance du diagnostic moléculaire pour les patients et pour la recherche translationnelle.

1. Notions de génétique

1.1.Le génome humain

Le génome humain est composé du génome nucléaire et du génome mitochondrial. La totalité du génome humain a été séquencé en 2001 par la collaboration scientifique du projet du génome humain *(The Human Genome Project*) (Lander et al., 2001). L'ADN nucléaire comporte environ 3 milliards de paires de base (pb), dont une **partie codante** pour des protéines et une **partie non-codante**, qui contient essentiellement les introns, les gènes produisant des ARN non codants, des séquences régulatrices et des séquences répétées (Jackson et al., 2018). La partie codante constitue environ 1.5% de la totalité du génome nucléaire, ce qui équivaut à 20 000 - 22 000 gènes. Le nombre de gènes pour les ARNs non codants est également d'environ 22 000 (Jackson et al., 2018). En outre, le génome humain contient près de 14 000 pseudogènes, qui sont des copies des gènes codants ayant perdu leur fonction au cours de l'évolution. Le reste du génome est constitué des séquences répétées parsemées *(intersperced repeat sequences)* ou de l'ADN satellite (microsatellites, minisatellites et macrosatellittes). Malgré le séquençage du génome entier, le décryptage fonctionnel de l'information génétique reste un sujet de recherche majeur en biologie moléculaire.

1.2.Organisation et expression de l'information génétique

L'ensemble de l'information génétique réside dans **la molécule d'ADN** sous forme de séquences nucléotidiques. **Un gène** peut être défini comme un segment d'ADN contribuant à la transcription d'un ARN correspondant qui peut ou pas être traduit en protéine. L'ADN est compactée sous forme de chromatine à l'aide des protéines histones. Plusieurs niveaux de compaction dynamique de l'ADN existent, les chromosomes sont l'ordre structural le plus élevé de la chromatine. L'ADN nucléaire de l'homme comporte **22 paires d'autosomes et 1 paire de chromosomes sexuels** (Fig.10). Chaque paire contient un chromosome provenant du père et un provenant de la mère. Le mot « **locus** » fait référence à la position d'une séquence

dans le chromosome. Chaque gènes existe sous deux formes alternatives ou **allèles**[1] : un provenant du père et l'autre de la mère. La majorité des gènes autosomiques possèdent une expression bi-allélique, tandis qu'environ 30 gènes sont soumis à une **empreinte parentale**, c'est-à-dire que s'exprime uniquement l'allèle d'un des parents *(Ameziane et al., 2005)*. Chez les femmes, qui possèdent deux chromosomes X, chaque gène s'exprime de façon mono-allélique, l'un des deux allèles étant inactivé au hasard **(lyonisation)** *(Ameziane et al., 2005)***.**

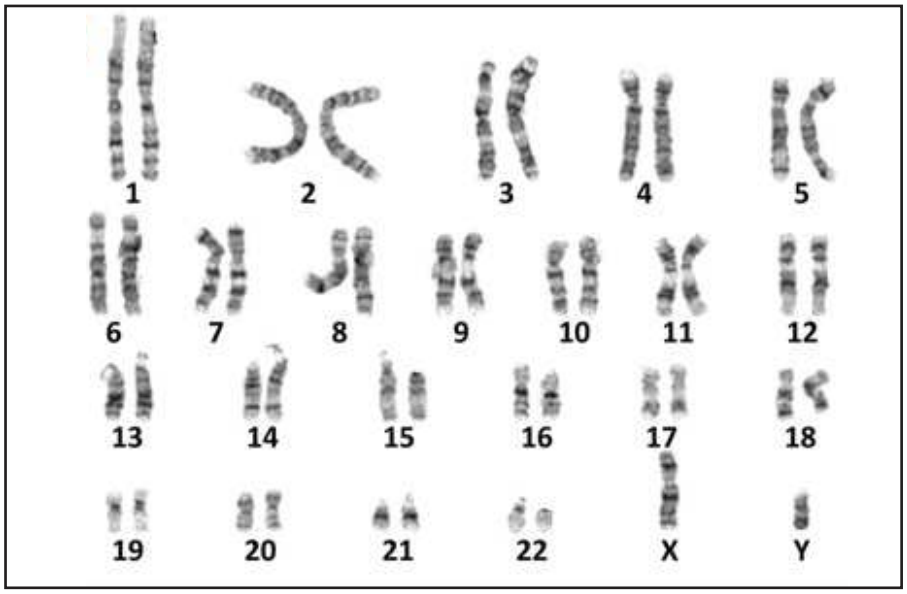


Figure 10 : Le karyotype humain *(Jackson et al., 2018) : Les différents chromosomes ont chacun une structure et taille différente, le chromosome 21 étant le plus petit et le chromosome 1 plus grand. Les parties sombres des chromosomes sont constituées de l'hétérochromatine qui est très condensée, ce qui rend l'ADN difficilement accessible à la transcription.*

Le taux de transcription d'un gène est régulé par des facteurs de transcription *(trans regulatory elements*, **TRE**) qui se fixent sur des séquences régulatrices spécifiques (*cis regulatory element*, **CRE**) (Ameziane et al., 2005). Les CRE sont plus ou moins éloignées du gène et peuvent avoir des effets différents, par exemple ***les enhancers*** stimulent l'expression, tandis que ***les silencers*** atténuent l'expression (tableau ii). Enfin, l'expression des gènes peut être modulée par le biais de l'épigénétique et le code histone. Les histones forment des complexes protéiques qui maintient la chromatine sous un état plus ou moins compacte. L'hétérochromatine est une conformation très condensée de chromatine, qui a pour effet

[1] La notion d'allèle sera détaillée dans le contexte de la variation génétique dans la partie suivante.

l'inactivation de l'expression génique. La modification chimique des histones, entre autres par la méthylation ou l'acétylation, a pour effet d'inhiber ou d'activer un gène.

Tableau ii : Les différents éléments régulateurs de l'expression génétique (CRE : cis regulatory element)

CRE	**Position et orientation**	**Effet sur l'expression des gènes**
Promoteur	En amont du gène ; dépend de l'orientation	Nécessaire pour l'initiation de la transcription
Enhancer	Peut se trouver dans un intron ou un exon ; indépendamment de l'orientation	Stimule l'expression
Silencer	Se situe entre le promoteur et *l'enhancer*	Diminue/inhibe l'expression
Insulators	Adjacent au gène, entre les promoteurs, les *enhancers* et les *silencers*	Empêche l'effet d'un CRE sur un autre gène adjacent
Elément de contrôle du locus (LCR)	Plusieurs dizaines de kb ; dépend du nombre de copies du gène	Stimulation d'une expression tissu-spécifique

Les gènes produisant des protéines sont organisés en parties codantes **(exons)** et en parties non codantes **(introns).** La séquence totale du gène (exons+introns) est transcrite en pré-ARNm puis, les introns sont éliminés lors de **l'épissage** (*splicing)* qui a lieu de manière co- et post-transcriptionnelle. Les sites d'épissage ont une séquence spécifique et se trouvent au niveau intronique de part et d'autre de chaque exon (Fig11). L'épissage est un processus complexe qui donne lieu à différentes isoformes protéiques en fonction de l'ordre et du nombre d'exons incorporés dans l'ARNm. L'ARNm mature comporte une coiffe en 5' et une queue polyA en 3'. Ces deux structures aident à stabiliser la molécule de l'ARNm et assurent sa survie dans le cytoplasme face à l'action des exonucléases et contribuent à la terminaison de la traduction (Ameziane et al., 2005).

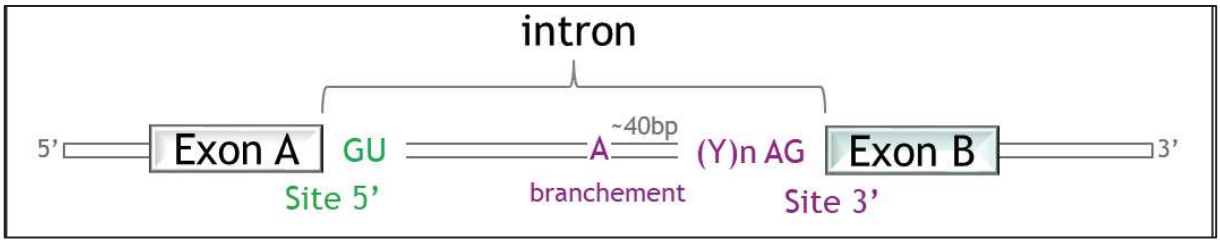


Figure11 : La structure d'un intron. En 5' et 3' de l'intron se trouvent des séquences conservées appelés respectivement site donneur et site accepteur d'épissage. La séquence en 3' est précédé par une séquence polypyrymidique avec un site de branchement conservé qui se trouve entre 10-50pb en amont *(Ameziane et al., 2005)*

Lors de la traduction, l'ARNm mature est lu par le ribosome sous forme de triplets de bases azotées appelés **codons**. Chaque codon sur la molécule de l'ARNm et à un anticodon de la molécule d'ARNt. La lecture du code génétique a lieu lors de la traduction où les ARNt apportent chaque acide aminé (AA) correspondant et le ribosome effectue leur polymérisation en peptide. Le code génétique est dit redondant, plusieurs codons peuvent coder pour le même AA, à l'exception de la Méthionine et du Tryptophane (Annexe I et II) (Osawa et al., 1992). Le code génétique est universel et conservé chez presque tous les organismes. Le premier AA incorporé dans les protéines lors de la traduction est **une Méthionine, dite initiatrice (Mi).** Historiquement, la numérotation des positions des AA au sein d'une protéine omettait la Mi, ce qui peut porter à des confusions si l'on recherche le codon correspondant sur la séquence génétique. Ceci est le cas pour la protéine SOD1 (superoxide dismutase 1) dont le gène est le premier à être associé à la SLA. Ainsi, une des mutations les plus étudiées sur cette protéine, la G93A, correspondrait à G94A en comptant la Mi. En effet, la numérotation des AA en diagnostic moléculaire s'effectue en suivant les recommandations développées par la société HGVS *(Human Genome Variant Society)* suggérant de décrire les séquences en fonction de la séquence de référence (Dunnen et al., 2016). Ainsi, étant donné que le codon initiateur ATG est présent sur la séquence de référence, la méthionine initiatrice sera considérée comme le premier AA dans une protéine.

1.3. La variation au sein du génome

Un variant génétique est défini comme une variation d'une séquence génétique par rapport à la séquence génétique de référence (Jackson et al., 2018). Ces variations peuvent avoir des conséquences ou non sur le phénotype. Le terme **mutation** est aussi utilisé pour désigner les

variants génétiques, cependant il a acquis une connotation négative au cours des années en référence aux mutations pathogènes. Un variant pathogène (ou mutation pathogène) est une variation allélique anormale qui peut aboutir à une maladie (Ameziane et al., 2005).

La variation entre les séquences génétiques de deux personnes prises au hasard et non apparentées est d'environ 0.5% - 1% (Jackson et al., 2018). Ce sont **les polymorphismes** de séquence, ils peuvent se trouver aussi bien au niveau intragénique qu'au niveau extragénique. Ils ne sont généralement pas considérés comme pathogènes mais peuvent refléter tout simplement la diversité biologique entre les individus, comme la couleur des yeux ou des cheveux (Ameziane et al., 2005).

La plupart des polymorphismes sont bi-alléliques et résultent du remplacement d'un nucléotide par un autre. Ils sont désignés par le terme **variants ponctuels** (*single nucléotide variant, SNV*). Lorsque la fréquence alléliques de l'allèle mineure *(minor allele frequency,* MAF*)* est supérieure ou égale à 1%, ils sont considérés comme des **polymorphismes ponctuels** (*single nucleotide polymorphism*, SNP) (Jackson et al., 2018). Il est estimé que le génome humain comporte un SNP toutes les 220pb, ce qui fait environ 14 millions de SNPs (Jackson et al., 2018). Les insertions et les délétions ***(indels)*** de petite taille (<1000pb), sont un autre élément induisant de la variation au sein du génome et sont souvent retrouvés chez les individus sains. Ensuite, il est possible de distinguer des polymorphismes multi-alléliques dont la taille dépasse 1000pb. Ce sont les **variants de nombre de copie** *(copy number variant CNV)* ou **polymorphismes du nombre de copies** *(copy number polymorphism, CNP)* lorsque leur fréquence est supérieure à 1%.

Ils incluent les translocations, les grandes duplications et délétions, les inversions ou les répétitions. Lorsqu'il s'agit d'une séquence répétée, celle-ci est désignée entre parenthèses et le nombre de copies est rajouté en index $[CCAG]_N$. Les microsatellites *(short tandem repeats)* sont des séquences de quelques nucléotides, entre 10 et 100, répétée plusieurs fois dans le génome. Dans le génome humain il en existe environ 50 000 et sont utilisés comme marqueurs pour les analyses de parentalité. Les minisatellites (*variable number of tandem repeats*) comportent quant à eux une séquence longue entre 15 et 70 pb qui est répétée en tandem, dans une conformation tête-bêche. Les mini et microsatellites sont des séquences hypervariables

dans la population, le nombre de répétitions varie d'un individu à l'autre. Il en existe environ 1500 dans le génome humain et sont utilisés comme marqueurs en médecine légale.

Un gène peut donc exister sous plusieurs formes alternatives ou **allèles**, en fonction des variations qu'il comporte (Fig.12). Enfin, il existe des cas de polymorphismes épigénétiques qui font référence aux modifications au niveau de l'épigénome. On vient de voir que la majorité des polymorphismes n'affectent pas le fonctionnement normal de l'organisme, cependant certains d'entre peuvent avoir un effet pathogène.

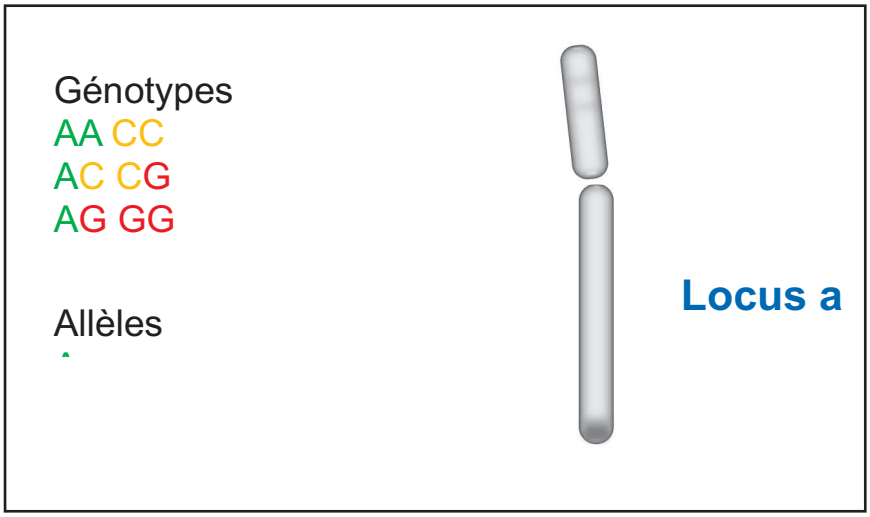


Figure 12: L'allèle d'un gène
Le **locus** indique un SNV ou une séquence sur le chromosome. Les variants A/C/G correspondent à trois versions (allèles) du locus. Un allèle peut représenter soit un seul polymorphisme soit un variant de séquence comprenant plusieurs nucléotides. Le génotype désigne les différents types de combinaisons alléliques possibles.

2. Notions de pathologie moléculaire

2.1. Les différents types de mutations

Les maladies génétiques sont associées à différentes anomalies comme les anomalies chromosomiques, les anomalies intragéniques ou les anomalies épigénétiques. Les variants pathogènes peuvent être classés en **microlésions** et en **macrolésions** en fonction de leur taille (tableau iii). Les microlésions incluent les mutations ponctuelles ainsi que les *indels* de quelques nucléotides. Elles résultent des erreurs lors des processus de réplication ou de

réparation de l'ADN ou apparaissent suite à des dépurinations ou des désaminations spontanées ou suite à des causes exogènes comme l'exposition aux UV ou aux agents chimiques. La majorité des mutations dans les gènes de la SLA sont des mutations ponctuelles à l'exception de *C9ORF72 (cf.*3.3.2. *C9ORF72)*. Les macrolésions peuvent aller de quelques kilobases jusqu'à plusieurs milliers de bases et résultent de mécanismes complexes de réarrangement géniques. Des macrolésions sont souvent observés dans les maladies neurologiques de l'enfant comme Charcot-Marie-Tooth ou la maladie de Gaucher et peuvent être trouvées dans certains cas de SLA (Jackson et al., 2018).

2.1.1. Les microlésions

Une mutation ponctuelle est la substitution d'un nucléotide. Dans les régions codantes, elles peuvent être de type silencieuse (synonymes), faux-sens ou non-sens. Les mutations synonymes induisent le changement d'un codon sans que cela affecte le type d'AA correspondant. Les mutations faux-sens induisent le changement de l'AA ce qui peut avoir pour effet de perturber la structure de la protéine. Ensuite, les mutations non-sens aboutissent à des codons de terminaison (Annexe I) prématurés et sont responsables de la production d'une protéine tronquée ou aboutissent directement à la dégradation de l'ARNm correspondant. L'élimination des ARN ayant des codons STOP prématuré est effectué par le système de *Nonsense Mediated Protein Decay (NMD)* (Guissart et al., 2020). Il est activé lorsque le codon STOP se trouve à une distance d'environ 50pb en amont de la jonction 5'exon/exon. Certaines mutations STOP peuvent cependant échapper à ce processus s'ils respectent une des quatre conditions suivantes : se trouver à moins de 50pb de la jonction 5' exon/exon, s'ils sont dans le dernier exon, s'ils sont dans un exon long de plus de 400pb, ainsi que s'ils sont situés proche du début de la protéine (dans les 150 pb suivant l'ATG) (Guissart et al., 2020). Il existe également des mutations *frameshift* qui décalent le cadre de lecture (*open reading frame, ORF)* qui souvent induisent un codon STOP prématuré quelques pb plus loin. Enfin, il se peut que la mutation ponctuelle perturbe des séquences nécessaires à l'épissage ce qui peut provoquer plusieurs conséquences différentes (Figure 13).

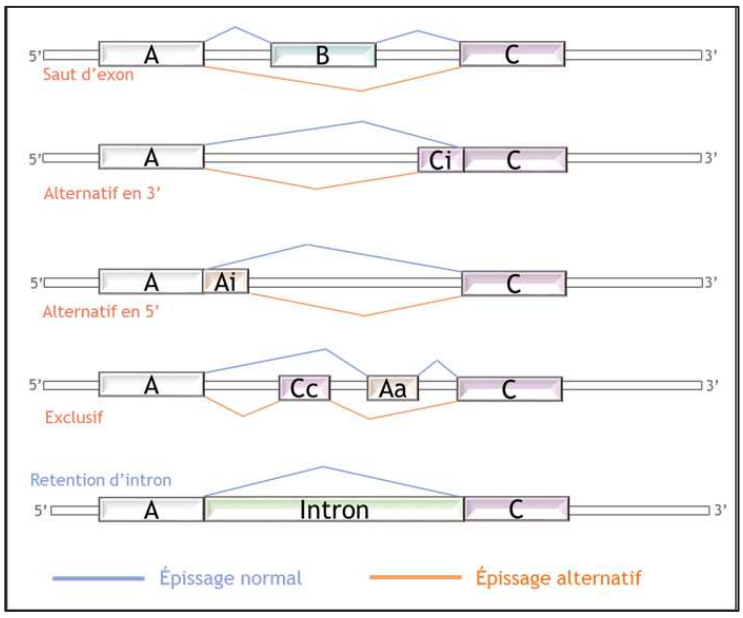


Figure 13 : Différents formes d'épissage Ici sont représentés différentes formes d'épissage classique (en bleu) ainsi que de l'épissage alternatif. (en orange) qui peut conduire à différentes isoformes protéiques. Certaines mutations perturbent l'épissage et peuvent créer de nouveaux sites donneurs ou supprimer de sites d'épissage et contribuer à la formation d'isoformes protéiques anormales.

Les indels concernent généralement des petites lésions qui peuvent avoir des effets similaires aux mutations ponctuelles. Toutes ces mutations peuvent survenir également sur les parties non codantes, et peuvent se retrouver dans les séquences régulatrices de la traduction et influencer ainsi le taux d'expression de certains gènes

2.1.2. Polymorphismes de répétition

Les polymorphismes de répétition résultent d'une répétition anormale de nucléotides. Il est possible de distinguer les répétitions qui affectent la région codante des gènes, où l'amplification de codons reste modérée, et celles qui affectent les régions non codantes, où la taille de l'élément amplifié peut atteindre 10 kb. Même si elles se trouvent au sein de séquences non-codantes elle peuvent être traduites en protéines par un mécanisme d'une traduction indépendante du codon initiateur *(Repeat associated non –AUG translation) (Cleary et al., 2018).* Dans certaines pathologies il est observé une augmentation du nombre de répétitions au cours des générations qui provoque une aggravation du phénotype clinique par un phénomène d'anticipation, dont le mécanisme exact est encore mal compris *(Cleary et al., 2018).* Il se peut qu'elles résultent d'erreurs dans la réplication de l'ADN lors de la méiose ou par d'erreurs de

réparation. Les polymorphismes de répétition peuvent résulter d'une instabilité des microsatellites et sont souvent rencontrés dans les maladies neurologiques *(Cleary et al., 2018).* Dans ces maladies il peut exister une corrélation entre le nombre de répétitions et le phénotype clinique, avec un seuil lié au nombre de répétition, au-delà duquel les individus développement la maladie.

2.1.3. Macrolésions dues aux réarrangements génomiques

Les macrolésions comprennent majoritairement les délétions, les duplications, les inversions et les amplifications et font souvent référence aux anomalies chromosomiques. De plus, d'autres macrolésions existent comme les fusions de gènes et les insertions d'éléments mobiles (transposons) ou de virus. Dans certains cas, plusieurs types de macrolésions peuvent coexister suite à un événement de réarrangement moléculaire Les délétions peuvent enlever tout ou partie d'un gène, voire de plusieurs gènes ce qui résulte en leur perte. A l'inverse, la duplication provoque la répétition d'un fragment plus ou moins long. L'inversion est le changement d'orientation d'une séquence. L'amplification représente la répétition anormale d'une partie de la séquence. Il existe quelques gènes de la SLA qui présentent des amplifications ou des expansions, où des séquences sont répétées de nombreuses fois comme *C9ORF72* et *ATXN2.* Certaines amplifications peuvent influencer l'expression d'un gène et provoquer un excès de copies et une surcharge en ARNm ou en protéine comme suggéré pour le gène *C9ORF72.*

2.2 Transmission des maladies mendéliennes

Les maladies mendéliennes sont classiquement considérées comme monogéniques : une seule mutation aboutit à une maladie. En effet, Gregor Mendel a posé les fondations de la génétique classique et décrit différents modes de transmission des caractères d'un individu à sa descendance (Mendel G., 1866). Ces lois de transmission sont majoritairement respectées par les maladies monogéniques. Parmi les maladies monogéniques les plus fréquentes sont l'hypercholestérolémie familiale avec une fréquence de 1/250 (Akioyamen et al., 2017; Jackson et al., 2018) et la mucoviscidose avec une incidence de 1/3000. Cependant la majorité des maladie monogéniques sont de maladies rares - quelques cas décrits pour certaines (Jackson et al., 2018). Il est possible de distinguer plusieurs modes de transmission des maladies mendéliennes.

2.2.1. Transmission autosomique dominante

Il s'agit d'un cas classique qui concerne la transmission par les autosomes, où il suffit d'un seul allèle muté pour induire le phénotype. Le phénotype se manifeste donc à l'état hétérozygote. Le sujet peut être atteint de la maladie ou être porteur sain jusqu'à ce qu'elle se manifeste. Un sujet porteur de la mutation a 50% de chance de la transmettre à sa descendance. S'il transmet cependant l'allèle sain, son enfant ne développera pas la maladie. Les mutations *de novo* sont des variants qui apparaissent chez un individu normal avant sa conception. Ce sont des mutations chromosomiques qui apparaissent dans les cellules germinales des parents lors de la réplication de l'ADN germinal.

2.2.2. Transmission récessive

Dans la transmission récessive, la maladie s'exprime cliniquement à l'état homozygote ou hétérozygote composite, c'est-à-dire que les deux allèles doivent porter un variant pathogène. Souvent les parents sont sains et porteurs d'un allèle muté à l'état hétérozygote.

2.2.3. Transmission liée à l'X

Les maladies qui ont une transmission liée à l'X sont le résultat d'un allèle anormal présent sur un gène du chromosome X. Leur expression est différente chez les deux sexes à cause nombre différent de chromosomes X qu'ils possèdent. Ainsi l'individu masculin sera atteint dans la majorité des cas, vu qu'il n'a qu'un seul chromosome X. La femme peut être homo- ou hétérozygote pour une mutation liée à l'X vu qu'elle en possède deux copies.

2.3. Effet fonctionnel des mutations

2.3.1. La perte de fonction

Les mutations qui provoquent une perte de la fonction protéique sont des mutations perte de fonction *(loss of function)*. Il est possible de distinguer : les allèles nuls chez qui il y a une perte totale de la fonction protéique et les allèles hypomorphes se caractérisant soit par la diminution de l'expression génique soit par la diminution de l'activité protéique. La majorité des mutations perte de fonction ont une transmission récessive à part dans le cas d'une haploinsuffisance (Jackson et al., 2018).

2.3.2. L'haploinsufisance

A l'état normal, les deux allèles du même gène autosomique possèdent un taux d'expression équivalent (Read, 2017). Certaines protéines comme les facteurs de transcription sont nécessaires en grandes quantités pour assurer leurs multiples rôles. Dès lors, la cellule a besoin de l'activité simultanée des deux allèles pour subvenir à ses besoins. Dans ce cas, si l'un des deux allèles est inactivé, l'autre ne sera pas suffisant pour assurer toutes les fonctions normales de la protéine. On parle alors d'une haploinsuffisance (Read, 2017). Ainsi, lorsqu'une mutation de type perte de fonction se trouve sur l'un des deux allèles, elle va induire un phénotype dominant.

2.3.3. Dominant négatif

On parle d'un effet dominant négatif lorsque le produit d'un allèle muté interagit avec le produit de l'allèle normal de façon à diminuer, voire inhiber son activité. Il se peut que des mutations aient des effets combinés d'haploinsuffisance et de dominant négatif par des mécanismes moléculaires alternatifs. C'est le cas généralement pour les protéines de structure qui agissent en associant plusieurs monomères entre eux.

2.3.4. Gain de fonction

Lorsqu'un allèle produit une protéine dont la fonction est différente de celle produite par l'allèle sauvage, il s'agit d'un gain de fonction. Dans certain cas, il se peut qu'une mutation gain de fonction augmente l'activité protéique plutôt que d'attribuer une nouvelle activité.Ceci a été observé pour le gène *SOD1* (Molnar et al., 2009) Le gain d'une nouvelle fonction est souvent observé dans la SLA, où une protéine peut acquérir la capacité à former des agrégats protéique comme pour les gènes *SOD1* et *TARDBP*.

2.4. La pénétrance

Quand il s'agit d'une maladie génétique, que ce soit une maladie monogénique ou non, il est rare d'observer exactement le même phénotype chez tous les individus porteurs du variant pathogène. La pénétrance décrit la proportion de sujets ayant une mutation causale et qui présentent un phénotype associé par rapport ceux qui sont porteurs sains. Ainsi, une pénétrance de 15% signifie que parmi tous les porteurs du variant pathogène, 15% présentent au moins un symptôme associé à la maladie (Ameziane et al., 2005). Une pénétrance complète signifie que

100% des porteurs développent la maladie. Également, la sévérité des symptômes, l'âge du déclenchement de la maladie et sa progression sont tous des facteurs qui peuvent évoluer différemment entre les personnes porteuses. Cette hétérogénéité clinique peut s'expliquer par une pénétrance incomplète. Le fond génétique personnel et les facteurs de l'environnement peuvent jouer un rôle non négligeable dans le phénotype clinique.

2.5. Les gènes de susceptibilité

L'expressivité variable du phénotype clinique est en partie sous l'influence d'allèles de susceptibilité. Ces allèles ne sont ni nécessaires ni suffisantes pour provoquer la maladie, mais peuvent cependant conférer un risque sous certaines conditions. Ils sont le résultat de la présence de polymorphismes dans le génome. Ils sont souvent le sujet d'études d'association génétique sur des groupes comparant des cas et des contrôles. Cependant, il est souvent difficile de les mettre en évidence, car ils n'agissent pas forcément de manière individuelle. En effet, il existe souvent une action synergique de plusieurs allèles de susceptibilité, tandis que le risque est moins important si les allèles sont pris individuellement.

2.6. Les gènes modificateurs

L'expression phénotypique de la maladie peut être influencé par des gènes modificateurs et par des facteurs de l'environnement tels que le tabagisme, l'exposition à des toxines ou l'état de nutrition. Les gènes modificateurs jouent un rôle dans la modification du phénotype clinique. Ils influencent l'âge de début de la maladie, sa progression ainsi que le tableau clinique de manière générale. De plus, dans certains cas, un gène modificateur d'une maladie peut être à l'origine d'autres maladies héréditaires.

2.7. Les maladies complexes

Le maladies complexes ou multifactorielles, comme leur nom l'indique, nécessitent de multiples facteurs pour être déclenchées et font souvent référence aux maladies **oligo-** ou **polygéniques**. Le phénotype pathogène des maladies polygéniques résulte de l'interaction additive ou synergique d'un réseau incluant plusieurs gènes et leurs allèles. De plus, il se peut que certains de ces allèles présent une **pléiotropie**, qui désigne la capacité d'un allèle à provoquer deux maladies différentes chez le même individu ou chez des individus différents.

L'expression de ces gènes peut également être sous la dépendance de gènes modificateurs. Certaines maladies complexes peuvent avoir une proportion de transmission mendélienne ou inversement, des maladies monogéniques à pénétrance incomplète peuvent s'avérer en fait être des maladies complexes.

2.8. Classification des variants génétiques

L'avancé dans les techniques de séquençage à haut débit et leur implémentation en clinique ont mené à la découverte de nouveaux gènes à l'origine de nombreuses maladies génétiques. Pour certaines d'entre elles, il est noté la présence d'une hétérogénéité génétique sous-jacente insoupçonné jusque-là. En effet, il est dévoilé la présence de nombreux variants rares qui peuvent ou non être à l'origine d'une maladie. La détermination de l'existence d'un lien avec la pathologie représente le défi majeur du diagnostic moléculaire. Les variants sont classés d'après un système international développé par le Collège Américain de Génétique Médicale *(american college for medical genetics, ACMG*) (Richards et al., 2015a). Il définit 5 classes de pathogénicité :

Class 1 : Bénin (B) ; Classe 2 : Probablement Bénin (PB) ; Classe 3 : Variant de signifiance indéterminée (VUS) ; Classe 4 : Probablement Pathogène (PP) et Classe 5 : Pathogène (P).

L'attribution d'une classe de pathogénicité repose sur un algorithme où différents critères de pathogénicité sont combinés. Chacun des critères peut être en faveur d'une pathogénicité ou d'une bénignité et possède un poids plus ou moins fort dans l'algorithme (Fig.14). En effet, il existe plusieurs combinaisons de facteurs possibles pour chaque classe. Elles sont listées ici en reprenant le code-couleur de la Fig14. et en séparant les différentes combinaisons par // :

Classe 1 : Bénin (B) →// 1 BA1 // ≥2 BS//

Classe 2 : Probablement Bénin (PB) → // 1 BS+1BP // ≥2 BP//

Classe 3 : Variant de signifiance indéterminé (VUS) → B = P ou autre cas de figure

Classe 4 : Probablement Pathogène (PP) → // 1 PVS1+1PM // 1PS+1-2PM // 1PS+≥2PP // // ≥3PM // 2PM+≥2PP // 1PM+≥4PP//

Classe 5 : Pathogène (P) → // 1 PVS1 + 1PS // 1 PVS1+2PM // 1 PVS1+1PM+1PP //

//1 PVS1+≥2PP//2PS//1PS+≥3PM//1PS+2PM+// ≥2PP1PS+1PM+≥4PP//

	Fortement en faveur d'une bénignité	En support d'une bénignité	En support d'une pathogénicité	Modérément en faveur d'une pathogénicité	Fortement en faveur d'une pathogénicité	Très fortement en faveur d'une pathogénicité
Fréquence dans la population	BA/BS1 : MAF très élevée pour une maladie BS2 : observé chez les contrôles, incohérence avec la pénétrance de la maladie			PM2: Absent de la population dans les bases de données	PS4: La fréquence chez les cas est significativement plus importante que chez les contrôles	
Prédiction *in silico*		BP4: Plusieurs prédictions ne montrent pas d'effet sur le gène ou son produit BP1: Mutation faux-sens dans une région où uniquement les non-sens provoquent la maladie BP7: Varient silencieux sans impacte sur l'épissage BP3: Indels qui ne perturbe pas le cadre de lecture	PP3: Plusieurs prédictions montrent l'effet délétère sur le gène ou son produit	PM5: Variant faux-sens sur une position où un autre variant faux-sens est déjà décrit PM4: Variant qui change la longueur de la protéine	PS1: Le changement de l'AA est déjà décrit comme pathogène	PVS1: Variant prédit nul, dans un gène ou la perte de fonction est connue comme mécanisme sous jacent à la maladie
Données fonctionnelles	BS3: Données fonctionnelles établies prouvant l'absence d'effet délétère		PP2: Faux-sens dans un gène avec faible taux de faux-sens bénins et grand taux de faux-sens pathogènes	PM1: Région « hot spot » de mutations ou région fonctionnelle connue sans variations bénignes	PS3: Données fonctionnelles établies prouvant un effet délétère	
Ségrégation	BS4: Pas de ségrégation du variant avec la maladie		PP1: Coségrégation du variant avec la maladie dans plusieurs membres de la famille	Augmentation de la co-ségrégation →		
De novo				PM6 : *De novo* sans confirmation des liens parentaux	PS2: *De novo avec confirmation des liens parentaux*	
Variant allélique		BP2: présence d'un variant dominant en *trans* BP2: présence d'un variant pathogène en cis		PM3: Pour les maladies récessives, si le variant est détecté en trans avec un autre variant pathogène		
Autres bases de données		BP6: une source fiable sans publication des données	PP5 : Une source fiable			
Autres informations		BP5: autre explication retrouvée chez le cas index	PP4: Tableau clinique /phénotype hautement spécifique du gène affecté			

3. Génétique de la SLA

3.1 La notion de maladie familiale

Nous avons vu précédemment que la grande majorité des cas de SLA sont sporadiques et que les formes familiales ne présentent que 10% de tous les cas *(Al-Chalabi et al., 2017)*. En effet, il n'existe pas de consensus quant à la définition de SLA familiale parmi les cliniciens *(Al-Chalabi et al., 2017; Vajda et al., 2017).* Certains auteurs préviennent que cette distinction peut induire une sur-simplification *(Hardiman et al., 2017,).* Tout d'abord, la part de la génétique peut être sous-estimée dans certains cas d'apparence sporadique *(Mathis et al., 2019, Tunca et al., 2020)*. Cela peut s'expliquer par la difficulté à rétablir l'historique complète de la maladie au sein d'une famille. Par exemple, il se peut que les parents du cas index soit décédés avant de développer une SLA, maladie qui débute en moyenne vers l'âge de 60 ans. En fonction des différentes pratiques, il est possible que le cas index soit diagnostiqué avec une SLA sporadique. Pour cette raison, le diagnostic d'une SLA sporadique peut évoluer en SLA familiale si la maladie se déclare chez un autre membre de la famille. Certaines études suggèrent qu'il est possible de distinguer les formes familiales des formes sporadiques à partir de la présentation clinique. Les formes familiales présenteraient rarement un début bulbaire, elles auraient un début plus précoce et une progression plus lente (Mathis et al., 2019a).

Ensuite, il est important de souligner que les notions de maladie familiale et de maladie génétique ne doivent pas être confondues. Ainsi, lorsqu'il s'agit d'une SLA familiale, la présence d'un variant pathogène n'est pas obligatoire. Une maladie familiale ne résulte pas forcément d'une mutation. Prenons l'exemple de la pandémie mondiale provoquée récemment par le virus SARS-COV2. Lorsque quelqu'un contracte ce virus, il développe une forme sporadique de la COVID-19. La personne infectée peut transmettre le virus à ses proches. Si plusieurs membres de la famille présentent des symptômes, la COVID-19 devient alors une maladie familiale. Dans ce cas, même si la maladie est familiale, elle ne résulte pas d'une mutation génétique. Si maintenant on observe un taux anormalement élevé de formes graves dans une famille, la situation devient encore plus complexe à analyser. En effet, il est probable que certaines personnes présentent une prédisposition génétique familiale aux formes graves, ce qui résulte en partie de gènes de susceptibilité et de gènes modificateurs. Dans ce dernier cas, il peut donc s'agir d'une maladie familiale provoquée par l'environnement (une infection

virale) mais qui s'exprime de façon particulièrement sévère au sein d'une famille donnée en raison d'une prédisposition génétique.

Il est ainsi judicieux de faire la nuance entre maladie familiale et maladie génétique, surtout dans le contexte de SLA où certaines formes sporadiques sont aussi d'origine génétique. Pour affiner la nomenclature des différentes formes, certains chercheurs proposent de prendre en compte l'implication ou non d'un facteur génétique et de parler de maladie héréditaire plutôt que de maladie familiale.

3.2 Architecture génétique de la SLA

L'architecture génétique de la SLA est complexe, la majorité des formes héréditaires sont monogéniques mais un nombre croissant d'études démontrent la présence d'une implication oligogénique dans la maladie *(Al-Chalabi et al., 2017; Gregory et al., 2020).*

Tout d'abord, la plupart de cas de SLA monogéniques se transmettent de manière autosomique dominant (Hardiman et al., 2017a). Dans moins de 1% des cas sont trouvés des mutations récessives, *de novo* ou liées à l'X *(Lattante et al., 2020).* L'identification de la plupart des causes monogéniques est faite par l'étude des formes héréditaires de SLA *(Al-Chalabi et al., 2017; Gregory et al., 2020)*. Le nombre de gènes associés à la maladie ne cesse d'augmenter depuis les premiers gènes découverts par analyse de liaison génétique *(linakage)* jusqu'à ceux identifiés récemment par GWAS *(genome-wide association studies)* et NGS *(next-generation sequencing) (Gregory et al., 2020)* (Fig.15).

