



**FILSLAN**

Filière de Santé Maladies Rares  
Sclérose Latérale Amyotrophique  
et Maladies du Neurone Moteur

**ARSLA**

Association pour la Recherche sur  
la Sclérose Latérale Amyotrophique  
et autres Maladies du Motoneurone



7<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche sur la SLA  
et les Maladies du Neurone Moteur

**RÉSUMÉS DES PRÉSENTATIONS**



**12 et 13 octobre 2021**

Format virtuel

*Avec le soutien de*



# ORGANISATION

## *Filière Nationale de Santé Maladies Rares SLA et Maladies du Neurone Moteur*

Coordinateur national de la FSMR FilSLAN : P. Couratier, Limoges

Cheffe de projet de FilSLAN : J. Catteau, Limoges

Chargée de mission de FilSLAN : E. Luçon, Limoges

Secrétaire de FilSLAN : C. Raffier, Limoges

Comité de Gouvernance de FilSLAN : E. Bernard (Lyon),

S. Boillée (Paris), J.-P. Camdessanché (St Etienne),

P. Couratier (Limoges), V. Danel-Brunaud (Lille),

C. Desnuelle (ARSLa), V. Goutines (ARSLa, Paris), N. Guy

(Clermont-Ferrand), F. Salachas (Paris), P. Vourc'h (Tours)

## *Association pour la Recherche sur la SLA et autres maladies du motoneurone*

Présidente : V. Goutines

Vice-Président : C. Desnuelle

Directrice générale : S. Turgeman

Président du Conseil Scientifique : C. Raoul

## *Comité Scientifique de FilSLAN*

H. Blasco (INSERM, CHU Tours), S. Boillée (ICM, Paris), P. Corcia (INSERM, CHU Tours),  
P. Couratier (INSERM, CHU Limoges), C. Desnuelle (ARSLa), L. Dupuis (INSERM, Strasbourg),  
G. Le Masson (INSERM, CHU Bordeaux), V. Paquis-Flucklinger (CNRS, CHU Nice),  
P.-F. Pradat (INSERM, APHP), C. Raoul (INSERM, CHU Montpellier)

## **FilSLAN**

**- Filière de Santé Maladies Rares SLA et Maladies du Neurone Moteur**

CHU de Limoges

2 avenue Martin Luther King

87042 Limoges

Tél : +33 (0)5 55 08 70 72

Fax : +33 (0)5 55 05 65 67

[filslan@chu-limoges.fr](mailto:filslan@chu-limoges.fr)

**Pour rester informé, cliquez sur :**

**Portail SLA**

**Codes de présentation** : C = conférence, PO = présentation orale, TR = table ronde et P = poster

**Numéro d'agrément formateur : 11 75 17 79 875**



## ÉDITO

Devenues un rendez-vous incontournable des chercheurs français et francophones, les Journées de la Recherche sur la SLA et les Maladies du Neurone Moteur, organisées tous les ans par la Filière de Santé FilSLAN en partenariat avec l'ARSLa autour de la mi-octobre, arrivent en 2021 à leur 7<sup>ème</sup> édition : e-JR7 SLA/MNM FilSLAN-ARSLa. Elles unissent des objectifs de partage et d'actualisation des connaissances scientifiques dans le thème des maladies du neurone moteur. Traditionnellement organisées dans les locaux de l'ICM à Paris, elles ont pour la seconde année, situation sanitaire COVID oblige, un contexte moins propice aux échanges puisqu'elles se déroulent en un format virtuel numérique. La technologie moderne permet néanmoins des interactions à distance.

Les Journées de la Recherche SLA/MNM réunissent de l'ordre de 150 à 200 chercheurs institutionnels et cliniciens et plus de 50 équipes de recherche nationales sont représentées. Elles démontrent la dynamique croissante de la recherche nationale sur le thème de la SLA. Les sessions scientifiques et posters sont l'occasion stimulante pour de jeunes chercheurs de faire connaître l'avancée de leurs travaux. Quatre communications sont récompensées par un prix ARSLa Jeunes Chercheurs après sélection par un jury émanant de son Conseil Scientifique. L'avènement dans le futur de thérapies génétiques ciblées nous conduit à se préparer à suivre les patients non atteints présymptomatiques. Une table ronde est organisée sur ce thème. Force est de constater que le champ de recherche sur la SLA s'enrichit des recherches sur d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington. Le développement de nouveaux biomarqueurs diagnostiques et de suivi est un enjeu majeur à la fois en pratique clinique et pour les essais thérapeutiques à venir.

Pr P. Couratier

## SOMMAIRE

<b>Résumés des présentations .....</b>	<b>4</b>
Session 1 .....	4
Session 2.....	10
Session ARSLa.....	16
Session 3 .....	20
<b>Conférence « Hors thème » .....</b>	<b>27</b>
<b>Table ronde.....</b>	<b>28</b>
<b>Résumés des posters.....</b>	<b>29</b>

# RÉSUMÉS DES PRÉSENTATIONS

## Session 1 : Génétique et mécanismes moléculaires des maladies du neurone moteur

- Conférence invitée

### **C 01 : RAN TRANSLATION**

*Nicolas CHARLET-BERGUERAND*

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104 - Inserm U 1258, Illkirch

A major finding in the ALS field was the discovery in 2012 that an expansion of hundreds to thousands of repeats of the hexanucleotide GGGGCC (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>) sequence in the first intron of the *C9ORF72* gene is the most frequent cause of Amyotrophic Lateral Sclerosis. These G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeats are thought to be pathogenic through various mechanisms, notably their translation into toxic proteins composed of repeated di-amino acids (DPR) in absence of any AUG start codon. This mechanism was named repeat-associated non-ATG (RAN) translation by the Laura Ranum group (Zu et al., 2011), and is now considered as a major pathogenic pathway involved in various neurodegenerative diseases. This presentation will focus on the latest finding on RAN translation, tentatively covering its pathological consequences in ALS, its molecular and cellular mechanisms and implication for other diseases.

References: Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. Zu et al., PNAS 2011 Jan 4;108(1):260-5.

Keyword: translation mechanism, C9ORF72, expanded repeats

Speaker: [ncharlet@igbmc.fr](mailto:ncharlet@igbmc.fr)

- Présentations sélectionnées à partir de l'appel à communication

### **PO 1.1 : LOSS OF NUCLEOPORIN NUP50 IS A RISK FACTOR IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

*Salim MEGAT<sup>1</sup>, Philippe COURATIER<sup>5</sup>, Stéphanie MILLECAMPS<sup>4</sup>, Edor KABASHI<sup>3</sup>, Erik STORKEBAUM<sup>2</sup>, Chantal SELLIER<sup>2</sup> & Luc DUPUIS<sup>1</sup>*

(1) Université de Strasbourg, Inserm, Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence, UMR-S1118, Centre de Recherches en Biomédecine, Strasbourg, France (2) Department of Molecular Neurobiology, Donders Institute for Brain, Cognition and Behavior and Faculty of Science, Radboud University, Nijmegen, Netherlands. (3) Laboratory of Translational Research for Neurological Disorders, Imagine Institute, Université de Paris, INSERM UMR 1163, 75015, Paris, France (4) Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm, CNRS, AHP, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris, France (5) Service de Neurologie, Centre de Référence SLA et autres maladies du neurone moteur, CHU Dupuytren 1, Limoges, France

Heritability of amyotrophic lateral sclerosis is still incompletely understood. Using two independent genetic strategies, we show here that a large part of ALS heritability lies in genes expressed in inhibitory and excitatory neurons, especially at splicing sites regulated by a defined set of RNA binding proteins including TDP43 and FUS. We conducted a transcriptome wide association study (TWAS) and identified 59 novel loci associated with ALS, including 14 previously identified genes, some of them not previously reaching genome wide significance in GWAS. Among the 45 novel

genes, several genes are involved in pathways known to be affected in ALS such as mitochondrial metabolism (including ATP5H, ATP5D, BCS1L), proteostasis (including COPS7A, G2E3, TMEM175, USP35) or gene expression and RNA metabolism (including ARID1B, ATXN3, PTBP2, TAF10). Interestingly, decreased expression of NUP50, a constrained gene encoding a nuclear pore basket protein, was associated with ALS in TWAS (Zscore = -4, FDR = 0.034). We further identified variants in ALS patients in the NUP50 gene, most of them in the region of the protein mediating interaction with Importin alpha, and including 2 frameshift mutations. In cells from two patients carrying NUP50 variants, we showed decreased levels of NUP50 protein. Importantly, knocking down Nup50 led to increased neuronal death associated with p62 and nucleoporin inclusions in cultured neurons, and motor defects in Drosophila and zebrafish. In all, our study identifies alterations in splicing in neurons as a critical pathogenic process in ALS, uncovers several new loci potentially contributing to ALS missing heritability, and provides genetic evidence linking the nuclear pore to ALS.

#### **PO 1.2 : MEMORY DYSFUNCTION IN ALS/FTD FUS<sup>ΔNLS/+</sup> MOUSE MODEL AND ASSOCIATED EPIGENETIC AND TRANSCRIPTOMIC CHANGES**

*Tzeplaeff L (1,2), Seguin J (1), Legras S (3), Plassard D (3), Megat S (2), Cosquer B (1), Merienne K (1), Cassel JC (1), Dupuis L (2), Boutillier AL (1)*

(1) CNRS UMR 7364, LNCA, Université de Strasbourg, Strasbourg (France), (2) Inserm UMR-S1118, CRBS, Université de Strasbourg, Strasbourg (France), (3) IGBMC, Plateforme GenomEast, Illkirch-Graffenstaden (France).

FUS cytoplasmic mislocalization is linked to ALS/FTD. FUS is involved in gene expression, DNA damage repair and epigenetic modifications. We hypothesized that FUS mislocalization in ALS/FTD will influence epigenetic regulations and associated transcription, ultimately impacting neuronal functions and cognitive abilities. We assessed this questions in the hippocampus, a key brain region involved in memory.

We used an heterozygous knock-in mouse carrying a FUS mutation on the nuclear localization signal (NLS) leading to partial cytoplasmic relocation (Fus<sup>ΔNLS/+</sup>) [1–3]. Four-month-old Fus<sup>ΔNLS/+</sup> mice presented decreased performance in the spatial version of the Morris Water Maze, suggesting early hippocampal alterations. At rest, only few changes of gene expression were observed in the hippocampus of Fus<sup>ΔNLS/+</sup> mice, but 288 genes related to synaptic plasticity (glutamatergic and GABAergic genes) were induced in their hippocampi, when mice were challenged with spatial training. Epigenetic and chromatin accessibility regulations were assessed at rest in neuronal/NeuN<sup>+</sup> FACS-sorted nuclei (Chip-seq and ATAC-seq). We observed increased enrichment of several histone marks associated with active transcription (H4K12ac, H3K27ac, H3K4me3) in Fus<sup>ΔNLS/+</sup> mice, while chromatin accessibility was not dramatically changed. Interestingly, footprint analyses revealed decreased binding of Elk1, a transcription factor involved in learning and memory processes. In parallel, we found by CHIP-seq analyses, that FUS bound *in vivo* to 386 target genes in the hippocampus. While no change in FUS-binding level on the genome was observed in Fus<sup>ΔNLS/+</sup>, predicted promotor motif revealed predominant binding of FUS on Elk1/Ets motifs (GGAA).

Our experiments demonstrate histone marks alterations in an ALS/FTD-mouse model and bring new information on FUS binding location on the genome. The significant epigenetic changes and decreased Elk1 binding in Fus<sup>ΔNLS/+</sup> hippocampus may induce inappropriate transcriptional response, impact the learning-induced transcriptome and underlie decreased memory performances. New experiments will help to better understand the precise role that FUS exert on Elk-dependent genes expression.

[1] Scekic-Zahirovic, J. *et al.* Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *The EMBO Journal* **35**, 1077–1097 (2016). [2] Scekic-Zahirovic, J. *et al.* Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* **133**, 887–906 (2017). [3] Scekic-Zahirovic,

J. *et al.* Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects. *Nature Communications* **12**, 1–19 (2021).

Mots clés : SLA-DFT, Mémoire, Epigénétique

Ce travail est soutenu par le CNRS, l'INSERM, l'UNISTRA, la FRM et l'ANR-DFG (ANR-16-CE92-0031).