La base de données *Amyotrophic Lateral Sclerosis online Database* (ALSoD http://alsod.iop.kcl.ac.uk/) répertorie toutes les données de la littérature concernant les mutations et les gènes liés à la SLA. A l'heure actuelle, elle possède une liste de 154 gènes associés à la maladie. Elle définit 6 catégories de gènes en fonction des preuves expérimentales quant à leur effet pathogène : gènes causaux ; gènes modificateurs du phénotype clinique ; gènes fortement liés à SLA ; gènes modérément liés à la SLA ; gènes probablement liés à la SLA et gènes de lien non attribué. Dans la catégorie des gènes causaux sont dénombrés 17 gènes, mais ce nombre peut varier en fonction des auteurs. Parmi ces gènes, il existe 4 gènes

majeurs qui contribuent à eux seuls à 70% des formes héréditaires et 10% des formes sporadiques : *C9ORF72, SOD1, TARDBP* et *FUS* (Hardiman et al., 2017a). Les variants pathogènes dans les gènes mineurs et les gènes de découverte plus récente comptent pour moins de 5% de tous les cas et leurs phénotypes sont encore peu étudiés. Certains gènes de la SLA présentent une pléiotropie et sont le plus souvent associés au recouvrement clinique entre la SLA et la DFT *(Al-Chalabi et al., 2017).*

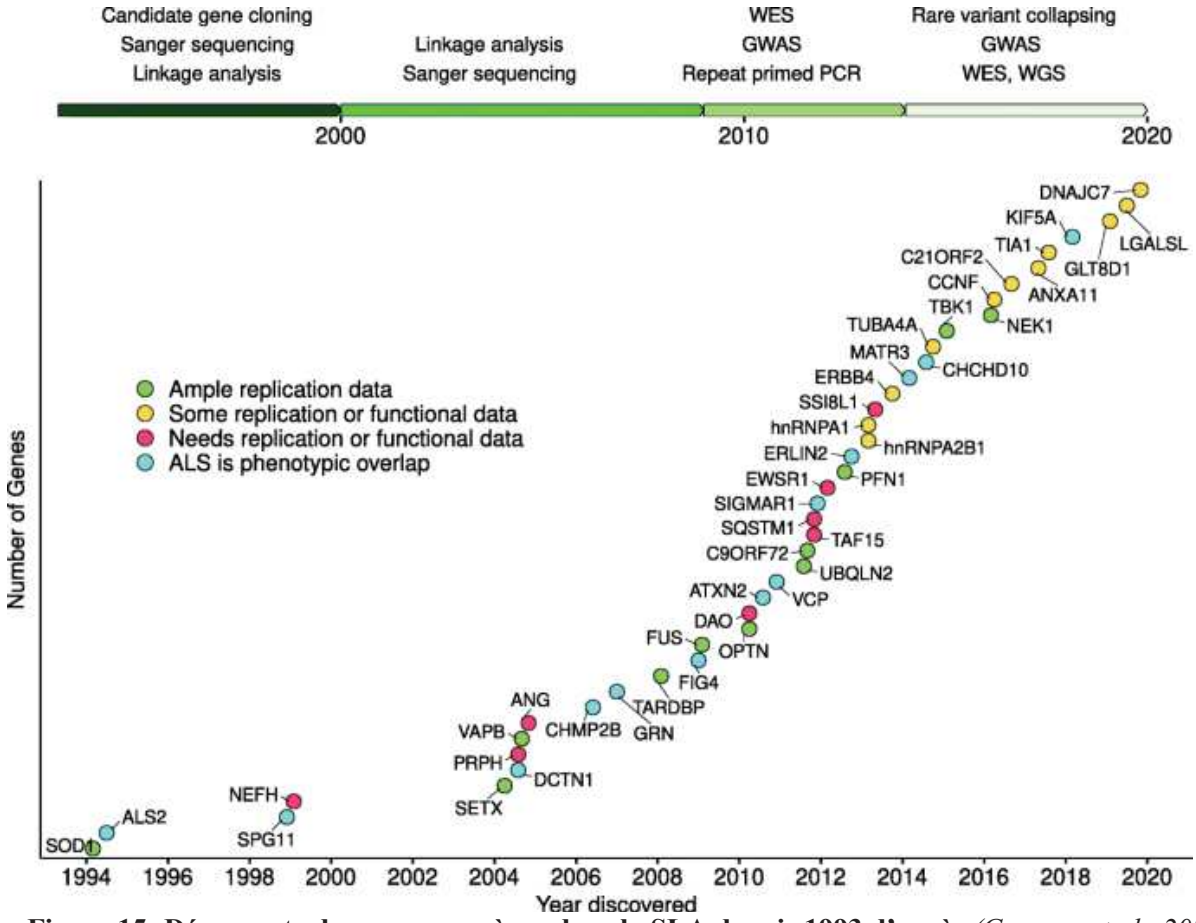


Figure 15: Découverte de nouveaux gènes dans la SLA depuis 1993 d'après *(Gregory et al., 2020)*
Quatre grandes périodes caractérisent la découverte de nouveaux gènes de SLA : la découverte de gènes par clonage, analyse de liaison génétique et séquençage Sanger, puis par analyse d'association et Sanger suivi par l'implication de GWAS et le séquençage d'exome (WES),

Deuxièmement, malgré la présence d'une SLA monogénique et d'un variant causal dans une famille, toutes les personnes atteintes ne présentent pas forcément les mêmes symptômes cliniques. Par exemple, la maladie ne sera pas déclenchée au même moment et le tableau clinique sera propre à chaque personne. Les études sur le sujet évoquent une interaction étroite entre gènes de susceptibilité, gènes modificateurs et environnement, ainsi que l'implication de

facteurs épigénétiques dont l'action exacte est peu connu à l'heure actuelle (Hardiman et al., 2017).

Enfin, quelques revues proposent une origine oligogénique de la SLA d'apparence sporadique. Deux hypothèses sont dégagées quant à sa composition allélique : soit elle résulterait de la cumulation de variants fréquents à risque pathogène faible soit par la combinaison de variants rares à risque pathogène élevé *(Al-Chalabi et al., 2017; Lattante et al., 2020)*. Il existe des arguments en faveur des deux hypothèses, cependant lorsqu'il s'agit d'étude de variants fréquents de SLA, le risque relatif est effectivement très faible. Néanmoins, plusieurs gènes causaux de la SLA ont été découvert en se basant sur cette hypothèse dans des études de GWAS sur des études cas témoin *(Nicolas et al., 2018)*. Une étude récente a montré que le dysfonctionnement cognitif associé aux SLA/DFT résulte d'une association de variants fréquents *(Placek et al., 2021)*. Quant aux variants rares, il est démontré qu'ils sont retrouvés à la fois dans de rares formes familiales, et dans des formes sporadiques de SLA *(Cady et al., 2015; Lattante et al., 2019; Ryan et al., 2019)*. L'architecture génétique de certaines formes de SLA se situerait alors à mi-chemin entre ces deux hypothèses, avec l'implication à la fois de variants rares à risque pathogène majeur et de variants plus fréquents conférant un risque pathogène plus faible *(Al-Chalabi et al., 2017)*. L'identification de gènes modificateurs reste cependant un défi.

3.3 Les gènes majeurs de la SLA

3.3.1. *SOD1*

Le premier gène lié à la SLA découvert en 1993 est *SOD1 (Rosen et al., 1993)*. Il code pour l'enzyme [Cu-Zn] superoxide dismutase 1 qui catalyse la dismutation de l'ion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en oxygène O_2 et péroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Fig. 16). La protéine SOD1 est très abondante dans les cellules, présentant environ 1% de la masse cellulaire (*Pardo et al., 1995*)et se trouve majoritairement dans le cytoplasme et la membrane interne des mitochondries (*Fukai and Ushio-Fukai, 2011*). Des mutations dans SOD1 comptent pour 15% de toutes les formes familiales et 2% des formes sporadiques (Volk et al., 2018). Aujourd'hui, plus de 180 mutations dans ce gène ont été identifiées et semblent pathogènes, les mutations A5V et G94A étant parmi les mieux étudiées dans des modèles au laboratoire *(Kirby et al., 2016)*. Les

mutations de SOD1 se retrouvent majoritairement dans l'exon 5 mais des variants pathogènes sont distribués tout au long de la séquence et peuvent impacter différents domaines de la protéine *(Kirby et al., 2016)*. La majorité des mutations de *SOD1* mènent à des substitutions d'un AA, avec un effet prononcé même si la nature de l'AA est proche, comme c'est le cas du remplacement de l'Alanine en position 5 par la Valine, qui sont tous les deux des AA aliphatiques.

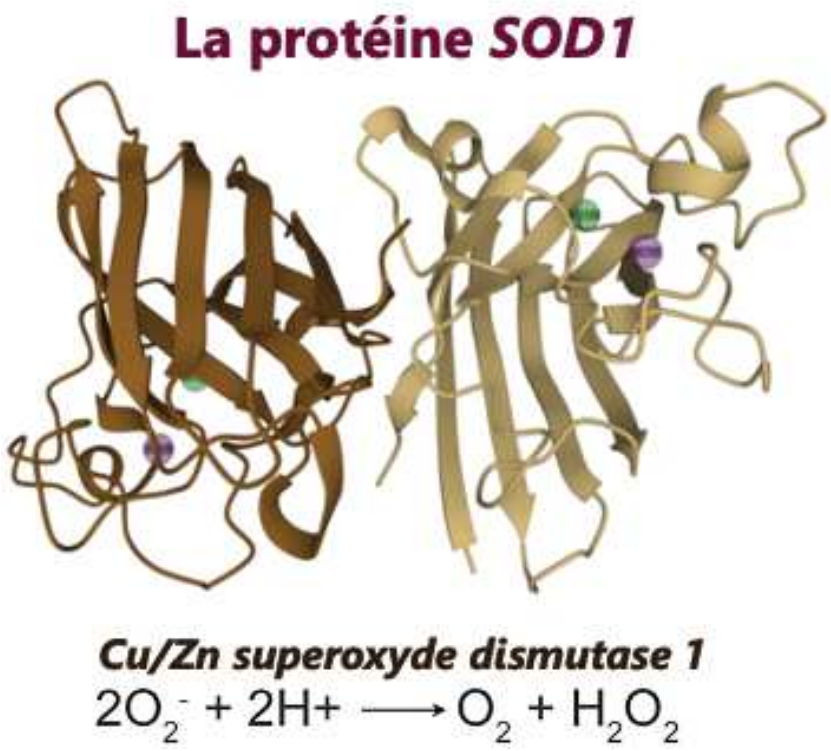


Figure 16 : La protéine SOD1 est constituée de 2 sous unités comprenant chacune un atome de Cu2+ (vert) et un atome de Zn2+ (violet) qui se trouvent au niveau du sie actif de la protéine. Chaque sous-unité contient un pont disulfure interne.

La majorité des variants de *SOD1* ont une transmission autosomique dominante, à l'exception du variant D91A qui a une transmission récessive. La distribution géographique de la fréquence des variants est différente, le D91A est le plus répandu mondialement tandis que A5V et H47R sont plus fréquents chez les américains et les japonais respectivement *(Yamashita and Ando, 2015)*. La présentation clinique d'une SLA liée à *SOD1* est généralement un début distal au niveau du membre inférieur avec une prédominance périphérique *(Yamashita and Ando, 2015)*. Les patients mutés *SOD1* (SLA-*SOD1)* présentent un phénotype de SLA pure, un déficit cognitif n'étant qu'exceptionnellement décrit chez eux. Les SLA-*SOD1* peuvent présenter une

hétérogénéité dans l'âge d'apparition des premiers symptômes et des tableaux cliniques différents en fonction de la mutation causale. Les variants A5V et G94A peuvent être associés à un tableau clinique hétérogène, une évolution rapide et une durée de survie de moins de 3 ans. Les variants D91A et H47R peuvent être associés à une durée de survie plus grande atteignant 10 ans et un phénotype clinique uniforme *(Yamashita and Ando, 2015)*. Enfin, il semblerait que les différents variants du gène *SOD1* auraient des degrés de toxicité différents et des phénotypes spécifiques.

Effet des mutations SOD1 sur la structure de la protéine et sur son activité

Les mécanismes exacts liés à la toxicité de SOD1 restent sujet à débat, cependant il est admis qu'il s'agit majoritairement d'un gain de fonction. Un premier élément en faveur de cette hypothèse est que les souris surexprimant une forme humaine de SOD1 mutée développent une pathologie mimant la SLA *(Gurney et al. 1994*), tandis que la suppression du gène endogène *Sod1* ne provoque aucun phénotype *(Reaume et al. 1996)*. Au niveau moléculaire il est observé que certaines les mutations de *SOD1* provoquent un mauvais repliement protéique, ce qui peut avoir un effet sur la stabilité de la protéine (Stathopulos et al., 2006) sans forcément moduler son activité enzymatique de départ *(Sangwan et al., 2017)*. Cependant, le mauvais repliement de la protéine provoque une exposition de la séquence de la boucle électrostatique au milieu cellulaire (Fig. 17 A) favorisant ainsi son interaction avec d'autres protéines et la formation d'agrégats (Shipp et al., 2003). La présence d'agrégats de SOD1 muté sont observés dans des tissu humains issu de formes familiales et dans différents modèles animaux (*Gurney et al., 1994*). Curieusement, la forme sauvage de la protéine SOD1 est également se retrouvée au niveau des agrégats chez des patients atteints de SLA sporadique (Bosco et al., 2010). En effet, plusieurs études montrent que certaines modifications post-traductionnelles comme la métallisation insuffisante, une oxydation excessive ou des perturbations dans la structure quaternaire de la protéine peuvent aussi contribuer à une perte de stabilité de SOD1 et contribuer à son agrégation (Ezzi et al., 2007; Bosco et al., 2010; Guareschi et al., 2012). En outre, les formes mal repliées de SOD1 (mutés ou non) sont solubles et ipeuvent avoir une action similaire aux maladies à prions. Elles interagissent avec les fromes sauvages de la protéine pour provoquer leur mauvais repliement et leur agrégation (Fig.17 B) (Witan et al., 2008).

A

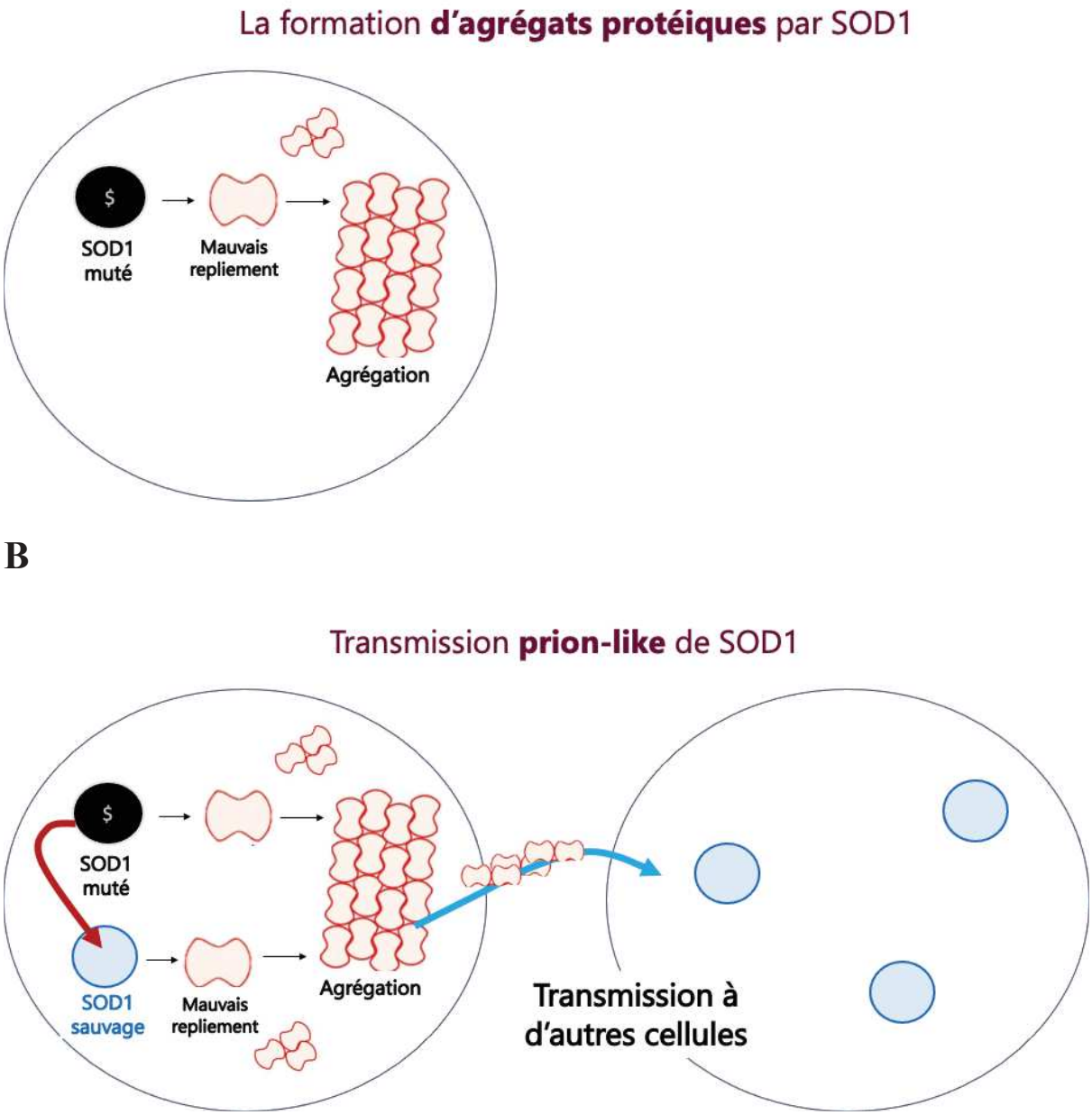


Figure 16 : Formation d'agrégats protéique et transmission prion-like de SOD1 A. Une mutation sur la séquence de protéique de SOD1 peut induire un mauvais repliement de la protéine, exposant ainsi des sites qui favorisent l'interaction avec d'autres protéines. Ainsi, plusieurs protéines mal repliées peuvent s'agréger entre elles pour former des longues structures fibrillaires. **B.** Dans certains cas, la forme SOD1 mutée. (Adaptée d'après *Mercedes Prudencio 2010 et al.* et *Rotunno MS et al.,. 2013)*

De plus, la forme soluble de SOD1 mal repliée peut être secrétée d'avantage par des voix de sécrétion alternative incluant des protéines chromogranines tout en étant moins secrétée par les voies classiques (*Turner et al., 2005, Urushitani et al., 2006)* et peut se transmettre à d'autres cellules. Enfin, l'inoculation d'une souris saine par un extrait de moelle épinière de souris exprimant hSOD1 mutée, induit la formation d'agrégats chez la première souris. Celle-ci développe des symptômes d'une SLA (Berg J. et al, 2015). Une étude récente par la même équipe a montré que l'inoculation d'une souris saine avec un extrait de moelle épinière de patient muté SOD1, induit elle-aussi l'agrégation de SOD1 chez la souris qui présente alors un phénotype semblable à une SLA *(Bidhendi et al.* Acta Neuropathol. *2018).* Toutes ces observations confirment l'hypothèse d'une transmission prion-like de SOD1, étant donné que forme mutée peut se transmettre entre deux individus de la même espèce ou entre espèces différentes.

Enfin, pendant que la SOD1 mal repliée est soluble, il n'a pas été observé une perte d'activité catalytique de la protéine. Cependant, lorsque celle-ci s'agrège, elle ne peut plus effectuer ses fonctions cellulaires ce qui peut être considéré comme une perte de fonction.

3.3.2. *C9ORF72*

La cause génétique la plus fréquente de SLA est un polymorphisme de répétions dans le premier intron du gène *C9ORF72 (C9 open reading frame 72)* (DeJesus-Hernandez et al., 2011a; Alan E. Renton et al., 2011). De plus, ce gène présente une pléiotropie car il est aussi la cause la plus fréquente pour le développement de la DFT et a été associé à d'autres maladies neurologiques comme la Sclérose Latérale Primitive et la maladie d'Alzheimer (Al-Chalabi et al., 2017; Cooper-Knock et al., 2014a). Ainsi, des études cliniques ont montré qu'il est responsable de 25.1% des cas de DFT familiale, 37% des cas de SLA familiales et 6.3% des cas de SLA sporadiques *(Kirby et al., 2016)*. Il est associé le plus souvent à des sujets d'origine européenne ou présentant un ancêtre d'origine européenne. Les patients mutés peuvent soit développer une SLA, soit une DFT, soit une forme de SLA/DFT. Le phénotype pathogène résulte d'une expansion anormale de l'hexanucléotide $[GGGGCC]_n$ qui peut être répété des centaines de fois chez les patients. L'allèle sauvage peur comporte 2 entre 30 répétitions *(Iacoangeli et al., 2019*), mais il existe des cas où l'hexanucléotide peut être répété des dizaines de fois sans que les personnes porteuses développent des symptômes *(Volk et al., 2018)*. Le

seuil de pathogénicité est fixé à 30 répétitions *(Cooper-Knock et al., 2014.* La pénétrance des mutations de C9ORF72 est de près de 100% à l'âge de 80 ans *(Volk et al., 2018)*. La manifestation clinique d'une expansion de C9ORF72 inclue le plus souvent un début bulbaire, un âge d'apparition plus bas et une évolution rapide (Cooper-Knock et al., 2014a).

La fonction de la protéine codée par *C9ORF72* n'est toujours pas complètement comprise et plusieurs mécanismes sont proposé pour expliquer son implication dans la survenue de la SLA. Il se peut que l'expansion pathogène mène à une haploinsuffisance ; il est observé une diminution du taux de C9ORF72 chez les patients et l'inactivation du gène homologue chez le poisson-zèbre provoque une axonopathie et des déficits moteurs (Ciura et al., 2013; Waite et al., 2014). Cependant ceci n'est pas observé chez la souris *(Koppers et al., 2015)*. Les deux autres mécanismes possibles sont l'accumulation d'ARN et l'accumulation de répétitions de dipeptides (*dipeptide protein repeat,* DPR). La transcription de l'expansion hexanucléotidique peut se faire dans les deux sens et induit la production d'ARN qui forment des structures secondaires complexes et s'accumulent sous forme de foyers d'ARNs (foci) *(Cooper-Knock et al., 2014b)*. Ces ARNs interagissent avec les protéines de liaison à l'ARN comme TDP-43 *(Cf. 3.2.3.3.*3.3. TARDBP*),* en altérant leur fonctionnement *(Cooper-Knock et al., 2015; Lee et al., 2013).* Enfin, il a été montré que certains de ses ARNs sont traduits par le mécanisme de RAN (*RAs-related Nuclear protein*) et les DPR qui en résulte sont retrouvés dans des inclusions protéiques *(Lehmer et al., 2017)*. Une étude utilisant des motoneurones humains induits a montré des défauts dans la dégradation des DPR et un nombre diminué de lysosomes *(Shi et al., 2018)*. Elle a également montré la présence d'une surexpression des récepteurs du glutamate à la surface cellulaire, ajoutant l'excitotoxicité aux mécanismes liés à C9ORF72 *(Shi et al., 2018).*

3.3.3. TARDBP

Des analyses *post-mortem* réalisées sur des neurones corticaux et spinaux de patients atteints de SLA ou de DFT ont révélé la présence d'inclusions cytoplasmiques de la protéine *Transactive responsa DNA-binding protein 43* (TDP-43). La protéine TDP-43 est l'isoforme prédominante codée par le gène *TARDBP.* Les mutations de *TARDBP* sont responsables de 5% des SLA familiales et environ 1% des SLA sporadiques. Cependant, 97% de tous les patients atteints de SLA présentent des inclusions de TDP-43, indépendamment de la présence d'une mutation du gène TARDBP *(Kirby et al., 2016)*. Jusqu'à présent, des inclusions de TDP-43

n'ont jamais été retrouvées chez des patients porteurs de mutations dans le gène *FUS (Cf.3.2.4.* 3.3.4 FUS*)*. Certaines revues discutent de l'absence d'agrégats de TDP-43 chez des sujets porteurs de mutations *SOD1 (Tziortzouda et al., 2021),* cependant n'est pas toujours le cas, car des agrégats de TDP-43 sont observés chez des patient porteurs de plusieurs mutations sur SOD1, dont la forme récessive D90A *(Feneberg et al., 2020; Lanznaster et al., 2021).* Les patients porteurs d'un variant dans *TARDBP* présenteraient généralement un début distal au niveau du membre supérieur, avec un âge d'apparition des symptômes vers 53 ans et une progression plus lente *(Yamashita and Ando, 2015).*

TDP-43 est une ribonucléoprotéine qui peut lier les ARNs et l'ADN et peut interagir également avec d'autres protéines via un domaine situé en C-terminal et qui est riche en Glycines. La majorité des mutations dans le gène TARDBP sont de type faux-sens et affectent l'exon 6 qui code pour le domaine en C-terminal *(Kabashi et al., 2008; Volk et al., 2018).* Elles ont une transmission autosomique dominante. L'effet pathogène des variants de *TARDBP* pourrait s'exercer à la fois par des mécanismes de gain de fonction et de perte de fonction *(Kabashi et al., 2010)*. La surexpression ou l'inactivation du gène *tardbp* chez le *zebrafish* conduisent tous les deux à une forte diminution des capacités motrices liée aux défauts dans la morphologie des motoneurones *(Kabashi et al., 2010)*. L'effet gain de fonction pourrait se produire suite à des dérégulations dans le métabolisme des ARNm, leur épissage et leur transport nucléo-cytoplasmique *(Štalekar et al., 2015)*. En effet, plusieurs études ont montré que les mutations de *TARDBP* provoquent la mauvaise localisation de TDP-43 au niveau cytoplasmique. TDP-43 possède des domaines « prion-like » qui pourraient expliquer la tendance à s'agréger *(Gregory et al., 2020).* L'induction d'une localisation nucléaire de TDP-43 muté par suppression de son site de SUMOylation induit une diminution de sa toxicité et une amélioration de la survie des cellules *(Maurel et al., 2020).*

3.3.4 FUS

Des variants pathogènes de *FUS (fused in sarcoma*) sont trouvés dans 3% des SLA familiales et dans moins de 1 % des SLA sporadiques *(Yamashita and Ando, 2015)*. *FUS* est une ribonucléoprotéine qui possède des rôles similaires à *TARDBP*, dont l'implication dans la régulation des ARNs. Les mutations dans *FUS* et *TARDBP* sont retrouvées en plus grande proportion chez des sujets d'origine asiatique *(Yamashita and Ando, 2015)*. Des études associent certains variants du gène *FUS* avec des formes juvéniles de SLA, dont le

déclenchement peut avoir lieu dès l'âge de 25 ans *(Conte et al., 2012)*. Cependant, il existe une hétérogénéité clinique en fonction des variants, avec certains variant qui provoquent des formes foudroyantes et d'autres qui provoquent des formes à progression classique. Les variants pathogènes de *FUS* peuvent se transmettre de manière autosomique dominante ou autosomique récessive *(Alsultan et al., 2016).*

La protéine FUS contient 526 AA, un domaine de liaison à l'ARN et un domaine C-terminal très conservé qui possède une séquence de localisation nucléaire (NLS). La majorité des variants pathogènes de *FUS* sont identifiés dans le domaine C-ter conservé. Des études en culture cellulaire montrent aussi que les variants de *FUS* peuvent causer un gain de fonction et/ou une perte de fonction. En effet, FUS possède également des domaines « prion-like » et peut s'agréger de manière similaire à TDP-43. L'inactivation de *FUS* chez le modèle murin ne provoque pas de défaut de locomotion ni de phénotype typique de SLA, suggérant que la perte de ce gène n'est pas suffisante pour provoquer la maladie dans ce contexte. Cependant, des études chez *zebrafish* montrent que l'inactivation de *Fus* provoque une réduction de l'activité motrice en lien avec une réduction de la taille des projections des motoneurones *(Kabashi et al., 2011)*. En outre, elle montre que la surexpression du variant R521H produit un phénotype similaire à l'inactivation de *Fus*, montrant l'implication des deux mécanismes à la fois. Enfin, cette étude montre que l'expression de *FUS WT* après inactivation de *Fus* ou de *Tardbp* arrive à restaurer le phénotype moteur suggérant un lien fonctionnel *in vivo* entre ses deux protéines. Enfin cette observation confirme des études *in vitro* montrant une interaction directe entez *FUS* et *TDP-43 (Kim et al., 2010).*

3.4. Autres gènes de la SLA

3.4.1. OPTN

L'optineurine *(OPTN)* est un gène initialement connu pour être associé au glaucome à angle ouvert, cependant quelques études japonaises ont mis en évidence des variants de ce gène chez des patients SLA. Dans la population asiatique, les mutations dans ce gène comptent pour 4% des SLA familiales et 0.4% des SLA sporadiques *(Maruyama et al., 2010)*. Chez les personnes d'origine européenne, les pourcentages respectifs sont de 1.3% et de 0.3% *(Fifita et al., 2017).* Il s'agit de mutations faux-sens dont la transmission dépend du variant et peut être soit dominante soit récessive. Le phénotype clinique d'une SLA-*OPTN* se caractérise par une progression lente et un âge de début peut qui varie entre 30 et 60ans. La protéine OPTN est

impliquée dans plusieurs processus cellulaires, dont l'autophagie, le maintien de l'intégrité de l'appareil de Golgi et dans la régulation de la voie NF-κB *(Fifita et al., 2017; Toth and Atkin, 2018).*

3.4.2. Autres gènes mineurs

De nombreux autres gènes mineurs sont aussi liés à la SLA mais ils comptent pour un petit pourcentage de cas. Leur identification permet de dévoiler de nouveaux mécanismes moléculaires contribuant à la physiopathologie de la SLA ou à souligner ceux dont l'implication est majeure. De plus, certains de ces gènes peuvent être impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires. Une partie de ces gènes sont liés au processus d'homéostasie protéique et à l'autophagie. Ce sont : *UBQLN2, SQSTM1, VCP* et *TBK1* (Gregory et al., 2020). Ce dernier est en outre impliqué dans la neuroinflammation. Les mutations dans les gènes *TIA1* et *CCNF* s'avèrent impliqués dans le transport nucléocytoplasmique et pourraient contribuer à la formation d'agrégats protéiques de TDP-43. Les mutations dans les gènes *NEK1,TUBA4A, KIF5A* et *ANAXA11* pourraient contribuer à des défauts dans le transport axonal (Gregory et al., 2020). Enfin, des mutations dans des gènes mineurs ont été décrits en parallèle avec des variants dans des gènes. Certains d'entre eux pourraient avoir un effet modificateur sur le phénotype de la SLA ou conférer un risque plus important pour le développement de la maladie. Les variants des gènes *UNC13A* et *ATXN11* confèreraient un risque plus élevé, tandis que certains variants dans *EPHA3* auraient un effet protecteur (Ciura et al., 2016; Diekstra et al., 2012; Uyan et al., 2013).

4. Le diagnostic moléculaire de la SLA

Lorsqu'une SLA est soupçonnée ou diagnostiquée, le neurologue peut proposer un diagnostic moléculaire au patient. Le diagnostic moléculaire de la SLA se base sur l'interprétation de variants génétiques retrouvés dans la séquence de chaque patient.

4.1 Le fond génétique de la SLA en France

Nous venons de voir que les différents gènes de la SLA et même les différents variants ont une distribution géographique particulière. Dès lors, il est essentiel que le diagnostic moléculaire soit adapté à la population à laquelle il s'adresse, en évaluant le fond génétique et la présence

d'ancêtres communs pour certains variants. Concernant la SLA familiales en Europe, 33% des cas sont dus à une mutation dans le gène *C9ORF72*, suivi par *SOD1* (14%), *TARDBP* (4,2%) et *FUS* (2,8%).

4.2. La classification des variants génétiques de la SLA

La recherche de variants pathogènes dans les séquences de patients atteints de SLA s'effectue par séquençage NGS, à l'exception de *C9ORF72* pour lequel est utilisé la PCR de type *« Repeat-primed PCR ».* Les centres de diagnostic moléculaire élaborent des panels de gènes pour le NGS qui permet de séquencer plusieurs gènes en parallèle. La plateforme de diagnostic moléculaire du CHU de Nîmes est l'un des trois centres de diagnostic moléculaire de la SLA en France. Il est suggéré aux cliniciens de prescrire une analyse des gènes *C9ORF72* et *SOD1,* en premier lieu. *C9ORF72* est le gène majoritairement muté dans les populations européennes tandis que *SOD1* est le candidat majeur pour les thérapies géniques émergeantes. Si aucun des deux gènes ne présente de variants pathogènes, la séquence du patient est alors analysée par NGS. Le panel utilisé comporté actuellement 47 gènes associés à la SLA dont la composition évolue en fonction de l'avancée des connaissances scientifiques.

Le séquençage à haut-début engendre la détection d'un grand nombre de variants pour chaque patient analysé. La majorité de ces variants sont de type synonyme et peuvent être automatiquement filtrés par les logiciels utilisés en clinique. Cependant, avec la diminution de la limite de détection des appareils de séquençage, de plus en plus de variants rares sont identifiés. Les critères de classification des variants définis par l'ACMG s'appliquent difficilement pour l'analyse de leur pathogénicité *(Lattante et al., 2020)*. Nous avons vu précédemment que chaque classe de pathogénicité résulte d'une combinaison de critères de classification. Cependant, beaucoup de critères de classification ne peuvent pas être respectés pour les variants rares. Pour cause, il n'existe souvent pas suffisamment de données quant à leur fréquence ou leur effet fonctionnel. Concernant la fréquence des variants, un variant ne sera pas considéré comme pathogène pour la SLA s'il est représenté à plus de 0,01% dans la population générale. Par conséquent, lorsqu'il n'y a pas suffisamment de critères en faveur d'une pathogénicité ou d'une bénignité, ces variants se retrouvent classés dans la classe des VUS. Le but du diagnostic moléculaire est donc de caractériser au mieux la pathogénicité des variants afin de leur attribuer un sens clinique.

III. Le modèle *zebrafish*

Ce chapitre présente les avantages du modèle *zebrafish (Danio Rerio)*, suivi d'une description du système moteur du poisson et présente enfin l'intérêt du modèle pour l'étude de la SLA.

1. Généralités

Le poisson-zèbre *(Danio Rerio)* ou encore *zebrafish* est introduit en tant que modèle d'étude par le chercheur George Streisinger dans les années 1960 (Parichy, 2015). Il s'agit d'un poisson d'eau douce originaire des zones tropicales en Inde, Népal, Pakistan et Myanmar (Parichy, 2015). Il vit naturellement dans les petites rivières à faible débit, notamment celles qui se forment à la mousson (Parichy, 2015).

Sa popularité en tant qu'organisme modèle s'est accrue au cours des dernières années notamment dans les domaines de la génétique, en toxicologie et en pharmacologie (MacRae and Peterson, 2015; White et al., 2017). Les principaux avantages du *zebrafish* sont : un développement embryonnaire rapide, l'obtention de nombreux embryons à chaque ponte une conservation génétique et physiologique avec les vertébrés dont l'Homme, une manipulation génétique aisée ainsi qu'une facilité de maintien au laboratoire par rapport à d'autres modèles de vertébrés (Howe et al., 2013; Teame et al., 2019; Veldman and Lin, 2008).

1.1. Cycle de vie

Le cycle de vie du *zebrafish* dure 90 jours et comprend 4 périodes : embryonnaire, larvaire, juvénile et adulte (Fig. 16). Le *zebrafish* est un poisson ovipare à développement extérieur ; un couple de poissons adultes peut pondre jusqu'à 300 œufs par ponte. L'embryogenèse est facilement observable car l'embryon est transparent ce qui a permis de caractériser précisément les différents stades de développement (Kimmel et al., 1995). Le développement embryonnaire commence depuis la première division cellulaire du zygote qui a lieu 40 min après la fécondation à 28°C. La segmentation a lieu dans les 24 heures post-fécondation (hpf) (Kimmel et al., 1995). A 24 hpf la majorité de l'organogénèse a lieu : le cœur commence à battre, la notochorde et les somites sont en place et le cerveau embryonnaire est déjà formé (Kimmel et al., 1995). Ces structures se complexifient entre 24 et 48 hpf, l'embryon se trouvant au stade

pharyngula où il possède toutes les caractéristiques communes avec les autres vertébrés (Kimmel et al., 1995). L'éclosion a lieu entre 48 et 72 hpf et la larve mesure 3 mm de longueur (Kimmel et al., 1995). Au bout de 72 hpf la majorité de la morphogénèse est achevée. Dans les jours suivants, la vessie natatoire se gonfle et la mâchoire s'allonge vers l'antérieur de la tête (Kimmel et al., 1995). Pendant les 7 premiers jours de développement, la larve se nourrit des stocks provenant du vitellus de l'œuf. A partir de 6-7 jours post-fécondation (jpf), la mâchoire est formée et la larve peut nager et se nourrir librement, c'est le stade larve autonome (Parichy, 2015). Pendant la période larvaire, les poissons grandissent et subissent des changements morphologiques au niveau des nageoires et des écailles (Parichy, 2015). La période juvénile commence une fois que toutes les écailles mises en place (Parichy, 2015). Au bout de 3 mois, la maturité sexuelle est atteinte, les poissons sont considérés comme adultes, capables de se reproduire (Parichy, 2015). Les *zebrafish* adultes mesurent entre 2.5 et 4 cm de longueur, ils possèdent un dimorphisme sexuel visible : les mâles ont un corps fin et allongé et ils sont de couleur vive tandis que les femelles ont un corps arrondi et une couleur plus terne (Teame et al., 2019).

1.2. Conservation génétique avec l'Homme

Le génome du z*ebrafish* contient plus de 26,000 gènes codants identifiés, avec 71.4% des gènes humains ayant un orthologue chez le poisson (Howe et al., 2013). De manière générale, ces orhologues ont une identité de séquence variable, tout en ayant une grande similarité fonctionnelle (MacRae and Peterson, 2015). Par exemple, la séquence du récepteur glucocorticoïde humain est identique à 54% avec son orthologue chez le poisson, tandis que son domaine fonctionnel est identique à 74%, suggérant une conservation fonctionnelle (MacRae and Peterson, 2015). La caractérisation phénotypique de *zebrafish* mutants a conduit à la caractérisation de nombreux gènes du développement, de leur identité cellulaire ainsi que de gènes impliqués dans des maladies humaines (Howe et al., 2013; Veldman and Lin, 2008). Parmi ces derniers, 82% ont des orthologues chez le poisson (Howe et al., 2013).

1.3. Techniques d'édition génétique

Le criblage phénotype/génotype est une méthode classique pour l'analyse des processus biologiques qui s'applique aussi chez le poisson (Lieschke and Currie, 2007). La mutagénèse aléatoire peut s'effectuer par exposition des poissons à des composés chimiques ou par des

transposons, induisant des mutations ponctuelles (Lieschke and Currie, 2007; Sertori et al., 2016). Le développement externe des *zebrafish* permet une analyse phénotypique rapide et garantit un accès facile au zygote pour la manipulation génétique (Sertori et al., 2016). Par cette technique de nombreux gènes impliqués dans des maladies humaines ont été étudiés, tel que le gène de la dystrophin impliqué dans la myopathie de Duchenne (Lieschke and Currie, 2007). Des techniques de génétique inverse s'appliquent également chez le poisson afin d'éteindre l'expression d'un gène. L'inactivation transitoire est possible par l'injection de morpholinos dans le zygote, tandis que la technique TILLING *(Targeting Induced Local Legions IN Genomes)* permet une inactivation stable (Sertori et al., 2016). En outre, la surexpression transitoire est également possible par l'injection de l'ARN messager d'une protéine (ARNm) directement dans le zygote (Sertori et al., 2016). La surexpression stable ubiquitaire ou tissu-spécifique est possible *via* transgénèse (Sertori et al., 2016). Plusieurs techniques d'édition du génome sont utilisés chez le poisson comme l'édition par nucléases (Zinc Finger ; TALLENs) ou par CRISPR/Cas9 (Sertori et al., 2016).

1.4. Contribution du modèle *zebrafish* à la recherche

La conservation des systèmes anatomiques avec les autres vertébrés fait du *zebrafish* un modèle versatile utilisé dans de multiples domaines de recherche. A son introduction au laboratoire, le poisson zèbre était utilisé majoritairement pour l'étude du développement. Il a permis d'élucider les mécanismes de formation des axes embryonnaires et de définir des étapes clef de différenciation cellulaires. En outre, *zebrafish* possède une grande plasticité génétique et de nombreux tissus peuvent être régénérés après lésion, ce qui fait un modèle essentiel pour comprendre l'identité cellulaire (Jopling et al., 2012; Umeda et al., 2016). La conservation de l'organisation du système nerveux et la bonne connaissance de ses circuits neuronaux ainsi que leur relative simplicité, combinés avec la présence de tests cognitifs et locomoteurs simples en font un modèle essentiel pour les maladies neurologiques (Adams and Kafaligonul, 2018; Barbereau et al., 2021; Ciura et al., 2016). Il est également utilisé pour étudier des troubles neurodévélopmentaux ou psychiatriques comme l'autisme ou la schizophrénie (Kabashi et al., 2011b). Le grand nombre d'individus par ponte, combiné avec la conservation génétique font du *zebrafish* un choix pertinent pour le criblage de mutations, de toxines et pour les tests précliniques de molécules thérapeutiques (Barbereau et al., 2021; MacRae and Peterson, 2015).

2. Système moteur du *zebrafish*

2.1. Organisation anatomique du système moteur

Les noyaux supra-spinaux impliqués dans la commande motrice chez le *zebrafish* se situent dans le tronc cérébral (Becker et al., 1997)(Becker et al., 1997). Ils comprennent des neurones réticulo-spinaux, vestibulo-spinaux et réticulaires qui forment le faisceau longitudinal médian (MLF) (Brustein et al., 2003). Les neurones reticulo-spinaux les mieux caractérisés sont le neurone de Mauthner et ses homologues MiD2 et MiD3 (Fig. No) qui sont impliqués dans la réponse d'échappement (Babin et al., 2014; Brustein et al., 2003). Les neurones du tronc cérébral projettent leurs axones dans la moelle épinière au niveau ventro-médian et contactent majoritairement des interneurones et certains motoneurones spinaux impliqués dans le contrôle des muscles axiaux (Babin et al., 2014). Chez le poisson il n'existe pas de motoneurones reliant le cortex à la moelle comme le font les voies descendantes directes chez l'Homme *(cf.*

Figure 3 : Élaboration hiérarchique de la commande motrice **adapté d'après** (Purves, 2004)**.** Le premier niveau est constitué des structures corticales et des ganglions de la base, qui intègrent les informations sensorielles et élabore une stratégie de réponse motrice (I). Le cortex moteur et le cervelet définit ensuite les paramètres spatio-temporels de cette réponse (II). Enfin, les voies descendantes acheminent les informations motrices jusqu'aux muscles (III).