Le séquençage a été effectué par la plate-forme GenomEast, membre du consortium «France Génomique» (ANR-10-INBS-0009). Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

[laura.tzeplaeff@gmail.com](mailto:laura.tzeplaeff@gmail.com)

### **PO 1.3 : DECIPHERING THE ROLE OF *TBK1* IN MOTOR NEURONS AND MICROGLIAL CELLS AND ITS IMPLICATIONS FOR ALS PATHOGENESIS**

*Lenoël I (1), Ribon M (1), Lameth J (2), Berriat F (1), Philibert C (1), Robaldo D (1), Badsì M (1), Mallat M (2), Brenner D (3), Weishaupt J (3), Bohl D (1), Millecamps S (1), Boillée S (1), Lobsiger CS (1).*

(1) Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Université, équipe du Dr. Boillée, (2) Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Université, équipe des Drs. Huillard et Sanson, (3) Ulm University, Neurology Department, Germany.

Mutations in the ubiquitously expressed *TANK-Binding Kinase 1* gene (*TBK1*) are linked to ALS and act by a dominant loss-of-function mechanism, which could be easier to study than unknown gain-of-toxic-functions or mixtures with loss-of-functions, linked to most other ALS-genes. *TBK1* is involved in autophagy and innate immunity, suggesting *TBK1* mutations could lead to ALS by both cell-autonomous (autophagy deregulation in motor neurons, MN) and cell-non-autonomous mechanisms (altered response in microglia). To decipher the role of *TBK1* in these two cell types, we have generated mice with *Tbk1* deletion specifically in MN or microglia. While *Tbk1* deletion in MN is not sufficient to induce their loss, it leads to increased age-related alterations of the neuromuscular junctions. Early on, we also found p62 inclusions in a little-known MN subpopulation and a shift in early MN subpopulations towards an age-linked distribution. We are now assessing the molecular basis of these changes directly in MN. To study the role of *Tbk1* in microglia, we use primary mouse microglial cells to assess how *Tbk1* deletion affects their reactivity and whether it contributes to MN degeneration in a non-cell autonomous manner. So far, we have tested the effects of *Tbk1* deletion on the production of reactive oxygen species, phagocytosis and autophagy. In parallel, we used transcriptomics to assess how *Tbk1* deletion changes microglial responses to different pro- and anti-inflammatory stimuli. Interestingly, our results indicate that *Tbk1* deletion strongly changes the response of microglia depending on the type of pro-inflammatory stimulation, which could have important and unexpected consequences for MN degeneration in ALS. In parallel, we have also started to assess microglial *Tbk1* deletion *in vivo* in mice and its effect in age-linked glial reactivity. This project could help better understand the ALS disease mechanism and the contribution of pathological MN-microglia interactions. (295/300)

Mots clés : *TBK1*, Mouse model, Microglial cells.

Financements : ARSLA, Neuratris, ARMC, S.L.A.F.R., La longue route des malades de la SLA, Un pied devant l'autre.

[isadora.lenoeil@icm-institute.org](mailto:isadora.lenoeil@icm-institute.org); [christian.lobsiger@icm-institute.org](mailto:christian.lobsiger@icm-institute.org)

## **PO 1.4 : LES MUTATIONS DES GENES *GRN* ET *C9ORF72* ENTRAINENT L'HYPERACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3 DANS LA MICROGLIE EN REPONSE AUX AGREGATS DE PROTEINES TDP-43.**

*Smeyers J* (1,2), *Banchi E-G* (1), *Le Bihan M* (1), *Yuan R* (1), *Dabout C* (1), *Magneron P* (1), *Langui D* (1), *Heneka M* (5,6,7), *Le Ber I* (1,3), *Latouche M* (1,2)

(1) ICM, Inserm U1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC-P6 UMR S 1127 - Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, (France), (2) École Pratique des Hautes Études - EPHE, PSL Research University, Laboratoire de Neurogénétique, F-75014, Paris, (France), (3) CNR-MAJ, AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, (France), (4) Department of Neurodegenerative Disease and Geriatric Psychiatry, University of Bonn, Bonn, (Germany), (5) German Center for Neurodegenerative Diseases, Bonn, (Germany), (6) Department of Infectious Diseases and Immunology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, (USA), (7) Institute of Innate Immunity, University of Bonn, Bonn, (Germany).

Les démences frontotemporales (DFT) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA) sont deux maladies neurodégénératives faisant partie d'un même spectre clinique, génétique et neuropathologique. Cependant, les voies biologiques communes contribuant à la pathogénèse sont peu identifiées. C'est dans cet objectif, que nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'activation microgliale dans les formes mixtes de DFT-SLA. En effet, les modèles murins knockout pour *GRN* ou *C9ORF72*, gènes mutés dans les formes familiales de DFT et DFT-SLA, développent des phénotypes immunitaires [1]. Par ailleurs, grâce aux nouvelles technologies TEP-SCAN, la participation précoce de la neuroinflammation à la pathogénèse des DFT/SLA est de plus en plus admise [2]. Ainsi, deux axes d'étude principaux ont composé ce projet: 1/ La protéine TDP-43, qui forme les inclusions majoritaires des DFT-SLA, est-elle capable d'activer les cellules microgliales ? Par quels mécanismes ? 2/ La perte de fonction des protéines *C9ORF72* et *PGRN* a-t-elle des conséquences sur la réactivité microgliale en présence de TDP-43 ? Par l'utilisation de modèles *in vitro* de cultures primaires microgliales nous montrons que la protéine TDP-43 active la voie non canonique microgliale de l'inflammasome NLRP3. Cette activation se produit suite à l'interaction de TDP-43 avec les récepteurs TLR2/4, et à son internalisation dans les cellules microgliales. Les cellules microgliales murines déficientes *C9orf72*<sup>-/-</sup> et *Grn*<sup>R493X/R493X</sup> sont hyper-réactives vis-à-vis d'une stimulation par TDP-43. Cet effet est reproduit dans un modèle « MDMi » de cellules microgliales dérivées de monocytes de patients DFT/SLA porteurs de mutation *GRN* ou *C9ORF72*. Enfin, nous montrons que cet effet peut être lié aux fonctions des protéines *PGRN* et *C9ORF72* nécessaires au bon fonctionnement de la voie de dégradation lysosomale [3]. Nos données mettent en évidence une voie commune de neuroinflammation dans les DFTs et la SLA, et ouvrent de nouvelles pistes sur les processus neurodégénératifs de ces maladies.

### **Références :**

- [1] J. G. O'Rourke *et al.*, "C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice," *Science* (80-. ), vol. 351, no. 6279, pp. 1324–1329, Mar. 2016, doi: 10.1126/science.aaf1064.
- [2] W. R. Bevan-Jones *et al.*, "Neuroinflammation and protein aggregation co-localize across the frontotemporal dementia spectrum," *Brain*, vol. 143, no. 3, pp. 1010–1026, 2020, doi: 10.1093/brain/awaa033.
- [3] J. Smeyers, E.-G. Banchi, and M. Latouche, "C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 15, May 2021, doi: 10.3389/fncel.2021.661447.

**Mots clés :** Microglie – Inflammasome NLRP3 – Lysosomes

**Remerciements/financements :** JPND, Fondation plan Alzheimer, EPHE

**Contacts :** [Julie.smeyers@hotmail.fr](mailto:Julie.smeyers@hotmail.fr) et [morwena.latouche@icm-institute.org](mailto:morwena.latouche@icm-institute.org)

**PO 1.5 : DEFINING THE FUNCTIONAL ROLE OF TBK1 USING A NOVEL ZEBRAFISH MODEL IN THE CONTEXT OF THE AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

*Haouy G. (1), de Calbiac H. (1), Rosello M. (2), del Bene F. (2), Ciura S. (1), Kabashi E. (1)*

(1) Inserm U1163, Institut Imagine, Sorbonne Université, Paris 75015, France (2) INSERM U934, CNRS UMR3215, Institut de la Vision, Sorbonne Université, Paris 75012, France

TBK1 loss of function have been recently (2015) associated with the ALS through two sequencing analysis of patient genome and exome. Tightly linked to both autophagy and inflammation, two impaired cellular pathways in ALS, it has become of major interest to understand TBK1 functional role in the pathogenesis. Studies have demonstrate the critical role of TBK1 during development as its deletion in the murine model induces an early embryonic death. However a heterozygous loss of function is not enough to induce any phenotype. For these reasons research have focus either on the impact of a heterozygous loss of TBK1 in previously established SOD1 and FUS model, lacking the TBK1 specificity or on neuronal-specific silencing of *TBK1*, lacking the whole organism analysis. Due to its neuroanatomic and neurochemical resemblance with the human nervous system and the high homology with the human *TBK1* orthologue the zebrafish emerges as a major model to study *Tbk1* loss of function. To analyze the mechanisms underlying *TBK1* deletion in motor neurons degeneration, we designed and characterized a new *tbk1* KO zebrafish model. We first observed a decrease in the locomotor ability. Then we correlate this impaired mobility to a decrease in the number of spinal motor neurons. Our knockout model is also characterized by a high lethality. We are investigating at the cell level which pathway is responsible for this lethality and why *Tbk1* expression is crucial at this stage. Following the literature we have start looking at a potential link with the autophagy and we exhibited that a drug induced stimulation of this pathway is prevent by the deletion of *tbk1*. Finally we have performed a metabolite mass spectrometer analysis which revealed an increase production of antioxidant molecules upon *tbk1* deletion, suggesting a harmful oxidative stress increase.

Keyword: *tbk1*, zebrafish, autophagy

[gregoire.haouy@institutimagine.org](mailto:gregoire.haouy@institutimagine.org)

[edor.kabashi@institutimagine.org](mailto:edor.kabashi@institutimagine.org)

**PO 1.6 : SYNERGISTIC PROPERTIES OF *C9orf72* MUTATION INDUCE MOTOR NEURON APOPTOSIS ENSUING FROM AUTOPHAGY DISRUPTION.**

*de Calbiac H (1), Renault S (1), Haouy G (1), Jung V(2), Marian A (1), Guerrero C (2), Ciura S (1), Kabashi E (1)*

(1) UMR Inserm 1163, Imagine Institute of Genetic Diseases Necker-Enfants Malades Hospital 24 boulevard du Montparnasse 75015 Paris France. (2) INSERM US24/CNRS UMS3633, Proteomics Platform Necker, Université de Paris - Structure Fédérative de Recherche Necker, Paris 75015, France.

To recapitulate *C9orf72*-related ALS disease phenotype *in vivo*, we developed a zebrafish model where we expressed 100 repeats of glycine-proline (GPs) in a *c9orf72* knockdown context. We observed a syergistic mechanism with our model displaying locomotor defects and paralysis only in the context of both gain and loss of function. At the cellular level, concomitant *c9orf72* knockdown and GPs expression induces the shortening of motor neurons and the loss of 30% of these cells. Substantially, we observed that GPs accumulate preferentially within motor neurons when *c9orf72* is deficient. Moreover, p62 accumulates along with GPs in this condition, -suggesting that GPs aggregates are targeted by proteostasis mechanisms -and recapitulating *C9orf72* ALS neuropathology. We confirmed that the accumulation of GPs is due to autophagy deficiency as quantified with an original probe from Dr Mizushima's lab designed to monitor autophagy[1]. Consistently, GPs and p62 accumulations, as well as motor defects are ameliorated by boosting autophagy with autophagy activators.



Also, we observed that GPs aggregates colocalize to swelled mitochondria, suggesting that motor neurons display defects in mitophagy process, what we confirmed using the mito-QC probe. The resultant congestion of motor neurons is associated with apoptosis activation, thus explaining their loss. Importantly, the constitutive inhibition of caspase-9 prevents the degeneration of motor neurons and the inherent motor defects. Moreover, treatment of embryos with decylubiquinone, an inhibitor of apoptosis, is sufficient to rescue these locomotor parameters, showing that initiated neurodegeneration can be turned off and thus raising new perspectives of therapeutics for ALS patients. Finally, proteomics analysis of purified zebrafish motor neurons confirms that mitochondria signaling pathway is a pathogenic event in our model.