3.1.2. Les Voies descendantes directes*).* Les neurones reticulo-spinaux sont cependant conservés chez les mammifères. Chez l'humain, ils forment le faisceau ventro-médian qui contacte majoritairement des interneurones spinaux et certains motoneurones spinaux qui contrôlent les muscles du dos, de la tête et du cou *(Cf. 3.1.3. Les Voies descendantes indirectes).*

Au niveau de la moelle épinière du *zebrafish* il existe deux types de motoneurones : les **motoneurones primaires (PMN)** et les **motoneurones secondaires (SMN)** (Beattie, 2000; Drapeau et al., 2002). Ils sont nommés en fonction de leur ordre d'apparition au cours du développement et ne correspondent pas au premier et deuxième motoneurone chez l'Homme *(Cf. 3.1.5. Les motoneurones spinaux)* (Adams and Kafaligonul, 2018; Brustein et al., 2003). Il n'existe pas d'équivalent des PMN identifiés chez l'Homme, tandis que les SMN correspondent aux motoneurones α (Babin et al., 2014). Les PMN apparaissent lors de la gastrulation (9-10 hpf), ils sont larges, peu nombreux et leurs projections axonales se forment le premier jour du développement (Beattie, 2000; Lewis and Eisen, 2003). En fonction de leur position et de leurs projections, il est possible de distinguer trois types majeurs de PMN : le motoneurone caudal primaire (CaP) qui innerve le myotome ventro-médian, le motoneurone primaire médian (MiP) qui projette vers les muscles le myotome dorso-médian et le motoneurone primaire rostral (RoP) qui innerve les muscles latéraux du myoseptum horizontal. (Beattie, 2000; Lewis and Eisen, 2003). Chaque hémi-segment de la moelle épinière contient les 3 PMN. Ils ont une position précise et leurs projections axonales se forment de manière précise et stéréotypé, ressemblant à la lettre J (Beattie, 2000). Les SMN apparaissent plus tard (14-15 hpf), ils sont plus nombreux et de plus petite taille, ayant des projections axonales plus fines (Beattie, 2000; Lewis and Eisen, 2003). Dans chaque hémi-segment de la moelle il existe environ 20 SMN, leurs axones se projettent en suivant celles des PMN (Beattie, 2000). Les axones des deux types de neurones forment le nerf dorsal et le nerf ventral (Beattie, 2000).

Le myotome de *zebrafish* est constitué de fibres rapides et de fibre lentes, organisées en forme de chevron et adoptant des positions précises dans le tronc (Beattie, 2000). Les fibres lentes constituent une monocouche en superficie, qui entoure le myotome (Babin et al., 2014; Beattie, 2000). Elles ont un petit diamètre, possèdent un métabolisme oxydatif et sont résistantes à la fatigue (Buss and Drapeau, 2000). Chaque fibre lente est innervée par plusieurs SMN (Babin et al., 2014). Dans les couches profondes du myotome se trouvent des fibres musculaires rapides fatigables, qui sont de plus grand diamètre et ont un métabolisme glycolytique (Buss

and Drapeau, 2000). Chaque fibre rapide est innervée par un PMN et plusieurs SMNs (Babin et al., 2014). Ainsi, les muscles lents sont utilisés lors d'une nage soutenue, tandis que les muscles rapides sont utilisés pour une nage rapide (Babin et al., 2014).

Le système neuromusculaire de *zebrafish* utilise les mêmes neurotransmetteurs que chez les mammifères.

2.2.La locomotion durant les premier 48h et le réflexe TEER

Les premiers mouvements sont observés à 17 hpf quand les embryons commencent à se retourner au sein de leur chorion (Drapeau et al., 2002; Saint-Amant, 2010). Ces mouvements résultent d'une activité spontanée des motoneurones primaires indépendamment des centres supra-spinaux (Drapeau et al., 2002; Saint-Amant, 2010). Vers 21 hpf les embryons peuvent désormais répondre au toucher avec une torsion du corps qui résulte en un retournement par-dessus de leur tête (Drapeau et al., 2002). Vers 27 hpf, l'embryon se retourne plus rapidement et peut s'échapper en nageant (Drapeau et al., 2002; Saint-Amant, 2010). Lors de l'apparition de la locomotion, la fréquence des battements de la nageoire est lente (20Hz) et augmente au cours du développement larvaire (400Hz). Ainsi, à 48 hpf la larve répond au toucher avec une nage explosive (*burst swimming).* La réponse d'échappement au toucher *(TEER touch evoked escape response)* est le premier comportement locomoteur complexe et représente un réflexe permettant de s'échapper d'un prédateur (Pietri et al., 2009). Cette réponse implique l'action coordonnée de plusieurs neurones du générateur central de mouvement (CPG) *(Cf :*3.2. Modulation de l'activité des motoneurones spinaux*)*.

Le CPG à ce stade embryonnaire comprend des mécanorécepteurs (les cellules de Rohon-Beard, RB), des interneurones et des motoneurones, qui ensemble régulent les paramètres du mouvement (Fig. N) (Berg et al., 2018). En effet, différents mécanismes cellulaires sont mis en place en fonction de l'endroit où le stimulus tactile est appliqué. L'arc reflexe d'une stimulation au niveau caudale comprend les cellules RB, des interneurones CoPA (commissural primaire ascendant) et des interneurones CiD (circonférentiel descendant) (Pietri et al., 2009; Umeda et al., 2016). La réponse sensorimotrice est induite par une signalisation glutamatergique AMPA-dépendante.

Les cellules RB sont les méchanosenseurs embryonnaires possédant des terminaisons libres au niveau cutané (Faucherre et al., 2013). Leurs corps cellulaires sont situés dans la moelle épinière où se finissent également la majorité de leurs terminaisons axonales (Umeda et al.,

2016). L'activation de plusieurs cellules RB par le toucher provoque une flexion du côté opposé à la stimulation *(C-start),* suivie d'un échappement brusque *(burst)* (Pietri et al., 2009; Umeda et al., 2016). Les cellules RB forment des synapses en passant sur les corps cellulaires des interneurones CoPA. Ces derniers envoient l'information sensorielle du côté controlatéral de la moelle épinière via une commissure rostrale. Le mécanisme exact permettant d'activer les motoneurones controlatéraux reste inconnu. Il est suggéré qu'au niveau rostral, les interneurones CoPa effectuent des synapses glutamatergiques avec des interneurones CiD descendants qui activeraient les motoneurones à leur tour (Pietri et al., 2009; Umeda et al., 2016).

2.3. La réponse motrice aux stimuli visuels et auditifs et le *startle*

Dès 4 jpf, les systèmes olfactif et visuel des larves, malgré le fait qu'ils ne soient pas encore totalement différenciés, sont en mesure de répondre à des stimulations (Neuhauss et al., 2003 ; Vitebsky et al., 2005). A 5 jpf, le système auditif des larves de poisson-zèbres est lui aussi en mesure de percevoir des stimulations sonores (Burgess et Granato, 2007 ; Wolman et al., 2011) ainsi que l'habituation à des stimulations lumineuses ou sonores répétées (Roberts et al., 2011).

En tenant compte de ces informations, il est possible de réaliser de manière précoce des tests comportementaux permettant d'analyser les performances motrices ainsi que l'intégrité des systèmes sensorimoteur des larves de poisson-zèbres. Les tests s'intéressant à l'activité locomotrice liée à la présence ou l'absence de lumière ont été développés, comme le test du « *visual motor response* » (VMR). Le test VMR est basé sur une alternance de périodes avec et sans lumière. La mesure de l'activité locomotrice des larves est effectuée, soit au moment du changement de lumière, il s'agit alors d'une réaction réflexe à un changement de lumière, soit pendant toute une période de lumière, ce qui se rapporte plus à de la locomotion. Lors des premiers stades larvaires, entre 5 et 7 jpf, les larves ont une activité locomotrice très faible en présence de lumière, et une activité locomotrice augmentée en absence de lumière. Ces réactions au test VMR mettent en jeu le système visuel, qui permet aux larves de réagir aux changements de lumière, et l'activité locomotrice qui est observée lors de chaque période (Deeti et al., 2014 ; Kist et Portugues, 2019).

L'accoustic startle response (ASR) est un test permettant d'étudier la réaction locomotrice des larves suite à une courte stimulation sonore. Comme vu précédemment, le système auditif

du poisson-zèbre commence à être opérationnel à partir de 5 jpf, il est donc possible d'étudier l'audition à partir de ce stade. Ce test implique différents systèmes qui sont l'audition et la locomotion. Cependant, la stimulation sonore induit aussi une vibration dans l'eau qui peut potentiellement déclencher une réponse liée au système mécanosensoriel de la ligne latérale. Avant 5 jpf, les réactions locomotrices observées lors d'un test ASR sont donc probablement liées à une réponse via le système mécanosensoriel des larves de poisson-zèbres (Liu et al., 2018 ; Ogino et al., 2019).

3. Modélisation de la SLA dans *zebrafish*

Le modèle *zebrafish* est validé pour l'étude de plusieurs gènes de la SLA en récapitulant des caractéristiques physiopathologiques communes avec les modèles murins de la SLA et avec l'Homme. Parmi les signes caractéristiques nécessaires à la validation du modèle sont une perturbation de la locomotion et/ou la paralysie, l'axonopathie des motoneurones, la perte des motoneurones, l'atrophie musculaire, une perte de force musculaire et une perte de la jonction neuromusculaire (JNM). Ces signes peuvent être observés aussi bien chez la larve que chez l'adulte. Il existe plusieurs lignées transgéniques pour chacun des gènes connus ainsi que des modèles de surexpression ou d'inactivation transitoire (Tableau iii).

3.1. Les modèles *zebrafish* du gène *SOD1*

Il existe des modèles de surexpression stable par transgénèse de *SOD1* et des modèles de surexpression transitoire par injection d'ARNm. Une première étude en 2007 décrit la surexpression transitoire de *SOD1 WT* et de trois mutations de *SOD1 : A4V, G93A et G37R* (Lemmens et al., 2007). Elle démontre que l'injection d'ARNm des variants humains mutants induit un raccourcissement des axones des motoneurones CaP chez la larve et provoque un branchement axonal important chez les mutants (Lemmens et al., 2007). Ce phénotype est sauvé ou aggravé respectivement par co-expression ou par inactivation du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Lemmens et al., 2007). D'autres études de surexpression transitoire de *SOD1 G93A* et de *SOD1 A4V* ont confirmé les résultats observés (Korac et al., 2013; Robinson et al., 2019; Sakowski et al., 2012; Sangwan et al., 2017). Par la suite, il a été montré que la surexpression transitoire de *SOD1 A4V* provoque un phénotype moteur chez les

larves dès 48 hpf avec une diminution de la distance parcourue à la nage suite à une stimulation lumineuse (Robinson et al., 2019).

Concernant les modèles transgéniques du gène *SOD1*, il en existe plusieurs dont le phénotype est comparable au modèle murin *G93A*. Plusieurs équipes ont créé des lignées de surexpression de la mutation *G93R* du gène endogène *Sod1* sous l'effet de son propre promoteur (Ramesh et al., 2010). Ces poissons ont une diminution du nombre des JNM dès l'âge de 11 jours post fécondation (Ramesh et al., 2010). A l'âge de 12 mois, les poissons mutants ont une endurance diminuée par rapport aux poissons exprimant le variant sauvage (Ramesh et al., 2010). Curieusement, au même âge, les poissons mutés présentent une meilleure résistance à la fatigue, de manière similaire aux observations faites chez le modèle murin de *Sod1 G93A* (Ramesh et al., 2010). Dans des stades avancés de la maladie, ces poissons subissent une perte des motoneurones, une paralysie et une atrophie musculaire comme décrit précédemment chez la souris (Ramesh et al., 2010). En outre, deux équipes utilisant les mêmes lignées avec *G93R* décrivent une désorganisation précoce des circuits neuronaux et l'implication des interneurones dans la physiopathologie de la SLA (Benedetti et al., 2016; McGown et al., 2013).

La surexpression stable et ubiquitaire de *SOD1 G93A* humain dans *zebrafish* provoque chez l'adulte une diminution de la vélocité de nage spontanée et une augmentation du temps de repos avec la progression de la maladie (Sakowski et al., 2012). De plus, chez ces poissons, on observe également une perte de la jonction neuromusculaire suivie par la dégénérescence des motoneurones (Sakowski et al., 2012). Un article récent montre que la surexpression tissu-spécifique de *SOD1 G93A* dans les oligodendrocytes de *zebrafish* induit leur dégénérescence. Ceci provoque et la perte de la gaine de myéline et la diminution de l'expression du transporteur monocarboxylate 1 (MCT1), causant ainsi une dégénérescence des motoneurones spinaux (Kim et al., 2019).

3.2.Les modèles *zebrafish* du gène OPTN

L'inactivation transitoire du gène *Optn* par morpholinos résulte en une axonopathie similaire à celle induite par surexpression transitoire du variant *SOD1 G93A,* provoquant un raccourcissement des projections axonales et une augmentation des branchements (Korac et al., 2013). La co-expression de l'ARNm de *SOD1 G93A* et du morpholino contre *Optn* résulte en une aggravation du phénotype induit par la mutation *G93A* (Korac et al., 2013). Ces observations ne sont cependant pas confirmées chez la ligné *optineurin (optn)*^{sa0143} qui

comporte une mutation nulle de *l'optn* endogène (Paulus and Link, 2014). Cette lignée comporte la mutation *L278X,* provoquant un codon stop prématuré et une protéine non fonctionnelle (Paulus and Link, 2014). Les mutants homozygotes de la lignée *optn*^{sa0143} ne présentent pas de défauts majeurs du comportement, ni de la fertilité, ni de la survie (Paulus and Link, 2014). Les larves de cette lignée présentent des défauts morphologiques mineurs (petits yeux et tube digestif raccourci) qui sont compensés au cours du temps. Dans les stades précoces de développement de cette lignée, il y a une augmentation de la mort cellulaire par apoptose et un ralentissement du trafic cellulaire dans les axones longitudinaux de la moelle épinière (Paulus and Link, 2014).

IV. Présentation du projet de recherche du doctorat

Ce chapitre présente les projets de recherche du doctorat en abordant les questions clefs pour chacun d'entre eux, ainsi que les différentes hypothèses et les approches utilisées pour les tester.

1. Avant-propos

La pathologie moléculaire des maladies neurodégénératives se développe ces derniers années, grâce à l'avancement dans les technologies de séquençage. Connaitre les gènes causaux de ces maladies permet de mieux comprendre les processus pathologiques sous-jacents et peut contribuer à la découverte de cibles thérapeutiques. Il s'avère que les maladies neurodégénératives ont une architecture génétique complexe et elles peuvent avoir des gènes de susceptibilité voir des gènes causaux communs (Perrone et al., 2021). Les études de GWAS ont identifié de nombreux variants fréquents, impliqués dans la modulation des phénotypes cliniques ou dans l'augmentation de la prédisposition à certaines maladies neurodégénératives. Les études de liaison génétique auprès des formes familiales a relevé la présence de variants rares qui ont une grande pénétrance. Le séquençage à haut débit a permis d'identifier plusieurs nouveaux gènes impliqués et a souligné le rôle des variants rares ainsi que la complexité génétique de ces maladies. Certains de ses variants n'ont jamais été décrits et les données fonctionnelles manquent pour définir leur implication dans chacune de ces maladies. Afin de

mieux comprendre la physiopathologie des maladies neurodégénératives, il est nécessaire de caractériser au mieux ces variants. Dès lors, l'analyse fonctionnelle des variant rares devient un défi commun à toutes ces maladies.

Le Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire de Nîmes et l'un des trois centres de diagnostic moléculaire de la SLA en France. Dans cette plateforme, le séquençage des patients est effectué en priorité sur les gènes *C9ORF72* et *SOD1.* Si aucun variant causal n'est retrouvé dans l'un de ces deux gènes, alors un séquençage NGS est effectué sur un panel de 47 gènes associés à la SLA. La plateforme de séquençage de Nîmes dispose d'une base de données de plus de 400 patients et de nombreux nouveaux variants rares sont identifiés. L'équipe de « Pathologie du Motoneurone : Inflammation et Thérapie » a pour objectif la compréhension des mécanismes extrinsèques menant à la dégénérescence sélective des motoneurones et la proposition de stratégies thérapeutiques. Elle comprend de nombreux spécialistes de différents domaines dont des scientifiques, des neurologues et des généticiens moléculaires. L'équipe s'appuie sur différents modèles *in vitro* et *in vivo*, comprenant la souris SOD G93A et plusieurs modèles de drosophile. Mon projet de thèse qui a commencé en Novembre 2017 s'inscrit dans la thématique « Clinique et génétique de la SLA » avec le but de lier la recherche clinique à la recherche fondamentale à travers l'analyse fonctionnelle des variants génétiques de la SLA identifiés chez l'Homme.

2. Contexte et objectifs de la thèse

En dix ans de séquençage au CHU de Nîmes, les bases de données de la plateforme se sont enrichies en variants VUS et PP identifiés chez les patients. Souvent, ces variants sont rares et il n'existe pas d'études fonctionnelles quant à leur lien avec la SLA. La plateforme de génétique a recherché alors à développer un outil de criblage fonctionnel pour mieux caractériser leur pathogénicité. Le but de ma thèse est de mettre en place et de développer différentes stratégies pour l'analyse fonctionnelle des variants génétiques de la SLA. Nous avons analysé les bases de données de séquençage du CHU de Nîmes et nous avons constitué une liste de variants candidats dans plusieurs gènes de la SLA. Au début, deux modèles animaux ont été choisis: le ver *C. elegans* et le *zebrafish*. En effet, ces modèles présentent plusieurs avantages dont la

conservation génétique, la facilité de manipulation et le fait qu'ils sont déjà utilisés pour modéliser la SLA. Dans le cadre de mon projet de thèse, nous avons mis en place une collaboration avec les plateformes ZeNeuro et ZeSens au sein du laboratoire Mécanismes moléculaires dans les Démences Neurodégénératives à la faculté de Montpellier.

Nous avons choisi de commencer par étudier les variants dans les gènes *SOD1* et *OPTN.* Le gène *SOD1* qui code pour l'enzyme superoxyde dismutase est responsable de 20% de tous les cas de SLA. Il est actuellement une des cibles majeures de la thérapie génique. En conséquence, le séquençage de *SOD1* devient prioritaire en clinique et de nouveaux variants rares seront sûrement dévoilés. Dès lors, il sera essentiel de caractériser au mieux leur pathogénicité et de connaître leur effet fonctionnel. Les mutations dans ce gène sont majoritairement de type gain de fonction et provoquent la formation d'agrégats protéiques toxiques pour la cellule. Les variants que nous avons choisi dans notre base de données sont : D126N, K137*, E134del et I150M. Le gène *OPTN* est un gène mineur de la SLA qui code pour une protéine impliquée dans le transport cellulaire, le maintien de l'intégrité de l'appareil de Golgi et la réaction inflammatoire par inhibition du facteur nucléaire NF-kappa β. Les formes mutées de ce gène altèrent certaines de ses fonctions mais provoquent également la formation d'agrégats. Le variant candidat de ce gène est le L429R.

Au vu de notre avancement sur *zebrafish* et des résultats prometteurs que nous avons obtenus, nous avons préféré nous focaliser sur ce modèle. Néanmoins, le modèle *C. elegans* sera retenu ultérieurement en tant que modèle complémentaire.

Dans le contexte de la thèse, nous avons essayé de répondre à plusieurs questions et avons défini plusieurs objectifs et stratégies :

1. Est-ce que la surexpression des variants provoque- des défauts sur la locomotion ?

- **Caractériser le phénotype moteur des larves surexprimant les variants**

Pour répondre à cette question nous avons développé des tests locomoteurs permettant d'analyser différents paramètres de la locomotion.

2. Est-ce que la surexpression des variants candidats a un effet neurotoxique ?

- **Caractériser la neurotoxicité induite par la surexpression des variants**

Nous analysons la longueur des projections axonales des motoneurones et leurs branchements ainsi que l'intégrité de la jonction neuromusculaire.

3. Est-ce que les variant candidats se comportent comme des variants pathogènes ?

- **Analyser les phénotypes induits par la surexpression de variants pathogènes connus et voir si les variants candidats présentent les mêmes phénotypes.**

Les phénotypes provoqués par la surexpression des variants de *SOD1* sont comparé avec les effets des variants pathogènes A5V et G94A ainsi qu'avec le variant SOD1 WT. Les phénotypes provoqués par le variant OPTN L429R est comparé avec le variant pathogène E478G et le variant OPTN WT.

MATERIEL ET METHODES

1. Choix des variants génétiques

28 variants candidats sont choisi dans le gène *SOD1*, 3 Variants du gène *OPTN*, 4 variants du gène *SQSTM,* 3 variants du gène *FUS* et 4 variants du gène *UBQLN (ANNEXE)*. Dans le cadre de ce travail sont analysés fonctionnellement quatre variants candidats du gène SOD1 : D126N ; E134del, K137* et I150M : et un variant candidat du gène OPTN , le E478G. La classe pathogénique des variants est déterminée suivant les règles du collège américain de génétique médicale (Richards et al., 2015a). Tous les variants sont dessiné *in silico* dans la plateforme *benchling.*

2. Constructions moléculaires

Toutes les séquences des variants humains sont intégrées après le promoteur *SP6* du plasmide *pCS2+* qui est un cadeau de Dr Anette Vergunst. Les séquences des variants SOD1 WT, SOD1G94A et SOD1A5V sont sous-clonées à partir de plasmides *pCR2.1-WT, pCR2.1-G94A et pCR2.1-A5V* par restriction avec BamHI et EcorI, suivie d'une ligation avec la T4 ADN ligase en respectant un ratio de 1:2 en faveur de l'insert Les variants D126N ; E134del, K137* et I150M du gène *SOD1* et les variants du gène *FUS* sont obtenus par mutagénèse dirigée *via* PCR à l'aide du kit Q5® Site-Directed Mutagenesis de NEB sur la séquence de *SOD WT* du plasmide pCR2.1, puis la même procédure de sous-clonage est suivie. Les variants des gènes *OPTN*, *SQSTM* et *UBQLN* sont commandés par synthèse de gènes auprès de la société Genscript.

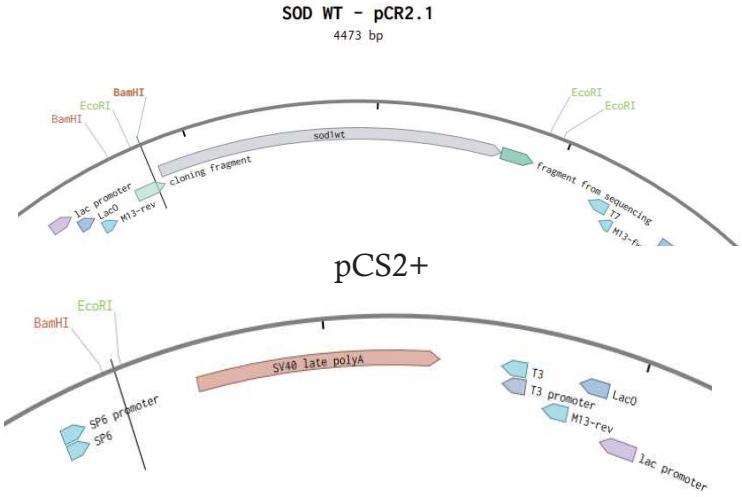


Figure 17 **Plasmides pCR2.1 et pCS2+ :**La séquence du gène *SOD1 WT* est sous clonée dans les sites BamHI et EcoRI. dans le vecteur pCS2+, en amont du promoteur *SP6*

Tableau : Liste des amorces utilisées pour la mutagénèse dirigée

Couple de primers	Séquence	Bp	%GC	Tm	T opt	Variant
pCR2.1-SOD376G>A 4/17/2018_F	AAAAGCAGATaACTTGGGCAAAG	23	39	60°C	61°C	SOD1 D126N
pCR2.1-SOD376G>A _4/17/2018_R	TCATGGACCACCAGTGTG	18	56	64°C		
pCR2.1-SOD450T>G 4/17/2018_F	GTGGTGTAATgGGGATCGCCC	21	62	66°C	63°C	SOD1 I150M
pCR2.1-SOD450T>G 4/17/2018_R	AAGCCAAACGACTTCCAG	18	50	62°C		
pCR2.1-SOD409A>T 4/17/2018_F	AGAAAGTACAtAGACAGGAAACG	23	39	58°C	59°C	SOD1 K137*
pCR2.1-SOD409A>T 4/17/2018_R	TCATTTCCACCTTTGCCC	18	50	62°C		
pCR2.1-SOD400-402del 4/17/2018_F	AGTACAAAGACAGGAAAC	18	39	56°C	57°C	SOD1 E134del
pCR2.1-SOD400-402del 4/17/2018_R	TTCATTTCCACCTTTGCC	18	44	60°C		
pCi-Neo-FUS139A>G_4/17/2018_F	GTCCACGGACgCTTCAGGCTA	21	62	67°C	66°C	FUS
pCi-Neo-FUS139A>G 4/17/2018_R	TGGCTATAACCACTGTAACTCTG	23	43	65°C		
pCi-Neo-FUS730C>T 4/17/2018_F	ACCCAGAGGTtGTGGAGGTGG	21	62	69°C	66°C	FUS
pCi-Neo-FUS730C>T 4/17/2018_R	TCATAGCCACCACTGCTG	18	56	65°C		

3. Transformation bactérienne par *heat shock*

Tous les plasmides sont amplifiés en transformant des bactéries chimiocompétentes *E. coli DH5 alpha* par choc thermique : 10 - 50ng de plasmide sont ajoutés à 50µl de suspension bactérienne. Les bactéries sont laissées 30 minutes sur glace, puis soumises à un choc thermique à 42°C pendant 1min 30. Elles sont remises sur glace pour 2 min et par la suite 900µl de milieu LB froid sont rajoutés. Les bactéries sont laissées récupérer pendant 1H à 37°C sous agitation à 120rpm. Enfin, 100µl de la suspension bactérienne concentrée sont étalées sur boîte de LB gélose supplémentés en antibiotique en fonction du marqueur de sélection du plasmide (100 µg/mL d'ampicilline ou 50µg/mL de kanamycine).

4. Extraction d'ADN plasmidique

Pour le séquençage, l'ADN plasmidique est extrait par mini prep à partir de 10 UFC par boîte. Les plasmides sont digérés par BamHI et KpnI pour déterminer le sens de l'insertion. Pour les plasmides contenant l'insert dans le bon sens, 2 tubes sont choisis et envoyés à séquencer. Après le séquençage les plasmides qui ont intégrés les constructions sont amplifiés par midi

prep est stockés à – 80°C pour lees stocker sur le long terme et à -20°C pour l'utilisation de tous les jours.

5. Synthèse et purification d'ARNm

Les ARNm sont obtenus à partir de chaque plasmide *pCS2+* en utilisant le kit mMESSAGE mMACHINE™ SP6 d'Invitrogen et en suivant les instructions du producteur.10ug de chaque plasmide est linéarisé par l'enzyme Not I (5' G C / G G C C G C 3') à 37°C sur la nuit. La réaction est arrêtée en incubant les solutions à 65°C pendant 15 min. Les plasmides linéarisés sont ensuite purifiés sur gel d'agarose de 0.8% en utilisant le kit Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up de MACHEREY-NAGEL. Les plasmides sont élués dans de l'H_2O RNase free, puis dosés au NanoDrop ; 1µg de chaque plasmide linéarisé est incubé avec l'ARN polymérase SP6 pendant 2H à 37°C enfin 5 µL de DNase sont rajoutés pour digérer le plasmide restant. Par la suite, les ARNm sont purifiées sur colonne en utilisant le kit RNeasy Mini Kit de Quiagen. Après vérification de la qualité de l'ARNm sur gel d'agarose à 1.2%, les ARNm sont aliquotes dans de l'H_2O RNase free. Torois concentrations d'ARNm de *SOD1* : 500pg, 250pg et 100pg sont premièrement testées afin d'obtenir la concentration optimale à laquelle les embryons ne présentent pas de défauts morphologiques. Lors de l'optimisation de l'injection, la concentration de l'ARNm de mCherry ou de GFP est de 80pg

La concentration de 100pg est retenue pour tous les variants *SOD1 et OPTN.*

6. Lignées *zebrafish*

Les lignées de *zebrafish* sont issues de la plateforme de la faculté de sciences de Montpellier. Elles sont maintenues à 28 °C en respectant toutes les conditions éthiques et d'élevage. Deux lignées de *zebrafish* transgéniques et la lignée sauvage AB sont testées afin de choisir celle qui est la plus adaptée à la visualisation des branchements neuronaux des motoneurones CaP. La lignée *NBT Tg (nbt:dsRed)* qui exprime la protéine fluorescente rouge *dsRed* sous le promoteur de la beta tubuline et *islet* qui exprime une protéine fluorescente rouge sous le promoteur . Nous avons opté pour la lignée AB suivie d'un marquage immunohistochimique des projections neuronales.

7. Injection

L'injection d'ARNm dans l'embryon s'effectue au stade de 1 cellule à l'aide d'une aiguille capillaire en verre de diamètre de 0,78mm. Une fois l'ARNm introduit dans l'aiguille celle-ci est associé à une pompe de pression Femto Jet. La pression d'injection, le temps d'injection et la pression de retour sont calibrés manuellement entre chaque nouvelle aiguille pour obtenir une goutte de volume 1nL.

8. Analyse morphologique des larves de *zebrafish*

Les larves sont analysées visuellement pour un retard du développement à 7hpf, 24hpf et 48hpf. Le taux de fécondation est déterminé à 7hpf et les œufs non fécondés sont enlevés. La mortalité et les retards de croissance sont évalués à partir de 24hpf jusqu'à 2dpf. Les embryons morts ou malformés sont enlevés.

9. Analyse du comportement moteur par TEER

Le test TEER est effectué sur des larves déchorionnés à 2jpf. Les larves sont placées dans une boîte au centre d'une boîte de Pétri de diamètre de 15cm contenant de l'eau embryonnaire E3 à 28°C. Elles sont laissées s'habituer pendant 30s et ensuite elles sont touchées légèrement au niveau de la nageoire caudale à l'aide de pinces de dissection couvertes d'un cône de pipette. Le mouvement des poissons est enregistré par le programme vitesse de 22 cadres par seconde à l'aide d'une camera Grasshopper2 (FLIR) et du logiciel FlyCapture. Le déplacement des poissons est analysé avec le plugin Manual Tracking de ImageJ et les différents paramètres de mouvement sont calculées manuellement.

10. Extraction protéique et Western Blot

Après les expériences de TEER, les larves sont anesthésiées sur de la glace puis placés dans du buffer RIPA (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5 sodium deoxycholate, 1% Triton + d'inhibiteurs de protéases de Roche Diagnostics). Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines totales est prélevé et un dosage BCA est réalisé. 15µg de protéines sont ensuite prélevés, dilués dans du laemmli 2X et chauffés 5min à 95°C. Les échantillons protéiques sont séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en gradient de polyacrylamide de 4 à 20% pendant 1H à 110V. Puis, le transfert semi-sec est effectué sur membrane de

nitrocellulose de 0.2µm dans un appareil BioRad avec programme de transfert de protéines à poids moléculaire mixte (15V pendant 7min). La membrane est ensuite lavée et la coloriés dans du rouge du Ponceau pour vérifier la présence de protéine. Après trois lavages dans tu TBST 0.3%(150mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8 et 0.3% Tween-20) et saturée pendant 1h à température ambiante dans une solution de blocage TBST0.3% + régilait à 4%. La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaires dilués dans la solution de blocage. Après cinq lavages de 10min dans du TBST, la membrane est incubée 2h à TA dans une solution d'anticorps secondaires dilués dans la solution de blocage. Après cinq lavages de 10min au TBST, les protéines sont détectées par chimiluminescence (ECL, GE Healthcare).

11. Anticorps

Les anticorps primaires utilisés pour les marquages en western blot sont : lapin anti-hSOD1 polyclonal de chez Abcam (*ab52950)* à une dilution de 1/1000 et souris anti-β-actine III (Sigma) à une dilution de 1:5000. Les anticorps secondaires sont couplés HRP et dilués au 1:1000 (Dako). L'anticorps utilisés pour la visualisation des projections neuronales en immunohistochimies est le mouse anti-SV2 (DSHB) à une dilution de 1/200.

12. Immunohistochimie

Des poissons à 2jpf sont placés dans de la PFA (Para formaldéhyde) à 4% et incubées sur la nuit à 4°C. Le lendemain elles sont lavées 4 x10 min dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) avec 0,1% Tween. Les larves sont perméabilisées dans une solution PBS + Triton 1% pendant une heure, puis elles sont mises dans une solution de blocage (1% BSA, 0.1% triton, PBS, 2% Sérum d'âne) pour 3h à TA. Ensuite les poissons sont incubés dans l''anticorps primaire anti-SV2 (1:200; DSHB) dilué dans de la solution de blocage et elles sont incubées 24h à 4°C. lendemain les poissons sont lavés dans du PBS + Triton 0.1% quatre fois pour 10 min. Ensuite les poissons sont incubés pendant 30 min dans de l'α-bungarotoxine conjuguée à Alexa 488 (αBTx, 1/1000, Abcam). Par la suite les poissons sont lavées 3 x 10min dans du PBS et puis sont incubées avec l'anticorps secondaire donkey-anti mouse Alexa-594 dilué dans de la solution de blockage à 1 /1000 pendant un après-midi à 4°C. Les poissons sont lavés 5 fois au PBS puis sont placés dans 70% glycérol pendant 24h avant d'être montés sut lame pour l'observation au microscope.

13. Microscopie

Les images des projections axonales des motoneurones CaP et de la jonction neuromusculaire sont obtenues par microscope confocale ZEISS LSM880 avec ou sans option Airy Scan à l'aide du logiciel ZEN. Des grossissements de x20 et des *Z-stacks* avec un pas optimal sont utilisés.

14. Analyse des projections axonales

La longueur des projections axonales de motoneurones *caudal primary* (CaP) est mesurée à l'aide du plugin SNT de ImageJ qui permet de retracer les projections axonales sur des images en Z-stack.

15. Analyse de la Jonction Neuromusculaire

La jonction neuromusculaire est analysée par le logiciel Imaris sur des reconstitutions en 3D à partir d'images pris au microscope confocale Zeiss LSM880 avec option *Fast Airyscan.*.La fonction collocalisation est utilisée pour calculer le pourcentage de Pearson pour le recouvrement des deux fluorophores.

16. Analyse par VMR et ASR

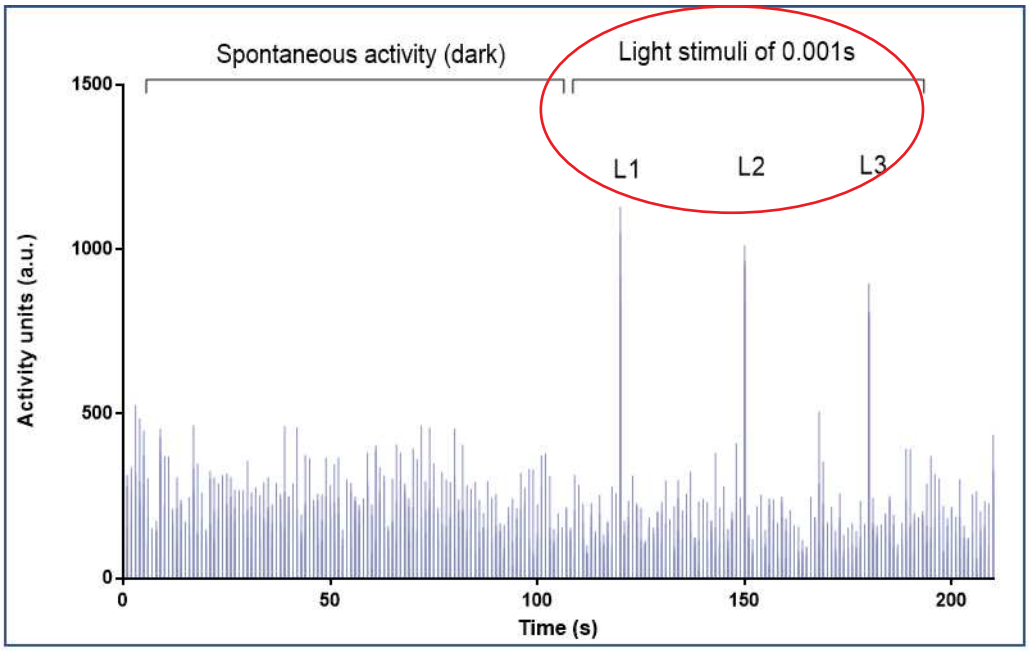
VMR

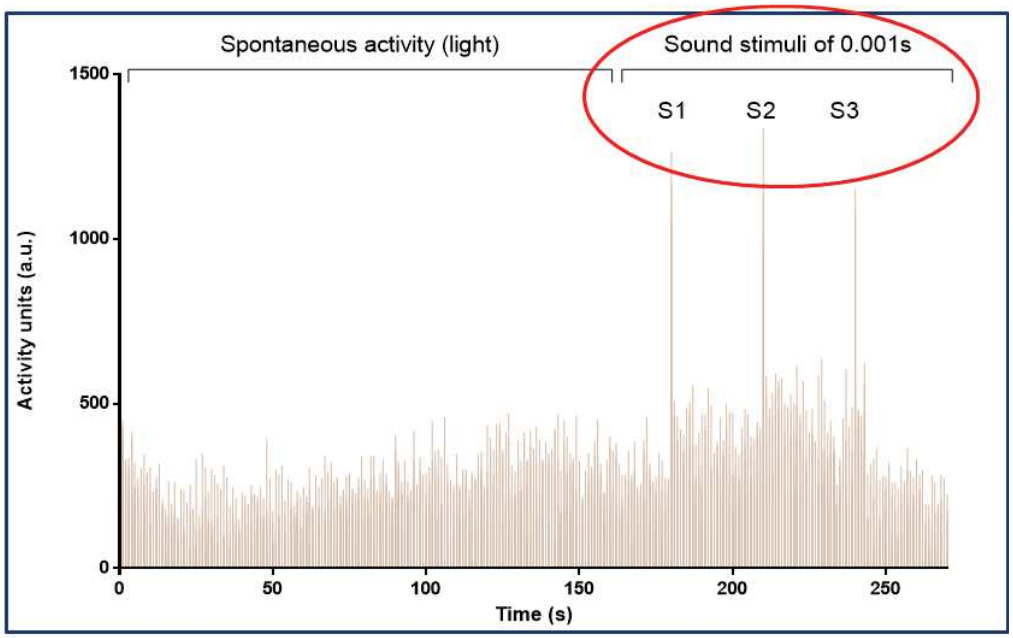
Le test de VMR et le test ASR sont effectués sur des larves à 5dpf. Les larves sont placées dans des plaques de 96puits avec 300 µL d'eau E3 le jour avant l'expérience. Le lendemain les plaques sont mise dans un Zebrabox (Viewpoint) pour la VMR. La durée totale du protocole est de 45 min : Durant les 25 premières minutes les poissons sont laissées dans l'obscurité pour s'habituer, leur activité spontanée est évaluée pendant 5 min à l'issu de la phase d'habitation. Enfin, 3 stimulations lumineuses de 0.001s sont envoyées toutes les 5 minutes. L'activité des larves en réponse à la lumière est analysée pour cette dernière période.

ASR

La durée du protocole d'ASR est également de 45min, cependant l'expérience s'effectue en présence de lumière. Au bout de 30 min, 3 stimulations sonores de 0.001s sont envoyées toutes

les 5 minutes. L'activité des larves en réponse à la lumière est analysée pour cette dernière période.





17. Statistiques

Toutes les données sont traitées avec le logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont représentés comme la moyenne ± SD sous forme de nuage de points où chaque point correspond à un individu. Les valeurs au-delà de 2xSTD sont enlevées manuellement. En fonction de la distribution des données deux tests sont utilisées : pour les populations qui suivent une loi normale une ANOVA avec post hoc de Tukey et une correction de Bonferroni est utilisée, à valeur de $\alpha<0.05$. Les données non-paramétriques sont analysés avec le test de Kruskal-Wallis avec la correction de Dunn, à une valeur de $\alpha<0.05$. Les données sont représentées sous forme normalisée par rapport au groupe de non injectés.