In conclusion, we described that autophagy and mitochondrial signaling pathways crosstalk to induce motor neuron degeneration in the context of *Cgorf72* mutation, with autophagy defects inducing mitochondrial apoptosis in a cell-autonomous manner.

Financements : ARSLA, FRM, ERC

[hortense.de-calbiac@institutimagine.org](mailto:hortense.de-calbiac@institutimagine.org)

[1] Kaizuka T. et al. An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control, Mol.Cell, 2016; 64 (4): 835-849

## Session 2 : Biomarqueurs et thérapies dans les maladies du neurone moteur

- Conférence invitée

### **C 02 : CSF AND SERUM NEUROFILAMENT LIGHT AND HEAVY CHAIN AS DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC BIOMARKERS FOR ALS**

*Halbgebauer S (1), Steinacker P (1), Verde F (2, 3), Weishaupt J 4, Oeckl P (1), von Arnim C (5), Dorst J (1), Feneberg E (6), Mayer B (7), Rosenbohm A (1), Silani V (2,3), Ludolph AC(1), Otto M (1, 8)*

(1) Neurology, University of Ulm, Ulm, Germany.(2) Department of Neurology - Stroke Unit and Laboratory of Neuroscience, Istituto Auxologico Italiano Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Milano, Italy.(3) Department of Pathophysiology and Transplantation, "Dino Ferrari" Center, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy.(4) Department of Neurology, Institute for Neurodegeneration, Universitätsmedizin Mannheim, Mannheim, Germany.(5) Department of Geriatrics, University Medical Center, Göttingen, Germany.(6) Department of Neurology, University Hospital Rechts der Isar, Munich, Bayern, Germany.(7) Institute for Epidemiology and Medical Biometry, Ulm University, Ulm, Germany. (8) Neurology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany.

**Objective:** Elevated levels of neurofilament light (NfL) and heavy (NfH) chain in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cerebrospinal fluid (CSF) and serum reflect neuro-axonal degeneration and are used as diagnostic biomarkers. However, studies comparing the differential diagnostic potential for ALS of all four parameters are missing. Here, we measured serum NfL/NfH and CSF NfL/NfH in a large cohort of ALS and other neurological disorders and analysed the differential diagnostic potential.

**Methods:** In total CSF and serum of 294 patients were analysed. The diagnostic groups comprised: ALS (n=75), frontotemporal lobar degeneration (FTLD) (n=33), Alzheimer's disease (n=20), Parkinson's disease (dementia) (n=18), Creutzfeldt-Jakob disease (n=11), non-neurodegenerative controls (n=77) (Con) and 60 patients who were seen under the direct differential diagnosis of a patient with ALS (Con.DD).

**Results:** CSF and serum NfL and NfH showed significantly increased levels in ALS ( $p < 0.0001$ ) compared with Con and Con.DD. The difference between ALS and FTLD was markedly stronger for NfH than for NfL. CSF and serum NfL demonstrated a stronger correlation ( $r = 0.84$  (95% CI 0.80 to 0.87),  $p < 0.001$ ) than CSF and serum NfH ( $r = 0.68$  (95% CI 0.61 to 0.75),  $p < 0.0001$ ). Comparing ALS and Con.DD, receiver operating characteristic analysis revealed the best area under the curve (AUC) value for CSF NfL (AUC=0.94, 95% CI 0.91 to 0.98), followed by CSF NfH (0.93, 95% CI 0.88 to 0.98), serum NfL (0.93, 95% CI 0.89 to 0.97) and serum NfH (0.88, 95% CI 0.82 to 0.94).

**Conclusion:** Our results demonstrate that CSF NfL and NfH as well as serum NfL are equally suited for the differential diagnosis of ALS, whereas serum NfH appears to be slightly less potent.

Key words: Neurofilaments, diagnostic marker, early diagnosis

Acknowledgment: Supported by ALS association, Thierry Latran foundation, JNPD-BMBF

e-mail: [markus.otto@uk-halle.de](mailto:markus.otto@uk-halle.de)

- Présentations sélectionnées à partir de l'appel à communication

**PO 2.1 : MODULATION OF CHOLESTEROL METABOLISM AS A NEW THERAPEUTICAL APPROACH FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

Wurtz G (1) Audouard E (1) Gillet-legrand B (1) Youssef-zadeh H (1) Cartier-lacave N (1) Piguet F (1)

1: INSERM U1127, Neurogencell, Paris Brain Institute, Paris

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is the most common motor neuron disease and is characterized by the progressive loss of upper and lower motor neurons, leading to paralysis and death. Accumulation of cholesterol in the central nervous system (CNS) has been reported to actively contribute to the disease progression in Alzheimer's disease, Huntington's disease, Spinocerebellar ataxia and more recently ALS. Cholesterol is essential for myelin compartment, but also for its functional and structural role in plasmatic membrane. However, in the CNS, cholesterol is synthesized in situ and is not able to freely cross the blood brain barrier (BBB). Cholesterol-24-hydroxylase (CYP46A1) allows the conversion of cholesterol to 24-hydroxycholesterol, able to cross the BBB, thus regulating cholesterol homeostasis. Furthermore, this enzyme is a key neuronal stress response such as oxidative stress or protein aggregation. Therefore, we hypothesized that CYP46A1 could be relevant for a therapy in ALS to target both familial and sporadic forms of ALS independently from their genetic origin. In the severe SOD1<sup>G93A</sup> model, we overexpressed CYP46A1 using a new AAV serotype (AAVi) able to cross the BBB after intravenous injection. As a first step, we confirmed that the AAVi viral vector has a specific tropism for the CNS and especially motoneurons. Secondary, we demonstrated a significant and prolonged motor rescue of animals treated pre or post-symptomatically, but also a preventive effect on myelin loss, compared to untreated animals. Evaluation of this therapeutic strategy is ongoing in another model of ALS.

Key words: gene therapy; metabolism; CYP46A1

Acknowledgements: we would like to thank the ARSLA organization

[guillaume.wurtz@icm-institute.org](mailto:guillaume.wurtz@icm-institute.org)

[francoise.piguet@icm-institute.org](mailto:francoise.piguet@icm-institute.org)

**PO 2.2 : HDAC INHIBITION IS A NOVEL PATHWAY FOR REGULATING LIPID HOMEOSTASIS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

Burg T (1,2), Rossaert E (1,2), Moisse M (1,2), Van Damme P (1,2,3) and Van Den Bosch L (1,2)

(1) Department of Neurosciences, Experimental Neurology, LBI, University of Leuven, Leuven (Belgium), (2) CBD, Laboratory of Neurobiology, VIB, Leuven (Belgium), (3) Department of Neurology, University Hospitals Leuven, Leuven (Belgium).

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) patients suffer from the lack of effective treatments and urgently need the development of new therapeutic strategies. While the etiology is still incompletely understood, it has become clear that energy metabolism defects act as a major contributor to disease progression [1]. Recently, we demonstrated that mice overexpressing human wild-type *FUS* present metabolic alterations in the spinal cord at presymptomatic and symptomatic stages. Using ACY-738, a potent HDAC inhibitor that can cross the blood-brain barrier, we showed that HDAC inhibition restored metabolic defects and subsequently ameliorated the motor phenotype and prolonged the life span of *FUS* mice [2]. Here, we investigated the specific effects of HDAC inhibition on lipid metabolism using untargeted lipidomic analysis coupled with transcriptomic analysis in the spinal cord of *FUS* mice. We demonstrate that symptomatic *FUS* mice recapitulate significant lipid alterations found in ALS patients and the *SOD1* mouse model [3]. Glycerophospholipids, sphingolipids and cholesterol esters mainly were affected. Strikingly, HDAC inhibition mitigated lipid homeostasis defects and selectively targeted glycerophospholipid metabolism at the gene and metabolite level. Therefore, our data suggest that HDAC inhibition is a potential new therapeutic strategy to modulate lipid metabolism in ALS.

**Références :** [1] Vandoorne, T., De Bock, K., & Van Den Bosch, L. (2018). Energy metabolism in ALS: an underappreciated opportunity? *Acta neuropathologica*, 135(4), 489-509. [2] Rossaert, E., et al. (2019). Restoration of histone acetylation ameliorates disease and metabolic abnormalities in a FUS mouse model. *Acta neuropathologica communications*, 7(1), 1-19. [3] Tracey, T. J., et al. (2020). The role of lipids in the central nervous system and their pathological implications in amyotrophic lateral sclerosis. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press.

**Mots-clés :** HDAC ; Lipids ; Metabolism.

**Remerciements/financements :** Nous remercions la fondation Thierry Latran et la Muscular Dystrophy Association (MDA) pour le financement de ces travaux. Van Den Bosch L a été soutenu par le fond « Opening future ». Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

**Contact :** [thibaut.burg@kuleuven.be](mailto:thibaut.burg@kuleuven.be) et [ludovandenbosch@kuleuven.be](mailto:ludovandenbosch@kuleuven.be)

### **PO 2.3 : IMPACT SUR L'ETAT FONCTIONNEL D'UNE COMPLEMENTATION NUTRITIONNELLE ORALE (CNO) PRECOCE DES PATIENTS ATTEINTS DE SLA : ETUDE NUTRALS.**

Jésus P (1,2,3), Fayemendy P(1,2,3), Desport JC (1,2,3), Benoit M (2,3,5), Lautrette G (4), Labrunie A (5), Preux PM (2,3,5), Luna J (2,3) Couratier P (2,3,4,) Nutrals Consortium (6).

(1) Unité de Nutrition, CHU de Limoges, Limoges, France (2) INSERM, U1094, NeuroEpidémiologie Tropicale, Faculté de Médecine de Limoges, Limoges, France (3) U1094, Institut de Neurologie et Epidémiologie Tropical, Université de Limoges, Limoges, France (4) CRMR SLA, CHU de Limoges, Limoges, France (5) Centre d'Epidémiologie, Biostatistique et Méthodologie de la recherche (CEBIMER), CHU de Limoges, Limoges, France (6) CRMR Paris-Salpêtrière, Montpellier, Marseille, Nice, Tours, Lille. CRC Lyon, Saint Etienne, Dijon, Bordeaux, Toulouse, Strasbourg, Caen, Saint Brieuc, Angers, Nancy, Clermont-Ferrand.

**Introduction :** Dans la SLA, le statut nutritionnel est associé à l'évolution de la maladie. L'objectif était d'évaluer l'impact d'une prise précoce de CNO sur l'évolution fonctionnelle, nutritionnelle et respiratoire à 6 mois, chez des patients SLA nouvellement diagnostiqués.

**Méthodes :** Le groupe intervention bénéficiait de CNO à l'inclusion versus groupe contrôle avec CNO en cas de perte de poids. L'étude était randomisée en double aveugle et multicentrique sur 18 centres SLA français. Les variables neurologiques (forme de début, ALSFRS-R), nutritionnelles (perte de poids, IMC, composition corporelle) et respiratoire (capacité vitale forcée [CVF]) étaient relevées. L'analyse statistique a été réalisée par pattern mixture model (PMM).

**Résultats :** 113 patients ont été inclus dans les deux groupes. L'âge moyen était de  $63,2 \pm 10,7$  ans avec un sex-ratio H/F de 1,17 et une forme bulbaire dans 26,5% des cas. A l'inclusion, l'ALSFRS-R était de  $38,6 \pm 5,1$  points et sa pente de  $-1,1 \pm 0,8$  points/mois. La perte de poids était de  $-4,9 \pm 7,5\%$  et 9,9% des patients étaient dénutris. Il n'existait pas de différence significative entre les deux groupes. Les apports énergétiques et protéiques à l'inclusion étaient de  $33,5 \pm 10,5$  kcal/kg/j et de  $1,4 \pm 0,4$  g/kg/j, respectivement et étaient similaires entre les deux groupes et au cours du suivi. Le PMM ne retrouvait pas de différence significative entre les deux groupes concernant l'évolution de l'ALSFRS-R. Il existait une évolution plus favorable à 6 mois de l'IMC et de la masse grasse dans le groupe intervention. En revanche, l'évolution de la CVF était similaire.

**Conclusion :** Bien que l'IMC et la composition corporelle évoluaient plus favorablement dans le groupe intervention, cette première étude interventionnelle, contrôlée, randomisée française n'a pas permis de montrer un impact sur l'évolution fonctionnelle d'une prise précoce de CNO au cours de la SLA.

**Mots clés :** Complément nutritionnel oral, ALSFRS-R, évolution.

**Remerciement :** Nutricia Nutrition Clinique, Fédération ANTADIR / **Financement :** Nutricia Nutrition Clinique, PHRC national

Pierre JESUS : [pierre.jesus@chu-limoges.fr](mailto:pierre.jesus@chu-limoges.fr)

## PO 2.4 : THERAPEUTIC STRATEGIES FOR ALS/FTD USING CELLULAR AND MURINE MODELS

*Ropert B (1), MAdjihounoum B (2), Lacas-Gervais S (3), Augé G (1), Mauri-Crouzet A (1), Lespinasse F (1), Genin E (1), Paquis-Flucklinger V (1)*

1) INSERM U 1081, CNRS UMR 7284, Université Côte d'Azur, IRCAN, Nice, France (2) Inserm U 1065, Université Université Côte d'Azur, C3M, Nice, France (3) Université Côte d'Azur, CCMA, Nice, France

The identification of a point mutation (p.S59L) in the *CHCHD10* gene was the first genetic evidence demonstrating that mitochondrial dysfunction can trigger a motor neuron disease. We identified this mutation in a large family touched by a mitochondrial myopathy associated with signs of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) or Fronto Temporal Dementia (FTD) [1]. Since, we have shown that this mutation leads to the disorganisation of the MICOS complex (Mitochondrial contact site and Cristae Organizing System) that normally maintains mitochondrial cristae structure. We have generated a mouse model and human motor neurons derived from iPSCs, both carrying the mutation p.S59L and a yeast mutant reproducing the MICOS loss. We now have relevant cellular and murine models as these models exhibit the phenotypes found in the patients [2]. The aim of our project is to identify and test drugs that could recover the deleterious phenotypes due to the p.S59L mutation and the loss of MICOS using our models. We identified, from two repurposed libraries, two compounds able to efficiently rescue the growth defect presented by our yeast mutant strain. One of these molecules also rescues the fragmentation of the mitochondrial network and the loss of mitochondrial cristae in patient fibroblasts [3] and motor neurons derived from iPSCs. We are now trying to understand the mechanism by which this molecules act on mitochondrial phenotypes. We want to localize the molecule within the cell thanks to a Click-assay. We are also looking at potential targets thanks to a MALDI-TOF approach. These answers will help us to launch a pre-clinical trial on our mouse model.

[1] Bannwarth, S. et al. (2014). A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through *CHCHD10* involvement. *Brain* 137, 2329–2345.

[2] Genin, E.C. et al. (2019). Mitochondrial defect in muscle precedes neuromuscular junction degeneration and motor neuron death in *CHCHD10*S59L/+ mouse. *Acta Neuropathol.*

[3] Genin, E.C et al. (2016). *CHCHD10* mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol Med* 8, 58–72.

Mitochondria – Repurposable library – Treatment

Financement : Financement de 4<sup>ème</sup> année de thèse par la FRM. N° de dossier FDT202012010694

[baptiste.ropert@univ-cotedazur.fr](mailto:baptiste.ropert@univ-cotedazur.fr) [veronique.paquis@univ-cotedazur.fr](mailto:veronique.paquis@univ-cotedazur.fr)

## PO 2.5 : MAGNETIC RESONANCE IMAGING OF THE SPINAL CORD PROVIDES A MARKER OF THE RATE OF PROGRESSION IN ALS PATIENTS

*Khamyasa M (1), Pellegrini M (1), Devos D(2,3), Rolland A-S (3), Marchand-Pauvert V (1), Pradat P-F (1, 4, 5)*

<sup>1</sup>Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, Paris, France <sup>2</sup>Département de Neurology, Centre référent SLA, CHU de Lille, Centre LICEND COEN, France <sup>3</sup>Département de Pharmacologie Médicale, Université de Lille, INSERM UMRS\_1171, CHU, Centre LICEND COEN, Lille, France <sup>4</sup>APHP, Département de Neurologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Centre référent SLA, Paris, France <sup>5</sup>Northern Ireland Centre for Stratified Medicine, Biomedical Sciences Research Institute Ulster University, C-TRIC, Altnagelvin Hospital, Derry/Londonderry, United Kingdom.

### Background :

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive motor neuron disorder that leads to eventual death[1, 2]. Although neuroimaging seems to be a reliable potential biomarker especially several studies showed significant MRI metrics changes between ALS patients and healthy controls, there is an unmet need for reliable biomarkers, not only for better diagnosis but also to provide a reliable

assessment of disease progression[3]. Therefore, the aim of this study is to measure the change of spinal cord MRI metrics over time based on a prospective, longitudinal, multipoint study.

#### **Methods:**

This study is an ancillary analysis using data collected from the Paris Center which is part of the PULSE study. PULSE is an ongoing observational and prospective multicentric cohort (Protocol 2013-A00969-36) in ALS patients. We included 40 ALS patients who underwent a structural and diffusion MRI. Magnetic resonance imaging (MRI) scans were acquired on 3T Siemens scanner, and clinical variables collected over three-time points. Spinal cord toolbox (SCT) was used to treat the structural and diffusion images to compute cross-sectional area (CSA) per-level and DTI parameters (FA, MD, RD, AD) at the lateral corticospinal tract and the dorsal columns at the cervical level. Clinical and demographic data will be then evaluated for correlations with cervical spinal cord imaging findings.

#### **Results:**

At the inclusion timepoint, MRI damage parameters, including CSA per-level and the DTI parameters at the lateral corticospinal tract and posterior dorsal columns at the cervical level, showed significant difference within the cohorts when we divided them regarding age at onset and site of onset. A significant difference in the MRI damage parameters was found within subgroups regarding the rate of progression as measured by the ALSFRS.

#### **Conclusion:**

This study demonstrates different scales of damage, indicated by the damage parameters at the MRI, in ALS patients based on the site of onset and the age at onset. And there was tendency to show more prominent difference with use of DTI damage parameters. Our results are in line with the literature of use of cervical cord MRI as a tool to monitor ALS progression, as this technique is sensitive to degeneration of both UMN and LMN. Analysis of longitudinal data are ongoing.

#### **References:**

1. Querin, G., et al., *Spinal cord multi-parametric magnetic resonance imaging for survival prediction in amyotrophic lateral sclerosis*. European journal of neurology, 2017. **24**(8): p. 1040-1046.
2. Valsasina, P., et al., *Diffusion anisotropy of the cervical cord is strictly associated with disability in amyotrophic lateral sclerosis*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2007. **78**(5): p. 480-484.
3. El Mendili, M.M., et al., *Spinal Cord Imaging in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Historical Concepts—Novel Techniques*. Frontiers in Neurology, 2019. **10**.

**Keywords:** ALS, Neuroimaging, Prognostic biomarker

#### **Acknowledgments**

We thank all the participants and their families for their cooperation. The authors are grateful for financial support from the French ARSLA charity (Christine Tabuenca et Marie France Cazalère), support from the French clinical research networks FILSLAN and ACT4ALS-MND and the Fédération de la Recherche Clinique du CHU de Lille (Anne-Sophie Rolland, Alain Duhamel, Maeva Kheng, Julien Labreuch, Dominique Deplanque, Edouard Millois, Victor Laugeais, Maxime Caillier, Aymen Aouni, Pauline Guyon, Francine Niset, Valérie Santraine, Marie Pleuvret, Mathilde Bon and Laetitia Thibault).

Autor name and email : "Mohammed KHAMAYSA" [mohammed.khamaysa@sorbonne-universite.fr](mailto:mohammed.khamaysa@sorbonne-universite.fr)

## PO 2.6 : THE IDENTIFICATION OF SCFV BIOMOLECULES THAT BIND TO TDP-43 AND PREVENT ITS INDUCED AGGREGATION AS A POTENTIAL THERAPY FOR ALS

*Hergesheimer R (1), Al Ojaimi Y (1), Haouari S (1), Chami A (1), Vourc'h P (1,2), Andres C (1,2), Corcia P (1,3), Martineau P (4), Reis de Assis D (1), Lanznaster D (1), Blasco H (1,2)*

1) UMR 1253, iBRAIN, Université de Tours, INSERM, Tours, France. 2) CHU de Tours, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Tours, France. 3) CHU de Tours, Service de Neurologie, Tours, France. 4) UMR 1194, IRCM, INSERM, Montpellier, France

Few drugs have a significant clinical impact on patients suffering from Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), thus leading to active research in drug development and biomarker exploration. One of the most attractive putative targets in ALS is the DNA/RNA-binding protein TDP-43. While mostly nuclear in physiological conditions, the wild-type form is found in cytoplasmic aggregates in 95% of ALS patients. TDP-43 aggregation is considered the hallmark of ALS, and its pathogenicity justifies efforts to prevent this aggregation as a neuroprotective strategy. The aim of our study was to find innovative molecules preventing TDP-43 aggregation via the use of biopharmaceuticals. By way of phage display of a library of small-chain variable fragments (scFv), we identified four clones exhibiting TDP-43-specific affinity. Flow cytometry on HEK293T cells incubated with purified scFv's suggested affinity for endogenous TDP-43. *In silico* binding site prediction revealed potential binding sites including the N-terminus, both RRM1 and 2 domains, and the C-terminus of TDP-43. MTT reduction analysis demonstrated that the scFv's were not cytotoxic to HEK293T cells, and immunofluorescence showed that two of the four scFv's exhibited robust overexpression. These results in our HEK293T model suggested potential for these two scFv's in counteracting TDP-43 pathology. In our disease model using lentivirus-transduced Neuro2A cells overexpressing TDP-43, we will evaluate their possible beneficial effects on the processes altered by pathological TDP-43 including protein aggregation, energy metabolism, RNA metabolism, neurite outgrowth, and cell viability.

**Acknowledgements:** The authors thank the Region Centre-Val de Loire, the program ARD2020 Biomédicaments, and the French Ministry of Higher Education and Research as part of the Investissements d'Avenir program: LabEx MAbImprove ANR-10-LABX-53-01.

**Key Words:** aggregation, TDP-43, therapeutics

**e-mail presenter:** [rchergesheimer@gmail.com](mailto:rchergesheimer@gmail.com)

**e-mail PI:** [helene.blasco@univ-tours.fr](mailto:helene.blasco@univ-tours.fr)

## Session ARSLa

- Présentations invitées sur projets financés par l'ARSLa

### **PO ARSLA 01 : INTEREST OF LINGO-1 AS A NEW THERAPEUTIC TARGET IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

*Elisabeth Traiffort<sup>1</sup>, Amina Zahaf<sup>2</sup>, Mireille Moussaed<sup>2</sup>, Séverine Morisset-Lopez<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>INSERM-Paris Saclay University, Diseases and Hormones of the Nervous System U1195, 80 Rue du Général Leclerc 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France. <sup>2</sup>Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, UPR 4301, University of Orléans and INSERM, rue Charles Sadron 45071 Orleans, France.

Although motoneurons have been long considered as the best characterized targets of the degenerative process observed in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), glial cells are now proposed as potentially interesting targets in the therapeutic approach of the disease. An increasing number of arguments have been provided in support of the implication of oligodendrocytes - the cells responsible for the synthesis of myelin sheath surrounding the neuronal axons in the central nervous system – in ALS pathogenesis. Our hypothesis is that the modulation of the signaling pathways involving LINGO-1 proteins might be of interest in this context due to the well-known LINGO-1 functions as negative regulators of neuronal survival, axonal regeneration and oligodendrocyte precursor cell differentiation into mature myelinating oligodendrocytes. A pilot study has led us to characterize the expression and colocalization of LINGO homologs in the adult mouse central nervous system, to investigate LINGO-1 expression and transcription in the spinal cord from the mouse model SOD1<sup>G93A</sup> at different stages of the disease and to visualize LINGO-1-expressing cells in the spinal cord of symptomatic animals. Finally, we have characterized early oligodendrogenesis in SOD1<sup>G93A</sup> mouse pups. Our data support the hypothesis that LINGO signaling is dysregulated in the SOD1<sup>G93A</sup> model.