RESULTATS

I. Article

1. Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie déclenchée à l'âge adulte, qui provoque la dégénérescence des motoneurones menant à une paralysie et au décès des patients. Dans 10% des cas, la SLA peut être héritée (SLAfam) et dans 90% des cas, elle est sporadique (SLAspo). La SLA présente une architecture génétique complexe, qui comprend une part monogénique et une part multifactorielle. A ce jour, il existe plus de 150 gènes associés à la maladie, dont 4 sont considérés majeurs : *SOD1, FUS, TARDBP* et *C9ORF72*. La présence d'un variant pathogène dans un de ses gènes peut expliquer jusqu'à 70% des cas familiaux et 11% des cas sporadiques. Indépendamment de la forme qu'ils présentent, les patients sont conseillés à effectuer un diagnostic moléculaire pour rechercher un variant génétique causal de la maladie. Tous les variants sont analysés d'après un système international pour leur attribuer une classe de pathogénicité: Bénin (B), Probablement Bénin (PB), Variant de signifiance indéterminé (VUS), Probablement Pathogène (PP) et Pathogène (P). Parmi les éléments permettant de classer un variant sont sa fréquence dans la population, sa ségrégation et les données fonctionnelles. Le but du diagnostic moléculaire et de caractériser au mieux chaque variant et de le classer comme définitivement bénin ou pathogène. La présence de variants rares chez les patients pose un problème majeur, car les éléments qui les caractérisent sont insuffisants. En conséquence, ils se retrouvent souvent dans une classe VUS. L'analyse fonctionnelle des variants est un élément fort qui permet dans certains cas de redéfinir la classe de pathogénicité de ces variants. Notre étude montre la caractérisation fonctionnelle de quatre variants PP dans le gènes *SOD1* en utilisant le modèle *zebrafish (Danio rerio*). Le gène *SOD1* qui code pour l'enzyme superoxyde dismutase 1 est le premier gène associé à la SLA. Il est actuellement la cible majeure de la thérapie génique par antisens. Les variants candidats de ce gène sont : D126N, K137*, E134del et I150M. Leur effet est comparé avec les variants pathogènes A5V et G94A ainsi que le variant WT. La surexpression des variants candidats et du variants pathogènes chez le *zebrafish* induit des défauts locomoteurs à 2 jours. Tous les variants candidats induisent une diminution significative de la vitesse maximale des poissons à 2jpf. En outre, le phénotype locomoteur à est associé avec des défauts dans les projections axonaux et des perturbations de la jonction neuromusculaire. Cette première caractérisation

fonctionnelle montre que les variants candidats aient un effet pathogène. Enfin cette étude montre que *zebrafish* peut être utilisé comme un outil simple pour cribler la pathogénicité des variants et qui a un potentiel d'application pour le diagnostic moléculaire de la SLA en clinique.

Ici sera présenté l'ébauche du papier qui sera finalisé avec des expériences complémentaires avant d'être soumis pour publication. La partie des matériels est méthodes est enlevé pour faciliter la lecture étant donné qu'elle est équivalente aux matériels et méthodes décrits précédemment.

Zebrafish is a useful model for pathogenicity screening of rare genetic variants in the molecular diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Chudinova A (1), Rossel M (2), Pittion S (3), Bernard E (4), Le-Masson G (5), Camu W (6), Raoul C (7), Lumbroso S (1), Mouzat K (1)

1 INM, Univ. Montpellier, INSERM, U1298, CHU Nîmes, Nimes, France
2 2MMDN, Univ. Montpellier, EPHE, INSERM, U1198, PSL Research University, , Montpellier, France
3 Department of Neurology, CHU de Nancy, Nancy, France
4 Centre SLA de Lyon, Hôpital neurologique P. Wertheimer, Hospices Civils de Lyon, Université de Lyon, Lyon, France, Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon I, 8 Avenue Rockefeller, Lyon, France
5 Department of Neurology, Nerve-Muscle Unit and Centre de Référence Des Pathologies Neuromusculaires CHU Bordeaux (Groupe Hospitalier Pellegrin), University of Bordeaux, Place Amélie Raba-Léon, , Bordeaux, France
6 ALS Center, Département de Neurologie, CHU Gui de Chauliac, Montpellier, France, Motoneuron Disease: Pathophysiology and Therapy, INM, Univ. Montpellier, Montpellier, France
7 Motoneuron Disease: Pathophysiology and Therapy, INM, U1298, Univ. Montpellier, Montpellier, France

Highlights

- Description of a rapid approach for the functional characterisation of ALS genetic variants in zebrafish embryos
- Functional characterisation of 4 candidate *SOD1* variants: N126D, E134del, K137* and I150M
- Overexpression of all candidate variants induces locomotor impairments
- Locomotor defects are consistent with abnormal axonal projections and defects in NMJ

Abstract
Genetic predisposition is considered a major cause for the development of familial forms of Amyotrophic lateral sclerosis (ALS). It is becoming apparent that rare genetic variants are characteristic of the genetic architecture of ALS. Indeed, rare variants in ALS-associated genes are often identified in patients' sequences by routine molecular diagnosis. Pathogenicity of rare

variants may be difficult to interpret, because often they are absent from disease-centered databases and there is little to no functional data about their effect. Functional data is considered a strong element to interpret nex genetic variants. In some cases, it can allow to reclassify the variants of uncertain significance (VUS) or to confirm the pathogenicity of the probably pathogenic variants. Here, we provide the first functional evidence for the pathogenic effect of four patient-derived variants in the *SOD1* gene: D126N, E134del, K137* and I150M and we describe a rapid approach for variant pathogenicity screening using zebrafish *(Danio rerio)*. All four variants were classified as probably pathogenic according to ACMG criteria. Overexpression of the human variants in zebrafish embryos induced significant locomotor impairments at 2 days post fertilization, as observed with the overexpression of the pathogenic A5V variant, but not with the WT variant. Locomotor phenotype was consistent with shortening of the axonal projections of Caudal Primary (CaP) motoneurons, with increased axonal branching and with impairments in the neuromuscular junction (NMJ). Based on our results, we confirm the pathogenicity of all four tested variants. We thus propose an original and efficient tool for genetic variants interpretation.

1. Introduction

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disease that affects both upper and lower motor neurons. There is a great heterogeneity in the clinical manifestation of the disease and it can vary by age of onset, site of onset and speed of progression (Ravits and La Spada, 2009). Overall, patients present muscle wasting and progressive paralysis of all voluntary muscles. The major cause of death is respiratory failure due to denervation of respiratory muscles. The lifetime-risk for developing ALS is 1 in 357 for man and 1 in 436 for women (Ryan et al., 2019). The mean age of onset worldwide is estimated as 60 years and generally the disease evolves in 2-5 years after onset of symptoms (Al-Chalabi et al., 2017). The exact mechanism leading to ALS is still not understood and recent studies propose a multi-step process leading to the disease with genetic predisposition being a major risk factor of some part of the sporadic forms.

Inherited forms of the disease (familial ALS, fALS) account for 10% of all ALS cases and the remaining 90% are considered sporadic ALS (sALS). A single causative variant can be found in around 70-80% of the fALS and in up to 11-14% of apparently sALS (Brown and Al-Chalabi, 2017; Renton et al., 2014). The disease has a complex inheritance pattern, a Mendelian transmission is seen for the majority of the variants, however some of them show reduced penetrance and it is estimated that oligogenic and polygenic interactions may contribute to less than 5% of the apparently sporadic cases (Shatunov and Al-Chalabi, 2021). Rare genetic variants are identified as a major component of the genetic architecture of ALS, with either a sole variant with high penetrance or several low penetrance variants that contribute differentially to disease risk and phenotype (Scarlino et al., 2020; van Rheenen et al., 2016).

The identification of a strong genetic contribution to ALS and the introduction of Next-generation sequencing (NGS) to the clinics results in a higher offer for genetic analysis to patients. For around 30 years, multiple ALS genes have been identified through genetic linkage studies and more recently trough genome wide association studies GWAS and whole exome sequencing WGS (Gregory et al., 2020) . The largest database on ALS genes, ALSoD (https://alsod.ac.uk; Wroe et al., 2008) counts to date more than 150 ALS-linked genes, among which 17 are considered to show sufficient evidence for causality. *SOD1* is the first discovered ALS gene identified through genetic linkage (Gregory et al., 2020). It codes for the enzyme Cu/Zn superoxyde dismutase 1 which catalyses the reduction of O2- into O2 and H2O2.

Different *SOD1* variants can be associated with specific clinical manifestations, for example the A5V and G94A mutations are associated with disease evolving in less than 3 years wether the G94C mutation is associated with a slower progression that can go up to 10years (Yamashita and Ando, 2015). Most *SOD1* mutations lead to gain of function and have autosomal dominant transmission. They are showed to increase protein instability and to induce the formation of toxic protein aggregates.

SOD1 is one of the major targets for upcoming antisense therapies, which will lead to an increased demand for *SOD1* sequencing in molecular diagnosis. More than 186 mutations have been identified in *SOD1.* The identification of a pathogenic *SOD1* variant, could help patients to get involved in clinical trials in the near future. The complete characterization of variant pathogenicity of ALS genetic variants is becoming essential in this context. Analysis of the pathogenicity of genetic variants is performed according to an international classification system developed by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards et al., 2015a). It defines five pathogenic classes: Benign (B), Probably Benign (PB), Variant of Unknown significance (VUS), Probably Pathogenic (PP) and Pathogenic (P).The classification system uses different elements such as the frequency of the variant in the population, *in silico* pathogenicity prediction, experimental evidence and others (Fig1.B). Each element has different strength and can indicate either a pathogenic or a benign effect. A recent study demonstrates the difficulty of applying ACMG criteria for pathogenicity analysis of rare genetic variants in ALS (Lattante et al., 2020b). Those variants can sometimes be absent from databases and there could be little to no functional evidence on their pathogenic effect. Hence, the classification elements are not sufficient to attribute them a definite Pathogenic or Benign class, even though some factors may suggest their involvement in the disease. In consequence, they are often being classified as VUS. The impossibility to attribute a definite pathogenic class to those variants is a major challenge in the molecular diagnosis of ALS.

One way to overcome this challenge is to provide functional evidence for their effect. Functional evidence is considered as a strong element in ACMG classification system, and in some cases, it can allow to redefine the pathogenic class of VUS or to confirm the pathogenicity of PP variants. Moreover, the functional characterization of different ALS variants can help identify variant-specific mechanisms leading to motoneuron degeneration and the underlying clinical heterogeneity and to find novel therapeutic targets.

Here, we perform the first functional characterization of four *SOD1* variants: D126N, E134del, K137* and I150M and we show the use of zebrafish *(Danio Rerio)* as a new tool for rapid variant pathogenicity screening. We compared the effects of overexpression of the candidate variants in the zebrafish embryo with the effects induced with the pathogenic A5V and G93A and with the WT protein.

2. Results

2.1. Identification of candidate variants in *SOD1* gene

SOD1 functions as a homodimer, each monomer contains 154 amino acids and each active site contains one Zn2+ and one Cu+ ions (Fig 1 A, B). Experiments using X-ray crystallographic resolution and NMR (nuclear magnetic resonance) of different forms of SOD1 show that ion binding is essential for the stabilization of the protein's structure and assuring its function (Strange et al., 2007). Moreover, mutations impairing metal binding-sites can provoke the

formation of fibrillary protein aggregates by destabilizing the protein's structure (Di Donato et al., 2003).

We selected four candidate variants in *SOD1* gene from our sequencing database (Fig1 G). All variants in our study are numbered according to the Human Genome Variation Society (HGVS) nomenclature (Dunnen et al., 2016) thus counting the initiating Methionine.

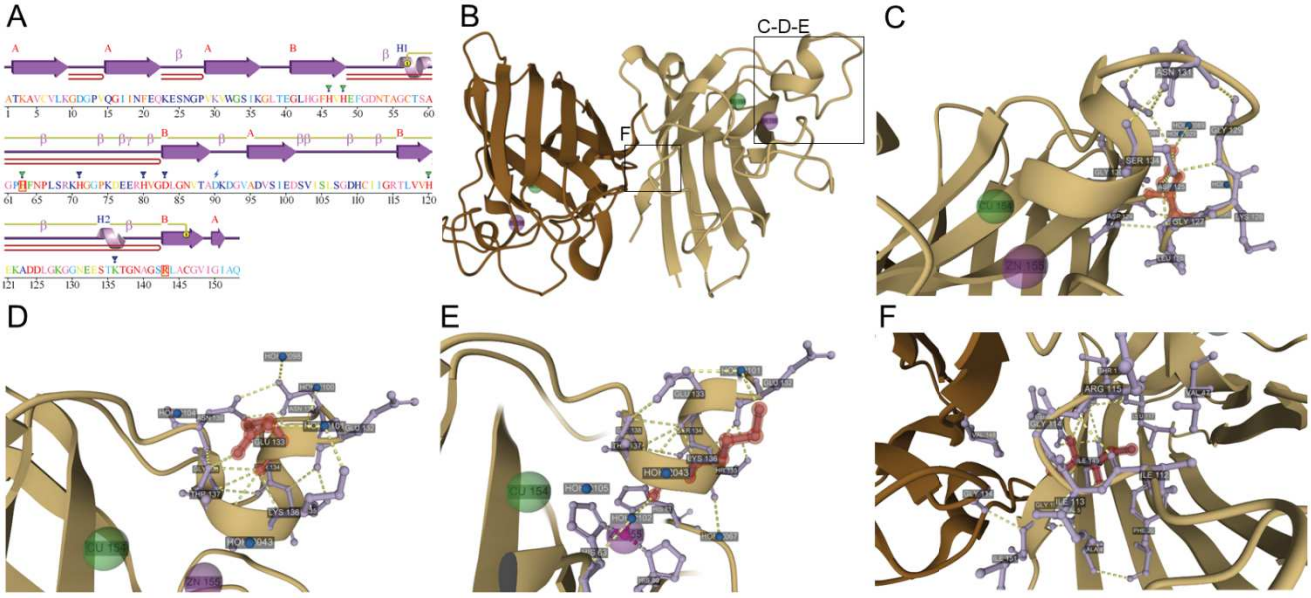
Patient 1 was a 42-years old female presenting a familial form of ALS with spinal onset and predominantly lower motor neuron signs (Fig. S1). Sequencing identified the missense variant c.376G>A leading to the replacement of Aspartate 126 to Asparagine (D126N). Her father (Patient 2) also presented symptoms of ALS, with disease onset at 63 years of age. Sequencing confirmed the co-segregation of the variant D126N. This variant is absent form gnomAD and there is no functional evidence of its effects. It has been reported in fALS form a Turkish cohort (Tunca et al., 2020) There is a known variant at the same position leading to the replacement of D126 with Histidine (D126H) (Enayat et al., 1995). The Amino acid D126 is part of the electrostatic and the zinc-binding loop of SOD1. The missense D126H induces structural perturbations in both loops and is showing reduced Cu and Zn2+ binding capacity compared to the WT protein, suggesting that some of the gain of function effects of *SOD1* mutations may be attributed to both electrostatic loop perturbations and lower metal affinity (Molnar et al., 2009). Based on our analysis of the variant according to ACMG criteria, it has been attributed a Probably Pathogenic class (Fig1.G)

Patient 3 (P3) presented sporadic ALS and was diagnosed at 33 years of age. The patient showed predominantly upper motor neuron signs at onset (UMN) and the disease evolved to the lower motor neurons (LMN) as well. Sequencing revealed the presence of a 3 nucleotides deletion at c.400_402 leading to an in-frame loss of Glutamate at position 134 (E134del) (Fig.1 D). It was described for the first time in another patient with sporadic ALS (Hosler et al., 1996) and it was classified as VUS by another group (Nykamp et al., 2017) . It is situated in the electrostatic loop of SOD1 protein (fig 1 A big square) forms hydrogen bonds with AA involved in the stabilisation of Zn2+ ion and with the Lysine 137 which is one of the active sites of the enzyme (Fig 1 D, E). From a structural point of view, E134del is considered a WT-like variant because it sustains its catalytic activity and metal binding capacity (Molnar et al., 2009). A study analysing effects of mutant variants on the structure of SOD1 shows that E134del leads to perturbation of the electrostatic loop and suggest that such perturbations may lead to abnormal protein interactions (Molnar et al., 2009). However, the overexpression of E134del in HEK cells revealed low propensity to aggregation which was not different from the aggregation propensity of the WT variant (Prudencio et al., 2009). The same study shows that E134del results in an increase of the net negative charge of the protein, but not to reduction in the stability nor the activity of SOD1. To date there is no functional evidence about the effect of E134del *in vivo*. The variant has been identified as VUS by another group (Nykamp et al., 2017) but based on ACMG criteria, we classified it as Probably Pathogenic (Fig.1 G).

Patient 4 (P4) presented a familial form of ALS with a total of 9 affected members in the same family (including patients 5 and 6) (Fig. S2). He was diagnosed at 44 years of age with spinal onset including unilateral fasciculation and weakness in the right arm with rapid progression of the disease. Sequencing revealed a variant at c.409A>T leading to a non-sense variant at Lysine 137 (K137*) causing a premature stop codon. We found co-segregation of the same variant in two other affected family members. All patients showed a rapid disease progression with predominantly LMN impairments. K137* is absent from controls in gnomAD database, and it has been previously described in an Italian study (Corrado et al., 2006). The K137 AA

is situated in the active site of Zn-binding domain of the SOD1 (Fig 1 A, D). This variant has been classified in our database as Pathogenic (Fig.1G)

Patient 7 was diagnosed at age 31 with sporadic form of ALS. The disease presented with bulbar onset and with very rapid progression. Sequencing identified a single point mutation at c.450T>G leading to a missense replacement of Isoleucine at position 150 to Methionine (I150M). This variant is absent from controls in gnomAD database and there is no experimental evidence for its effect. Two other missense variants have been reported at the same position leading to the substitution Isoleucine by Threonin I150T or by Valine (I150V) (Couthouis et al., 2014; Pramatarova et al., 1995) I150 is located near the C-ter extremity of the protein (Fig 1 F), and is part of the interaction surface for protein dimerization . The variant I150T has been suggested to have a reduction in protein stability and is shown to reduce SOD1 activity when overexpressed in lymphoblasts. (Pramatarova et al., 1995).



G

	RefSeq	Coding	Protein	Spo/ Fam	Age	Onset	ACMG Criteria	Pathogenic class	Clinical manifestation
P1 P2	NM_000454.4	c.376G>A	D126N	Fam	42 63	spinal	PM1, PM2, PM5, PP1, PP3, PP5	Probably Pathogenic	LMN
P3	NM_000454.4	del c.400_402	E134del	Spo	33	bulbar	PM1, PM2, PM4, PP5	Probably Pathogenic	UMN, LMN
P4 P5 P6	NM_000454.4	c.409A>T	K137*	Fam	44 47 n.c	spinal	PVS1,PM1,PM2,PP1,PP4, PP5	Pathogenic	LMN, rapid
P7	NM_000454.4	c.450T>G	I150M	Spo	31	bulbar	PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	Probably Pathogenic	UMN, aggressive

Figure 1 Candidate SOD1 variants A. Representation of the secondary structure of *WT SOD1*. The number of each amino acid in this representation is given after removal of the initial Methionine and corresponds to n-1 in our AA annotation. The candidate variants are located in the last line of the protein representation. The colour of the letters corresponds to the conservation of the amino acid (AA) residue with red and green indicative high and low conservation respectively B. 3D representation of the holo-*SOD1* homodimer based on resolved crystal structure (Strange et al., 2007), each monomer (dark brown or ochre) contains one Zn2+ and one Cu+ ions . The big square indicates the domains in which are three of our candidate variants (D-E) and the little square shows the domain in which is the last variant (F). C. The Asp125 corresponds to the position of the variant D126N. It is situated in the Zn-binding loop of SOD1. D. The Glu133 corresponds to the position of variant E134 del. It is part of the electrostatic loop of SOD1 and it is in contact with Lys136. E The Lys136 corresponds to the position of the K137*

variant. Lys 136 binds to Zn2+ and constitutes one of the active sites of SOD1. F The Ile149 corresponds to the position of I150M variant. It is situated near the C-ter of the protein and is part of the dimerization interface of SOD1. G Table of candidate variants found in patients with coding position and the corresponding AA change.

2.2.Overexpression of *SOD1* in the Zebrafish embryo

Zebrafish has successfully been used to model *SOD1*-linked ALS and it is a practical model for high-throughput analysis. The conservation of Human *SOD1* (NM_000454.4) and zebrafish *sod1* (NM_) is 60% at the transcript level and 80% at the protein level. Thus, we tested the effect of the transient overexpression of *hSOD1* variants in the zebrafish embryo. We performed injection of *m*RNA of each human variant directly into 1-cell stage embryos. Injection of different quantities of *m*RNA induced dose-dependent morphological defects with 100pg being the least toxic concentration from the three concentrations tested, consistent with previous research (Fig. S3). The morphology and development of embryos was assessed at 24 hours post-fertilisation (hpf) and 48hpf. Abnormalities of morphology or development are seen in less than 5% of all WT fishes and in less than 10% of all mutant fishes compared to Not injected (NI) fishes (Fig. S4). For all further experiments only normally developing fishes are kept. Next, expression of proteins is confirmed by western blot analysis directed against hSOD1 at 2 days post-fertilization (dpf). All variants are continuously expressed throughout the first two days of development (Fig 1). We observed that the relative protein density of hSOD1 proteins is different for the different variants, as previously described. The SOD1 WT protein is the most strongly expressed compared to all mutant variants. A5V, D126N and E134del show a twofold decrease in expression compared to WT. G94A shows a threefold decrease and K137* and I150M show the less than 20% expression compared to WT variant.

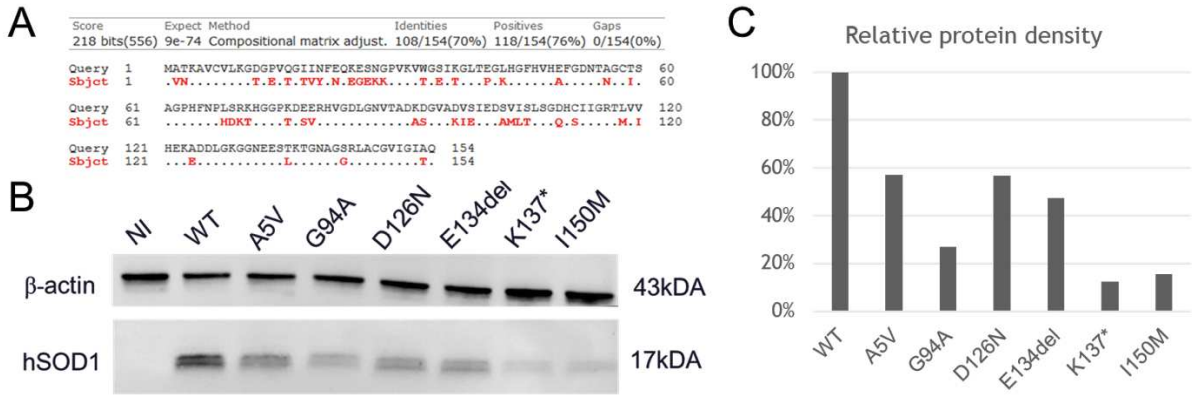


Figure 1 Overexpression of SOD1 variants in Zebrafish embryo A. Alignment of human SOD1 and the zebrafish homolog Sod1 with the BlastP (Altschul et al., 1997) show 70% conservation of protein sequence and 76% of sequence similarity. The sequence of each variant is subcloned in pCS2+ vector containing an SP6 promoter for *in vitro m*RNA synthesis. Each mRNA is diluted to 100 ng/µL and is injected in 1-cell stage embryo **B.** WB on the soluble protein fraction after extraction of protein from 2dpf larvae, visualized with rabbit anti-SOD1 and mouse anti β-actin as a control of quality of protein extraction. SOD1 monomers are detected at 17kDA and β-actin at around 43kDA **C.** Relative density of SOD1 proteins is compared to the WT variant (100%), all mutant variants are detected at lower quantitates compared to the WT protein: AV 57%, G94A 27%, D126N 56%, E134del 47%,K137* 12% and I150M 15%. N=1

2.3. Overexpression of candidate *SOD1* variants leads to locomotor impairments in 2 days-old larvae

By 48hpf the zebrafish larvae are able to escape in response to touch on the head or on the tail by escaping with a rapid burst swimming. This is a well described behaviour that can be used to assess locomotor impairments trough the Touch Evoked Escapre Response Assay (TEER). We used the TEER assay in 2dpf larvae to analyse the effect variants' overexpression on different swimming parameters such as duration, distance and maximal speed. For all experiments, the fish expressing candidate variants are compared to the WT group which serves as negative control of pathogenicity and to the pathogenic A5V and G94A as positive controls of pathogenicity. The NI group is used as an additional control and serve for normalization of experiments. All fishes were able to respond to touch at the tail and initiate locomotion after stimulation. We observed variant-specific effects on different locomotion parameters and we noted some heterogeneity among some groups with rather subtle phenotypes. First, we plotted the swimming trajectory of each group of fishes and analysed it by visual extrapolation (Fig3 A). The group expressing the pathogenic K137* variant shows a visibly reduced trajectory compared with all other groups. We proceeded to analyse locomotion parameters starting with total duration of response. We observed great heterogeneity on the duration of escape response both inside each group and between different groups. The groups expressing the pathogenic A5V and G94A also showed a significant reduction in swimming duration compared to the WT group. Moreover fishes expressing the probably pathogenic D126N also showed a significant reduction in total duration. There were no significant effect on the duration of movement following overexpression of the probably pathogenic E134del neither with the I150M. The WT group exhibited slightly longer duration of movement compared to the NI group. We then analysed the distance, but since duration was variable we needed to fix a time where most of the fish are swimming. We calculated that 99% of all fishes are active during the first 270ms following stimulation so we compared the cumulative distances for this period. The group expressing the A5V variant showed a reduced distance compared to WT. This was observed also with the probably pathogenic D126N and I150M groups. Surprisingly, neither of the groups expressing the G94A nor K137* showed any reduction of distance for this time period. There was no reduction of swimming distance in larvae overexpressing the E134del. Since there was heterogeneity in distance and time parameters, we decided to analyse the maximal speed achieved by each group, so we are independent of other parameters. All groups expressing candidate variants showed a significant reduction in maximal speed as well as the pathogenic A5V. Here again, we observed a strong tendency for a reduction of maximal speed in the G94A expressing group, however this was not significant. This is explained by our observation that E134del reaches their maximal speed significantly later than the other groups, with more than 30% of the fishes exclude by the 270s limit (Fig S3). Interestingly we observed that K137* group reach their maximal speed at 180ms significantly earlier than the WT group. The other groups did not show significant differences in the time they reach maximal speed.Taken together, these data indicate that overexpression of all candidate variants indices locomotion impairments that are comparable with the impairments induced by the pathogenic A5V and G94A variant. These results show that there are variant specific-effects on the different locomotor parameters relevant of phenotypic heterogeneity. However each variant induces a significant impairment in at least one parameter, and is validated by comparison with the pathogenicity controls.

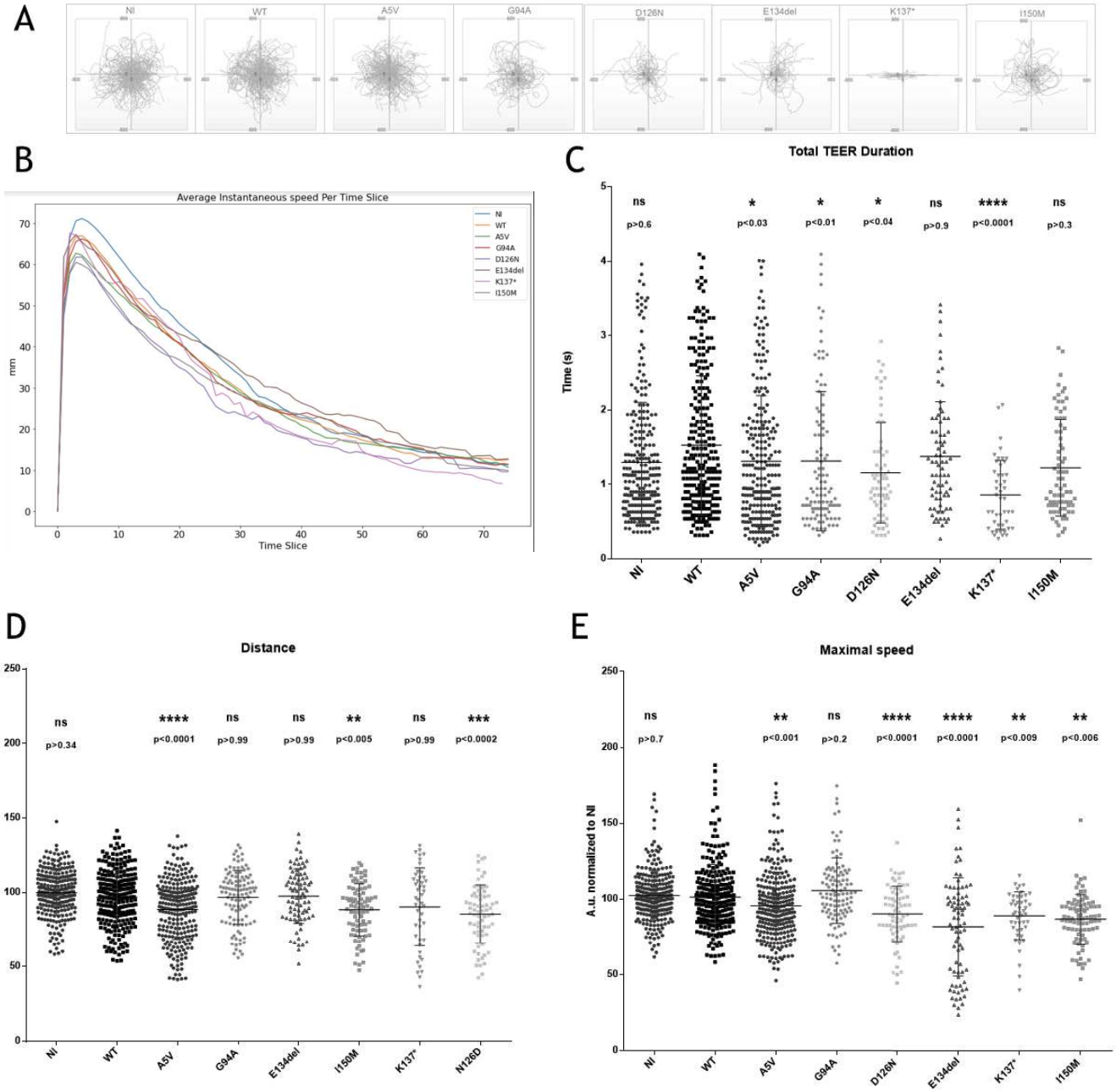


Figure 2: Locomotor impairments during TEER

A. Tracing of the trajectories of TEER for each population in pixels. We observe that NI (N = 273), WT (N=279) and A5V (N=265) are the largest groups and have the largest exploration areas. WT group is showing slightly reduced area of exploration compared to NI fish. The trajectory of A5V group is slightly reduced compared to both WT and NI fish. G94A (N = 117) group contains less larvae than the other three group and is showing a reduced trajectory compared to A5V, WT and NI. D126N (N = 73) E134del (N = 82) and I150M (N=85) groups contain equivalent number. All three have reduced trajectories compared to WT and NI. I150M show the largest trajectory compared with E134del and D126N show the smallest area of exploration compared to the other two groups. Larvae expressing K137* (N = 51) are showing the smallest exploration area compared to all other groups and it is predominantly on the X axis and less on the Y axis. B. Larvae reach their maximal speed in the first 10 time slices (fast phase of swimming), then the swimming speed decreases steadily C. The total duration of TEER is heterogenous among all groups. Total duration of response of NI and WT is not significantly different however duration of movement of WT is slightly increased. The groups A5V, G94A, D126N and K137* show significant decrease of the duration of response. K137* is showing the shortest duration of response compared to all other groups. E134del and I150M do not show a significant difference with WT. D Distance during 270ms.E Maximal speed Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc correction alpha = 0.05, p<0.01 *, p<0.001** ; p< 0,0001****

2.4. Locomotor phenotype is consistent with abnormal axonal branching of Caudal Primary Motoneurons in 48hpf larvae

In in order to understand whether the observed locomotor phenotypes result from impairments in motoneurons we performed analysis of the axonal projection of the embryonic motoneurons In other zebrafish ALS models it is shown a shortening of the axonal projections and increased axonal branching at 48hpf. At this time in embryo there are two types of motoneurons depending on the time at which they arise during development. The primary motoneurons are the earliest type of motoneurons in the zebrafish. Caudal Primary motoneurons. To visualize axonal projections, we performed immunostaining with anti-SV2 antibody targeting synaptic vesicles glycoprotein 2A. We analyse the axonal projections of the caudal primary motoneurons (CaP) which project towards the ventral myotome, in a characteristic J-shaped projection, as well as secondary motoneurons that follow the same pathway. Shortening of axonal length and increased axonal branching are considered a hallmark of ALS in larval zebrafish modelling the disease. We analysed the length of the axons in the body region corresponding to somites 15-17 as they are easily identifiable through their position adjacent to the vitellus. The pathogenic A5V, G94A and K137* showed significantly increased axonal branching. Larvae expressing the K137* variant had highly disorganised axonal projections with complete loss of the J-shape.

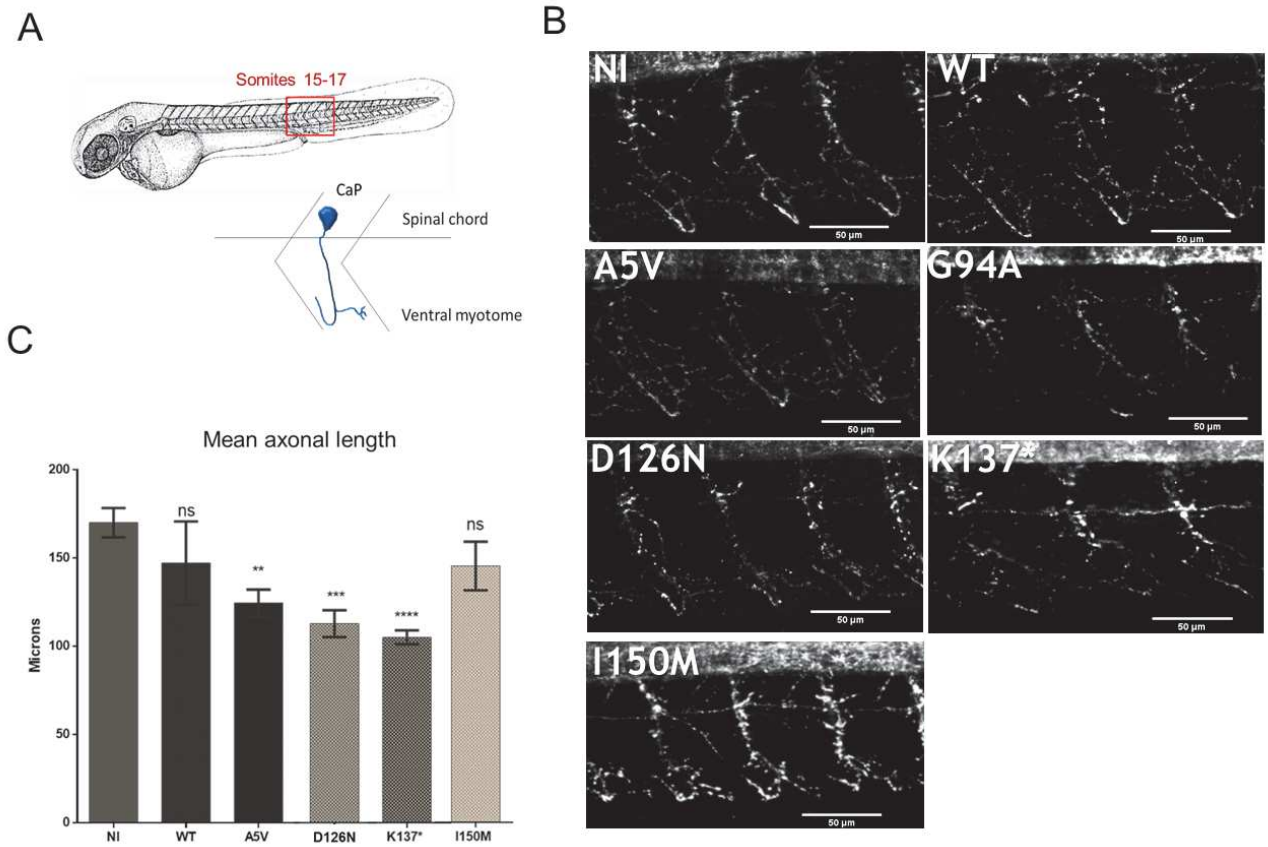


Figure 3: Candidate variants overexpression induces axonopathy of the motoneurons in 2dpf larvae A:Caudal Primary CaP motoneurons have characteristic j-formed projection towards the ventral myotome. We 3 motoneurons from the somites 15-17 B. Representative images of SV2 immunostaining of analyse CaP motoneurons in 2dpf zebrafish. Note the increased neuronal branching, the shortening of axons and the disruption of the axonal morphology. C. Quantification of the mean axonal length of axonal projections Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc correction alpha = 0.05, $p<0.01$ *, $p<0.001$** ; $p< 0{,}0001$****

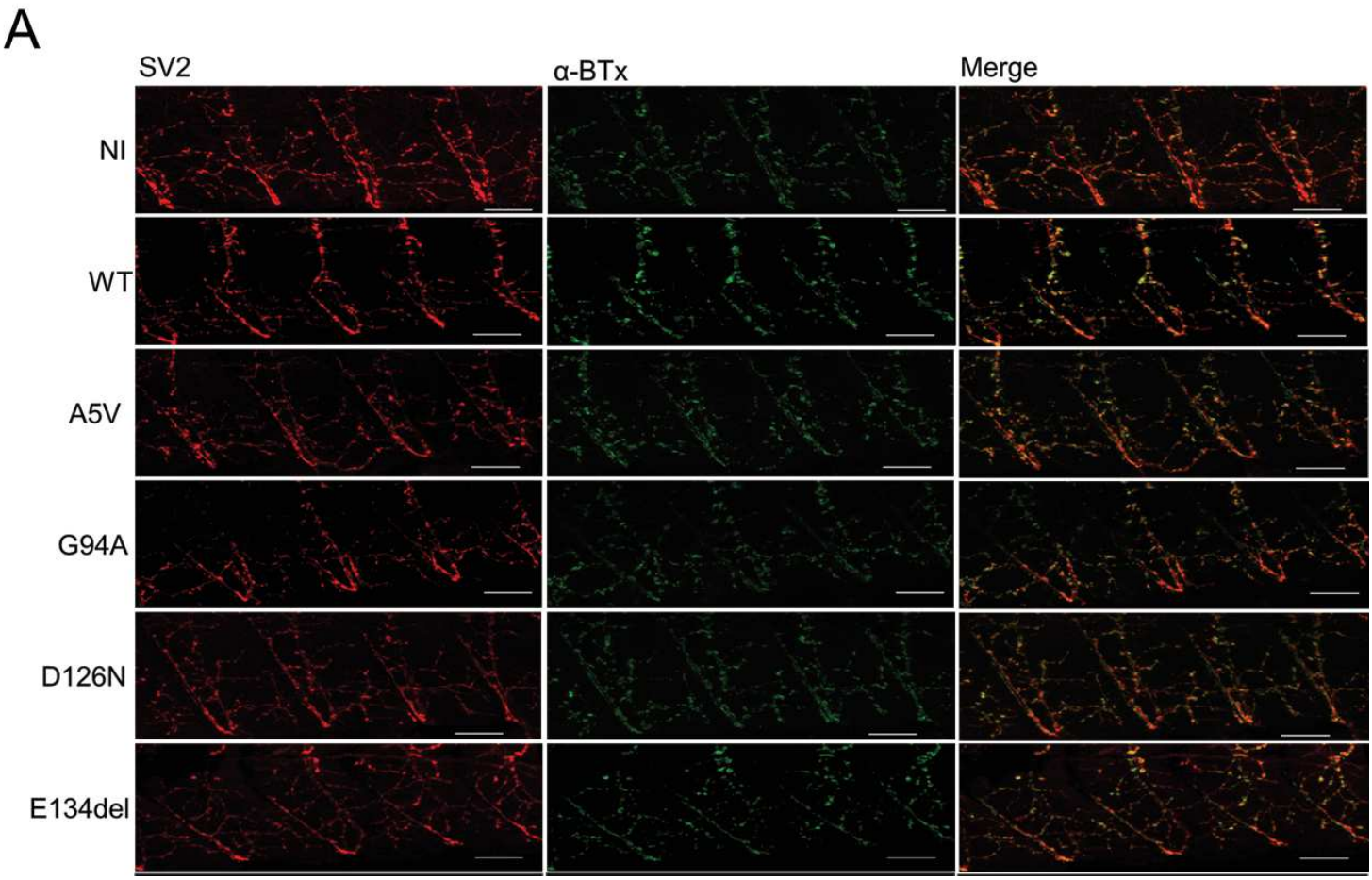


Figure 4. Neuromuscular junction A: Immunostaining of the neuromuscular junction, in the first panel is showed presynaptic SV2 staining, in the middle panel is the post synaptic a-Btx staining and in the third panel is a merged image. Note the presence of orphaned aBTx junctions B: Quantification of the collocalisation with Imaris software

2.5.Overexpression of candidate *SOD1* variants induces orphaned neuromuscular junctions

Distal axonopathy and neuromuscular junction impairments are one of the first signs seen in mouse models of ALS and are considered as hallmarks of the disease fisher. The transgenic zebrafish model overexpressing the human G94Avairant exhibit loss of NMJ integrity at 20weeks of age. The overexpression of the G94R variant in the endogenous *Sod1* of zebrafish is shown to induce defects in NMJ of 11-days old larvae as well as in adult fish. In TARDBP and FUS zebrafish models of ALS, orphaned neuromuscular junctions can be seen as early as 48hpf. Since we observed abnormal axonal branching, we analysed the integrity of neuromuscular junctions at 48hpf in larvae overexpressing candidate human SOD1 variants. We labelled the pre-synaptic membrane with SV2 antibody and the post-synaptic acetyl choline receptors with a-bungarotoxin. We performed colocalization analysis using the Imaris software on 3-D reconstructions of the axonal projections obtained from confocal images. We calculated Pearson's coefficients of colocalization for red (SV2) and green (aBTx) fluorophores. Reconstructions from NI and WT larvae showed the highest scores of colocalization for both SV2 and aBTx. A5V and G94A group showed significantly reduced coefficient of localization for the green channel suggestive of orphaned aBTx clusters. D126N and E134del showed a strong tendency for orphaned aBTx clusters.

3. Discussion

The majority of mice models of ALS are focusing on the functional characterization of a unique genetic variant in order to gain insight on disease pathology. However, since different variants can be associated with specific clinical manifestations, it is interesting to be able to perform comparative functional analysis of the effect of every single variant. Indeed, *in vitro* studies already demonstrated that different *SOD1* variants have specific effects on the protein structure and activity and to its propensity to form aggregates. The capacity of SOD1 to form aggregates has been linked to the severity of disease phenotype *in vivo* in mice. It has been demonstrated that the A5V variant does not induce ALS-like phenotype in mice on its own, but is rather potentiated by its co-expression with the WT variant. However, zebrafish do show a typical ALS-like phenotype upon overexpression of the A5V variant. Moreover, it is difficult to perform large genetic screening in mice, due to the complexity of their genetic manipulation and the cost of maintaining multiple lines. Zebrafish on the other hand allows for a rapid variant screening trough overexpression and can help to accurately identify pathogenic effects. In addition, transgenesis of zebrafish is easier than in mice and the cost of maintaining multiple lines is significantly lower, which is an advantage.

Supplementary figures

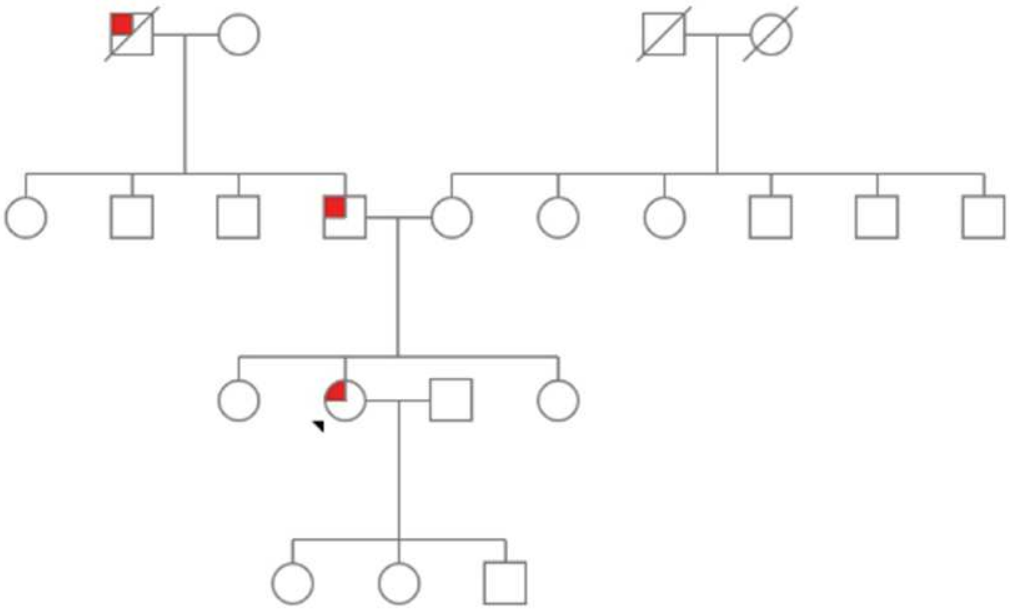
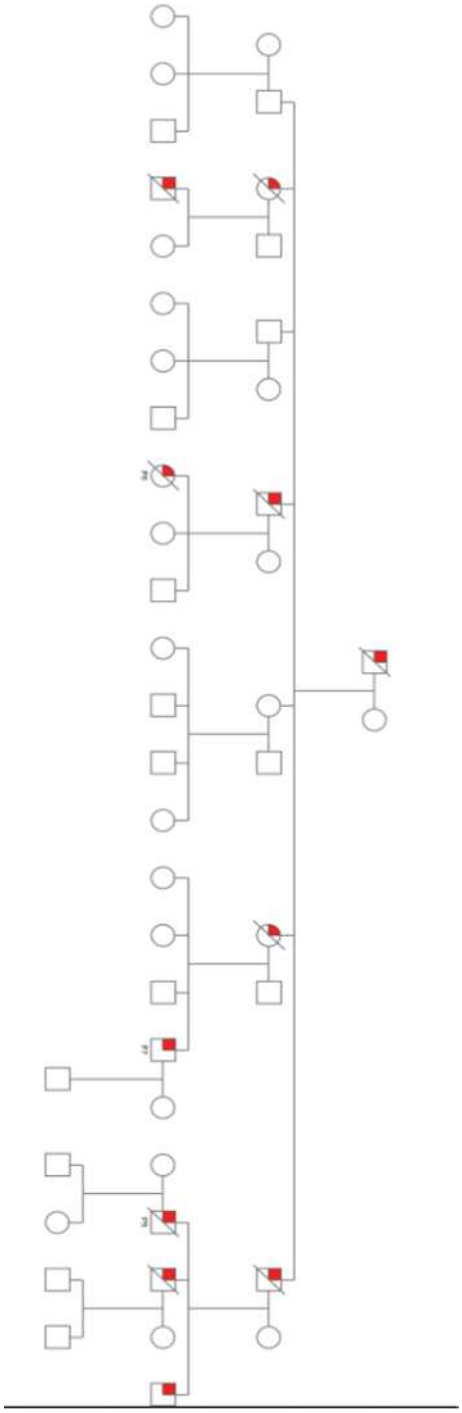
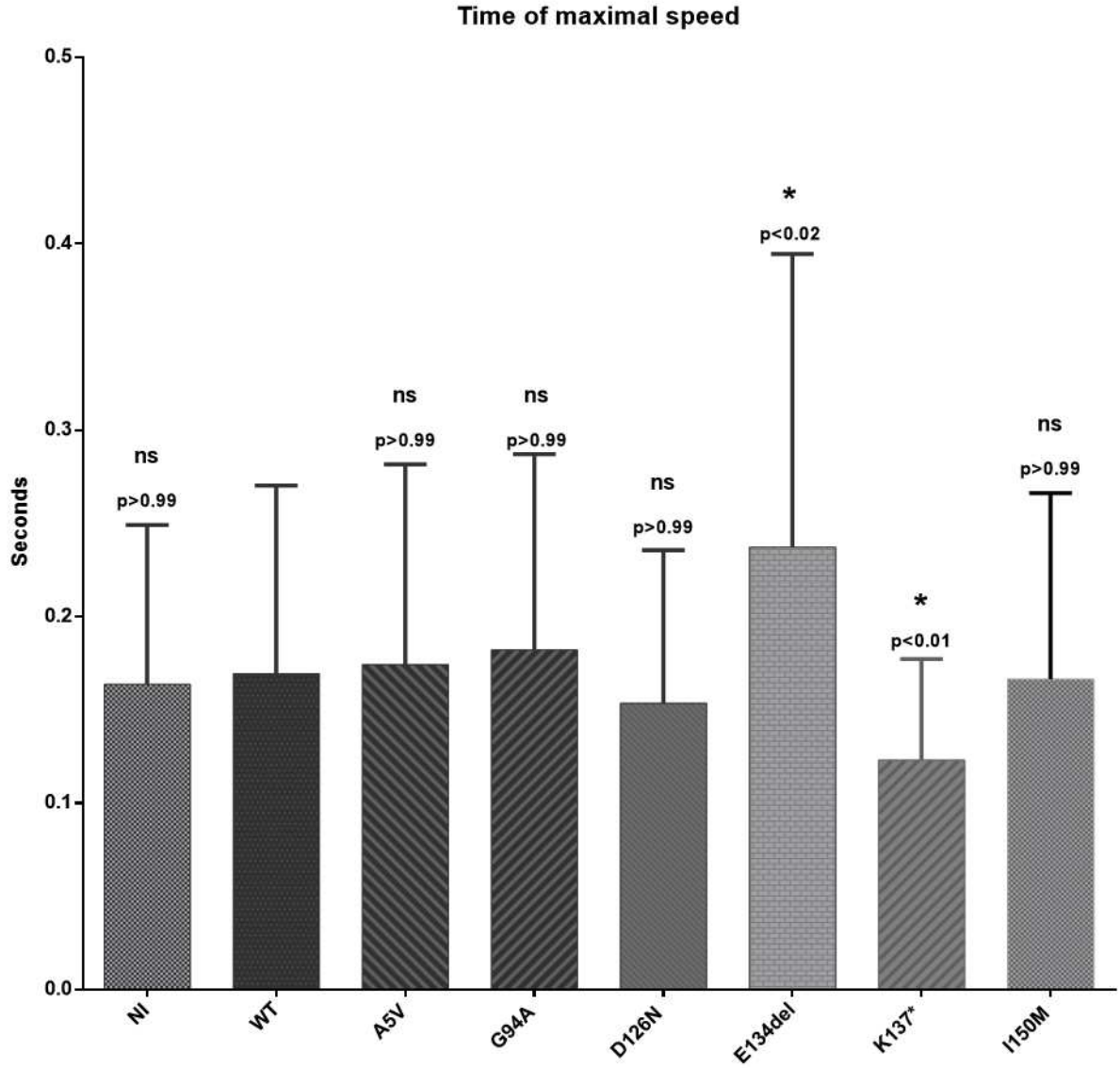


Fig S1 : Family history of P1 and P2

Fig S2 : Family history of P4, P5 and P6





Supplementary figure S3 Time of maximal speed Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc correction alpha = 0.05, p<0.01 *, p<0.001** ; p< 0,0001**** NI n=273, WT n=271, A5V n= 259, G94A n=111, D126 n=70 E134del n= 106, K137* n= 49 I150M n=77

II. Résultats complémentaires à l'article

1. Les larves surexprimant A5V, G94A et D126N présentent une diminution de l'activité en VMR à 5jpf

Nous avons analysé l'effet de la surexpression des variants du gène *SOD1* sur l'activité des larves à 5 jours par deux tests : la réponse visuelle motrice (VMR) et le startle réponse acoustique (ASR). Pour le test VMR, les larves sont d'abord laissées dans l'obscurité pour s'habituer pendant 25 minutes, puis leur activité spontanée est mesurée pendant 5 min. Nous n'avons pas observé d'effet sur l'activité spontanée des larves (non communiqué). A l'issu de la période d'habitation, une stimulation lumineuse de 0.001s est envoyée toutes les cinq minutes pendant une période totale de 15 minutes. L'activité spontanée des larves est analysée suivant chacune des stimulations. Nous avons observé une diminution significative de l'activité des groupes G94A et D126N comparé aux poissons non-injectés suivant la première stimulation lumineuse (Fig.1A). La deuxième stimulation lumineuse a quant à elle induit une augmentation de l'activité des trois groupes, mais ceci reste non significatif (Fig. 1B). La troisième stimulation lumineuse induit une diminution significative de l'activité du groupe A5V en plus du groupe D126N (Fig.1C). Les larves exprimant le variant G94A ne présentent pas d'altérations dans leur activité suivant la troisième stimulation lumineuse.

L'analyse par ASR est effectuée de manière similaire, les larves sont placées en présence de lumière cette fois-ci et sont laissées s'habituer pendant 25min. Ensuite leur activité spontanée est mesurée pour une période de 5 min. Nous n'avons pas observé de différences significatives dans l'activité des larves pendant cette période (non communiqué). Ensuite, trois stimulations acoustiques sont d'une durée de 0.001s sont envoyées toutes les 5 minutes pendant une période de 15min. Les larves présentent habituellement une augmentation de leur activité suivant chaque stimulation. Nous avons observé une augmentation de l'activité larvaire après la première stimulation acoustique. Cependant avec la répétition des stimulations sonores, de moins en moins d'individus répondaient à la stimulation. Nous n'avons pas observé de différences significatives dans l'activité des poissons suivant les stimulations sonores (Fig. 1 E-F). Cependant, le groupe G94A présente une augmentation d'activité après de la première stimulation sonore.

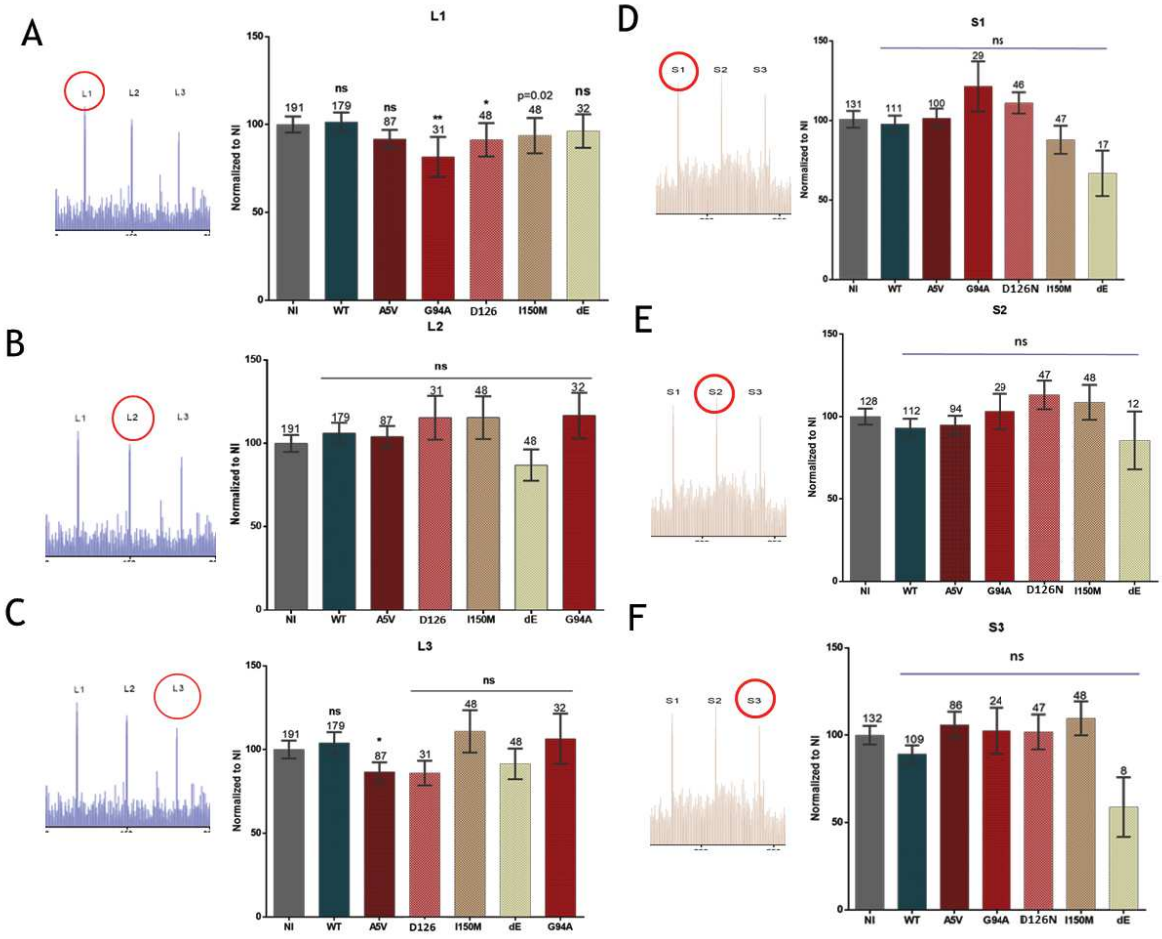


Figure 1 Activité des poissons après stimulation lumineuse ou sonore A – C Réponse aux stimulations lumineuses D-F Réponses aux stimulations acoustiques. Kruskal-Wallis avec correction post-hoc de Dunn, alpha = 0.05, p<0.01 *, p<0.001** ; p< 0,0001****

2. La surexpression des variants candidats dans le gène OPTN induit une diminution de l'accélération des larves à 2dpf

Le gène OPTN est un gène mineur de la SLA qui code pour une protéine impliquée dans le transport cellulaire et le maintien de l'intégrité de l'appareil de Golgi. Le variant candidat de ce gène est le L429R, l'effet de sa surexpression est comparé avec les effets induits par la surexpression de E478G et du variant WT. Nous avons étudié différents paramètres de la locomotion dont la durée totale de la réponse, la distance parcourue pendant 270ms, la vitesse maximale et l'accélération maximale. La surexpression du variant WT induit une diminution significative de la distance et de la vitesse maximale des poissons après TEER (Fig.1) comparé au groupe NI. La surexpression d'OPTN WT n'induit pas de diminution de l'accélération maximale. Les poissons surexprimant le variant pathogène E478G montrent une diminution significative de la distance parcourue, de la vitesse maximale et de l'accélération maximale. Enfin la surexpression du variant candidat L429R induit une diminution significative de la distance parcoure mais n'a pas d'effet sur la vitesse maximale. Néanmoins, les poissons exprimant ce variant ont une accélération maximale significativement plus petite que celle des poissons NI.

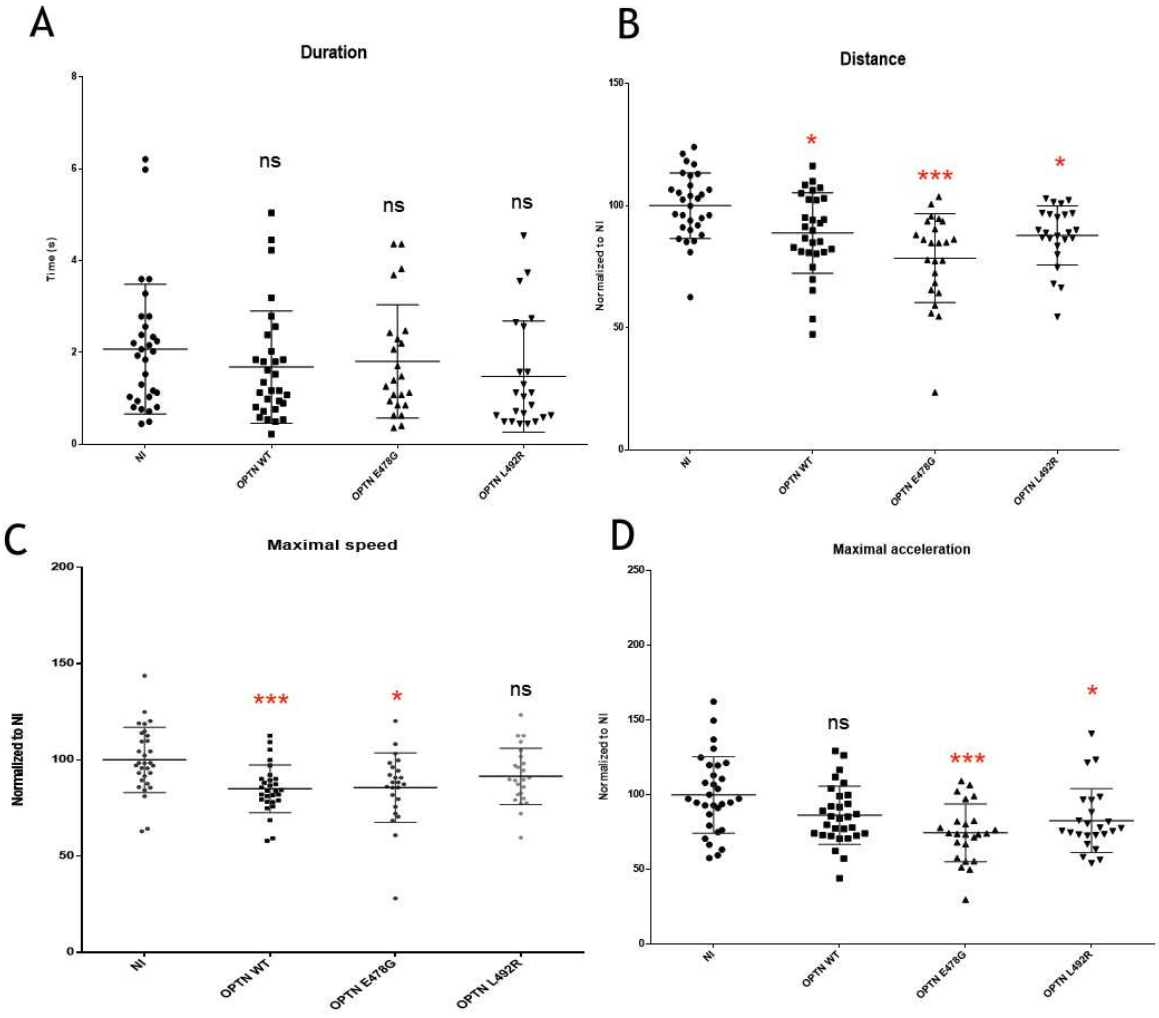


Figure 1. TEER des poissons exprimant les variants du gène OPTN A. Durée totale de la réponse TEER B. Distance parcourue pendant 270ms C. Vitesse maximale D. Accélération maximale. NI n=30, WT n=31, E478G n=24, L429 n=24 , Kruskal-Wallis avec correction post-hoc de Dunn, alpha = 0.05, p<0.01 *, p<0.001** ; p< 0,0001****

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Etude de l'effet de la surexpression des variants du gène *SOD1* sur la locomotion

Nous avons analysé l'effet de la surexpression de 4 variants candidats du gène *SOD1* sur la locomotion des larves de zebrafish. Les variants D126N, E134del K137* et I150M provoquent tous une diminution de la vitesse maximale des larves à 2 jpf dans au TEER, test locomoteur impliquant de la réponse au toucher. Cet effet est également observé avec la surexpression du variant pathogène A5V mais n'est pas observé avec la surexpression du variant G94A ou avec la surexpression du variant WT. Nous avons observé que les différents variants induisent des effets spécifiques sur les différents paramètres de la locomotion tels que la durée du mouvement ou la distance parcourue pendant 270 ms. La surexpression des variants G94A et dE134 n'induit pas de différence significative au niveau de la distance parcourue. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les différents groupes de larves n'atteignent pas leur vitesse maximale au même moment. Effectivement, nous avons vu qu'environ 30% des larves du groupe E134del atteignent leur vitesse maximale après 270 ms. Nous avons observé que la durée de la réponse au toucher peut-être très variable. La surexpression des variants A5V, G94A, D126N et K137* provoque une diminution significative de la durée totale de la réponse au toucher. Cependant la surexpression des variants E134del et I150M ne provoque pas de diminution significative de la durée de réponse. Les variants E134del et I150M montrent une tendance pour une durée de réponse plus longue.

La nage de la larve se caractérise par deux phases : la phase du *burst* où le poisson nage par à-coups à une vitesse élevée, suivie de la phase *glide* où la vitesse de nage est plus petite (Saint-Amant and Drapeau, 1998). Des études électrophysiologiques ont montré que les motoneurones primaires du *zebrafish* sont actives majoritairement pendant la nage rapide tandis que les motoneurones secondaires seraient actifs pendant la nage lente (Liu and Westerfield, 1988; McLean et al., 2007). Les différents paramètres du comportement locomoteur des larves de *zebrafish* sont sous l'effet de circuits neuronaux bien étudiés. Il a été montré que les neurones du faisceau médian longitudinal (nMLF) de la partie rostrale du cerveau postérieur de la larve projettent directement sur les motoneurones larvaires à différents niveaux de la moelle spinale (Wang and McLean, 2014). Ces neurones seraient impliqués dans le contrôle de la vitesse et de la direction la nage (Severi et al., 2014). Un deuxième niveau de modulation de la locomotion se trouve au niveau du CPG. Les cellules RB modulent

sélectivement la vitesse rapide de l'échappement au toucher par le biais des interneurones CoPA et des interneurones V2a. Le contrôle rythmique de la locomotion est sous l'action d'interneurones excitateurs et d'interneurones inhibiteurs. Les interneurones V2 permettent d'induire la locomotion chez la larve par le biais de la signalisation glutamatergique. Des expériences d'ablation des interneurones V2a dorsaux chez la larve ont mené à la suppression des mouvements rapides, tandis que l'ablation des interneurones V2a ventraux a provoqué l'arrêt de tout mouvement (Eklöf-Ljunggren et al., 2012). De plus, en fonction de leur position et de leur apparition au cours du développement, les différents interneurones V2a peuvent être impliquées dans le contrôle de mouvements de vitesses différentes. Ainsi, les interneurones V2a primaires sont impliqués dans les mouvements rapides, tandis que les interneurones secondaires sont recrutés pour des mouvements lents (McLean et al., 2007). Les interneurones V0 du CPG sont constitués de la population V0v excitatrice et de la population V0d inhibitrice (GABA et glycine). Des neurones équivalents existent chez la larve de zebrafish mais leur action exacte n'est pas encore caractérisée. L'action des neurones V2a est inhibé par les interneurones inhibiteurs V1 (Kimura and Higashijima, 2019). Les interneurones V1 expriment le facteur de transcription *Engrailed 1* (En1) et sont impliqués dans le ralentissement de la vitesse de locomotion. Chez le *zebrafish* ils assurent également l'inhibition des motoneurones lents pendant les mouvements rapides (Kimura and Higashijima, 2019). Les interneurones inhibiteurs sont la première population neuronale qui montre des marqueurs de stress cellulaire dans le modèle transgénique de *zebrafish Sod1*(McGown et al., 2013). De plus, chez ce modèle la transmission glycinérgiques au niveau des motoneurones est perturbée. Une étude récente chez la souris G93A montre pour la première fois que les interneurones V1 dégénèrent avant la mort des motoneurones et suggèrent un rôle important de ces interneurones dans la susceptibilité sélective des motoneurones (Allodi et al., 2021).

L'inactivation des interneurones V1 chez la larve provoque une altération de l'innervation des motoneurones lents et des motoneurones rapides et une suractivation des motoneurones lents (Kimura and Higashijima, 2019). Ainsi, lorsque la larve est stimulée, elle parait effectuer trois mouvements rapides pendant la totalité de sa réponse (Kimura and Higashijima, 2019).

Les perturbations du fonctionnement des interneurones V1 pourraient expliquer certaines de nos observations additionnelles et aider à la compréhension de l'hétérogénéité phénotypique. Les larves des groupes K137*, A5V et D126N, effectuent de nombreux mouvements par à coup suivant la première réponse au TEER. Dans notre analyse, nous avons pris en compte uniquement le premier mouvement, qui résulte directement de la stimulation mécanique. Les

poissons exprimant les variants dE134 et I150M effectuent des mouvements par à coup sans s'arrêter entre deux rebonds, ce qui pourrait expliquer la tendance qu'ils montrent pour une durée de réponse plus longue.

3. Etude de la neurotoxcicité induite par la surexpression des variants candidats du gène *SOD1*

La surexpression du variant G94A du gène *SOD1* provoque une augmentation des branchements neuronaux et une diminution de la longueur axonale chez le poisson zèbre (Sakowski et al., 2012). Nous avons également observé une diminution de la longueur axonale moyenne des projections axonales des motoneurones CaP et une augmentation des branchements neuronaux pour tous les variants candidats. Les effets sur les projections neuronales étaient significatifs même pour le groupe G94A qui n'a pas montré de diminution de la vitesse maximale lors du TEER. Nous avons analysé l'intégrité de la jonction neuromusculaire afin de voir s'il existe une corrélation avec le phénotype observé au niveau des projections axonales. Nous avons utilisé le marqueur pré-synaptique SV2 qui marque les vésicules synaptiques du motoneurone et le marqueur post-synaptique α-bungarotoxine qui se fixe sur le récepteur à l'Acétylcholine. Des perturbations dans l'intégrité de la jonction neuromusculaire sont caractéristiques pour les modèles animaux de la SLA comme la souris et le poisson zèbre (Fischer et al., 2004; Lemmens et al., 2007). Jusqu'à présent, aucun modèle *SOD1* de *zebrafish* ne montre de perturbations de la jonction neuromusculaire à un stade larvaire aussi précoce. Ces modèles témoignent des défauts dans la jonction neuromusculaire à partir de 11 jpf (Da Costa et al., 2014; Lemmens et al., 2007; Sakowski et al., 2012). Néanmoins, les modèles *zebrafish* des gènes *TARDBP* et *FUS* montrent des défauts de la JNM dès 2 jpf (Bose et al., 2019; Bourefis et al., 2020) . Nous avons observé une diminution significative de la collocalisation des deux marqueurs chez tous les groupes exprimant les variants candidats. La collocalisation du côté du récepteur cholinergique est significativement réduite ce qui suggère l'absence de contact synaptique à ce niveau.

4. Etude de l'effet de la surexpression du variant candidat sur la locomotion

Le gène *OPTN* est un gène mineur de la SLA. La surexpression du variant E478G chez la souris induit une augmentation de l'inflammation et induit une mort neuronale (Liu et al., 2018). Nous avons utilisé l'approche que l'on a développé pour étudier l'effet de la surexpression du variant E492R et le comparer avec l'effet induit par le variant E478G. Nous avons observé notamment une diminution significative de la distance et de la vitesse maximale provoquée par la surexpression du variant WT par rapport aux poissons non injectés. La surexpression du variant pathogène E478G et la surexpression du variant candidat L429R provoquent tous les deux une diminution significative de l'accélération maximale tandis que ceci n'est pas observé avec le groupe WT. L'accélération maximale au cour du TEER est proportionnelle à la force musculaire générée par les muscles squelettiques (Sztal et al., 2016). Il serait intéressant d'analyser l'intégrité de la jonction neuromusculaire et la morphologie des cellules musculaires pour confirmer cette observation.

5. Utilisation du zebrafish pour l'analyse fonctionnelle des variants de la SLA

Le *zebrafish* est un excellent modèle pour le criblage fonctionnel de la pathogénicité des variants génétiques de la SLA. Nous avons utilisé une approche de surexpression transitoire des variants candidats par injection d'ARNm dans l'embryon au stade 1 cellule. Nous avons montré qu'elle s'applique aisément pour étudier des variants qui provoquent un gain de fonction. Néanmoins, il est possible d'utiliser le modèle avec la même facilité afin de diminuer ou supprimer l'expression d'un gène par injection de morpholinos. Le test locomoteur TEER permet de mettre en évidence des défauts locomoteurs au bout de 2 jours suivant l'injection. Le phénotype moteur peut être plus ou moins subtil, néanmoins, avec un système automatisé il est possible de quantifier des défauts sur les différents paramètres de la locomotion. Les défauts locomoteurs sont associés aux défauts au niveau de la morphologie des motoneurones embryonnaires. Les phénotypes locomoteur et cellulaires résultant de la surexpression du variant pathogène A5V sont francs et ce variant pourrait être utilisé en tant que contrôle positif de pathogénicité. Nous n'avons pas observé de défauts suivant la surexpression du variant WT

ni au niveau de la locomotion, ni au niveau cellulaire et confirmons qu'il peut être utilisé comme control négatif de pathogénicité. La surexpression du variant G94A ne provoque pas de défauts locomoteurs majeurs, à part une diminution de la durée de réponse. Néanmoins, les larves surexprimant ce variant présentent d'importants défauts dans l'intégrité des projections neuronales. Ce variant pourrait servir de contrôle positif de pathogénicité dans ce contexte.

La surexpression du variant sauvage du gène *OPTN* induit une diminution significative de la distance et de la vitesse maximale des larves, comparés au poissons NI. Le variant pathogène E478G induit lui aussi une diminution significative de la distance parcourue et de la vitesse mais aussi de l'accélération. Il a été montré que la surexpression du variant E478G chez la souris interfère avec le mécanisme de l'autophagie par un effet dominant négatif (Shen et al., 2015). Cependant, il semblerait que la surexpression du variant WT chez le poisson pourrait interférer avec la protéine endogène. Ce sera pertinent d'étudier tous ces effets dans une lignée qui n'exprime pas le gène endogène.

Lorsqu'un nouveau gène devrait être modélisé par notre approche, il sera judicieux d'adapter les variants servants de contrôle et de s'assurer de leur mode de transmission. Avec le nombre croissant de gènes associés à la SLA et les thérapies géniques émergeantes, il devient essentiel de développer des outils simples pour l'analyse de la pathogénicité des variants. Le système que l'on propose peut répondre à ce besoin, néanmoins il est important de noter que cette méthode présente aussi quelques inconvénients. Les variants ne sont pas surexprimés de façon stable. Une expression variable pourrait être à l'origine de l'hétérogénéité phénotypique observée. Afin de surmonter cette contrainte il est possible de créer des lignées transgéniques de Zebrafish, suivant un premier criblage par surexpression transitoire. En outre, vu l'hétérogénéité phénotypique, il sera judicieux de confirmer les effets sur le plan cellulaire.

En conclusion, le modèle *zebrafish* peut être utilisé pour reproduire de façon complète la physiopathologie de la SLA et permet de faire une analyse fonctionnelle précise et très rapide des variants génétiques. La caractérisation fonctionnelle des effets des variants génétiques de la SLA permettra une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués. Le *zebrafish* présente un grand avantage dans ce contexte, car il possède une conservation génétique et physiologique avec l'Homme. De plus, sa circuiterie neuronale est bien caractérisée, facilement observable et peut aider à dévoiler les mécanismes moléculaires menant à une susceptibilité différentielle des populations neuronales.

ANNEXXES

ANNEXE I

G	Glycine	Gly	**P**	Proline	Pro
A	Alanine	Ala	**V**	Valine	Val
L	Leucine	Leu	**I**	Isoleucine	Ile
M	Methionine	Met	**C**	Cysteine	Cys
F	Phenylalanine	Phe	**Y**	Tyrosine	Tyr
W	Tryptophan	Trp	**H**	Histidine	His
K	Lysine	Lys	**R**	Arginine	Arg
Q	Glutamine	Gln	**N**	Asparagine	Asn
E	Glutamic Acid	Glu	**D**	Aspartic Acid	Asp
S	Serine	Ser	**T**	Threonine	Thr

ANNEXE II

AA	Codons	AA	Codons
Ala	GCT, GCC, GCA, GCG	**Leu**	TTA, TTG, CTT,CTC, CTA, CTG
Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	**Lys**	AAA, AAG
Asn	AAT, AAC	**Met**	ATG
Asp	GAT, GAC	**Phe**	TTT, TTC
Cys	TGT, TGC	**Pro**	CCT, CCC, CCA, CCG
Gln	CAA, CAG	**Ser**	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Glu	GAA, GAG	**Thr**	ACT, ACC, ACA, ACG
Gly	GGT, GGC, GGA, GGG	**Trp**	TGG
His	CAT, CAC	**Tyr**	TAT, TAC
Ile	ATT, ATC, ATA	**Val**	GTT, GTC. GTA, GTG
Start	ATG	**Stop**	TAA, TGA, TAG

REVUE

Revie

MDPI

International Journal of
Molecular Sciences

Paper: Review

Regulation of brain cholesterol: what role for Liver X Receptors in neurodegenerative diseases?

Kevin Mouzat [1]*, Aleksandra Chudinova [1], Anne Polge [2], Jovana Kantar [1], William Camu [3], Cédric Raoul [4] and Serge Lumbroso [1]

[1] Motoneuron Disease: Pathophysiology and Therapy, INM, Univ. Montpellier, Montpellier, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Nîmes, Nîmes, France
[2] Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Nîmes, Univ. Montpellier, Nîmes, France
[3] ALS Reference Center, CHU and Univ Montpellier, Inserm UMR1051, France
[4] The Neuroscience Institute of Montpellier, Inserm UMR1051, Univ Montpellier, Saint Eloi Hospital, Montpellier, France
* Correspondence: kevin.mouzat@umontpellier.fr; Tel.: +33466683207

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Liver X Receptors (LXR) alpha and beta are two members of nuclear receptor superfamily documented as endogenous cholesterol sensors. Following conversion of cholesterol in oxysterol, both LXR isoforms detect intracellular concentrations and act as transcription factors to promote expression of target genes. Among their numerous physiologic roles, they act as central cholesterol-lowering factors. In the central nervous system (CNS), cholesterol has been shown to be an essential determinant of brain function, particularly as a major constituent of myelin and membranes. In the brain, LXRs act as cholesterol central regulators, and beyond this metabolic function, LXRs have additional roles such as neuroprotective effects and lowering neuroinflammation. In many neurodegenerative disorders, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Alzheimer's disease (AD) and multiple sclerosis (MS), dysregulations of cholesterol and oxysterol have been reported. Here, we propose to focus on recent advances in the knowledge of the LXRs roles on brain cholesterol and oxysterol homeostasis, neuroinflammation, neuroprotection and their putative involvement in neurodegenerative disorders. We will discuss their potential use as candidates for both molecular diagnosis and as promising pharmacological targets in the treatment of ALS, AD or MS patients.

Keywords: Liver X receptors, cholesterol, oxysterols, neuroinflammation, amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, multiple sclerosis.

1. Introduction

Liver X Receptors (LXRs) are lipid-activated transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily (Chawla et al., 2001). Since their identification in mid 1990's (Shinar et al., 1994; Willy et al., 1995), they have been the focus of many studies. The initial discovery of oxidized forms of cholesterol, oxysterols, as natural ligands of these nuclear receptor identified them as central actors in lipid homeostasis, particularly cholesterol homeostasis (Wang and Tontonoz, 2018). However, the growing interest for LXRs and the generation of mice with genetic ablation of *Lxrs* (Peet et al., 1998) has shed the light on their pivotal role in many physiological functions, including endocrine system (Maqdasy et al., 2016), female and male fertility (Dallel et al., 2018; El-Hajjaji et al., 2011), inflammation

and immune processes (Fessler, 2018), cancer (De Boussac et al., 2013) and the nervous system (Courtney and Landreth, 2016).