[elisabeth.traiffort@inserm.fr](mailto:elisabeth.traiffort@inserm.fr)

### **PO ARSLA 02 : UNCONVENTIONAL SECRETION OF MISFOLDED SOD1 IN ALS: A NOVEL MECHANISM OF TOXICITY SPREADING**

*Gosset P, Challuau D, Scamps F, Raoul C, Mezghrani A*

The Institute for Neurosciences of Montpellier, Inserm UMR 1051, Univ Montpellier, Saint Eloi Hospital, Montpellier, France

**OBJECTIVES:** Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is characterized by the selective loss of upper and lower motoneurons leading to paralysis and death. The most frequent forms are sporadic. Among the familial forms of the disease, the first gene identified codes for an ubiquitous protein, superoxide dismutase type 1 (SOD1). Transgenic mice expressing mutated human forms of SOD1 faithfully summarize the main features of the disease. Insufficient degradation of these aberrant proteins induces a gain in intracellular toxic function in motoneurons. However, numerous studies have shown that the loss of motor functions is due to a combination of deleterious non-cell autonomous mechanisms encountered in many cell types, involving the spread of toxic molecules such as mutant SOD1. Here, we propose to assess the role of unconventional secretion pathway for misfolded proteins in SOD1-related ALS. **METHODS:** We study the ubiquitin specific protease USP19-dependent "unconventional" secretion of SOD1<sup>G93A</sup> mutant using primary culture of motoneurons and oligodendrocytes and analyze the cellular and tissue expression of USP19 during the different stages of the disease by immunofluorescence and biochemistry in SOD1<sup>G93A</sup> mice. **RESULTS:** Our preliminary data show *in vitro* that the USP19 promotes the secretion of SOD1<sup>G93A</sup> as well as of the wild-type form. *Post-mortem* analyses reveal that USP19 is particularly expressed in



oligodendrocytes of the central nervous system, and show abnormalities of its expression. **CONCLUSION:** These results allow us to define the bases for a targeted intervention in these ALS transgenic mice and they will provide new knowledge on the proteinopathy aspect necessary for the development of new therapies.

**Keywords:** Amyotrophic lateral sclerosis, SOD1, USP19

**Acknowledgments:** ARSLA fundings, ANR "SPREADALS" fundings.

[philippe.gosset@inserm.fr](mailto:philippe.gosset@inserm.fr) ; [alexandre.mezghrani@inserm.fr](mailto:alexandre.mezghrani@inserm.fr)

### **PO ARSLA 03 : DELIVRANCE CIBLEE PAR VECTEUR ADENOVIRAL D'UN AGENT NEURO-PROTECTEUR DES MOTONEURONES DANS UN MODELE MURIN DE SLA.**

*Julien Bourel, Jéflie Tournezy, Loan Samalens, Claire Léger, Sonia Pezet, Mathilde Cohen, Stéphanie Astord, Maria-Grazia Biferi, Stéphanie Chevalier, Gwendal Le Masson*

La protéine X du Borna virus a montré des propriétés neuro-protectrices qui sont associées à son adressage et à son action sur les mitochondries. Sur un modèle murin de SLA (G93A), nous avons montré la restauration des capacités de production d'ATP intra neuronal, sur des motoneurones en culture mais également sur fibroblastes de patients. Chez la souris, l'administration intramusculaire de la protéine X au moyen d'un vecteur viral CAV2 couplée à l'instillation intra-nasale de son peptide dérivé (PX3) entraîne un retard d'apparitions des symptômes moteurs, une préservation des fibres motrices et des corps cellulaires dans la corne dorsale. Cependant ces effets neuro-protecteurs sont restreints à des stades symptomatiques précoces. C'est pourquoi nous avons développé des vecteurs viraux (AAV9 et AAV10) capable d'intégrer de façon plus efficace l'ARN de la protéine X et ainsi espérer un effet protecteur plus marqué.

[gwendal.le-masson@chu-bordeaux.fr](mailto:gwendal.le-masson@chu-bordeaux.fr)

### **PO ARSLA 04 : MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION DE LA CONFORMATION « MISFOLDEE » DE SOD1 DANS LE SERUM DES PATIENTS SLA**

*Lisa Morichon<sup>1</sup>, Jean-Pierre Julien<sup>2</sup>, William Camu<sup>3</sup>, Sylvain Lehmann<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Laboratoire de Biochimie Protéomique Clinique, Université Montpellier, CHU Montpellier, INSERM, Montpellier, France. <sup>2</sup> Department of Psychiatry and Neuroscience, CERVO Brain Research Centre, University Laval, 2601, Chemin de la Canardière, Quebec City, QC G1J 2G3 Canada <sup>3</sup> Clinique du motoneurone et pathologies neuromusculaires, Gui-de-Chauliac Hospital, CHU Montpellier, Inserm U1061, Montpellier, France

De récents travaux ont montré que la protéine SOD-1 était capable d'adopter des conformations aberrantes, dites « misfoldées » (misSOD-1) pouvant être retrouvées dans les SLA avec mutation SOD-1 et également dans les formes sporadiques, bien que ce dernier point reste discuté. La détection de misSOD-1 dans la SLA, pourrait permettre de disposer d'un marqueur biologique important de la maladie. Nous avons donc développé des systèmes de détection spécifiques de la forme normale et de la misSOD-1 avec la technologie ultrasensible Quanterix SIMOA® (Single Molecule Array). Cette technique utilise en particulier, pour sa mise au point, l'anticorps D3H5 reconnaissant spécifiquement la conformation misSOD-1 associé à la mutation G93A.

Résultats : Les tests développés avec l'anticorps D3H5 et des anticorps commerciaux (#PA581036, Thermofisher et ADI-SOD-100B, Enzo) présentent une sensibilité inférieure à 0.5ng/mL, permettant une détection reproductible et différentielle de la SOD-1 normale et de la forme misSOD-1 dans les échantillons de LCR et dans le sérum. L'analyse des patients SLA a révélé une grande variabilité interindividuelle, des différences significatives des concentrations en SOD-1 dans le sang et le LCR selon le profil clinique des participants ont été retrouvées. La concentration totale en SOD-1 normale dans le LCR est significativement augmentée dans les formes sporadiques par rapport aux

contrôles ( $p$ -values = 0.0046). Dans les formes familiales, au contraire, les analyses sanguines montrent que la concentration en misSOD-1 est significativement diminuée par rapport aux formes sporadiques ( $p$  = 0.0328) et aux contrôles ( $p$  = 0.0186). Par contre, le ratio misSOD-1/SOD-1 normale est clairement augmenté dans certaines formes familiales. Ces résultats suggèrent l'existence de plusieurs conformations de misSOD-1 dont certaines seulement seraient reconnues par l'anticorps D3H5.

#### Références :

Paré, B., Lehmann, M., Beaudin, M. et al. Misfolded SOD1 pathology in sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Rep* 8, 14223 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31773-z>

Bosco DA, Morfini G, Karabacak NM, et al. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci.* 2010;13(11):1396-1403. doi:10.1038/nn.2660

Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, et al. The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J Lab Autom.* 2016;21(4):533-547. doi:10.1177/2211068215589580

Contact : [s-lehmann@chu-montpellier.fr](mailto:s-lehmann@chu-montpellier.fr)

#### **PO ARSLA 05 : A LA RECHERCHE DE MODIFICATEURS GENETIQUES DANS LES MALADIES A EXPANSION C9ORF72.**

*Mathieu Barbier, Agnès Camuzat, Khalid El Hachimi, Serena Lattante, Daisy Rinaldi, Mario Sabatelli, Fabienne Clot, Philippe Couratier, Lucette Lacomblez, William Camu, Charles Duyckaerts, Le réseau français de recherche clinique et génétique DFT/DFT-SLA et PREVDEMAALS, Brainbank Neuro-CEB Neuropathology Network, Neurological Tissue Bank of the Biobank Hospital Clinic-IDIBAPS, Ellen Gelpi, Rosa Rademakers, Eric Le Guern, Christine Van Broeckhoven, Alexis Brice, Emmanuelle Génin, et Isabelle L Ber.*

Les causes génétiques de sclérose latérale amyotrophique (SLA) sont présentes dans les 10% cas environ, l'expansion pathogénique du gène *C9orf72* étant une des causes génétiques principales. Des symptômes cognitifs témoignant d'une démence frontotemporale (DFT) peuvent également s'ajouter à la SLA dans un certain nombre de cas. Ces deux pathologies, aux extrémités d'un continuum clinique, partagent d'autres points communs comme une grande variabilité de l'âge de début qui peut aller de 30 à 90 ans. Cette variabilité de l'âge de début impacte en particulier le conseil génétique, la mise en place d'essais thérapeutiques et plus généralement la prise en charge des patients.

A travers une étude familiale nous avons identifié un polymorphisme situé sur le chromosome X (rs1009776), influençant l'âge de début des symptômes.

Le financement accordé par l'ARSLA a été déterminant pour mieux délimiter l'effet du modificateur génétique de l'âge de début des symptômes parmi les porteurs de l'expansion pathologique *C9orf72*. De plus, le budget alloué a permis d'effectuer des analyses fonctionnelles qui ont permis de confirmer l'importance du trafic vésiculaire synaptique comme voie physiologique impactée par l'expansion pathogénique de *C9orf72* et dont le degré d'altération pourrait influencer l'évolution de la maladie.

[mathieu.barbier@icm-institute.org](mailto:mathieu.barbier@icm-institute.org)

**PO ARSLA 06 : CONCEPTION D'UN CASQUE EEG ET ADAPTATION D'UNE INTERFACE CERVEAU-ORDINATEUR (ICO) POUR UNE UTILISATION DANS LA VIE COURANTE PAR DES PERSONNES EN SITUATION DE HANDICAP : RESULTATS PRELIMINAIRES DANS LA SLA.**

*Violaine Guy, S. Guebba, T. Papadopoulo, M. Bruno, Claude Desnuelle, M. Clerc, Marie-Hélène Soriani*

Les interfaces cerveau-ordinateur (ICO) sont des systèmes capables de mesurer l'activité électrique cérébrale, de traiter les signaux enregistrés et de les traduire en commande. Les ICO représentent une voie de recherche très active et prometteuse pour l'assistance aux personnes en situation de handicap moteur sévère et devraient permettre à terme, une utilisation comme outil de communication alternative, de contrôle d'environnement et de la robotique.

Le P300 speller est une ICO constituée d'un clavier virtuel présenté sur un écran d'ordinateur permettant une communication alternative.

Un prototype de P300 speller a été développé par l'INRIA de Sophia-Antipolis. Les résultats d'une première étude réalisée avec ce prototype ont permis de valider son utilisation chez des personnes en situation de handicap lourd (SLA). Cette étude a également permis d'identifier les facteurs limitant son utilisation en situation écologique et nous a conduit à proposer la conception d'un casque ergonomique intégrant des électrodes sèches en nombre réduit et positionnées pour respecter le confort du patient.

Les résultats préliminaires de cette étude de prototypage seront présentés.

[soriani.m@chu-nice.fr](mailto:soriani.m@chu-nice.fr)

## Session 3 : Physiopathologie des maladies du neurone moteur

- Conférence invitée

### **C 03 : PROTEINES DE LIAISON A L'ARN TELLES QUE TDP-43 ET LA SEPARATION DE PHASE LIQUIDE : IMPLICATION DANS LA SLA.**

*Rengifo-Gonzalez JC<sup>1</sup>, El Hage K<sup>1</sup>, Clément M-J<sup>1</sup>, Steiner E, Joshi V<sup>1</sup>, Craveur P<sup>2</sup>, Durand D<sup>3</sup>, Pastré D<sup>1</sup>, Bouhss A<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, INSERM U1204, Univ Evry, Structure-Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques (SABNP), 91025, Evry, France. <sup>2</sup>SYNSIGHT, 3 rue Pierre Fontaine, 91000 Evry, France <sup>3</sup>Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France.

Dans les cellules eucaryotes, il existe des compartiments sans membrane tels que des granules de stress (GS) et des nucléoles. Ils participent à la régulation spatiotemporelle de fonctions cellulaires. Ces compartiments possèdent des propriétés physico-chimiques liquides. Ils sont observés après la séparation de deux phases liquides, appelé « séparation de phase liquide-liquide » (LLPS). Ils sont contrôlés par les domaines auto-attractants à faible complexité (LCD) qui génèrent des interactions multivalentes entre des protéines auto-attractives. De nombreuses protéines de liaison à l'ARN (RBPs) possèdent un LCD et jouent un rôle clé dans l'assemblage de compartiments de type liquide dans les cellules. Les ARN cibles de ces RBPs sont impliqués également dans ce processus. Plusieurs membres de cette superfamille de protéines sont liés à des pathologies telle que la SLA. (1 et 2)

Au cours de cette présentation, je me focaliserai sur TDP-43, une protéine qui en plus du domaine LCD, possède un domaine N-terminal et deux domaines RRM de la liaison à l'ARN. TDP-43 est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires telles que l'épissage de certains ARNm ou encore dans la formation de GS. Par ailleurs, des inclusions cytoplasmiques de TDP-43 sont retrouvées dans certaines neurones de patients atteints par la SLA. Des mutations pathologiques sont associées à ces inclusions dans les formes familiales. D'après de précédents travaux, l'ARN est essentiel pour le maintien de la solubilité de TDP-43. En accord avec ce modèle, nous avons récemment mis en évidence que la liaison coopérative de TDP-43 permet son recrutement dans les GS qui sont des compartiments réversibles riches en ARNm offrant ainsi un environnement propice au maintien de la solubilité de TDP-43. Nous avons aussi identifié à partir de nos analyses structurales extensives des mutations qui altèrent la coopérativité de TDP-43 menant la protéine dans des agrégats cytoplasmiques distincts des GS (3).

*Références :*

<sup>1</sup> *Role of RNA Binding Proteins with prion-like domains in muscle and neuromuscular diseases. Picchiarelli G, Dupuis L. Cell Stress. 2020 Mar 10;4(4):76-91. doi: 10.15698/cst2020.04.217.*

<sup>1</sup> *FUS and TDP-43 Phases in Health and Disease. Portz B, Lee BL, Shorter J. Trends Biochem Sci. 2021 Jul;46(7):550-563. doi: 10.1016/j.tibs.2020.12.005.*

<sup>3</sup> *The cooperative binding of TDP-43 to GU-rich RNA repeats antagonizes TDP-43 aggregation. Rengifo-Gonzalez JC et al. Elife. 2021 Sep 7;10:e67605. doi: 10.7554/eLife.67605.*

**Mots-clés :** Protéines de liaison à l'ARN, Séparation de phase liquide-liquide (LLPS), TDP-43.

**Remerciements / financements :** Ce travail a été soutenu par l'INSERM, le CNRS, l'Université d'Evry, l'Université Paris-Saclay, Genopole, la Région Ile-de-France (SESAME n°15013102) et ED SDSV. Ce travail a également été soutenu par l'Association pour la recherche sur la SLA (ARSLA) (Financement doctorale eOTP 19SATSAB02 au JCRG), Genopole (bourse de soutien postdoctoral à

KEH). Nous remercions Synchrotron SOLEIL (Saint Aubain, France) pour la fourniture d'installations de rayonnement synchrotron et l'assistance personnelle à la ligne de lumière SWING.

[ahmed.bouhss@univ-evry.fr](mailto:ahmed.bouhss@univ-evry.fr)

- **Présentations sélectionnées à partir de l'appel à communication**

**PO 3.1 : ETUDE DES EFFETS MOLECULAIRES ET COMPORTEMENTAUX DE DELOCALISATION CYTOPLASMIQUE NEURONALE DE FUS CHEZ LA SOURIS ADULTE**

*Cassel R<sup>2</sup>, Lorenc F, Dieterle S<sup>1</sup>, De Tapia C<sup>1</sup>, Goy M-A<sup>1</sup>, Megat S, Dupuis L<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>INSERM U1118 « Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence » Strasbourg, France

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto temporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives incurables qui, malgré des symptômes très différents, semblent génétiquement et cliniquement liées. La SLA entraîne une atteinte des capacités motrices tandis que la DFT est associée à des changements comportementaux (changement de personnalité, troubles de sociabilité). Les mutations dans le gène *FUS* (codant pour une protéine multifonctionnelle) touchant sa séquence de localisation nucléaire (SLN) entraîne la forme la plus sévère de SLA. Ces souris présentent une délocalisation et la formation d'agrégats cytoplasmiques de *FUS*, agrégats retrouvés également chez les patients DFT et ce même en absence de mutation de *FUS*. Un nombre grandissant de publications pointent *FUS* comme protéine commune pouvant être la clef mécanistique reliant la SLA et la DFT. Nous avons ainsi créé un nouveau modèle de souris, les souris *Fus*<sup>ΔNeuron</sup>, chez lesquelles nous induisons une mutation du gène *FUS* semblable à celles observées chez les patients touchant la SLN à la fois dans une fenêtre temporelle (souris jeunes adultes) et spatiale (neurones de projections) spécifique grâce au système Cre-recombinase. Les souris adultes traitées au tamoxifène expriment une forme tronquée de la protéine *FUS* dans le cortex frontal et la moelle épinière. Alors qu'elles ne présentent aucun trouble moteur, ces souris développent un phénotype cognitif complexe semblant indiquer une atteinte des structures impliquées dans la sociabilité et l'exécution de tâches tandis la mémoire des objets est préservée, tableau clinique rappelant celui des patients atteints de DFT. Une analyse de séquençage d'ARN nous a permis de mettre en évidence une altération de l'expression des gènes associés à la plasticité synaptique et à la mémoire (gènes immédiats). Ces résultats suggèrent que la mutation de *FUS* l'âge adulte est suffisante pour induire des déficits cohérents avec le tableau clinique observé chez les patients atteints de SLA.

Mots clés : *FUS*, Sclérose Latérale Amyotrophique, Démence Fronto Temporale

Financement : EpiFUS, ANR-16-CE92-0031 ; ToFU, ANR-16-CE16-0015

Adresse mail : [raphaelle.cassel@inserm.fr](mailto:raphaelle.cassel@inserm.fr)

**PO 3.2 : PROPAGATION AND TOXICITY OF PATHOGENIC DETERMINANTS OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

*Picard F (1), Bernard E (1, 2), Raoul C (3), Mezgrhani A (3), Dupuis L (4), Bohl D (5), Schaeffer L (1) and Leblanc P (1)*

(1) INSERM U1217, CNRS UMR5310, Institut NeuroMyoGène, INMG, Lyon (France) (2) Service de neurologie, Hôpital neurologique, CHU de Lyon HCL Lyon (France) (3) INSERM U1051, Institut de Neurosciences, INM, Montpellier (France) (4) INSERM U1118, Université de Strasbourg, Strasbourg (France) (5) INSERM U1127, CNRS UMR7225, Institut du Cerveau et de la moelle, ICM, Paris (France) (1), (3), (4) and (5) the ANR SPREADALS Consortium coordinated by Cedric Raoul.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal and incurable paralytic neurodegenerative disorder caused by the loss of motor neurons in the brain and spinal cord. ALS initiates in mid-life by focal

muscle weakness, evolving rapidly into a generalized muscle wasting that leads irrevocably to death within 2-3 years of clinical onset. Most of ALS cases (90%) are of sporadic origin and 10% from inherited mutations affecting genes involved in trafficking, autophagy or RNA metabolism.

Key pathological hallmarks of ALS are the deposition of misfolded proteins such as TDP-43 FUS or SOD1 into cytoplasmic inclusions in motor neurons and/or glia in the spinal cord/brainstem and motor cortex. TDP-43, SOD1 or FUS were found to display many similarities with prion proteins especially in their capacity to form aggregates that propagate from cell-to-cell in a seed-dependent and self-templating manner. Different studies revealed that pathological SOD1, TDP-43 or FUS can potentially spread from cell-to-cell through different pathways including release of free aggregates in the extracellular medium, release in association with extracellular vesicles (exosomes and microvesicles) or cell-cell contacts through tunneling nanotubes. Recently, an additional unconventional pathway was identified involving USP19, an endoplasmic reticulum (ER) resident deubiquitinase involved in the secretion of the pathological prion-like proteins  $\alpha$ -synuclein and Tau involved in Parkinson or Alzheimer diseases respectively. Here we explored the role of USP19 on the release of pathological TDP-43 and FUS using the HEK293T cellular model. Our data revealed that wild type USP19 but not USP19 $\Delta$ TM, a mutant isoform that is not attached to the ER, strongly enhances the release of pathological TDP-43 in the extracellular medium whereas its wild type isoform was not. Similarly, FUS $\Delta$ NLS was also released in presence of USP19. We are now investigating the cellular and molecular mechanisms involved the USP19 dependent release of these pathological proteins in the extracellular milieu.

**Keywords:** Amyotrophic Lateral Sclerosis, USP19, unconventional secretion

**Mail address:** [flavien.picard@univ-lyon1.fr](mailto:flavien.picard@univ-lyon1.fr); [pascal.leblanc@univ-lyon1.fr](mailto:pascal.leblanc@univ-lyon1.fr)

### PO 3.3 : ASSESSING THE ROLE OF CORTICAL NETWORK DYSFUNCTION IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS VIA CHEMOGENETIC SILENCING OF THE CORTICOFUGAL NEURONS

*Maduna T (1), Gilet J (1), Araujo Duarte M (1) et Rouaux C (1)*

(1) Inserm UMR\_S1118, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, Université de Strasbourg, France.

Cortical network dysfunction (Cortical\_Dysf) is a hallmark of ALS, although its contribution to the disease remains unclear. In particular, cortical hyperexcitability has been demonstrated to precede muscle denervation, negatively correlate with patient survival, and be temporarily corrected through Riluzole treatment [1]. This suggests that Cortical\_Dysf may actively contribute to disease progression via its main outputs, the corticofugal tracts.

Using electrocorticography, cross-frequency coupling analysis and pentylentetrazol susceptibility, we recently demonstrated that the *Sod1*<sup>G86R</sup> and *Fus*<sup>ANLS</sup> mouse models of ALS recapitulate presymptomatic Cortical\_Dysf [2]. To better understand the contribution of Cortical\_Dysf in ALS, we aimed at chemogenetically silencing the corticofugal neuronal populations present in the motor cortex of the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS.

Thus, we first crossed the *Sod1*<sup>G86R</sup> with the *CrymCreER*<sup>T2</sup> mice [3] to restrict Cre expression to the corticofugal neurons. The AAV encoding the Cre-dependent DREADD inhibitory receptor hM4Di together with the mCherry reporter gene was administered intracortically, whereas control mice received the Cre-expressing AAV that was devoid of hM4Di. Immunofluorescence and confocal analyses indicate that our strategy allows for selective targeting of corticofugal neurons throughout the motor cortex. Activation of the hM4Di receptor upon acute administration of its synthetic ligand, clozapine-N-Oxide (CNO), significantly decreased the proportion of targeted neurons that induced the expression of the early immediate gene, *cFos*, following motor system activation through the rotarod task. These preliminary results suggest that the silencing method employed in our study is

efficient. Current work is further assessing this strategy through electrophysiological and behavioral approaches.

Building on this promising preliminary data, we have started investigating the consequences of corticofugal neuron silencing on motor symptom onset, disease progression and survival in the *Sod1<sup>G86R</sup>* mouse model of ALS.

This work is intended to evaluate whether Cortical\_Dysf could represent a potential new therapeutic target in ALS.

## References

1. Eisen, A., et al., Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2017. **88**(11): p. 917-924.
2. Brunet, A\*, Scekcic-Zahirovic, J\* et al., *in preparation*.
3. Scekcic-Zahirovic, J., et al., Evidence that corticofugal propagation of ALS pathology is not mediated by prion-like mechanism. *Progress in Neurobiology*, 2021. **200**: p. 101972.