2. LXRs: structure and mode of action

LXRs exist as two distinct isoforms, LXR alpha (LXRα) and LXR beta (LXRβ). They are encoded by two distinct genes: *NR1H3*, for LXRα, located on chromosome 11 and *NR1H2*, for LXRβ, located on chromosome 19. Although many splice variants coexist, the predominant transcripts of both genes share similar structure. *NR1H3* predominant transcript (NM_005693) have 9 coding exons and encodes a 447-aminoacids protein, while *NR1H2* predominant transcript (NM_007121) have 8 coding exons and encodes a 463-aminoacids protein. Both proteins share an identical structure, involving 4 functional domains, common to typical nuclear receptors. The N-terminal domain is the most variable domain among members of the nuclear receptor superfamily. It contains regulatory regions responsible for co-activators binding, including that related to AF-1 function. The DNA-binding domain (DBD) is a hallmark of all nuclear receptors and its sequence is highly conserved in the superfamily. LXR DNA-binding activity is mediated by two zinc-fingers, responsible for the recognition of the specific LXR Responsive Element (LXRE) within the promoter of target genes. Interestingly, while a common consensus response element sequence may be identified (two AGGTCA cores separated by 4 nucleotides (Willy et al., 1995)), some differences in DNA-binding have been observed for the two LXRs (Henry-Berger et al., 2008; Volle et al., 2004), some promoters being preferentially bound by one of the isoform. The DBD also contains the nuclear localization signal domain (NLS). The hinge domain has a double role, allowing flexibility of the nuclear receptor bound on DNA as well as the recruitment of co-repressors while inactivated (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995). The C-terminal domain has many central roles, including dimerization with Retinoid X Receptor (RXR), recruitment of co-activators and ligand binding. The latter function is mediated by a hydrophobic pocket which recognizes the various ligands of both receptors (Maqdasy et al., 2016; Viennois et al., 2012). Differences in LXRα/LXRβ expression sites have been observed, but it is now admitted that all animal tissues can express both isoforms (www.nursa.org).

Their mechanism of action is similar to other "RXR partners" nuclear receptors. In their canonical mode of action, LXRs are constitutively bound to LXRE within the promoter of the target gene. In the absence of activating ligand, the RXR/LXR complex recruits co-repressors, maintaining the chromatin in a non-transcription-permissive state (*i.e.* "compacted state"), due to epigenetic mechanisms such as histone deacetylase activities (Hu and Lazar, 2000; Lazar, 2003). The binding of an activating oxysterol and/or 9-*cis* retinoic acid (respectively LXR and RXR activating ligands) induces conformational changes responsible for the release of co-repressors and the binding of co-activators (Maqdasy et al., 2016). The latter can trigger epigenetic changes (*e.g.* Histone acetyl transferase activities), maintaining the chromatin in a transcription-permissive state (Figure 1) (McKenna and O'Malley, 2002).

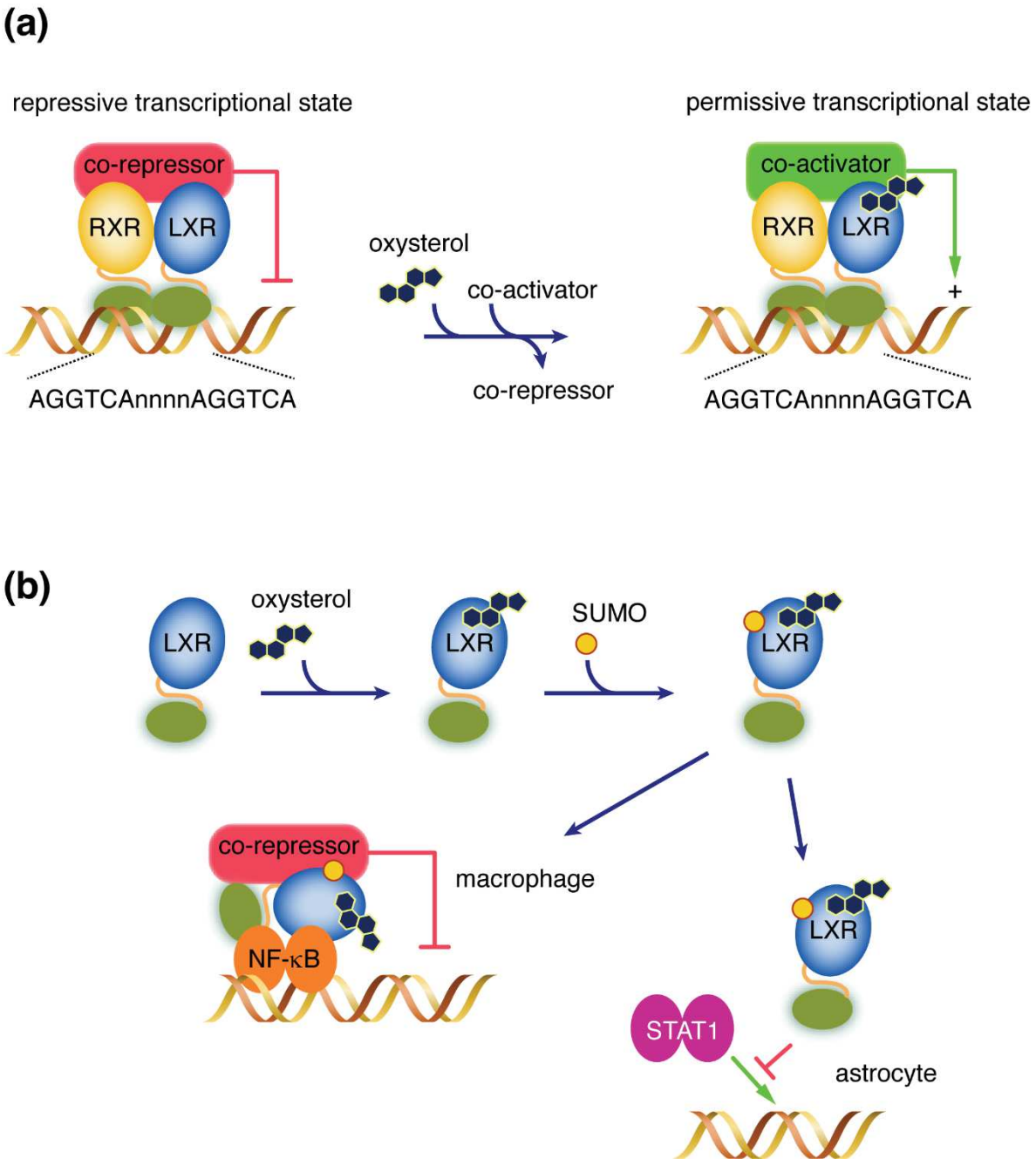


Figure 1. Schematic representation of LXR mode of action. (**a**) In their canonic mode of action, the RXR/LXR heterodimer is constitutively bound to DNA on its response elements (LXRE – whose consensus sequence is AGGTCAnnnnAGGTCA). In the absence of ligand, the heterodimer interacts with co-repressors, maintaining the chromatine in a repressive transcriptional state. The binding of either an RXR or an LXR ligand (*e.g.* an oxysterol) induces conformational changes leading to the release of co-repressors and the recruitment of co-activators, promoting a chromatine permissive transcriptional state and the activation of target genes. (**b**) In the transrepression mechanism, binding of an LXR-ligand induces its SUMOylation. In macrophage, SUMOylated LXR stabilizes co-repressors on NF-κB, thus down-regulating the expression of the target gene. In astrocyte, SUMOylated LXR prevents target gene expression by blocking the binding of STAT1 to promoters. LXR, Liver X Receptor; LXRE, LXR Responsive Element; RXR, Retinoid X Receptor; STAT1, signal transducer and activator of transcription 1; SUMO, small ubiquitin-like modifier.

The anti-inflammatory role of LXRs has been observed for a long time, as activation of LXRs by an activating ligand decreases the expression of many pro-inflammatory genes (*e.g.* inducible nitric oxide synthase, interleukin (IL)- IL-1β, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)-α) (Bensinger and Tontonoz, 2008; Joseph et al., 2003; Landis et al., 2002). However, while the canonical mode of action of LXRs was a trans-activation mechanism, it had been postulated that this anti-inflammatory effect was indirect. Recently, a direct transrepression mechanism involving small ubiquitin-like modifier (SUMO) proteins has been described, explaining a direct negative effect of LXRs on pro-inflammatory target genes upon LXRs activation (Fessler, 2018; Ghisletti et al., 2007). Binding of a ligand to LXR could also induce its SUMOylation, resulting in a cell type-specific gene inhibition mechanism. In macrophages, SUMOylated LXR stabilizes the interaction between NF-κB and co-repressors on the target-genes promoters, then repressing their expression. In astrocytes, target gene inhibition is mediated by the prevention of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) by SUMOylated LXRs. Non-genomic actions of LXRs have also been described, but these effects remain to be explored yet (Fessler, 2018).

3. LXRs ligands

As many nuclear receptors, LXRs have been first identified by studies based on sequence homology with other known nuclear receptors. Their ligands were thus unknown, leading to initially consider them "orphan" nuclear receptors. The first attempt to identify LXR ligands used constructs made from the fusion of LXRα LBD to GAL4 transcription factor. This initial screening of more than 70 molecules led to the identification of a series of LXRα-activating oxysterols (Janowski et al., 1996). Oxysterols are oxidized-derivatives of cholesterol or cholesterol precursors (Mutemberezi et al., 2016; Schroepfer, 2000). Among the impressive number of known oxysterols, only some of them are activating LXR ligands. Particularly, 22(*R*)-hydroxycholesterol, 24(*S*),25-epoxycholesterol or 27-hydroxycholesterol have been intensively studied. It had been early noticed that oxysterols profiles depend on their synthesis site. Interestingly, 24(*S*)-hydroxycholesterol has been of one the first LXR-activating oxysterol described in the central nervous system (CNS), and has been consecutively named cerebrosterol (Viennois et al., 2012). The role of cholesterol has been known for decades in brain, where its metabolism is known to be the highest compared to other tissues (Zhang and Liu, 2015). Thus, cholesterol is crucial for the formation and the support of myelin sheath, but also synaptogenesis, axonal plasticity, neuroprotection and recovery following neuronal injury (Mauch et al., 2001; Tassew et al., 2014). Additionally, it is now well admitted that oxysterols play a central role in the CNS (Griffiths et al., 2016). 24(*S*)-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol produced either by peripheral cells or neurons can cross the blood-brain-barrier (BBB) to reach the brain, where they can interact with LXRs, or be eliminated into the blood circulation (Gosselet et al., 2014). Brain 24-hydroxycholesterol has been shown as the major source of circulating cholesterol and its plasma levels are correlated with the number of metabolically active neurons (Leoni and Caccia, 2011). In brain, the conversion of cholesterol into 24-hydroxycholesterol also represents the main cholesterol excretion route. Interestingly, the concentrations of some oxysterols, such as 24(*S*)-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol both in plasma and cerebrospinal fluid have been linked to many neurological disorders, including neurodegenerative diseases (Leoni and Caccia, 2013). Although these oxysterols were initially considered neuronal cholesterol by-products, more recent studies suggest a direct involvement of these molecules on CNS physiology, such as nerve impulse, neurogenesis and memory processes (Bezine et al., 2018; Theofilopoulos et al., 2019; Zhang and Liu, 2015).

4. LXRs: two central regulators of cholesterol metabolism

The initial finding of oxysterols as LXR ligands logically led to study a putative role for LXRs in cholesterol metabolism. One of the first *in vivo* evidence of this control arouse from the generation of mice with targeted deletion of *Lxrα* (Peet et al., 1998). Contrary to wild-type animals, *Lxr*-deficient mice were unable to stimulate *cyp7a1* gene expression in response to dietary cholesterol. This gene encodes

a key enzyme in the first step of cholesterol conversion into bile acids, and thus their elimination from the body. This study was the first showing the *in vivo* role of LXRs in the control of cholesterol concentrations, particularly in the liver. Although a tight link between oxysterol and cholesterol was well admitted, many oxysterols being enzymatically synthesized from cholesterol (Mutemberezi et al., 2016), the *in vivo* proof that oxysterols were a direct link between cholesterol and LXRs came from the engineering of transgenic mice unable to produce 24(S)-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol (Chen et al., 2007). Interestingly, these mice were unable to activate many LXR-target genes in response to dietary cholesterol. During the last two decades, the involvement of LXRs has been shown in almost every cholesterol metabolism pathways (for a review, see (Wang and Tontonoz, 2018)). Beyond the activation of *cyp7a1* promoter, LXR-induced cholesterol efflux from the liver is also controlled by Abcg5 and Abcg8, two cholesterol transporters responsible for its efflux in bile (Repa et al., 2002, p. 5; Yu et al., 2003). LXRs also negatively regulate cholesterol biosynthesis by reducing the expression of enzymes involved in cholesterol *de novo* biosynthesis (Alberti et al., 2001; Schultz et al., 2000; Wang et al., 2008), and reverse cholesterol transport to the liver (Tontonoz and Mangelsdorf, 2003). The latter includes cellular efflux from peripheral cells *via* Abca1, Abcg1, Abcg4, Abcg5 and Abcg8 (Engel et al., 2001; Kennedy et al., 2001; Repa et al., 2002, 2000), but also the blood transport of cholesterol towards the liver by stimulating apolipoprotein genes, such as APOE/CI/CII/CIV (Laffitte et al., 2001; Mak et al., 2002). Altogether, these data enlighten the pivotal role for LXRs as an endogenous cholesterol sensors in the regulation of both intracellular cholesterol concentration, but also the control of its homeostasis within the whole body.

5. Cholesterol and oxysterol in the CNS: which place for LXRs in the regulation of brain homeostasis?

Cholesterol is one of the major constituents of the CNS. Brain contains approximatively 25% of whole body's cholesterol (Hussain et al., 2019). In the CNS, metabolic rate of cholesterol is also the highest with 95% of brain cholesterol content being produced *de novo* (Björkhem and Meaney, 2004; Zhang and Liu, 2015). It is a key constituent of myelin, where it accounts for 70% of brain content, and neural cell membranes (Mauch et al., 2001). At a cellular level, cholesterol has been shown to promote synaptogenesis, axonal plasticity, neuroprotection, and glial cells proliferation (Goritz et al., 2005). Interestingly, in adult stages, the main source of neuronal cholesterol arises from astrocytes, neuronal cholesterol biosynthesis being relatively low (Zhang and Liu, 2015). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) exerts several protective roles within the CNS, including neuronal survival, differentiation and plasticity. In cultured neurons, BDNF treatment reduced cholesterol uptake (Spagnuolo et al., 2018). This effect was associated with an increase in LXRβ expression, suggesting a protective role for this nuclear receptor against an excess of neuronal cholesterol. Hence, based on this well-established role for cholesterol in the CNS, it appears that its regulation would be essential to maintain CNS normal functions (Mouzat et al., 2016). Indeed, LXRs have been shown to modulate brain cholesterol homeostasis at various stages. The neuronal cholesterol concentrations have thus been demonstrated to be modulated at three levels: (1) cholesterol uptake by neurons is negatively regulated by LXRs, *via* the degradation of LDL receptor (LDLR) by inducible degrader of LDLR (IDOL) (Courtney and Landreth, 2016), (2) LXR activation by a synthetic agonist stimulated neuronal cholesterol efflux (Eckert et al., 2007) and (3) LXRs control the cholesterol supply from astrocytes to neurons. The latter pathway is now known as the main source of cholesterol for neurons (Zhang and Liu, 2015). Thus, both (24S)-hydroxycholesterol and GW683965A (a synthetic LXR-agonist) up-regulate ABCA1 and ABCG1 in astrocytes, promoting cholesterol efflux from this cell type. APOE expression is also increased, mediating the cholesterol transport towards neurons (Abildayeva et al., 2006). Besides, in oligodendrocytes and Schwann cells, which provide cholesterol to the myelin sheath, LXR can control both cholesterol homeostasis and myelination processes (Makoukji et al., 2011; Meffre et al., 2015).

LXRs could also exert a neuroprotective role in the CNS, acting on neuroinflammation. In a mouse model of intracerebral hemorrhage, brain lesions were associated with an increase in LXRα production (Wu et al., 2016). LXR induction, with the widely used synthetic agonist T0901317, also attenuated tissue

loss and neuronal death, BBB and brain edema, microglial activation and pro-inflammatory responses. Microglia considered as the resident immune cells of the CNS, are involved in many essential functions including phagocytosis, elimination of toxics, synaptic pruning and optimization of neurotransmission (Haukedal and Freude, 2019). These cells account for 0.5 to 16.6% of CNS cells, depending on the anatomical region (Bachiller et al., 2018). Microglial activation leads to the acquisition of the M1 phenotype, a pro-inflammatory phenotype that is a hallmark of many neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal dementia (FTD). In the recent years, the use of *in vitro* models revealed that activation of LXRs can reduce many pro-inflammatory factors produced by cultured glial cells, including iNOS and nitric oxide, COX-2, IL-1β, IL-6, MCP-1 and impaired the IκB-NF-κB pathway (Kim et al., 2006; Secor McVoy et al., 2015; Zhang-Gandhi and Drew, 2007). Microglial activation was also reduced in various *in vivo* mouse models upon treatment with LXR agonists (Paterniti et al., 2017; Wu et al., 2016). Taken together, these findings strongly support a key role for LXRs in the CNS homeostasis, both in the regulation of brain cholesterol metabolism and in the control of microglia-dependent neuroinflammatory processes. Further studies of LXRs in cellular and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases may help in the future to understand the natural history of these diseases.

6. What role for LXRs in neurodegenerative diseases?

As cholesterol and oxysterol homeostasis are crucial to a correct development and maintenance of CNS functions, and LXRs are central regulators of their metabolism, it is tempting to suggest that dysregulations of LXRs could be involved in the risk of developing neurological diseases, and/or in the modulation of their natural history. Here, we review the putative involvement of these nuclear receptors in several neurodegenerative disorders. In three of them, the targeted activation of LXRs could be a goal to achieve in the future: ALS, AD and Multiple Sclerosis (MS).

6.1. Amyotrophic Lateral Sclerosis

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a rapidly fatal adult-onset neurodegenerative disease characterized by the progressive death of both upper and lower motor neurons (MN). Mean age at onset is 65 years and median survival time after onset is 3 years (Hardiman et al., 2011). The incidence of ALS is 2-3/100 000 and overall prevalence worldwide is 7-10 /100 000 (Hardiman et al., 2017b; Talbot, 2009). The clinical consequences of the MN degeneration in ALS is a progressive paralysis, starting by one leg or speech, and spreading on the body leading to tetraplegia, anarthria, aphagia, ending with respiratory failure. Cognitive impairment is not rare in ALS patients, and 20-50% of the patients exhibit fronto-temporal lobe dementia (FTD) (Kiernan et al., 2011). Almost 10% of ALS cases inherited (FALS) with a prominent autosomal dominant trait. In FALS cases many genes have been described, but 4 major genes have been identified: *C9ORF72*, superoxide dismutase-1 (*SOD1*), TAR DNA binding protein (*TARBP*), encoding the protein TDP43, and fused in sarcoma (*FUS*) (Mathis et al., 2019b). Repeat expansions in *C9ORF72* is the most frequent genetic abnormality accounting for more than 40% of FALS cases and, overall for 3-4% of ALS cases (DeJesus-Hernandez et al., 2011b; A. E. Renton et al., 2011).

Pathophysiology of ALS is not fully understood but clues may come from the high variability of the prognosis of ALS patients ranging from a few months to more than 40 years, that may suggest that prognosis, and pathogenesis, are linked to the diffusion of a biological agent, in a prion-like mechanism (Chiò et al., 2009). Many different cellular pathways have been implicated in the pathogenesis of ALS such as impairment of RNA metabolism, protein aggregation, cellular and nuclear transport dysfunction, glutamate excitotoxicity (van den Bos et al., 2019). In addition, neuron-microglia interactions seem central in ALS pathogenesis, and CNS immune cells infiltration (Coque et al., 2019), as well as microglia and astrocyte activation, together with MN degeneration are among hallmarks of the disease (Aebischer et al., 2013; Mouzat et al., 2016).

Cholesterol and oxysterols metabolisms have been described as impaired in ALS patients, but this is still debated. Some studies showed elevated plasma cholesterol in ALS patients compared to controls, while others did not (Ahmed et al., 2016; Schmitt et al., 2014). In a cohort of French patients, elevated LDL/HDL ratio was associated with better prognosis (Dupuis et al., 2008). Elevated cholesterol has been observed in CSF of ALS patients (Abdel-Khalik et al., 2017). Analysis of cholesterol metabolites also showed defects in brain cholesterol and bile acids metabolisms. Recently, serum and CSF levels of 25-hydroxycholesterol were shown to be higher in ALS patients than in controls, and the levels were also associated with disease severity (Kim et al., 2017).

Based on the well-known roles of LXRs in the control of cholesterol metabolism and in the regulation of immune processes, mainly by their anti-inflammatory action, LXRs seem to represent good candidates to be studied in ALS pathophysiology. The use of *Lxr* deficient mice by Gustafsson's group revealed a motor phenotype comparable to ALS patients' symptoms. Lxr$\beta^{-/-}$ mice had progressive impaired motor performance leading to hind limb paralysis, associated with motoneuron degeneration and loss of neuromuscular junctions (Andersson et al., 2005; Bigini et al., 2010; Kang and Rivest, 2012). The animals also had signs of astrocytic activation and elevated pro-inflammatory factors in spinal cord. Ubiquitin and TDP-43 inclusions in motoneurons were noted, one hallmark of brain pathology in ALS patients (Kim et al., 2008). Oral administration of β-sitosterol, a putative neurotoxic plant sterol, worsened the ALS-like phenotype of lxr$\beta^{-/-}$ mice, suggesting a neuroprotective role for the nuclear receptor. This sterol also impaired 24-hydroxycholesterol metabolism, bringing evidence that LXRβ could act as a regulator of brain cholesterol and oxysterol metabolisms, this role being at least in part important for its neuroprotective role.

In ALS patients, a proteomic analysis of sera from ALS patients and controls revealed significant changes in many proteins concentrations (Xu et al., 2018). Among them, a bioinformatic analysis showed the LXR/RXR pathway as one of the most significant. Recently, we showed for the first time that both LXRα and LXRβ were genetic modulators of ALS phenotype in patients (Mouzat et al., 2017). In a cohort of 438 patients and 330 healthy controls, two LXRα SNPs were shown to be associated with age at onset. Particularly, age at onset was increased for heterozygous patients (+3.9 years) and was much more increased in patients carrying the homozygous rare genotype (+7.8 years) for the LXRα SNP rs2279238 ($p = 0.003$, false discovery rate (FDR) = 0.012). Interestingly, the prognosis of ALS patients was influenced by LXRβ genotype. The LXRβ SNP rs2695121 was indeed associated with the duration time of the disease. T/T carriers had a significantly shorter survival time than C carriers (Hazard Ratio = 1.47 [1.12–1.93], $p = 0.0055$, FDR = 0.044).

Altogether, many studies today point towards a neuroprotective role for LXRs, making them good candidates for both molecular diagnosis, strengthening the need for searching *NR1H3* and *NR1H2* variants responsible for the disease and/or its prognosis, as well as pointing to their future use as pharmacological targets in the treatment of ALS patients.

*6.2. **Alzheimer's disease***

AD is the commonest form of dementia, characterized by progressive memory loss, aphasia, apraxia, agnosia, due to degeneration of cortical neurons. Most AD cases begin after 70 years old. Almost 44 million people suffer from dementia worldwide, and AD accounts for 50%-75% of them (Lane et al., 2018; Robinson et al., n.d.). Around five to seven million new cases of AD are recorded each year. Pathologically, the disease is characterized by the presence of brain amyloid deposits, neurofibrillary tangles, and neuronal loss (Dubois et al., 2014). One of the major constituents of these deposits is the Aβ peptide, arising from the sequential cleavage of the Amyloid precursor protein (APP). The genetic basis of the disease is complex. Three major genes, *APP*, *PSEN1* and *PSEN2* (encoding Presenilin-1 and 2 respectively), may be responsible for early onset AD cases, but only account for less than 1% of all cases. Several genetic susceptibility factors have been described, but the genetic landscape of the disease remains largely elusive. It is noteworthy that one of the major genetic risk factors for AD is the well-known LXR-target APOE, the APOEε4 allele increasing the risk of developing the disease from 3 times (for heterozygous carriers) to 12 times (for homozygous carriers).

The link between cholesterol and AD has been suggested when the treatment of patients with statins (HMG-CoA reductase inhibitors) were associated with a lower prevalence of AD (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). In mice models of AD overexpressing mutated APP, the administration of T0901317 lowered both soluble Aβ40 and Aβ42 (Koldamova et al., 2005). In these animals, genetic loss of either LXRα or LXRβ worsened brain deposits (Zelcer et al., 2007). The activation of LXRs has several biological consequences: 1) In cultured glial cells, it attenuates the inflammatory response induced by fibrillary Aβ; 2) In AD mouse models it induces not only overexpression of the LXR-targets ABCA1, ABCG1 and APOE, but also reduces cognitive defects and an improves brain pathology (Sandoval-Hernández et al., 2015; Vanmierlo et al., 2011). The anti-inflammatory role of LXRs in the CNS, particularly on microglia, has also been shown with, when activated, a reduced production of pro-inflammatory factors particularly involved in the NF-κB pathway (Cui et al., 2012). In primary cultures of hippocampal neurons, administration of the synthetic LXR-agonist GW3965 prevented synaptic defects induced by Aβ exposure (Báez-Becerra et al., 2018). In AD mice models, GW3965 modulated synaptic plasticity *in vivo* and reduced astrogliosis (Sandoval-Hernández et al., 2015).

In humans, the progression of brain atrophy has been associated with a decrease in circulating concentration of 24-hydroxycholesterol (Leoni and Caccia, 2011), suggesting a link between the disease and oxysterols metabolism. The first genetic link between LXR-encoding genes and AD has been found in 2006, with a mild association of an haplotype comprising rs1405655 and rs2695121 within the LXRβ-encoding gene (*NR1H2*) (Adighibe et al., 2006). The association of a genetic interaction between *NR1H2* and *CD14* genes with AD further suggested a possible link between LXRβ and the modulation of immune processes in the disease (Rodríguez-Rodríguez et al., 2008, p. 14). LXRα-encoding gene has also been implicated since rs7120118 within *NR1H3* was associated with AD (Natunen et al., 2012). The C allele of this Single Nucleotide polymorphism (SNP) was also associated with decrease of Tau and phospho-Tau in the cerebrospinal fluid (CSF) of the patients, whose increase is known to be a hallmark of AD. The same group reported a significant association of rs7120118 CC but not CT genotype with a decrease in soluble Aβ42 concentration in temporal cortex of patients compared to TT genotype (Natunen et al., 2013). The CT genotype, but not the CC genotype of the same SNP was also associated with LXRα expression, whereas LXRs targets ABCA1, ABCG1 and APOE expressions were not influenced by rs7120118 genotype.

Several results are in favor of a protective role of both LXR isoforms in humans and for the involvement of LXRs in the molecular mechanisms underlying AD pathogenesis. While their exact role remains to be uncovered, those data show that the pharmacological activation of LXRs could be considered as a potential therapeutic target in AD.

*6.3. **Multiple sclerosis***

MS is a neuroinflammatory disorder characterized by late, progressive, neurodegeneration (Nylander and Hafler, 2012). MS is one of the most prevalent chronic neurologic disorders in young adults, with a highly variable prevalence, ranging from less than 1 to more than 100 per 100 000 people per year (Browne et al., 2014). There is also a large variability in age of onset, varying from early childhood to more than 70 years, but mean age of onset is 31 years (Nicholas and Rashid, 2013). To date no clear monogenic cause has been identified so far, but many susceptibility loci have been identified (Beecham et al., 2013). The most admitted genetic association is an increased risk of MS in the HLADRB1*1015 allele carriers. Correlatively, pathogenesis of MS clearly involve autoimmune and neuroinflammatory processed in the CNS. Typically, the symptoms are represented by relapses during which patients develop neurological deficits in relation with brain inflammatory foci secondary to blood brain barrier (BBB) lesions. This condition is called relapsing remitting MS (RRMS). If relapses are not prevented efficiently by the treatment, a second, progressive, phase may occur after a variable delay, marked by a relentlessly progressive handicap, this is the Secondary Progressive MS (SPMS). However, almost 10 of the patients never experience relapses but have since the onset a progressive handicap, called, primary progressive MS (PPMS). In RRMS, neuroinflammatory mechanisms are largely prominent and the efficiency of the various treatments for this condition have well

demonstrated that. In SPMS and PPMS, neurodegenerative processes are involved and anti inflammatory drugs are not efficient.

Immune processes is a well-known LXR-controlled pathway. Cholesterol turnover has long been suggested as involved in neurological diseases (Björkhem et al., 2009; Xu et al., 2013). Side-chain oxysterols, particularly 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol have been proposed to reflect cerebral cholesterol turnover. Their use as diagnostic markers has hence been studied as these side-chain oxysterols can cross the BBB. In patients with MS there is a decrease in circulating 24(S)-hydroxycholesterol and this decrease are associated with the severity of the disease (Leoni et al., 2002). Various oxysterol profiles have been observed depending on the type of MS (Crick et al., 2017; Fellows Maxwell et al., 2019). Myelin is one important target of the inflammatory process in MS. LXRs have been shown to regulate myelination and remyelination, by modulating expression of several genes involved in myelin sheath formation (Meffre et al., 2015; Shackleford et al., 2017).

In patients, although no SNP within LXR-encoding genes has been associated with MS, a missense mutation in the *NR1H3* gene (NM_005693.3:c.1244G>A; p.Arg415Gln; rs61731956) in families with PPMS was recently described (Wang et al., 2016a). The variant segregated with the disease in two unrelated families. Haplotype analysis of the variant carriers suggested that they might arise from a common ancestor. Although predicted pathogenic by *in silico* analyses, incomplete penetrance was reported, supporting the need for additional genetic analyses. This finding, however, has been source of debate (Wang et al., 2016b). Indeed, a study from The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium did not show any association of this variant with MS risk in a wider population comprising 32 852 controls 36 000 MS cases (assumed to be 13-fold larger than Wang *et al.* population) (Antel et al., 2016). No association with the disease in the PPMS subpopulation could be found, nor any association with MS clinical course. Another group argued against pathogenicity of the variant using variant frequencies available in public databases (Minikel and MacArthur, 2016). Nevertheless this issue remains in dispute (Wang et al., 2016c). This enlightens one of the most important challenge in human genetics: variant interpretation. The wide use of next-generation sequencers in human molecular diagnosis today leads to the identification of many variants, whose role in human pathology may be difficult to interpret. Although interesting efforts in the standardization of variant interpretation have been made (Richards et al., 2015b), there is today a need for new tools to help the classification of variants of uncertain significance, especially in neurodegenerative diseases.

7. Conclusion

In the last decades, cholesterol and oxysterols metabolisms have demonstrated their pivotal role in maintaining brain homeostasis. In several neurodegenerative disorders, cholesterol and oxysterols dysregulations were frequently observed, raising the question of their putative use as biomarkers. LXRs, well known as cholesterol endogenous sensors, have today proven their key role as CNS cholesterol gatekeepers. These fascinating nuclear receptors must not be reduced to their cholesterol-lowering function. Once activated, they act as anti-inflammatory actors, especially in brain. We can thus propose a dual role for LXRs, both maintaining brain cholesterol metabolism, as well as repressing neuroinflammatory processes. Studies have shown their involvement in many neurodegenerative disorders, such as ALS, AD and MS (figure 2).

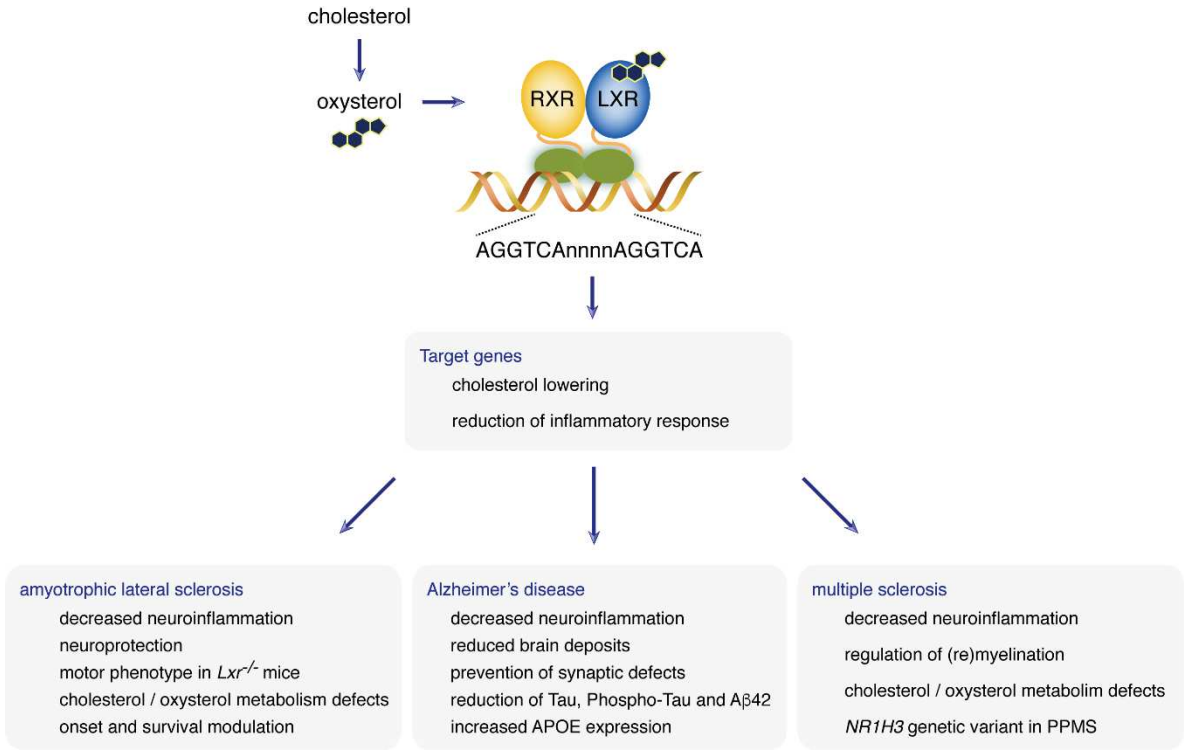


Figure 2. Involvement of LXRs in neurodegenerative diseases. LXRs are central regulators of both cholesterol and oxysterol metabolisms. They have multiple roles in brain functions and dysregulations of LXR-controlled metabolisms have been observed in neurodegenerative disorders. In amyotrophic lateral sclerosis, animal studies suggested that LXRs decrease neuroinflammation and act as neuroprotectors. *Lxr*-defective mice also have a motor phenotype mimicking ALS. In patients, cholesterol and oxysterol metabolisms disturbances have been observed and LXR encoding-genes polymorphisms are associated with age at onset and survival time. In Alzheimer's disease, treatment of AD animal models with a LXR agonist decreases neuroinflammation and reduces brain deposits. Cell culture and animal models also show that LXR could prevent synaptic defects. In patients, LXRα encoding-gene polymorphism is associated with a decrease in Tau and phospho-Tau levels in CSF of patients, as well as in Aβ42 in temporal cortex. *APOE*, whose allele ε4 is strongly associated with AD, is also a LXR-target gene. In multiple sclerosis, LXRs have been shown to promote myelination and remyelination and to decrease neuroinflammation. In patients, cholesterol and oxysterol metabolisms have been observed and a missense genetic variant has been described as responsible for familial forms of primary progressive MS. LXR, Liver X Receptor; PPMS, Primary Progressive Multiple Sclerosis; RXR, Retinoid X Receptor.

In vitro, in vivo and human studies all showed the involvement of LXRs in neuroprotection. Right now, those works led us to a key point: as they are inducible transcription factors, the development of pharmacological agonists targeting LXRs for the treatment of neurodegenerative disorders have to be considered.

Funding: Our work is supported by grants from the institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), the Groupement de Coopération Sanitaire Montpellier-Nîmes (GCS-MERRI) and Association Française pour la Recherche sur la SLA (ARSLA). The current study is part of the thematic portfolio for clinical research studies which were at least partly supported through the University Hospital of Nîmes call for internal bids « Thématiques émergentes ».

Acknowledgments: We are grateful to all technicians of the Department of Biochemistry and Molecular Biology at Nîmes University Hospital and team members for helpful discussion. We thank the University hospital of Nîmes for its structural, human and financial support through the award obtained by our team during the internal call for tenders « Thématiques émergentes ».

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

Abbreviations

AD	Alzheimer's disease
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
APP	Amyloid precursor protein
BBB	Blood brain barrier
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CNS	Central nervous system
CSF	Cerebrospinal fluid
DBD	DNA-binding domain
FALS	Familial ALS
FDR	False discovery rate
FTD	Frontotemporal dementia
IDOL	Inducible degrader of LDLR
IL	Interleukin
LDLR	LDL receptor
LXR	Liver X Receptor
LXRE	LXR Responsive Element
MN	Motor neuron
MS	Multiple sclerosis
NLS	Nuclear localization signal
PPMS	Primary progressive MS
RRMS	Relapsing remitting MS
RXR	Retinoid X Receptor
SPMS	Secondary Progressive MS
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TNF	Tumor necrosis factor

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-Khalik, J., Yutuc, E., Crick, P.J., Gustafsson, J.-Å., Warner, M., Roman, G., Talbot, K., Gray, E., Griffiths, W.J., Turner, M.R., Wang, Y., 2017. Defective cholesterol metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. J. Lipid Res. 58, 267–278. https://doi.org/10.1194/jlr.P071639

Abildayeva, K., Jansen, P.J., Hirsch-Reinshagen, V., Bloks, V.W., Bakker, A.H.F., Ramaekers, F.C.S., de Vente, J., Groen, A.K., Wellington, C.L., Kuipers, F., Mulder, M., 2006. 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. J. Biol. Chem. 281, 12799–12808. https://doi.org/10.1074/jbc.M601019200

Adams, M.M., Kafaligonul, H., 2018. Zebrafish—A Model Organism for Studying the Neurobiological Mechanisms Underlying Cognitive Brain Aging and Use of Potential Interventions. Front. Cell Dev. Biol. 0. https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00135

Adighibe, O., Arepalli, S., Duckworth, J., Hardy, J., Wavrant-De Vrièze, F., 2006. Genetic variability at the LXR gene (NR1H2) may contribute to the risk of Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging 27, 1431–1434. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.08.010

Aebischer, J., Bernard-Marissal, N., Pettmann, B., Raoul, C., 2013. Death Receptors in the Selective Degeneration of Motoneurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis. J. Neurodegener. Dis. 2013, 746845. https://doi.org/10.1155/2013/746845

Ahmed, R.M., Irish, M., Piguet, O., Halliday, G.M., Ittner, L.M., Farooqi, S., Hodges, J.R., Kiernan, M.C., 2016. Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: distinct and overlapping changes in eating behaviour and metabolism. Lancet Neurol. 15, 332–342. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00380-4

Akioyamen, L.E., Genest, J., Shan, S.D., Reel, R.L., Albaum, J.M., Chu, A., Tu, J.V., 2017. Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and meta-analysis. BMJ Open 7, e016461. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016461

Alberti, S., Schuster, G., Parini, P., Feltkamp, D., Diczfalusy, U., Rudling, M., Angelin, B., Bjorkhem, I., Pettersson, S., Gustafsson, J.A., 2001. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. J Clin Invest 107, 565–73.

Al-Chalabi, A., Hardiman, O., 2013. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. Nat. Rev. Neurol. 9, 617–628. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.203

Al-Chalabi, A., van den Berg, L.H., Veldink, J., 2017. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. Nat. Rev. Neurol. 13, 96–104. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.182

Allodi, I., Montañana-Rosell, R., Selvan, R., Löw, P., Kiehn, O., 2021. Locomotor deficits in a mouse model of ALS are paralleled by loss of V1-interneuron connections onto fast motor neurons. Nat. Commun. 12, 3251. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23224-7

Alsultan, A.A., Waller, R., Heath, P.R., Kirby, J., 2016. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. Degener. Neurol. Neuromuscul. Dis. 6, 49–64. https://doi.org/10.2147/DNND.S84956

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389–3402. https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389

Ameziane, N., Bogard, M., Lamoril, J., 2005. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Elsevier Masson.

Andersson, S., Gustafsson, N., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2005. Inactivation of liver X receptor beta leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. Proc Natl Acad Sci U A 102, 3857–62.