**Keywords:** cortical network dysfunction, corticofugal neurons, DREADD silencing

**Acknowledgements:** We are grateful to the ARSLA and the ERC for funding this project.

**Addresses mail :** [tando.maduna@inserm.fr](mailto:tando.maduna@inserm.fr), [caroline.rouaux@inserm.fr](mailto:caroline.rouaux@inserm.fr)

## PO 3.4 : VALIDATION DES EFFETS BENEFIQUES DU RECEPTEUR SIGMA-1 DANS UN MODELE SLA CHEZ LE POISSON-ZEBRE

*Peyrel A, Crouzier L, Denus M, Cubedo N, Rossel M, Delprat B, Maurice T and Liévens J-C*

MMDN, Université de Montpellier, EPHE, INSERM, Montpellier, France

Le récepteur Sigma-1 (S1R) est une protéine chaperon du réticulum endoplasmique (RE) qui régule l'import de calcium du RE vers les mitochondries et la réponse cellulaire au stress du RE. S1R peut de plus réguler l'expression de gènes en interagissant avec les protéines de la membrane nucléaire (1). Nous avons précédemment montré que la surexpression de S1R contrecarre la toxicité de TDP43 dans les neurones chez la drosophile (2). A présent, nous voulons apporter la preuve de ce concept dans un modèle vertébré et disséquer les mécanismes liés à cette neuroprotection.

Nos résultats montrent que l'expression transitoire de TDP43 mutée (TDP43<sup>G348C</sup>) chez le poisson-zèbre réduit de moitié la distance parcourue en 5 sec après une stimulation mécanique. Cette réponse d'échappement est améliorée par la surexpression concomitante de S1R. De même, l'activation de S1R par des agonistes de référence, comme le PRE-084 ou le SA4503, corrige la réponse d'échappement des larves de poisson-zèbre exprimant TDP43<sup>G348C</sup>. L'analyse de la respiration mitochondriale *in vivo* par un analyseur Seahorse™ révèle que le PRE-084 augmente significativement la respiration oxydative maximale des poissons TDP43<sup>G348C</sup>. Le PRE-084 semble également activer les défenses contre le stress oxydant en augmentant l'expression génique de NRF2, un facteur de transcription clé des mécanismes de défense antioxydante. Ainsi l'activation de S1R serait bénéfique dans un modèle SLA en prévenant le stress oxydant et en stimulant la fonction mitochondriale.

**Références :** (1) Lee\*, P.T., Liévens\*, J.C., Wang\*, S.M., et al. (2020) *Nat Commun* 11, 5580.

(2) Couly, S. et al. (2020), *Hum Mol Genet* 29, 529-540.

**Mots clés :** Tar DNA-binding protein 43 kDa, récepteur Sigma-1, mitochondrie

**Courriels :** [amandine.peyrel@umontpellier.fr](mailto:amandine.peyrel@umontpellier.fr) ; [jean-charles.lievens@umontpellier.fr](mailto:jean-charles.lievens@umontpellier.fr)

### **PO 3.5 : HIGH-CONTENT SCREEN OF SMALL MOLECULES INTERFERING WITH TDP-43 CYTOPLASMIC SELF-ASSEMBLIES**

*Rabhi C (3,1), Pastre D (1), Babault N (2), Henrie H (2) Craveur P (2), Rattenbach R (3), Bouhss A (1)*

(1) SABNP – Inserm U1204, Université Paris Saclay /Evry Val d'Essonne-, Bâtiment Maupertuis, rue du père Jarlan, 91025 Evry (France), (2) SYNSIGHT – Genopole Entreprises – 4, rue Pierre Fontaine 91058 Evry (France), (3) 4P-PHARMA – Institut Pasteur, 1 Rue du Professeur Calmette, 59800 Lille (France)

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disease caused by the progressive loss of motor neuron in the brain and spinal cord. To date, there is still no effective treatment to treat this pathology. TAR DNA-binding protein (TDP-43) is an RNA/DNA binding protein (RBP) involved in neuronal RNA metabolism. It regulates mRNAs splicing and mediates membraneless organelle formation through liquid-liquid phase separation (LLPS). Several mutations associated with ALS disrupt TDP-43 LLPS pathway to promote the transition from a reversible liquid compartment to a solid and irreversible TDP-43 aggregation. Many recent studies suggest that stress granules (SG), RNA granules formed by the LLPS pathway, could be important intermediates for the mislocalization and aggregation of cytoplasmic TDP-43 [1]. To decipher the role of ALS-associated TDP-43 mutations in aggregation, stress granules and mRNA splicing, we developed a high-content screen (HCS) in cells. Briefly, we used an innovative technology developed in our laboratory, the microtubule bench, to measure the formation of TDP-43 liquid compartments along microtubules. Accordingly, we quantified that some TDP-43 mutations impacted TDP-43 LLPS in the cytoplasm. The selected mutations were also able to modulate the recruitment of TDP-43 in stress granules. Currently, the effects of a hundred of molecules on TDP-43-regulated LLPS and splicing events are explored by HCS. The development of small-molecules interfering with TDP-43 LLPS will open new perspectives to understand the link between the formation of liquid compartments rich in TDP-43 and splicing in the nucleus. Finally, it may pave the way for the discovery of ALS therapeutic agents.

[1] DEWEY, Colleen M., CENIK, Basar, SEPTON, Chantelle F., et al. TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key?. Brain research, 2012, vol. 1462, p. 16-25.

Keywords: ALS, TDP-43, high-content screening

[celia@4p-pharma.com](mailto:celia@4p-pharma.com) (Célia Rabhi)

[ahmed.bouhss@univ-evry.fr](mailto:ahmed.bouhss@univ-evry.fr)

### **PO 3.6 : TROPHICITE ET TOXICITE DES MACROPHAGES ET DES CELLULES MICROGLIALES HUMAINES ENVERS LES MOTONEURONES DANS LA SLA**

*Liu. E (1), Karpf L. (1), Lefebvre. C (1), Ribon. M (1), Jost-Mousseau C. (1), Salachas. F (1,2), Lacomblez. L (2), Lobsiger. CS (1), Millicamps. S (1), Boillée. S (1), Bohl. D (1).*

(1) Institut du Cerveau – Paris Brain Institute- ICM - INSERM U 1127 - CNRS UMR-7225 –Sorbonne Université, Paris, France ; (2) AHPH, Centre de ressources et de compétences SLA Ile de France, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France. (3) CNRS UMR 8246 NPS- IBPS- UPMC –Sorbonne Université, Paris, France

La SLA, caractérisée par une dégénérescence progressive des motoneurones (MNs) spinaux et des neurones moteurs du cortex, est associée à une réactivité immunitaire importante, non seulement au niveau du système nerveux central où réside les cellules microgliales (MG) mais aussi à la périphérie où sont activés les macrophages (MP) le long des axones des MNs. Des travaux récents de l'équipe ont montré dans le modèle  $SOD1^{G93A}$  murin des réponses différentes des MP et des cellules MG au décours de la maladie suggérant une implication distincte des deux types cellulaires dans la pathologie (Chiot et al., 2020). Afin d'étudier la contribution de ces cellules dans d'autres formes de SLA (*C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP*, sporadique) et dans le contexte humain, nous modélisons les interactions entre les MNs, les MP et les cellules MG, à partir de cellules souches pluripotentes



induites humaines. Tout d'abord, nous avons observé des défauts intrinsèques des MP et cellules MG dérivés des patients. Nous avons mis en évidence un état d'activation plus important de ces cellules par rapport aux contrôles ainsi que des défauts dans des voies de dégradation protéique. En réalisant des co-cultures avec des MNs, nous avons constaté une réactivité différente des MP et des cellules MG selon la forme de SLA, ainsi qu'une souffrance axonale plus importante des MNs contrôles lorsqu'ils sont placés en présence de MP ou MG mutantes. Nous menons à présent une étude transcriptomique afin d'identifier les voies dérégulées dans les MP et les cellules MG présentant différentes SLA, seuls ou lors de cultures sur MNs contrôles ou de patients. Ce travail est réalisé dans la perspective d'identifier des voies que nous pourrions moduler afin d'agir sur la survie et souffrance neuronale ; et qui à terme pourraient offrir des possibilités thérapeutiques. (289/300)

**Mots clés :** neuro-inflammation, iPSc, puces microfluidiques

**Remerciements/financements :** ARSLA, AFM, Fondation T.Latran, LABEX REVIVE, ARMC, S.L.A.F.R., La longue route des malades de la SLA, un pied devant l'autre

[Elise.liu@icm-institute.org](mailto:Elise.liu@icm-institute.org) ; [delphine.bohl@icm-institute.org](mailto:delphine.bohl@icm-institute.org)

### Référence

Chiot, A., Zaïdi, S., Iltis, C. et al. Modifying macrophages at the periphery has the capacity to change microglial reactivity and to extend ALS survival. *Nat Neurosci* 23, 1339–1351 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00718-z>

- [Conférence invitée](#)

### **C 04 : HUNTINGTON DISEASE AS A NEURODEVELOPMENTAL DISORDER WITH ADULT-ONSET MANIFESTATIONS**

*Sandrine Humbert*

Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, CEA, Grenoble Institute Neurosciences, 38000 Grenoble, France

Huntington Disease belongs to the family of polyglutamine diseases, a group of neurological disorders characterized by abnormal polyglutamine tract expansion in different proteins specific to each disease. As with all these 'proteopathies,' symptoms in Huntington Disease typically do not appear until mid-life or later, although long polyglutamine tracts can cause juvenile onset. Yet huntingtin (HTT), the protein mutated in Huntington Disease, and mutant HTT are expressed from the very beginning of life and HTT is essential for mouse development. Anyway, given the adult onset and dysfunction and death of adult neurons characterizing Huntington Disease, most studies have focused on the toxic effects elicited by mutant HTT in adult post-mitotic neurons and the roles of the wild-type protein during development have been less studied.

I will discuss how the HTT protein regulates several steps of mouse corticogenesis. HTT maintains the pool of cycling progenitors, ensures the multipolar-bipolar transition of newborn neurons, their proper migration and maturation [1-3]. In Huntington Disease mice, mutant HTT causes mitotic spindle misorientation of dividing progenitors and decreases cortical thickness. Mutant HTT also interferes with the migration and maturation of post-mitotic neurons. Finally, I will also show that, as in Huntington Disease mouse models, mutant HTT reduces the number of proliferating cells and triggers more neural progenitors to enter lineage specification prematurely in human Huntington Disease mutation carrier fetuses and consider the viewing of Huntington Disease as a developmental disorder.

### **References:**

Barnat M, Capizzi M, Aparicio E et al. Huntington disease alters human neurodevelopment. *Science* (2020) 369, 787-793.

Barnat M, Le Fric J, Benstaali C et al. Huntingtin-mediated multipolar-bipolar transition of newborn cortical neurons is critical for their postnatal neuronal morphology. *Neuron* (2017) 93, 99-114.

Molina-Calavita M, Barnat M, Elias S et al. Mutant huntingtin affects cortical progenitor cell division and development of the mouse neocortex. *J Neurosci* (2014) 34, 10034-10040.

**Keywords:**

Huntington Disease, huntingtin, cortical development

[sandrine.humbert@inserm.fr](mailto:sandrine.humbert@inserm.fr)

## CONFÉRENCE « HORS THÈME »

### C "HORS THÈME" : UNE EXPERIENCE D'ATELIER DE CONCEPTION INNOVANTE SUR LA SLA : DEMARCHE ET RESULTATS

*David A. (1), Haiech J. (2), Aymé S. (3), Mounier C. (4) et Lafon D. (5)*

- (1) Université Paris Dauphine, PSL
- (2) Université de Strasbourg
- (3) INSERM-ICM
- (4) Institut Charles Cros
- (5) Cayak Innov

Un atelier de conception innovante sur la SLA a été organisé conjointement par l'ICM et l'Université Paris-Dauphine, en octobre 2020. L'objectif était de produire les bases d'une cartographie conceptuelle des causes et mécanismes de la SLA, qui puisse inclure les modèles actuels et des options inédites. L'atelier a réuni cinq experts SLA, quatre biologistes non experts SLA et trois experts en sciences sociales porteurs de la méthodologie de l'atelier. Le principe était de dépasser un brainstorming classique entre experts et de faire interagir les trois natures d'expertise mises en présence, recueillir les propositions, les cartographier en s'appuyant sur la théorie CK1, théorie de référence en formalisation du raisonnement de conception. Les experts SLA ont chacun exposé l'essentiel de leur vision sur la maladie et réagi aux propositions des autres. Puis, les autres experts, hors de la présence des experts SLA, ont mutualisé leurs questions, remarques et propositions d'ouverture, avant d'en présenter la synthèse aux experts SLA. Enfin, les experts SLA y ont répondu. En quatre heures d'atelier, près de 145 assertions ont été mises en commun, chaque groupe d'experts ayant finalement contribué à hauteur de 1/3 du total. Les propositions concernent pour moitié des questions d'ontologie, de nosologie, de définition et précision des termes, et pour moitié des connaissances et questionnements sur le fonctionnement de la maladie : hétérogénéité ontologique des SLA, limites de la distinction entre SLA familiale et sporadique, nature et rôle des agrégats protéiques, continuum avec les maladies neurodégénératives, effets de mode, intérêt d'une approche par états d'équilibre, biochimie des protéines, prise en compte de l'épidémiologie, rôle possible du cerveau comme entité cognitive. Une cartographie a été ensuite construite à partir des contributions et échanges sous la forme d'une arborescence qui distingue et hiérarchise les voies d'explorations entrevues. L'expérience illustre l'intérêt de la méthodologie utilisée.