Antel, J., Ban, M., Baranzini, S., Barcellos, L., Barizzone, N., Beecham, A., Berge, T., Bernardinelli, L., Booth, D., Bos, S., Buck, D., Butkiewicz, M., Celius, E.G., Comabella, M., Compston, A., Dedham, K., Cotsapas, C., D' Alfonso, S., De Jager, P., Dubois, B., Duquette, P., Fontaine, B., Gasperi, C., Gil, E., Goris, A., Gourraud, P.A., Graetz, C., Gyllenberg, A., Hadjigeorgiou, G., Hafler, D., Hribko, D., Haines, J., Harbo, H., Hauser, S., Warto, S., Hawkins, C., Hemmer, B., Henry, R., Hintzen, R., Horakova, D., Ivinson, A., Howard, M., Jelcic, I., Kaskow, B., Kira, J.-I., Kleinova, P., Kockum, I., Kucerova, K., Lill, C., Luessi, F., Malhotra, S., Martin, R., Martinelli, F., Matsushita, T., McCabe, C., McCauley, J., Mescheriakkova, J., Mitrovic, M., Moen, S.-M., Montalban, X., Muhlau, M., Nakmura, Y., Oksenberg, J., Olsson, T., Oturai, A., Palotie, A., Patsopoulos, N., Pavlicova, J., Pericak-Vance, P., Piehl, F., Rebeix, I., Rioux, J., Saarela, J., Sawcer, S., Sellebjerg, F., Sondergaard, H.B., Sorensen, P.S., Sospedra, M., Spurkland, A., Stewart, G., Taylor, B., Uitterlinden, A., Van Duijn, C., Zipp, F., 2016. NR1H3 p.Arg415Gln Is Not Associated to Multiple Sclerosis Risk. Neuron 92, 333–335. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.052

Babin, P.J., Goizet, C., Raldúa, D., 2014. Zebrafish models of human motor neuron diseases: Advantages and limitations. Prog. Neurobiol. 118, 36–58. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.03.001

Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., Boza-Serrano, A., 2018. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. Front. Cell. Neurosci. 12. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488

Bae, J.S., Simon, N.G., Menon, P., Vucic, S., Kiernan, M.C., 2013. The Puzzling Case of Hyperexcitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis. J. Clin. Neurol. Seoul Korea 9, 65–74. https://doi.org/10.3988/jcn.2013.9.2.65

Báez-Becerra, C., Filipello, F., Sandoval-Hernández, A., Arboleda, H., Arboleda, G., 2018. Liver X Receptor Agonist GW3965 Regulates Synaptic Function upon Amyloid Beta Exposure in Hippocampal Neurons. Neurotox. Res. 33, 569–579. https://doi.org/10.1007/s12640-017-9845-3

Barbereau, C., Cubedo, N., Maurice, T., Rossel, M., 2021. Zebrafish Models to Study New Pathways in Tauopathies. Int. J. Mol. Sci. 22, 4626. https://doi.org/10.3390/ijms22094626

Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 2016. Neuroscience: exploring the brain, Fourth edition. ed. Wolters Kluwer, Philadelphia.

Beattie, C.E., 2000. Control of motor axon guidance in the zebrafish embryo. Brain Res. Bull. 53, 489–500. https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00382-8

Becker, T., Wullimann, M.F., Becker, C.G., Bernhardt, R.R., Schachner, M., 1997. Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. J. Comp. Neurol. 377, 577–595. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970127)377:4<577::AID-CNE8>3.0.CO;2-#

Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kemppinen, A., Cotsapas, C., Shahi, T.S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., Oturai, A., Saarela, J., Fontaine, B., Hemmer, B., Martin, C., Zipp, F., D'alfonso, S., Martinelli-Boneschi, F., Taylor, B., Harbo, H.F., Kockum, I., Hillert, J., Olsson, T., Ban, M., Oksenberg, J.R., Hintzen, R., Barcellos, L.F., Agliardi, C., Alfredsson, L., Alizadeh, M., Anderson, C., Andrews, R., Søndergaard, H.B., Baker, A., Band, G., Baranzini, S.E., Barizzone, N., Barrett, J., Bellenguez, C., Bergamaschi, L., Bernardinelli, L., Berthele, A., Biberacher, V., Binder, T.M.C., Blackburn, H., Bomfim, I.L., Brambilla, P., Broadley, S., Brochet, B., Brundin, L., Buck, D., Butzkueven, H., Caillier,

S.J., Camu, W., Carpentier, W., Cavalla, P., Celius, E.G., Coman, I., Comi, G., Corrado, L., Cosemans, L., Cournu-Rebeix, I., Cree, B.A.C., Cusi, D., Damotte, V., Defer, G., Delgado, S.R., Deloukas, P., di Sapio, A., Dilthey, A.T., Donnelly, P., Dubois, B., Duddy, M., Edkins, S., Elovaara, I., Esposito, F., Evangelou, N., Fiddes, B., Field, J., Franke, A., Freeman, C., Frohlich, I.Y., Galimberti, D., Gieger, C., Gourraud, P.-A., Graetz, C., Graham, A., Grummel, V., Guaschino, C., Hadjixenofontos, A., Hakonarson, H., Halfpenny, C., Hall, G., Hall, P., Hamsten, A., Harley, J., Harrower, T., Hawkins, C., Hellenthal, G., Hillier, C., Hobart, J., Hoshi, M., Hunt, S.E., Jagodic, M., Jelčić, I., Jochim, A., Kendall, B., Kermode, A., Kilpatrick, T., Koivisto, K., Konidari, I., Korn, T., Kronsbein, H., Langford, C., Larsson, M., Lathrop, M., Lebrun-Frenay, C., Lechner-Scott, J., Lee, M.H., Leone, M.A., Leppä, V., Liberatore, G., Lie, B.A., Lill, C.M., Lindén, M., Link, J., Luessi, F., Lycke, J., Macciardi, F., Männistö, S., Manrique, C.P., Martin, R., Martinelli, V., Mason, D., Mazibrada, G., McCabe, C., Mero, I.-L., Mescheriakova, J., Moutsianas, L., Myhr, K.-M., Nagels, G., Nicholas, R., Nilsson, P., Piehl, F., Pirinen, M., Price, S.E., Quach, H., Reunanen, M., Robberecht, W., Robertson, N.P., Rodegher, M., Rog, D., Salvetti, M., Schnetz-Boutaud, N.C., Sellebjerg, F., Selter, R.C., Schaefer, C., Shaunak, S., Shen, L., Shields, S., Siffrin, V., Slee, M., Sorensen, P.S., Sorosina, M., Sospedra, M., Spurkland, A., Strange, A., Sundqvist, E., Thijs, V., Thorpe, J., Ticca, A., Tienari, P., van Duijn, C., Visser, E.M., Vucic, S., Westerlind, H., Wiley, J.S., Wilkins, A., Wilson, J.F., Winkelmann, J., Zajicek, J., Zindler, E., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Ivinson, A.J., Stewart, G., Hafler, D., Hauser, S.L., Compston, A., McVean, G., De Jager, P., Sawcer, S., McCauley, J.L., 2013. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Nat. Genet. 45, 1353–1360. https://doi.org/10.1038/ng.2770

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 motorneurons hyperexcitability in the Sod1-G93R zebrafish ALS model. Sci. Rep. 6, 24515. https://doi.org/10.1038/srep24515

Bensinger, S.J., Tontonoz, P., 2008. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. Nature 454, 470–477. https://doi.org/10.1038/nature07202

Berg, E.M., Björnfors, E.R., Pallucchi, I., Picton, L.D., El Manira, A., 2018. Principles Governing Locomotion in Vertebrates: Lessons From Zebrafish. Front. Neural Circuits 12, 73. https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00073

Bergh J, Zetterstrom P, Andersen PM, Brannstrom T, Graffmo KS, Jonsson PA, Lang L, Danielsson J, Oliveberg M, Marklund SL. Structural and kinetic analysis of protein-aggregate strains in vivo using binary epitope mapping. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:4489–4494. doi: 10.1073/pnas.1419228112.

Bezine, M., Namsi, A., Sghaier, R., Ben Khalifa, R., Hamdouni, H., Brahmi, F., Badreddine, I., Mihoubi, W., Nury, T., Vejux, A., Zarrouk, A., de Sèze, J., Moreau, T., Nasser, B., Lizard, G., 2018. The effect of oxysterols on nerve impulses. Biochimie 153, 46–51. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.013

Bigini, P., Steffensen, K.R., Ferrario, A., Diomede, L., Ferrara, G., Barbera, S., Salzano, S., Fumagalli, E., Ghezzi, P., Mennini, T., Gustafsson, J.A., 2010. Neuropathologic and biochemical changes during disease progression in liver X receptor beta-/- mice, a model of adult neuron disease. J Neuropathol Exp Neurol 69, 593–605.

Björkhem, I., Cedazo-Minguez, A., Leoni, V., Meaney, S., 2009. Oxysterols and neurodegenerative diseases. Mol. Aspects Med. 30, 171–179. https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.001

Björkhem, I., Meaney, S., 2004. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 806–815. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b

Boillée, S., Velde, C.V., Cleveland, D.W., 2006. ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. Neuron 52, 39–59. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.018

Bosco, D., Morfini, G., Karabacak, N. *et al.* Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci* **13,** 1396–1403 (2010). https://doi.org/10.1038/nn.2660

Bose, P., Armstrong, G.A.B., Drapeau, P., 2019. Neuromuscular junction abnormalities in a zebrafish loss-of-function model of TDP-43. J. Neurophysiol. 121, 285–297. https://doi.org/10.1152/jn.00265.2018

Bourefis, A.-R., Campanari, M.-L., Buee-Scherrer, V., Kabashi, E., 2020. Functional characterization of a FUS mutant zebrafish line as a novel genetic model for ALS. Neurobiol. Dis. 142, 104935. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104935

Bradley, W.G., Miller, R.X., Levine, T.D., Stommel, E.W., Cox, P.A., 2018. Studies of Environmental Risk Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and a Phase I Clinical Trial of l-Serine. Neurotox. Res. 33, 192–198. https://doi.org/10.1007/s12640-017-9741-x

Brown, R.H., Al-Chalabi, A., 2017. Amyotrophic Lateral Sclerosis [WWW Document]. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1603471. https://doi.org/10.1056/NEJMra1603471

Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B.V., Thompson, A.J., 2014. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. Neurology 83, 1022–1024. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000768

Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Drapeau, P., 2003. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. J. Physiol. Paris 97, 77–86. https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2003.10.009

Burrell, J.R., Halliday, G.M., Kril, J.J., Ittner, L.M., Götz, J., Kiernan, M.C., Hodges, J.R., 2016. The frontotemporal dementia-motor neuron disease continuum. Lancet Lond. Engl. 388, 919–931. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00737-6

Buss, R.R., Drapeau, P., 2000. Physiological Properties of Zebrafish Embryonic Red and White Muscle Fibers During Early Development. J. Neurophysiol. 84, 1545–1557. https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.3.1545

Butti, Z., Patten, S.A., 2019. RNA Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Front. Genet. 9, 712. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00712

Cady, J., Allred, P., Bali, T., Pestronk, A., Goate, A., Miller, T.M., Mitra, R., Ravits, J., Harms, M.B., Baloh, R.H., 2015. ALS onset is influenced by the burden of rare variants in known ALS genes. Ann. Neurol. 77, 100–113. https://doi.org/10.1002/ana.24306

Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J., 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. Science 294, 1866–70.

Chen, J.D., Evans, R.M., 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature 377, 454–7.

Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., Russell, D.W., 2007. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. Cell Metab 5, 73–9.

Chiò, A., Logroscino, G., Hardiman, O., Swingler, R., Mitchell, D., Beghi, E., Traynor, B.G., Eurals Consortium, 2009. Prognostic factors in ALS: A critical review. Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis. 10, 310–323. https://doi.org/10.3109/17482960802566824

Chiò, A., Mazzini, L., D'Alfonso, S., Corrado, L., Canosa, A., Moglia, C., Manera, U., Bersano, E., Brunetti, M., Barberis, M., Veldink, J.H., van den Berg, L.H., Pearce, N., Sproviero, W., McLaughlin, R., Vajda, A., Hardiman, O., Rooney, J., Mora, G., Calvo, A., Al-Chalabi, A., 2018. The multistep hypothesis of ALS revisited: The role of genetic mutations. Neurology 91, e635–e642. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005996

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. https://doi.org/10.1002/ana.23946

Ciura, S., Sellier, C., Campanari, M.-L., Charlet-Berguerand, N., Kabashi, E., 2016. The most prevalent genetic cause of ALS-FTD, C9orf72 synergizes the toxicity of ATXN2 intermediate polyglutamine repeats through the autophagy pathway. Autophagy 12, 1406–1408. https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1189070

Cleary, J.D., Pattamatta, A., Ranum, L.P.W., 2018. Repeat-associated non-ATG (RAN) translation. J. Biol. Chem. 293, 16127–16141. https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003237

Conradi, S., Ronnevi, L.O., 1993. Selective vulnerability of alpha motor neurons in ALS: relation to autoantibodies toward acetylcholinesterase (AChE) in ALS patients. Brain Res. Bull. 30, 369–371. https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90267-f

Conte, A., Lattante, S., Zollino, M., Marangi, G., Luigetti, M., Grande, A.D., Servidei, S., Trombetta, F., Sabatelli, M., 2012. P525L FUS mutation is consistently associated with a severe form of juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neuromuscul. Disord. 22, 73–75. https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.08.003

Cooper-Knock, J., Higginbottom, A., Stopford, M.J., Highley, J.R., Ince, P.G., Wharton, S.B., Pickering-Brown, S., Kirby, J., Hautbergue, G.M., Shaw, P.J., 2015. Antisense RNA foci in the motor neurons of C9ORF72-ALS patients are associated with TDP-43 proteinopathy. Acta Neuropathol. (Berl.) 130, 63–75. https://doi.org/10.1007/s00401-015-1429-9

Cooper-Knock, J., Shaw, P.J., Kirby, J., 2014 The widening spectrum of C9ORF72-related disease; genotype/phenotype correlations and potential modifiers of clinical phenotype. Acta Neuropathol. (Berl.) 127, 333–345. https://doi.org/10.1007/s00401-014-1251-9

Cooper-Knock, J., Walsh, M.J., Higginbottom, A., Robin Highley, J., Dickman, M.J., Edbauer, D., Ince, P.G., Wharton, S.B., Wilson, S.A., Kirby, J., Hautbergue, G.M., Shaw, P.J., 2014b. Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. Brain J. Neurol. 137, 2040–2051. https://doi.org/10.1093/brain/awu120

Coque, E., Salsac, C., Espinosa-Carrasco, G., Varga, B., Degauque, N., Cadoux, M., Crabé, R., Virenque, A., Soulard, C., Fierle, J.K., Brodovitch, A., Libralato, M., Végh, A.G., Venteo, S., Scamps, F., Boucraut, J., Laplaud, D., Hernandez, J., Gergely, C., Vincent, T., Raoul, C., 2019. Cytotoxic CD8+ T lymphocytes expressing ALS-causing SOD1 mutant selectively trigger death of spinal motoneurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116, 2312–2317. https://doi.org/10.1073/pnas.1815961116

Corrado, L., D'Alfonso, S., Bergamaschi, L., Testa, L., Leone, M., Nasuelli, N., Momigliano-Richiardi, P., Mazzini, L., 2006. SOD1 gene mutations in Italian patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Neuromuscul. Disord. 16, 800–804. https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.07.004

Couratier, P., Corcia, P., Lautrette, G., Nicol, M., Preux, P.-M., Marin, B., 2016. [Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis]. Rev. Prat. 66, 556–558.

Courtney, R., Landreth, G.E., 2016. LXR Regulation of Brain Cholesterol: From Development to Disease. Trends Endocrinol. Metab. TEM 27, 404–414. https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.03.018

Couthouis, J., Raphael, A.R., Daneshjou, R., Gitler, A.D., 2014. Targeted Exon Capture and Sequencing in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. PLOS Genet. 10, e1004704. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004704

Crabé, R., Aimond, F., Gosset, P., Scamps, F., Raoul, C., 2020. How Degeneration of Cells Surrounding Motoneurons Contributes to Amyotrophic Lateral Sclerosis. Cells 9, 2550. https://doi.org/10.3390/cells9122550

Crick, P.J., Griffiths, W.J., Zhang, J., Beibel, M., Abdel-Khalik, J., Kuhle, J., Sailer, A.W., Wang, Y., 2017. Reduced Plasma Levels of 25-Hydroxycholesterol and Increased

Cerebrospinal Fluid Levels of Bile Acid Precursors in Multiple Sclerosis Patients. Mol. Neurobiol. 54, 8009–8020. https://doi.org/10.1007/s12035-016-0281-9

Cui, W., Sun, Y., Wang, Z., Xu, C., Peng, Y., Li, R., 2012. Liver X receptor activation attenuates inflammatory response and protects cholinergic neurons in APP/PS1 transgenic mice. Neuroscience 210, 200–210. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.02.047

Da Costa, M.M.J., Allen, C.E., Higginbottom, A., Ramesh, T., Shaw, P.J., McDermott, C.J., 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. https://doi.org/10.1242/dmm.012013

Dallel, S., Tauveron, I., Brugnon, F., Baron, S., Lobaccaro, J.M.A., Maqdasy, S., 2018. Liver X Receptors: A Possible Link between Lipid Disorders and Female Infertility. Int. J. Mol. Sci. 19. https://doi.org/10.3390/ijms19082177

Dardiotis, E., Siokas, V., Sokratous, M., Tsouris, Z., Aloizou, A.-M., Florou, D., Dastamani, M., Mentis, A.-F.A., Brotis, A.G., 2018. Body mass index and survival from amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis. Neurol. Clin. Pract. 8, 437–444. https://doi.org/10.1212/CPJ.0000000000000521

De Boussac, H., Alioui, A., Viennois, E., Dufour, J., Trousson, A., Vega, A., Guy, L., Volle, D.H., Lobaccaro, J.-M.A., Baron, S., 2013. Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions. Expert Opin. Ther. Targets 17, 1029–1038. https://doi.org/10.1517/14728222.2013.820708

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.-Y.R., Karydas, A., Seeley, W.W., Josephs, K.A., Coppola, G., Geschwind, D.H., Wszolek, Z.K., Feldman, H., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Miller, B.L., Dickson, D.W., Boylan, K.B., Graff-Radford, N.R., Rademakers, R., 2011a. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. Neuron 72, 245–256. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011

Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragnolini, A., Martínez-Palma, L., Cassina, P., Beckman, J., Barbeito, L., 2011. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 18126–18131. https://doi.org/10.1073/pnas.1110689108

DiDonato, M., Craig, L., Huff, M.E., Thayer, M.M., Cardoso, R.M.F., Kassmann, C.J., Lo, T.P., Bruns, C.K., Powers, E.T., Kelly, J.W., Getzoff, E.D., Tainer, J.A., 2003. ALS Mutants of Human Superoxide Dismutase Form Fibrous Aggregates Via Framework Destabilization. J. Mol. Biol. 332, 601–615. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00889-1

Diekstra, F.P., van Vught, P.W.J., van Rheenen, W., Koppers, M., Pasterkamp, R.J., van Es, M.A., Schelhaas, H.J., de Visser, M., Robberecht, W., Van Damme, P., Andersen, P.M., van den Berg, L.H., Veldink, J.H., 2012. UNC13A is a modifier of survival in amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol. Aging 33, 630.e3-630.e8. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.029

Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Brustein, E., 2002. Development of the locomotor network in zebrafish. Prog. Neurobiol. 68, 85–111. https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00075-8

Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J.L., Blennow, K., DeKosky, S.T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G.B., Fox, N.C., Galasko, D., Habert, M.-O., Jicha, G.A., Nordberg, A., Pasquier, F., Rabinovici, G., Robert, P., Rowe, C., Salloway, S., Sarazin, M., Epelbaum, S., de Souza, L.C., Vellas, B., Visser, P.J., Schneider, L., Stern, Y., Scheltens, P., Cummings, J.L., 2014. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. Lancet Neurol. 13, 614–629. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0

Dunnen, J.T. den, Dalgleish, R., Maglott, D.R., Hart, R.K., Greenblatt, M.S., McGowan-Jordan, J., Roux, A.-F., Smith, T., Antonarakis, S.E., Taschner, P.E.M., 2016. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. Hum. Mutat. 37, 564–569. https://doi.org/10.1002/humu.22981

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. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27

Eckert, G.P., Vardanian, L., Rebeck, G.W., Burns, M.P., 2007. Regulation of central nervous system cholesterol homeostasis by the liver X receptor agonist TO-901317. Neurosci. Lett. 423, 47–52. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.05.063

Ekhtiari Bidhendi E, Bergh J, Zetterström P, et al. Mutant superoxide dismutase aggregates from human spinal cord transmit amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol. 2018;136(6):939-953. doi:10.1007/s00401-018-1915-y

Eklöf-Ljunggren, E., Haupt, S., Ausborn, J., Dehnisch, I., Uhlén, P., Higashijima, S., Manira, A.E., 2012. Origin of excitation underlying locomotion in the spinal circuit of zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 5511–5516. https://doi.org/10.1073/pnas.1115377109

El-Hajjaji, F.Z., Oumeddour, A., Pommier, A.J., Ouvrier, A., Viennois, E., Dufour, J., Caira, F., Drevet, J.R., Volle, D.H., Baron, S., Saez, F., Lobaccaro, J.M., 2011. Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. Biochim Biophys Acta 1812, 974–81.

Enayat, Z.E., Orrell, R.W., Claus, A., Ludolph, A., Bachus, R., Brockmüller, J., Ray-Chaudhuri, K., Radunovic, A., Shaw, C., Wilkinson, J., king, A., Swash, M., Leigh, P.N., Belleroche, J. de, Powell, J., 1995. Two novel mutations in the gene for coppe zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis. Hum. Mol. Genet. 4, 1239–1240. https://doi.org/10.1093/hmg/4.7.1239

Ezzi, S. A., Urushitani, M., and Julien, J. P. (2007). Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J. Neurochem*. 102, 170–178. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04531.x

Engel, T., Lorkowski, S., Lueken, A., Rust, S., Schluter, B., Berger, G., Cullen, P., Assmann, G., 2001. The human ABCG4 gene is regulated by oxysterols and retinoids in monocyte-derived macrophages. Biochem Biophys Res Commun 288, 483–8.

Faucherre, A., Nargeot, J., Mangoni, M.E., Jopling, C., 2013. piezo2b regulates vertebrate light touch response. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 33, 17089–17094. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0522-13.2013

Fellows Maxwell, K., Bhattacharya, S., Bodziak, M.L., Jakimovski, D., Hagemeier, J., Browne, R.W., Weinstock-Guttman, B., Zivadinov, R., Ramanathan, M., 2019. Oxysterols and apolipoproteins in multiple sclerosis: a 5 year follow-up study. J. Lipid Res. 60, 1190–1198. https://doi.org/10.1194/jlr.M089664

Feneberg, E., Turner, M.R., Ansorge, O., Talbot, K., 2020. Amyotrophic lateral sclerosis with a heterozygous D91A SOD1 variant and classical ALS-TDP neuropathology. Neurology 95, 595–596. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010587

Fessler, M.B., 2018. The challenges and promise of targeting the Liver X Receptors for treatment of inflammatory disease. Pharmacol. Ther. 181, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.010

Fifita, J.A., Williams, K.L., Sundaramoorthy, V., Mccann, E.P., Nicholson, G.A., Atkin, J.D., Blair, I.P., 2017. A novel amyotrophic lateral sclerosis mutation in OPTN induces ER stress and Golgi fragmentation in vitro. Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener. 18, 126–133. https://doi.org/10.1080/21678421.2016.1218517

Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., Glass, J.D., 2004. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. Exp. Neurol. 185, 232–240. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.10.004

Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal*. 15, 1583–1606. doi: 10.1089/ars.2011.3999

Garnier, Delamare, 2009. Dictionnaire illustré des termes de médecine - 30e édition [WWW Document]. URL https://www.livres-medicaux.com/dictionnaire-illustre-des-termes-de-medecine-30e-edition-cd-rom.html (accessed 4.19.21).

Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.E., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., 2007. Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. Mol Cell 25, 57–70.

Goritz, C., Mauch, D.H., Pfrieger, F.W., 2005. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. Mol. Cell. Neurosci. 29, 190–201. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.02.006

Gosselet, F., Saint-Pol, J., Fenart, L., 2014. Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: implications for Alzheimer's disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 446, 687–691. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.059

Gowland, A., Opie-Martin, S., Scott, K.M., Jones, A.R., Mehta, P.R., Batts, C.J., Ellis, C.M., Leigh, P.N., Shaw, C.E., 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. https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1587629

Gregory, J.M., Fagegaltier, D., Phatnani, H., Harms, M.B., 2020. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Curr. Genet. Med. Rep. 8, 121–131. https://doi.org/10.1007/s40142-020-00194-8

Griffiths, W.J., Abdel-Khalik, J., Hearn, T., Yutuc, E., Morgan, A.H., Wang, Y., 2016. Current trends in oxysterol research. Biochem. Soc. Trans. 44, 652–658. https://doi.org/10.1042/BST20150255

Guissart, C., Mouzat, K., Kantar, J., Louveau, B., Vilquin, P., Polge, A., Raoul, C., Lumbroso, S., 2020. Premature termination codons in SOD1 causing Amyotrophic Lateral Sclerosis are predicted to escape the nonsense-mediated mRNA decay. Sci. Rep. 10, 20738. https://doi.org/10.1038/s41598-020-77716-5

Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775. doi: 10.1126/science.8209258

Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E.M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P.J., Simmons, Z., van den Berg, L.H., 2017a. Amyotrophic lateral sclerosis. Nat. Rev. Dis. Primer 3, 1–19. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71

Hardiman, O., van den Berg, L.H., Kiernan, M.C., 2011. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. Nat. Rev. Neurol. 7, 639–649. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.153

Haukedal, H., Freude, K., 2019. Implications of Microglia in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. J. Mol. Biol., Dementia, Brain Disorders and Molecular Mechanisms 431, 1818–1829. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.004

Henry-Berger, J., Mouzat, K., Baron, S., Bernabeu, C., Marceau, G., Saru, J.P., Sapin, V., Lobaccaro, J.M., Caira, F., 2008. Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. Biol Reprod 78, 968–75.

Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., et al., 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature 377, 397–404.

Hosler, B.A., Nicholson, G.A., Sapp, P.C., Chin, W., Orrell, R.W., de Belleroche, J.S., Esteban, J., Hayward, L.J., Mckenna-Yasek, D., Yeung, L., Cherryson, A.K., Dench, J.E., Wilton, S.D., Laing, N.G., Horvitz, H.R., Brown, R.H., 1996. Three novel mutations and two variants in the

gene for Cu/Zn superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. Neuromuscul. Disord. NMD 6, 361–366. https://doi.org/10.1016/0960-8966(96)00353-7

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J.D., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Crollius, H.R., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature 496, 498–503. https://doi.org/10.1038/nature12111

Hu, X., Lazar, M.A., 2000. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. Trends Endocrinol Metab 11, 6–10.

Hussain, G., Wang, J., Rasul, A., Anwar, H., Imran, A., Qasim, M., Zafar, S., Kamran, S.K.S., Razzaq, A., Aziz, N., Ahmad, W., Shabbir, A., Iqbal, J., Baig, S.M., Sun, T., 2019. Role of

cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. Lipids Health Dis. 18, 26. https://doi.org/10.1186/s12944-019-0965-z

Iacoangeli, A., Al Khleifat, A., Jones, A.R., Sproviero, W., Shatunov, A., Opie-Martin, S., Morrison, K.E., Shaw, P.J., Shaw, C.E., Fogh, I., Dobson, R.J., Newhouse, S.J., Al-Chalabi, A., 2019. C9orf72 intermediate expansions of 24–30 repeats are associated with ALS. Acta Neuropathol. Commun. 7. https://doi.org/10.1186/s40478-019-0724-4

Jackson, M., Marks, L., May, G.H.W., Wilson, J.B., 2018. The genetic basis of disease. Essays Biochem. 62, 643–723. https://doi.org/10.1042/EBC20170053

Jaiswal, M.K., 2019. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. Med. Res. Rev. 39, 733–748. https://doi.org/10.1002/med.21528

Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., Mangelsdorf, D.J., 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. Nature 383, 728–31.

Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., Drachman, D.A., 2000. Statins and the risk of dementia. Lancet 356, 1627–31.

Jopling, C., Suñé, G., Faucherre, A., Fabregat, C., Izpisua Belmonte, J.C., 2012. Hypoxia induces myocardial regeneration in zebrafish. Circulation 126, 3017–3027. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.107888

Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., 2003. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. Nat Med 9, 213–9.

Kabashi, E., Bercier, V., Lissouba, A., Liao, M., Brustein, E., Rouleau, G.A., Drapeau, P., 2011a. FUS and TARDBP but Not SOD1 Interact in Genetic Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. PLOS Genet. 7, e1002214. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002214

Kabashi, E., Brustein, E., Champagne, N., Drapeau, P., 2011b. Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. Biochim. Biophys. Acta 1812, 335–345. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.09.011

Kabashi, E., Lin, L., Tradewell, M.L., Dion, P.A., Bercier, V., Bourgouin, P., Rochefort, D., Bel Hadj, S., Durham, H.D., Velde, C.V., Rouleau, G.A., Drapeau, P., 2010. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. Hum. Mol. Genet. 19, 671–683. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp534

Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Velde, C.V., Bouchard, J.-P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P.-F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N., Rouleau, G.A., 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. Nat. Genet. 40, 572–574. https://doi.org/10.1038/ng.132

Kang, J., Rivest, S., 2012. Lipid metabolism and neuroinflammation in Alzheimer's disease: a role for liver X receptors. Endocr. Rev. 33, 715–746. https://doi.org/10.1210/er.2011-1049

Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., Edwards, P.A., 2001. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. J Biol Chem 276, 39438–47.

Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., Zoing, M.C., 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 377, 942–55.

Kim, H.J., Fan, X., Gabbi, C., Yakimchuk, K., Parini, P., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2008. Liver X receptor beta (LXRbeta): a link between beta-sitosterol and amyotrophic lateral sclerosis-Parkinson's dementia. Proc Natl Acad Sci U A 105, 2094–9.

Kim, O.S., Lee, C.S., Joe, E., Jou, I., 2006. Oxidized low density lipoprotein suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglia: oxidative stress acts through control of inflammation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 342, 9–18. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.107

Kim, S.H., Shanware, N.P., Bowler, M.J., Tibbetts, R.S., 2010. Amyotrophic Lateral Sclerosis-associated Proteins TDP-43 and FUS/TLS Function in a Common Biochemical Complex to Co-regulate HDAC6 mRNA *. J. Biol. Chem. 285, 34097–34105. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154831

Kim, S.-M., Noh, M.-Y., Kim, H., Cheon, S.-Y., Lee, K.M., Lee, J., Cha, E., Park, K.S., Lee, K.-W., Sung, J.-J., Kim, S.H., 2017. 25-Hydroxycholesterol is involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Oncotarget 8, 11855–11867. https://doi.org/10.18632/oncotarget.14416

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203, 253–310. https://doi.org/10.1002/aja.1002030302

Kimura, Y., Higashijima, S., 2019. Regulation of locomotor speed and selection of active sets of neurons by V1 neurons. Nat. Commun. 10, 2268. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09871-x

King, A.E., Woodhouse, A., Kirkcaldie, M.T.K., Vickers, J.C., 2016. Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? Exp. Neurol. 275, 162–171. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.09.019

Kirby, J., Al Sultan, A., Waller, R., Heath, P., 2016. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. Degener. Neurol. Neuromuscul. Dis. 49. https://doi.org/10.2147/DNND.S84956

Koldamova, R.P., Lefterov, I.M., Staufenbiel, M., Wolfe, D., Huang, S., Glorioso, J.C., Walter, M., Roth, M.G., Lazo, J.S., 2005. The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. J Biol Chem 280, 4079–88.

Koppers, M., Blokhuis, A.M., Westeneng, H.-J., Terpstra, M.L., Zundel, C.A.C., Vieira de Sá, R., Schellevis, R.D., Waite, A.J., Blake, D.J., Veldink, J.H., van den Berg, L.H., Pasterkamp, R.J., 2015. C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. Ann. Neurol. 78, 426–438. https://doi.org/10.1002/ana.24453

Korac, J., Schaeffer, V., Kovacevic, I., Clement, A.M., Jungblut, B., Behl, C., Terzic, J., Dikic, I., 2013. Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. J. Cell Sci. 126, 580–592. https://doi.org/10.1242/jcs.114926

Kumar, D.R., Aslinia, F., Yale, S.H., Mazza, J.J., 2011. Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology. Clin. Med. Res. 9, 46–49. https://doi.org/10.3121/cmr.2009.883

Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., 2001. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. Proc Natl Acad Sci U A 98, 507–12.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, Christina, Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A.,

Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.-F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.-C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G.R., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kaspryzk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F.A., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.-P., Yeh, R.-F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, Christopher, Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Patrinos, A., Morgan, M.J., International Human Genome Sequencing Consortium, Whitehead Institute for Biomedical Research, C. for G.R., The Sanger Centre:, Washington University Genome Sequencing Center, US DOE Joint Genome Institute:, Baylor College of Medicine Human

Genome Sequencing Center:, RIKEN Genomic Sciences Center:, Genoscope and CNRS UMR-8030:, Department of Genome Analysis, I. of M.B., GTC Sequencing Center:, Beijing Genomics Institute/Human Genome Center:, Multimegabase Sequencing Center, T.I. for S.B., Stanford Genome Technology Center:, University of Oklahoma's Advanced Center for Genome Technology:, Max Planck Institute for Molecular Genetics:, Cold Spring Harbor Laboratory, L.A.H.G.C., GBF—German Research Centre for Biotechnology:, *Genome Analysis Group (listed in alphabetical order, also includes individuals listed under other headings):, Scientific management: National Human Genome Research Institute, U.N.I. of H., Stanford Human Genome Center:, University of Washington Genome Center:, Department of Molecular Biology, K.U.S. of M., University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas:, Office of Science, U.D. of E., The Wellcome Trust:, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860–921. https://doi.org/10.1038/35057062

Landis, M.S., Patel, H.V., Capone, J.P., 2002. Oxysterol activators of liver X receptor and 9-cis-retinoic acid promote sequential steps in the synthesis and secretion of tumor necrosis factor-alpha from human monocytes. J Biol Chem 277, 4713–21.

Lane, C.A., Hardy, J., Schott, J.M., 2018. Alzheimer's disease. Eur. J. Neurol. 25, 59–70. https://doi.org/10.1111/ene.13439

Lanznaster, D., Hergesheimer, R., Vourc'h, P., Corcia, P., Blasco, H., 2021. TDP43 aggregates: the 'Schrödinger's cat' in amyotrophic lateral sclerosis. Nat. Rev. Neurosci. 22, 514–514. https://doi.org/10.1038/s41583-021-00477-1

Lattante, S., Doronzio, P.N., Marangi, G., Conte, A., Bisogni, G., Bernardo, D., Russo, T., Lamberti, D., Patrizi, S., Apollo, F.P., Lunetta, C., Scarlino, S., Pozzi, L., Zollino, M., Riva, N., Sabatelli, M., 2019. Coexistence of variants in TBK1 and in other ALS-related genes elucidates an oligogenic model of pathogenesis in sporadic ALS. Neurobiol. Aging 84, 239.e9-239.e14. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.03.010

Lattante, S., Marangi, G., Doronzio, P.N., Conte, A., Bisogni, G., Zollino, M., Sabatelli, M., 2020a. High-Throughput Genetic Testing in ALS: The Challenging Path of Variant Classification Considering the ACMG Guidelines. Genes 11. https://doi.org/10.3390/genes11101123

Lattante, S., Marangi, G., Doronzio, P.N., Conte, A., Bisogni, G., Zollino, M., Sabatelli, M., 2020b. High-Throughput Genetic Testing in ALS: The Challenging Path of Variant

Classification Considering the ACMG Guidelines. Genes 11. https://doi.org/10.3390/genes11101123

Lazar, M.A., 2003. Nuclear receptor corepressors. Nucl Recept Signal 1, e001.

Le Gall, L., Anakor, E., Connolly, O., Vijayakumar, U.G., Duddy, W.J., Duguez, S., 2020. Molecular and Cellular Mechanisms Affected in ALS. J. Pers. Med. 10. https://doi.org/10.3390/jpm10030101

Le Masson, G., Przedborski, S., Abbott, L.F., 2014. A COMPUTATIONAL MODEL OF MOTOR NEURON DEGENERATION. Neuron 83, 975–988. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.001

Lee, Y.-B., Chen, H.-J., Peres, J.N., Gomez-Deza, J., Attig, J., Stalekar, M., Troakes, C., Nishimura, A.L., Scotter, E.L., Vance, C., Adachi, Y., Sardone, V., Miller, J.W., Smith, B.N., Gallo, J.-M., Ule, J., Hirth, F., Rogelj, B., Houart, C., Shaw, C.E., 2013. Hexanucleotide repeats in ALS/FTD form length-dependent RNA foci, sequester RNA binding proteins, and are neurotoxic. Cell Rep. 5, 1178–1186. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.049

Lehmer, C., Oeckl, P., Weishaupt, J.H., Volk, A.E., Diehl-Schmid, J., Schroeter, M.L., Lauer, M., Kornhuber, J., Levin, J., Fassbender, K., Landwehrmeyer, B., German Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration, Schludi, M.H., Arzberger, T., Kremmer, E., Flatley, A., Feederle, R., Steinacker, P., Weydt, P., Ludolph, A.C., Edbauer, D., Otto, M., 2017. Poly-GP in cerebrospinal fluid links C9orf72-associated dipeptide repeat expression to the asymptomatic phase of ALS/FTD. EMBO Mol. Med. 9, 859–868. https://doi.org/10.15252/emmm.201607486

Lemmens, R., Van Hoecke, A., Hersmus, N., Geelen, V., D'Hollander, I., Thijs, V., Van Den Bosch, L., Carmeliet, P., Robberecht, W., 2007. Overexpression of mutant superoxide dismutase 1 causes a motor axonopathy in the zebrafish. Hum. Mol. Genet. 16, 2359–2365. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm193

Leoni, V., Caccia, C., 2013. Potential diagnostic applications of side chain oxysterols analysis in plasma and cerebrospinal fluid. Biochem. Pharmacol. 86, 26–36. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.015

Leoni, V., Caccia, C., 2011. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. Chem. Phys. Lipids 164, 515–524. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.04.002

Leoni, V., Masterman, T., Diczfalusy, U., De Luca, G., Hillert, J., Björkhem, I., 2002. Changes in human plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis. Neurosci. Lett. 331, 163–166. https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00887-x

Lewis, K.E., Eisen, J.S., 2003. From cells to circuits: development of the zebrafish spinal cord. Prog. Neurobiol. 69, 419–449. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00052-2

Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. Nat. Rev. Genet. 8, 353–367. https://doi.org/10.1038/nrg2091

Liu, D.W., Westerfield, M., 1988. Function of identified motoneurones and co-ordination of primary and secondary motor systems during zebra fish swimming. J. Physiol. 403, 73–89. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017239

Liu, Z., Li, H., Hong, C., Chen, M., Yue, T., Chen, C., Wang, Z., You, Q., Li, C., Weng, Q., Xie, H., Hu, R., 2018. ALS-Associated E478G Mutation in Human OPTN (Optineurin) Promotes Inflammation and Induces Neuronal Cell Death. Front. Immunol. 9, 2647. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02647

Logroscino, G., Piccininni, M., 2019. Amyotrophic Lateral Sclerosis Descriptive Epidemiology: The Origin of Geographic Difference. Neuroepidemiology 52, 93–103. https://doi.org/10.1159/000493386

Longinetti, E., Fang, F., 2019. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. Curr. Opin. Neurol. 32, 771–776. https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000730

MacRae, C.A., Peterson, R.T., 2015. Zebrafish as tools for drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 14, 721–731. https://doi.org/10.1038/nrd4627

Mak, P.A., Laffitte, B.A., Desrumaux, C., Joseph, S.B., Curtiss, L.K., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., Edwards, P.A., 2002. Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. J Biol Chem 277, 31900–8.

Makoukji, J., Shackleford, G., Meffre, D., Grenier, J., Liere, P., Lobaccaro, J.-M.A., Schumacher, M., Massaad, C., 2011. Interplay between LXR and Wnt/β-catenin signaling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 31, 9620–9629. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0761-11.2011

Maqdasy, S., Trousson, A., Tauveron, I., Volle, D.H., Baron, S., Lobaccaro, J.-M.A., 2016. Once and for all, LXRα and LXRβ are gatekeepers of the endocrine system. Mol. Aspects Med. 49, 31–46. https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.001

Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., Komure, O., Matsuura, S., Kobatake, K., Morimoto, N., Abe, K., Suzuki, N., Aoki, M., Kawata, A., Hirai, T., Kato, T., Ogasawara, K., Hirano, A., Takumi, T., Kusaka, H., Hagiwara, K., Kaji, R., Kawakami, H., 2010. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. Nature 465, 223–226. https://doi.org/10.1038/nature08971

Masrori, P., Van Damme, P., 2020a. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. Eur. J. Neurol. 27, 1918–1929. https://doi.org/10.1111/ene.14393

Masrori, P., Van Damme, P., 2020b. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. Eur. J. Neurol. 27, 1918–1929. https://doi.org/10.1111/ene.14393

Masseret, E., Banack, S., Boumédiène, F., Abadie, E., Brient, L., Pernet, F., Juntas-Morales, R., Pageot, N., Metcalf, J., Cox, P., Camu, W., 2013. Dietary BMAA Exposure in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Cluster from Southern France. PLoS ONE 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083406

Mathis, S., Goizet, C., Soulages, A., Vallat, J.-M., Masson, G.L., 2019a. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review. J. Neurol. Sci. 399, 217–226. https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.02.030

Mauch, D.H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E.C., Otto, A., Pfrieger, F.W., 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. Science 294, 1354–1357. https://doi.org/10.1126/science.294.5545.1354

Maurel, C., Chami, A.A., Thépault, R.-A., Marouillat, S., Blasco, H., Corcia, P., Andres, C.R., Vourc'h, P., 2020. A role for SUMOylation in the Formation and Cellular Localization of TDP-43 Aggregates in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Mol. Neurobiol. 57, 1361–1373. https://doi.org/10.1007/s12035-019-01810-7

McGown, A., McDearmid, J.R., Panagiotaki, N., Tong, H., Al Mashhadi, S., Redhead, N., Lyon, A.N., Beattie, C.E., Shaw, P.J., Ramesh, T.M., 2013. Early Interneuron Dysfunction in ALS: Insights from a Mutant sod1 Zebrafish Model. Ann. Neurol. 73, 246–258. https://doi.org/10.1002/ana.23780

McKenna, N.J., O'Malley, B.W., 2002. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. Endocrinology 143, 2461–5.

McLean, D.L., Fan, J., Higashijima, S., Hale, M.E., Fetcho, J.R., 2007. A topographic map of recruitment in spinal cord. Nature 446, 71–75. https://doi.org/10.1038/nature05588

Meffre, D., Shackleford, G., Hichor, M., Gorgievski, V., Tzavara, E.T., Trousson, A., Ghoumari, A.M., Deboux, C., Nait Oumesmar, B., Liere, P., Schumacher, M., Baulieu, E.-E., Charbonnier, F., Grenier, J., Massaad, C., 2015. Liver X receptors alpha and beta promote myelination and remyelination in the cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 7587–7592. https://doi.org/10.1073/pnas.1424951112

Mendel G., 1866. Versuche über Pflanzen-Hybriden. Verh. naturf. Ver. Brünn.

Miller, R.G., Mitchell, J.D., Moore, D.H., 2012. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). Cochrane Database Syst. Rev. CD001447. https://doi.org/10.1002/14651858.CD001447.pub3

Miller, T., Cudkowicz, M., Shaw, P.J., Andersen, P.M., Atassi, N., Bucelli, R.C., Genge, A., Glass, J., Ladha, S., Ludolph, A.L., Maragakis, N.J., McDermott, C.J., Pestronk, A., Ravits, J., Salachas, F., Trudell, R., Van Damme, P., Zinman, L., Bennett, C.F., Lane, R., Sandrock, A., Runz, H., Graham, D., Houshyar, H., McCampbell, A., Nestorov, I., Chang, I., McNeill, M., Fanning, L., Fradette, S., Ferguson, T.A., 2020. Phase 1-2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. N. Engl. J. Med. 383, 109–119. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2003715

Minikel, E.V., MacArthur, D.G., 2016. Publicly Available Data Provide Evidence against NR1H3 R415Q Causing Multiple Sclerosis. Neuron 92, 336–338. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.054

Molnar, K.S., Karabacak, N.M., Johnson, J.L., Wang, Q., Tiwari, A., Hayward, L.J., Coales, S.J., Hamuro, Y., Agar, J.N., 2009. A Common Property of Amyotrophic Lateral Sclerosis-associated Variants. J. Biol. Chem. 284, 30965–30973. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.023945

Mora, J.S., Genge, A., Chio, A., Estol, C.J., Chaverri, D., Hernández, M., Marín, S., Mascias, J., Rodriguez, G.E., Povedano, M., Paipa, A., Dominguez, R., Gamez, J., Salvado, M., Lunetta, C., Ballario, C., Riva, N., Mandrioli, J., Moussy, A., Kinet, J.-P., Auclair, C., Dubreuil, P., Arnold, V., Mansfield, C.D., Hermine, O., AB10015 STUDY GROUP, 2020. Masitinib as an

add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener. 21, 5–14. https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1632346

Mouzat, K., Molinari, N., Kantar, J., Polge, A., Corcia, P., Couratier, P., Clavelou, P., Juntas-Morales, R., Pageot, N., Lobaccaro, J.-M.A., Raoul, C., Lumbroso, S., Camu, W., 2017. Liver X Receptor Genes Variants Modulate ALS Phenotype. Mol. Neurobiol. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0453-2

Mouzat, K., Raoul, C., Polge, A., Kantar, J., Camu, W., Lumbroso, S., 2016. Liver X receptors: from cholesterol regulation to neuroprotection-a new barrier against neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis? Cell. Mol. Life Sci. CMLS 73, 3801–3808. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2330-y

Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O., Muccioli, G.G., 2016. Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. Prog. Lipid Res. 64, 152–169. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.09.002

Natunen, T., Helisalmi, S., Vepsäläinen, S., Sarajärvi, T., Antikainen, L., Mäkinen, P., Herukka, S.-K., Koivisto, A.M., Haapasalo, A., Soininen, H., Hiltunen, M., 2012. Genetic Analysis of Genes Involved in Amyloid-β Degradation and Clearance in Alzheimer's Disease. J. Alzheimers Dis. 28, 553–559. https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111109

Natunen, T., Martiskainen, H., Sarajärvi, T., Helisalmi, S., Pursiheimo, J.-P., Viswanathan, J., Laitinen, M., Mäkinen, P., Kauppinen, T., Rauramaa, T., Leinonen, V., Alafuzoff, I., Haapasalo, A., Soininen, H., Hiltunen, M., 2013. Effects of NR1H3 genetic variation on the expression of liver X receptor α and the progression of Alzheimer's disease. PloS One 8, e80700. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080700

Nicholas, R., Rashid, W., 2013. Multiple sclerosis. Am. Fam. Physician 87, 712–714.

Nicolas, A., Kenna, K.P., Renton, A.E., Ticozzi, N., Faghri, F., Chia, R., Dominov, J.A., Kenna, B.J., Nalls, M.A., Keagle, P., Rivera, A.M., van Rheenen, W., Murphy, N.A., van Vugt, J.J.F.A., Geiger, J.T., Van der Spek, R.A., Pliner, H.A., Shankaracharya, Smith, B.N., Marangi, G., Topp, S.D., Abramzon, Y., Gkazi, A.S., Eicher, J.D., Kenna, A., Mora, G., Calvo, A., Mazzini, L., Riva, N., Mandrioli, J., Caponnetto, C., Battistini, S., Volanti, P., La Bella, V., Conforti, F.L., Borghero, G., Messina, S., Simone, I.L., Trojsi, F., Salvi, F., Logullo, F.O., D'Alfonso, S., Corrado, L., Capasso, M., Ferrucci, L., de Araujo Martins Moreno, C.,

Kamalakaran, S., Goldstein, D.B., Gitler, A.D., Harris, T., Myers, R.M., Phatnani, H., Musunuri, R.L., Evani, U.S., Abhyankar, A., Zody, M.C., Kaye, J., Finkbeiner, S., Wyman, S.K., LeNail, A., Lima, L., Fraenkel, E., Svendsen, C.N., Thompson, L.M., Van Eyk, J.E., Berry, J.D., Miller, T.M., Kolb, S.J., Cudkowicz, M., Baxi, E., Benatar, M., Taylor, J.P., Rampersaud, E., Wu, G., Wuu, J., Lauria, G., Verde, F., Fogh, I., Tiloca, C., Comi, G.P., Sorarù, G., Cereda, C., Corcia, P., Laaksovirta, H., Myllykangas, L., Jansson, L., Valori, M., Ealing, J., Hamdalla, H., Rollinson, S., Pickering-Brown, S., Orrell, R.W., Sidle, K.C., Malaspina, A., Hardy, J., Singleton, A.B., Johnson, J.O., Arepalli, S., Sapp, P.C., McKenna-Yasek, D., Polak, M., Asress, S., Al-Sarraj, S., King, A., Troakes, C., Vance, C., de Belleroche, J., Baas, F., ten Asbroek, A.L., Muñoz-Blanco, J.L., Hernandez, D.G., Ding, J., Gibbs, J.R., Scholz, S.W., Floeter, M.K., Campbell, R.H., Landi, F., Bowser, R., Pulst, S.M., Ravits, J.M., MacGowan, D.J.L., Kirby, J., Pioro, E.P., Pamphlett, R., Broach, J., Gerhard, G., Dunckley, T.L., Brady, C.B., Kowall, N.W., Troncoso, J.C., Le Ber, I., Mouzat, K., Lumbroso, S., Heiman-Patterson, T.D., Kamel, F., Van Den Bosch, L., Baloh, R.H., Strom, T.M., Meitinger, T., Shatunov, A., Van Eijk, K.R., de Carvalho, M., Kooyman, M., Middelkoop, B., Moisse, M., McLaughlin, R.L., Van Es, M.A., Weber, M., Boylan, K.B., Van Blitterswijk, M., Rademakers, R., Morrison, K.E., Basak, A.N., Mora, J.S., Drory, V.E., Shaw, P.J., Turner, M.R., Talbot, K., Hardiman, O., Williams, K.L., Fifita, J.A., Nicholson, G.A., Blair, I.P., Rouleau, G.A., Esteban-Pérez, J., García-Redondo, A., Al-Chalabi, A., Rogaeva, E., Zinman, L., Ostrow, L.W., Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., Simmons, Z., Cooper-Knock, J., Brice, A., Goutman, S.A., Feldman, E.L., Gibson, S.B., Taroni, F., Ratti, A., Gellera, C., Van Damme, P., Robberecht, W., Fratta, P., Sabatelli, M., Lunetta, C., Ludolph, A.C., Andersen, P.M., Weishaupt, J.H., Camu, W., Trojanowski, J.Q., Van Deerlin, V.M., Brown, R.H., van den Berg, L.H., Veldink, J.H., Harms, M.B., Glass, J.D., Stone, D.J., Tienari, P., Silani, V., Chiò, A., Shaw, C.E., Traynor, B.J., Landers, J.E., 2018. Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. Neuron 97, 1268-1283.e6. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.027

Nykamp, K., Anderson, M., Powers, M., Garcia, J., Herrera, B., Ho, Y.-Y., Kobayashi, Y., Patil, N., Thusberg, J., Westbrook, M., Topper, S., 2017. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG–AMP variant classification criteria. Genet. Med. 19, 1105–1117. https://doi.org/10.1038/gim.2017.37

Nylander, A., Hafler, D.A., 2012. Multiple sclerosis. J. Clin. Invest. 122, 1180–1188. https://doi.org/10.1172/JCI58649

Osawa, S., Jukes, T.H., Watanabe, K., Muto, A., 1992. Recent evidence for evolution of the genetic code. Microbiol. Rev. 56, 229–264.

Pardo, C. A., Xu, Z., Borchelt, D. R., Price, D. L., Sisodia, S. S., and Cleveland, D. W. (1995). Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 92, 954–958. doi: 10.1073/pnas.92.4.954

Parichy, D.M., 2015. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. eLife 4, e05635. https://doi.org/10.7554/eLife.05635

Paterniti, I., Campolo, M., Siracusa, R., Cordaro, M., Di Paola, R., Calabrese, V., Navarra, M., Cuzzocrea, S., Esposito, E., 2017. Liver X receptors activation, through TO901317 binding, reduces neuroinflammation in Parkinson's disease. PloS One 12, e0174470. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174470

Paulus, J.D., Link, B.A., 2014. Loss of Optineurin In Vivo Results in Elevated Cell Death and Alters Axonal Trafficking Dynamics. PLoS ONE 9, e109922. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109922

Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., Mangelsdorf, D.J., 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. Cell 93, 693–704.

Perrone, F., Cacace, R., van der Zee, J., Van Broeckhoven, C., 2021. Emerging genetic complexity and rare genetic variants in neurodegenerative brain diseases. Genome Med. 13, 59. https://doi.org/10.1186/s13073-021-00878-y

Pietri, T., Manalo, E., Ryan, J., Saint-Amant, L., Washbourne, P., 2009. Glutamate Drives the Touch Response Through a Rostral Loop in the Spinal Cord of Zebrafish Embryos. Dev. Neurobiol. 69, 780–795. https://doi.org/10.1002/dneu.20741

Placek, K., Benatar, M., Wuu, J., Rampersaud, E., Hennessy, L., Van Deerlin, V.M., Grossman, M., Irwin, D.J., Elman, L., McCluskey, L., Quinn, C., Granit, V., Statland, J.M., Burns, T.M., Ravits, J., Swenson, A., Katz, J., Pioro, E.P., Jackson, C., Caress, J., So, Y., Maiser, S., Walk, D., Lee, E.B., Trojanowski, J.Q., Cook, P., Gee, J., Sha, J., Naj, A.C., Rademakers, R., Chen, W., Wu, G., Paul Taylor, J., McMillan, C.T., 2021. Machine learning suggests polygenic risk for cognitive dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. EMBO Mol. Med. 13. https://doi.org/10.15252/emmm.202012595

Pramatarova, A., Figlewicz, D.A., Krizus, A., Han, F.Y., Ceballos-Picot, I., Nicole, A., Dib, M., Meininger, V., Brown, R.H., Rouleau, G.A., 1995. Identification of new mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. Am. J. Hum. Genet. 56, 592–596.

Prudencio, M., Hart, P.J., Borchelt, D.R., Andersen, P.M., 2009. Variation in aggregation propensities among ALS-associated variants of SOD1: Correlation to human disease. Hum. Mol. Genet. 18, 3217–3226. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp260

Purves, D. (Ed.), 2004. Neuroscience, 3rd ed. ed. Sinauer Associates, Publishers, Sunderland, Mass.

Ramesh, T., Lyon, A.N., Pineda, R.H., Wang, C., Janssen, P.M.L., Canan, B.D., Burghes, A.H.M., Beattie, C.E., 2010. A genetic model of amyotrophic lateral sclerosis in zebrafish displays phenotypic hallmarks of motoneuron disease. Dis. Model. Mech. 3, 652–662. https://doi.org/10.1242/dmm.005538

Ravits, J.M., La Spada, A.R., 2009. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread. Neurology 73, 805–811. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b6bbbd

Read, A.P., 2017. Haploinsufficiency, in: ELS. American Cancer Society, pp. 1–5. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0005489.pub2

Renton, A.E., Chiò, A., Traynor, B.J., 2014. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. Nat. Neurosci. 17, 17–23. https://doi.org/10.1038/nn.3584

Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A.M., Kaganovich, A., Scholz, S.W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D.W., Hernandez, D.G., Johnson, J.O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R.J., Orrell, R.W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I.E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J.B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M.A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V.M., Kaivorinne, A.L., Holtta-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wuu, J., Chio, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J.D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E.E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N.M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris,

H.R., Tienari, P.J., Traynor, B.J., 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. Neuron 72, 257–68.

Renton, Alan E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A.M., Kaganovich, A., Scholz, S.W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D.W., Hernandez, D.G., Johnson, J.O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R.J., Orrell, R.W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I.E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J.B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M.A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V.-M., Kaivorinne, A.-L., Hölttä-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wuu, J., Chiò, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J.D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E.E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N.M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H.R., Tienari, P.J., Traynor, B.J., 2011. A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. Neuron 72, 257–268. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010

Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., Mangelsdorf, D.J., 2002. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. J Biol Chem 277, 18793–800.

Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., Mangelsdorf, D.J., 2000. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. Science 289, 1524–9.

Richards, D., Morren, J.A., Pioro, E.P., 2020. Time to diagnosis and factors affecting diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. Sci. 417, 117054. https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.117054

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L., 2015a. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet. Med. 17, 405–423. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L., ACMG Laboratory Quality Assurance

Committee, 2015b. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet. 17, 405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Roberts, A.L., Johnson, N.J., Cudkowicz, M.E., Eum, K.-D., Weisskopf, M.G., 2016. Job-related formaldehyde exposure and ALS mortality in the USA. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 87, 786–788. https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-310750

Roberts, B.R., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Malencik, D.A., Anderson, S.R., Bomben, V.C., Meyers, K.R., Karplus, P.A., Beckman, J.S., 2007. Structural Characterization of Zinc-deficient Human Superoxide Dismutase and Implications for ALS. J. Mol. Biol. 373, 877–890. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.07.043

Robinson, K.J., Yuan, K.C., Don, E.K., Hogan, A.L., Winnick, C.G., Tym, M.C., Lucas, C.W., Shahheydari, H., Watchon, M., Blair, I.P., Atkin, J.D., Nicholson, G.A., Cole, N.J., Laird, A.S., 2019. Motor Neuron Abnormalities Correlate with Impaired Movement in Zebrafish that Express Mutant Superoxide Dismutase 1. Zebrafish 16, 8–14. https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1588

Robinson, M., Lee, B.Y., Hane, F.T., n.d. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. J. Alzheimers Dis. 57, 317–330. https://doi.org/10.3233/JAD-161149

Rodríguez-Rodríguez, E., Sánchez-Juan, P., Mateo, I., Infante, J., Sánchez-Quintana, C., García-Gorostiaga, I., Berciano, J., Combarros, O., 2008. Interaction between CD14 and LXRbeta genes modulates Alzheimer's disease risk. J. Neurol. Sci. 264, 97–99. https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.08.001

Rosenbohm, A., Peter, R.S., Erhardt, S., Lulé, D., Rothenbacher, D., Ludolph, A.C., Nagel, G., Andres, F., Arnold, G., Asshauer, I., Baezner, H., Baier, H., Beattie, J., Becker, T., Behne, F., Bengel, D., Boertlein, A., Bracknies, V., Broer, R., Burkhard, A., Connemann, B., Dempewolf, S., Dettmers, C., Dieterich, M., Etzersdorfer, E., Freund, W., Gersner, T., Gold, H.-J., Hacke, W., Hamann, G., Hecht, M., Heimbach, B., Hemmer, B., Hendrich, C., Herting, B., Huber, R., Huber-Hartmann, K., Hülser, P.-J., Jüttler, E., Kammerer-Ciernioch, J., Kaspar, A., Kern, R., Kimmig, H., Klebe, S., Kloetzsch, C., Klopstock, T., Kohler, A., Kuethmann, A., Lewis, D., Lichy, C., Lindner, A., Mäurer, M., Maier-Janson, W., Metrikat, J., Meudt, O., Meyer, A., Müller vom Hagen, J., Naegele, A., Naumann, M., Neher, K.-D., Neuhaus, O., Neusch, C.,

Niehaus, L., Opherk, C., Raape, J., Ratzka, P., Rettenmayr, C., Riepe, M.W., Rothmeier, J., Sabolek, M., Schabet, M., Schell, C., Schlipf, T., Schmauss, M., Schoels, L., Schuetz, K., Schweigert, B., Sommer, N., Sperber, W., Steber, C., Steber, R., Stroick, M., Synofzik, M., Trottenberg, T., Tumani, H., Wahl, C., Weber, F., Weiler, M., Weiller, C., Wessig, C., Winkler, A., The ALS Registry Study Group, 2017. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Southern Germany. J. Neurol. 264, 749–757. https://doi.org/10.1007/s00415-017-8413-3

Ryan, M., Heverin, M., McLaughlin, R.L., Hardiman, O., 2019. Lifetime Risk and Heritability of Amyotrophic Lateral Sclerosis. JAMA Neurol. 76, 1367–1374. https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.2044

Saint-Amant, L., 2010. Chapter 4 - Development of motor rhythms in zebrafish embryos, in: Gossard, J.-P., Dubuc, R., Kolta, A. (Eds.), Progress in Brain Research, Breathe, Walk and Chew: The Neural Challenge: Part I. Elsevier, pp. 47–61. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53613-6.00004-6

Saint-Amant, L., Drapeau, P., 1998. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. J. Neurobiol. 37, 622–632. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(199812)37:4<622::aid-neu10>3.0.co;2-s

Sakowski, S.A., Lunn, J.S., Busta, A.S., Oh, S.S., Zamora-Berridi, G., Palmer, M., Rosenberg, A.A., Philip, S.G., Dowling, J.J., Feldman, E.L., 2012. Neuromuscular effects of G93A-SOD1 expression in zebrafish. Mol. Neurodegener. 7, 44. https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-44

Sandoval-Hernández, A.G., Buitrago, L., Moreno, H., Cardona-Gómez, G.P., Arboleda, G., 2015. Role of Liver X Receptor in AD Pathophysiology. PloS One 10, e0145467. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145467

Sangwan, S., Zhao, A., Adams, K.L., Jayson, C.K., Sawaya, M.R., Guenther, E.L., Pan, A.C., Ngo, J., Moore, D.M., Soriaga, A.B., Do, T.D., Goldschmidt, L., Nelson, R., Bowers, M.T., Koehler, C.M., Shaw, D.E., Novitch, B.G., Eisenberg, D.S., 2017. Atomic structure of a toxic, oligomeric segment of SOD1 linked to amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, 8770–8775. https://doi.org/10.1073/pnas.1705091114

Scarlino, S., Domi, T., Pozzi, L., Romano, A., Pipitone, G.B., Falzone, Y.M., Mosca, L., Penco, S., Lunetta, C., Sansone, V., Tremolizzo, L., Fazio, R., Agosta, F., Filippi, M., Carrera, P., Riva, N., Quattrini, A., 2020. Burden of Rare Variants in ALS and Axonal Hereditary Neuropathy Genes Influence Survival in ALS: Insights from a Next Generation Sequencing

Study of an Italian ALS Cohort. Int. J. Mol. Sci. 21, 3346. https://doi.org/10.3390/ijms21093346

Shipp, E. L., Cantini, F., Bertini, I., Valentine, J. S., and Banci, L. (2003). Dynamic properties of the G93A mutant of copper-zinc superoxide dismutase as detected by NMR spectroscopy: implications for the pathology of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemistry* 42, 1890–1899. doi: 10.1021/bi026704y

Schmitt, F., Hussain, G., Dupuis, L., Loeffler, J.-P., Henriques, A., 2014. A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. Front. Cell. Neurosci. 8, 25. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00025

Schroepfer, G.J., Jr., 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. Physiol Rev 80, 361–554.

Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., Lustig, K.D., Shan, B., 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. Genes Dev 14, 2831–8.

Secor McVoy, J.R., Oughli, H.A., Oh, U., 2015. Liver X receptor-dependent inhibition of microglial nitric oxide synthase 2. J. Neuroinflammation 12, 27. https://doi.org/10.1186/s12974-015-0247-2

Sertori, R., Trengove, M., Basheer, F., Ward, A.C., Liongue, C., 2016. Genome editing in zebrafish: a practical overview. Brief. Funct. Genomics 15, 322–330. https://doi.org/10.1093/bfgp/elv051

Severi, K.E., Portugues, R., Marques, J.C., O'Malley, D.M., Orger, M.B., Engert, F., 2014. Neural Control and Modulation of Swimming Speed in the Larval Zebrafish. Neuron 83, 692–707. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.032

Shackleford, G.G., Grenier, J., Abi Habib, W., Massaad, C., Meffre, D., 2017. Liver X Receptors differentially modulate central myelin gene mRNA levels in a region-, age- and isoform-specific manner. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 169, 61–68. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.032

Shatunov, A., Al-Chalabi, A., 2021. The genetic architecture of ALS. Neurobiol. Dis. 147, 105156. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105156

Shen, W.-C., Li, H.-Y., Chen, G.-C., Chern, Y., Tu, P.-H., 2015. Mutations in the ubiquitin-binding domain of OPTN/optineurin interfere with autophagy-mediated degradation of

misfolded proteins by a dominant-negative mechanism. Autophagy 11, 685–700. https://doi.org/10.4161/auto.36098

Shi, Y., Lin, S., Staats, K.A., Li, Y., Chang, W.-H., Hung, S.-T., Hendricks, E., Linares, G.R., Wang, Y., Son, E.Y., Wen, X., Kisler, K., Wilkinson, B., Menendez, L., Sugawara, T., Woolwine, P., Huang, M., Cowan, M.J., Ge, B., Koutsodendris, N., Sandor, K.P., Komberg, J., Vangoor, V.R., Senthilkumar, K., Hennes, V., Seah, C., Nelson, A.R., Cheng, T.-Y., Lee, S.-J.J., August, P.R., Chen, J.A., Wisniewski, N., Hanson-Smith, V., Belgard, T.G., Zhang, A., Coba, M., Grunseich, C., Ward, M.E., van den Berg, L.H., Pasterkamp, R.J., Trotti, D., Zlokovic, B.V., Ichida, J.K., 2018. Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. Nat. Med. 24, 313–325. https://doi.org/10.1038/nm.4490

Shinar, D.M., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Rodan, G.A., Schmidt, A., 1994. NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. Gene 147, 273–6.

Spagnuolo, M.S., Donizetti, A., Iannotta, L., Aliperti, V., Cupidi, C., Bruni, A.C., Cigliano, L., 2018. Brain-derived neurotrophic factor modulates cholesterol homeostasis and Apolipoprotein E synthesis in human cell models of astrocytes and neurons. J. Cell. Physiol. 233, 6925–6943. https://doi.org/10.1002/jcp.26480

Štalekar, M., Yin, X., Rebolj, K., Darovic, S., Troakes, C., Mayr, M., Shaw, C.E., Rogelj, B., 2015. Proteomic analyses reveal that loss of TDP-43 affects RNA processing and intracellular transport. Neuroscience 293, 157–170. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.046

Stathopulos, P. B., Rumfeldt, J. A., Scholz, G. A., Irani, R. A., Frey, H. E., Hallewell, R. A., et al. (2003). Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 100, 7021–7026. doi: 10.1073/pnas.1237797100

Stefania Guareschi, Emanuela Cova, Cristina Cereda, Mauro Ceroni, ElenaDonetti, Daryl A. Bosco, Davide Trotti, Piera Pasinelli, SOD1 is overoxidized and toxic in sporadic ALS, Proceedings of the National Academy of Sciences Mar 2012, 109 (13) 5074-5079; DOI:10.1073/pnas.1115402109

Strange, R.W., Yong, C.W., Smith, W., Hasnain, S.S., 2007. Molecular dynamics using atomic-resolution structure reveal structural fluctuations that may lead to polymerization of human Cu–Zn superoxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 10040–10044. https://doi.org/10.1073/pnas.0703857104

Sztal, T.E., Ruparelia, A.A., Williams, C., Bryson-Richardson, R.J., 2016. Using Touch-evoked Response and Locomotion Assays to Assess Muscle Performance and Function in Zebrafish. J. Vis. Exp. JoVE. https://doi.org/10.3791/54431

Talbot, K., 2009. Motor neuron disease: the bare essentials. Pract. Neurol. 9, 303–309. https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.188151

Tassew, N.G., Mothe, A.J., Shabanzadeh, A.P., Banerjee, P., Koeberle, P.D., Bremner, R., Tator, C.H., Monnier, P.P., 2014. Modifying lipid rafts promotes regeneration and functional recovery. Cell Rep. 8, 1146–1159. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.014

Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., Zhou, Z., 2019. The use of zebrafish (Danio rerio) as biomedical models. Anim. Front. 9, 68–77. https://doi.org/10.1093/af/vfz020

Theofilopoulos, S., Abreu de Oliveira, W.A., Yang, S., Yutuc, E., Saeed, A., Abdel-Khalik, J., Ullgren, A., Cedazo-Minguez, A., Björkhem, I., Wang, Y., Griffiths, W.J., Arenas, E., 2019. 24(S),25-Epoxycholesterol and cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) overexpression promote midbrain dopaminergic neurogenesis in vivo. J. Biol. Chem. 294, 4169–4176. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005639

Tontonoz, P., Mangelsdorf, D.J., 2003. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. Mol Endocrinol 17, 985–93.

Toth, R.P., Atkin, J.D., 2018. Dysfunction of Optineurin in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Glaucoma. Front. Immunol. 9, 1017. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01017

Tunca, C., Şeker, T., Akçimen, F., Coşkun, C., Bayraktar, E., Palvadeau, R., Zor, S., Koçoğlu, C., Kartal, E., Şen, N.E., Hamzeiy, H., Özoğuz Erimiş, A., Norman, U., Karakahya, O., Olgun, G., Akgün, T., Durmuş, H., Şahin, E., Çakar, A., Başar Gürsoy, E., Babacan Yıldız, G., İşak, B., Uluç, K., Hanağası, H., Bilgiç, B., Turgut, N., Aysal, F., Ertaş, M., Boz, C., Kotan, D., İdrisoğlu, H., Soysal, A., Uzun Adatepe, N., Akalın, M.A., Koç, F., Tan, E., Oflazer, P., Deymeer, F., Taştan, Ö., Çiçek, A.E., Kavak, E., Parman, Y., Başak, A.N., 2020. Revisiting the complex architecture of ALS in Turkey: Expanding genotypes, shared phenotypes,

molecular networks, and a public variant database. Hum. Mutat. 41, e7–e45. https://doi.org/10.1002/humu.24055

Turner, B. J., Atkin, J. D., Farg, M. A., Zang, D. W., Rembach, A., Lopes, E. C., et al. (2005). Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurosci. 25, 108–117. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4253-04.2005

Tziortzouda, P., Van Den Bosch, L., Hirth, F., 2021. Triad of TDP43 control in neurodegeneration: autoregulation, localization and aggregation. Nat. Rev. Neurosci. 22, 197–208. https://doi.org/10.1038/s41583-021-00431-1

Umeda, K., Ishizuka, T., Yawo, H., Shoji, W., 2016. Position- and quantity-dependent responses in zebrafish turning behavior. Sci. Rep. 6, 27888. https://doi.org/10.1038/srep27888

Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R., and Julien, J. P. (2006). Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci*. 9, 108–118. doi: 10.1038/nn1603

Uyan, Ö., Ömür, Ö., Ağım, Z.S., Özoğuz, A., Li, H., Parman, Y., Deymeer, F., Oflazer, P., Koç, F., Tan, E., Özçelik, H., Başak, A.N., 2013. Genome-Wide Copy Number Variation in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Turkish Population: Deletion of EPHA3 Is a Possible Protective Factor. PLOS ONE 8, e72381. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072381

Vajda, A., McLaughlin, R.L., Heverin, M., Thorpe, O., Abrahams, S., Al-Chalabi, A., Hardiman, O., 2017. Genetic testing in ALS. Neurology 88, 991–999. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003686

van den Bos, M.A.J., Geevasinga, N., Higashihara, M., Menon, P., Vucic, S., 2019. Pathophysiology and Diagnosis of ALS: Insights from Advances in Neurophysiological Techniques. Int. J. Mol. Sci. 20, 2818. https://doi.org/10.3390/ijms20112818

Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., Robberecht, W., 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis., Molecular Basis of Amyotrophic Lateral Sclerosis 1762, 1068–1082. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.05.002

van Rheenen, W., Shatunov, A., Dekker, A.M., McLaughlin, R.L., Diekstra, F.P., Pulit, S.L., van der Spek, R.A.A., Võsa, U., de Jong, S., Robinson, M.R., Yang, J., Fogh, I., van Doormaal,

P.T., Tazelaar, G.H.P., Koppers, M., Blokhuis, A.M., Sproviero, W., Jones, A.R., Kenna, K.P., van Eijk, K.R., Harschnitz, O., Schellevis, R.D., Brands, W.J., Medic, J., Menelaou, A., Vajda, A., Ticozzi, N., Lin, K., Rogelj, B., Vrabec, K., Ravnik-Glavač, M., Koritnik, B., Zidar, J., Leonardis, L., Grošelj, L.D., Millecamps, S., Salachas, F., Meininger, V., de Carvalho, M., Pinto, S., Mora, J.S., Rojas-García, R., Polak, M., Chandran, S., Colville, S., Swingler, R., Morrison, K.E., Shaw, P.J., Hardy, J., Orrell, R.W., Pittman, A., Sidle, K., Fratta, P., Malaspina, A., Topp, S., Petri, S., Abdulla, S., Drepper, C., Sendtner, M., Meyer, T., Ophoff, R.A., Staats, K.A., Wiedau-Pazos, M., Lomen-Hoerth, C., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Elman, L., McCluskey, L., Basak, A.N., Tunca, C., Hamzeiy, H., Parman, Y., Meitinger, T., Lichtner, P., Radivojkov-Blagojevic, M., Andres, C.R., Maurel, C., Bensimon, G., Landwehrmeyer, B., Brice, A., Payan, C.A.M., Saker-Delye, S., Dürr, A., Wood, N.W., Tittmann, L., Lieb, W., Franke, A., Rietschel, M., Cichon, S., Nöthen, M.M., Amouyel, P., Tzourio, C., Dartigues, J.-F., Uitterlinden, A.G., Rivadeneira, F., Estrada, K., Hofman, A., Curtis, C., Blauw, H.M., van der Kooi, A.J., de Visser, M., Goris, A., Weber, M., Shaw, C.E., Smith, B.N., Pansarasa, O., Cereda, C., Bo, R.D., Comi, G.P., D'Alfonso, S., Bertolin, C., Sorarù, G., Mazzini, L., Pensato, V., Gellera, C., Tiloca, C., Ratti, A., Calvo, A., Moglia, C., Brunetti, M., Arcuti, S., Capozzo, R., Zecca, C., Lunetta, C., Penco, S., Riva, N., Padovani, A., Filosto, M., Muller, B., Stuit, R.J., Blair, I., Zhang, K., McCann, E.P., Fifita, J.A., Nicholson, G.A., Rowe, D.B., Pamphlett, R., Kiernan, M.C., Grosskreutz, J., Witte, O.W., Ringer, T., Prell, T., Stubendorff, B., Kurth, I., Hübner, C.A., Leigh, P.N., Casale, F., Chio, A., Beghi, E., Pupillo, E., Tortelli, R., Logroscino, G., Powell, J., Ludolph, A.C., Weishaupt, J.H., Robberecht, W., Van Damme, P., Franke, L., Pers, T.H., Brown, R.H., Glass, J.D., Landers, J.E., Hardiman, O., Andersen, P.M., Corcia, P., Vourc'h, P., Silani, V., Wray, N.R., Visscher, P.M., de Bakker, P.I.W., van Es, M.A., Pasterkamp, R.J., Lewis, C.M., Breen, G., Al-Chalabi, A., van den Berg, L.H., Veldink, J.H., 2016. Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. Nat. Genet. 48, 1043–1048. https://doi.org/10.1038/ng.3622

Vanmierlo, T., Rutten, K., Dederen, J., Bloks, V.W., van Vark-van der Zee, L.C., Kuipers, F., Kiliaan, A., Blokland, A., Sijbrands, E.J.G., Steinbusch, H., Prickaerts, J., Lütjohann, D., Mulder, M., 2011. Liver X receptor activation restores memory in aged AD mice without reducing amyloid. Neurobiol. Aging 32, 1262–1272. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.07.005

Veldman, M.B., Lin, S., 2008. Zebrafish as a Developmental Model Organism for Pediatric Research. Pediatr. Res. 64, 470–476. https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318186e609

Viennois, E., Mouzat, K., Dufour, J., Morel, L., Lobaccaro, J.M., Baron, S., 2012. Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health? Mol Cell Endocrinol 351, 129–41.

Volk, A.E., Weishaupt, J.H., Andersen, P.M., Ludolph, A.C., Kubisch, C., 2018. Current knowledge and recent insights into the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis. Med. Genet. 30, 252–258. https://doi.org/10.1007/s11825-018-0185-3

Volle, D.H., Repa, J.J., Mazur, A., Cummins, C.L., Val, P., Henry-Berger, J., Caira, F., Veyssiere, G., Mangelsdorf, D.J., Lobaccaro, J.M., 2004. Regulation of the aldo-keto reductase gene akr1b7 by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. Mol Endocrinol 18, 888–98.

Waite, A.J., Bäumer, D., East, S., Neal, J., Morris, H.R., Ansorge, O., Blake, D.J., 2014. Reduced C9orf72 protein levels in frontal cortex of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration brain with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion. Neurobiol. Aging 35, 1779.e5-1779.e13. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.016

Wang, B., Tontonoz, P., 2018. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. Nat. Rev. Endocrinol. 14, 452–463. https://doi.org/10.1038/s41574-018-0037-x

Wang, M.-D., Little, J., Gomes, J., Cashman, N.R., Krewski, D., 2017. Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. NeuroToxicology, Determinants of Neurological Disease 61, 101–130. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.06.015

Wang, W.-C., McLean, D.L., 2014. Selective Responses to Tonic Descending Commands by Temporal Summation in a Spinal Motor Pool. Neuron 83, 708–721. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.021

Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R., Burris, T.P., 2008. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. J. Biol. Chem. 283, 26332–26339. https://doi.org/10.1074/jbc.M804808200

Wang, Z., Sadovnick, A.D., Traboulsee, A.L., Ross, J.P., Bernales, C.Q., Encarnacion, M., Yee, I.M., de Lemos, M., Greenwood, T., Lee, J.D., Wright, G., Ross, C.J., Zhang, S., Song,

W., Vilariño-Güell, C., 2016a. Nuclear Receptor NR1H3 in Familial Multiple Sclerosis. Neuron 90, 948–954. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.039

Westeneng, H.-J., Al-Chalabi, A., Hardiman, O., Debray, T.P., van den Berg, L.H., 2018. The life expectancy of Stephen Hawking, according to the ENCALS model. Lancet Neurol. 17, 662–663. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30241-2

White, R.J., Collins, J.E., Sealy, I.M., Wali, N., Dooley, C.M., Digby, Z., Stemple, D.L., Murphy, D.N., Billis, K., Hourlier, T., Füllgrabe, A., Davis, M.P., Enright, A.J., Busch-Nentwich, E.M., 2017. A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. eLife 6, e30860. https://doi.org/10.7554/eLife.30860

Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. Genes Dev 9, 1033–45.

Wilson, J.M., Loenneke, J.P., Jo, E., Wilson, G.J., Zourdos, M.C., Kim, J.-S., 2012. The Effects of Endurance, Strength, and Power Training on Muscle Fiber Type Shifting. J. Strength Cond. Res. 26, 1724–1729. https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e318234eb6f

Witan, H., Kern, A., Koziollek-Drechsler, I., Wade, R., Behl, C., and Clement, A. M. (2008). Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation. *Hum. Mol. Genet*. 17, 1373–1385. doi: 10.1093/hmg/ddn025

Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., Siegel, G., 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methyglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. Arch Neurol 57, 1439–43.

Wroe, R., Wai-Ling Butler, A., Andersen, P.M., Powell, J.F., Al-Chalabi, A., 2008. ALSOD: The Amyotrophic Lateral Sclerosis Online Database. Amyotroph. Lateral Scler. 9, 249–250. https://doi.org/10.1080/17482960802146106

Wu, C.-H., Chen, C.-C., Lai, C.-Y., Hung, T.-H., Lin, C.-C., Chao, M., Chen, S.-F., 2016. Treatment with TO901317, a synthetic liver X receptor agonist, reduces brain damage and attenuates neuroinflammation in experimental intracerebral hemorrhage. J. Neuroinflammation 13, 62. https://doi.org/10.1186/s12974-016-0524-8

Xu, P., Li, D., Tang, X., Bao, X., Huang, J., Tang, Y., Yang, Y., Xu, H., Fan, X., 2013. LXR agonists: new potential therapeutic drug for neurodegenerative diseases. Mol. Neurobiol. 48, 715–728. https://doi.org/10.1007/s12035-013-8461-3

Xu, Z., Lee, A., Nouwens, A., Henderson, R.D., McCombe, P.A., 2018. Mass spectrometry analysis of plasma from amyotrophic lateral sclerosis and control subjects. Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener. 19, 362–376. https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1433689

Yamashita, S., Ando, Y., 2015. Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. Transl. Neurodegener. 4, 13. https://doi.org/10.1186/s40035-015-0036-y

Yu, L., York, J., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2003. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. J. Biol. Chem. 278, 15565–15570. https://doi.org/10.1074/jbc.M301311200

Zelcer, N., Khanlou, N., Clare, R., Jiang, Q., Reed-Geaghan, E.G., Landreth, G.E., Vinters, H.V., Tontonoz, P., 2007. Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. Proc Natl Acad Sci U A 104, 10601–6.

Zhang, J., Liu, Q., 2015. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. Protein Cell 6, 254–264. https://doi.org/10.1007/s13238-014-0131-3

Zhang-Gandhi, C.X., Drew, P.D., 2007. Liver X receptor and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of microglia and astrocytes. J. Neuroimmunol. 183, 50–59. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.11.007