Mots-clés : recherche pluridisciplinaire, raisonnement de conception, combinaison d'expertises

[albert.david@dauphine.psl.eu](mailto:albert.david@dauphine.psl.eu)

[haiech@hotmail.fr](mailto:haiech@hotmail.fr)

[segolene.ayme@icm-institute.org](mailto:segolene.ayme@icm-institute.org)

---

<sup>1</sup> <https://www.ck-theory.org/la-theorie-ck/>

## TABLE RONDE

### PRÉSYMPTOMATIQUES ET CONVERSION

#### **TR 01 : INSIGHTS FROM NEUROIMAGING AT THE PRESYMPTOMATIC PHASE OF ALS**

*Pierre-François Pradat (1)*

(1) Laboratory of Biomedical Imaging, CNRS, INSERM, Sorbonne University, Paris, France.

Neuroimaging studies have gained much relevance in recent years thank to their ability to depict early degenerative changes and to track their evolution over time. The constitution of large cohorts of asymptomatic subjects carrying gene mutations responsible for familial ALS allows to investigate the very early structural and functional changes. An unexpected finding from MRI and PET studies is that subcortical structures, such as the thalamus or the hypothalamus, are affected at an early stage (1). White matter damages occur before the age of 40 years in presymptomatic C9ORF72 mutation carriers with a decrease of a neurite density index (2). In the same cohort, a recent spinal cord neuroimaging study suggested that corticospinal tract degeneration occurs before lower motor neuron involvement through a dying forward mechanism (3). Structural connectome studies demonstrated that several neural networks can show a decreased connectivity but also an increased connectivity. The later could reflect either compensatory plasticity changes or a decrease of inhibitory circuits. Some neuroimaging data supports that some lesions are possibly developmental, in line with the new and provocative concept that ALS may be neurodevelopmental disorder. Neuroimaging in ALS is transitioning from academic research studies to a precision clinical tool. Neuroimaging tools will play an important role in the context emerging gene therapies at the presymptomatic phase.

References

- 1) Gorges M et al. Hypothalamic atrophy is related to body mass index and age at onset in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(12):1033-1041.
- 2) Bertrand A et al. Early Cognitive, Structural, and Microstructural Changes in Presymptomatic C9orf72 Carriers Younger Than 40 Years. *JAMA Neurol*. 2018;75(2):236-245.
- 3) Querin G et al. Presymptomatic spinal cord pathology in c9orf72 mutation carriers: A longitudinal neuroimaging study. *Ann Neurol*. 2019;86(2):158-167.

Key words : ALS, neuroimaging, genetics

E mail: pierre-francois.pradat@aphp.fr

#### **TR 02 : PHENOTYPAGE ET COGNITION DES PRESYMPTOMATIQUES C9ORF72**

*Isabelle Le Ber (1)*

(1) Paris

#### **TR 3 : PRESYMPTOMATIQUE CHEZ LA SOURIS FUS**

*Luc Dupuis (1)*

(1) Strasbourg

## SESSION POSTERS

### I. Génétique et mécanismes moléculaires des maladies du neurone moteur

#### **P 01 : SLP2 AND PROHIBITINS : NOVEL KEY CHCHD10 PARTNERS IN RELATED DISEASES**

*Genin E.C\** (1), *Bannwarth S\** (1), *Roport B* (1), *Mauri-Crouzet A* (1), *Lespinasse F* (1), *Augé G* (1), *Fragaki K* (1), *Cochaud C* (1), *Lacas-Gervais S* (2), *Paquis-Flucklinger V* (1)

(1) Université Côte d'Azur, Inserm U1081, CNRS UMR7284, IRCAN, CHU de Nice, Nice, France (2) Université Côte d'Azur, Centre Commun de Microscopie Appliquée, Nice, France \*co-1st authors

We previously showed that *CHCHD10* is involved in mitochondrial diseases but is also an ALS-FTD gene demonstrating that a primary mitochondrial dysfunction can trigger motor neuron disease. *CHCHD10* is involved in a large clinical spectrum, that encodes a protein whose precise function within mitochondria is unclear. Analyzing the effects of *CHCHD10* mutations is fundamental to identify molecular mechanisms involved in corresponding patients. It will also help to understand the role of secondary mitochondrial abnormalities found in all patients with ALS and other neurodegenerative diseases.

By using human cellular and mouse models, we identified two new key players : the Stomatin-Like Protein 2 (SLP2) and the Prohibitin (PHB) complex, whose destabilization is at the origin of a pathological cascade of events associated with *CHCHD10*-related diseases. We show that *CHCHD10* interacts with SLP2 to control the stability of the PHB complex in the inner mitochondrial membrane. In affected tissues, SLP2 forms aggregates with prohibitins and the instability of the PHB complex results in activation of OMA1 and accelerated OPA1 proteolysis leading to mitochondrial fragmentation, loss of mitochondrial cristae and apoptosis. Abnormal mitochondrial cristae morphogenesis depends on both the PHB complex destabilization leading to MICOS complex instability, *via* disruption of OPA1/Mitofilin interaction, and the activation of PINK1- and Parkin-mediated mitophagy. We also show that the hippocampus is affected by SLP2/PHB dysfunction within *in vivo* models, attesting to its involvement in the neurodegenerative process. Thus, SLP2/PHBs aggregates and destabilization of the PHB complex with PINK1 activation are critical in the sequence of events leading to *CHCHD10*<sup>S59L</sup>-related disease.

**Keywords** : *CHCHD10*, SLA, mitochondria

**Acknowledgements** : This work was made possible by grant from the ANR (Agence Nationale de la Recherche) ANR-16-CE16-0024-01.

[Emmanuelle.GENIN@univ-cotedazur.fr](mailto:Emmanuelle.GENIN@univ-cotedazur.fr)

## **P 02 : IMPACT D'UNE MUTATION INTRONIQUE FREQUENTE DE SOD1 DANS LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE : OPTIMISATION DE SON CRIBLAGE EN VUE DES NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES**

*Muratet F (1), Teyssou E (1), Chiot A (1), Boillée S (1), Lobsiger CS (1), Bohl D (1), Gyorgy B (1), Guegan J (1), Marie Y (1), Amador MDM (1, 2), Salachas F (1,2), Meininger V (3), Bernard E (4, 5), Antoine JC (6), Camdessanché JP (6), Camu W (7), Cazeneuve C (8), Fauret-Amsellem AL (8), Leguern E (1, 8), Mouzat K (9), Guissart C (9), Lumbroso S (9), Corcia P (10, 11), Vourc'h P (11, 12), Grapperon AM (13), Attarian S (13), Verschueren A (13), Seilhean D (1, 14)<sup>#</sup> et Millecamps S (1)<sup>#</sup>*

(1) ICM, Institut du Cerveau, Inserm U1127, CNRS UMR7225, Sorbonne Université, Paris, France. (2) AP-HP, Département de Neurologie, Centre de référence SLA Ile de France, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France. (3) Hôpital des Peupliers, Ramsay Générale de Santé, Paris, France. (4) Centre de référence SLA, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, Hospices Civils de Lyon, Université de Lyon, Bron, France. (5) Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, France. (6) Service de Neurologie, Centre de Ressource et de Compétence SLA, Hôpital Nord, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France. (7) Centre de référence SLA, Hôpital Gui de Chauliac, CHU et Université de Montpellier, Montpellier, France. (8) Département de Génétique et Cytogénétique, Unité Fonctionnelle de neurogénétique moléculaire et cellulaire, AHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France. (9) Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Nîmes, Nîmes, Motoneuron Disease: Pathophysiology and Therapy, INM, INSERM, Univ. Montpellier, Montpellier, France. (10) Centre SLA, CHU Tours, Tours, France. (11) UMR 1253, Université de Tours, Inserm, Tours, France. (12) Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Tours, Tours, France. (13) Centre de Référence pour les Maladies Neuromusculaire et la SLA, CHU de Marseille, Hôpital de la Timone, Marseille, France. (14) AP-HP, Département de Neuropathologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France. <sup>#</sup>contribution équivalente.

Les mutations dans SOD1, qui code la superoxide dismutase 1, sont la deuxième cause génétique des formes familiales de SLA (FALS) en France avec plus de 200 mutations réparties sur toute la longueur du gène. L'impact de quelques variants introniques modifiant l'épissage de SOD1 a été validé [1]. Nous décrivons les conséquences d'une mutation intronique (c.358-10T>G) fréquente dans notre cohorte de formes familiales. Cette mutation ségrége pour 8 membres dans une famille présentant une SLA spinale ayant débuté au niveau des membres inférieurs, sans trouble cognitif associé.

Des expériences réalisées à partir de lymphoblastes de ces patients, montrent l'insertion de 3 acides aminés (FLQ) dans la séquence protéique de SOD1. Dans les tissus post-mortem, les niveaux protéiques de la forme monomérique sont diminués alors que des formes multimériques insolubles s'accumulent. Un traitement à l'iodoacétamide suggère qu'il s'agit de monomères mal conformés liés par des ponts disulfures ayant la capacité de s'oligomériser et de séquestrer la SOD1. L'examen neuropathologique de la moelle épinière d'un patient portant cette mutation montre l'absence d'accumulation filamenteuse de TDP-43. En revanche, des inclusions ubiquitinées de SOD1 et des accumulations de neurofilaments sont observées dans les motoneurons. Ces résultats génétiques, cliniques et neuropathologiques confirment la pathogénicité de cette mutation intronique et indiquent que les patients porteurs de ce type de mutations sont éligibles pour les essais thérapeutiques en cours, utilisant des oligonucléotides anti-sens dirigés contre SOD1. Dans cette perspective, nous proposons une nouvelle méthode de diagnostic, basée sur le séquençage unique et complet de l'ARNm de SOD1 à partir d'amorces localisées dans les régions 5'UTR et 3'UTR de ce gène. L'objectif est de détecter d'éventuelles mutations introniques qui pourraient avoir échappées aux analyses actuellement utilisées et permettre au plus grand nombre de patients, porteurs de mutations dans ce gène, de participer aux essais cliniques en cours.

[1] Valdmanis, P.N., Belzil, V.V., Lee, J., et al. A Mutation That Creates a Pseudoexon in SOD1 Causes Familial ALS. *Ann. Hum. Genet.*, 2009 ; 73 : 652–657.

Mots clés : SOD1, mutation intronique, diagnostic génétique

Remerciements/financements : ARSla

[francois.muratet@icm-institute.org](mailto:francois.muratet@icm-institute.org)

## P 03 : ZEBRAFISH FOR THE FUNCTIONAL ANALYSIS OF VARIANT PATHOGENICITY IN ALS ASSOCIATED GENES

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)

<sup>1</sup> INM, Univ. Montpellier, INSERM, U1298, CHU Nîmes, Nîmes, France <sup>2</sup> 2MMDN, Univ. Montpellier, EPHE, INSERM, U1198, PSL Research University, , Montpellier, France <sup>3</sup> Department of Neurology, CHU de Nancy, Nancy, France <sup>4</sup> 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 <sup>5</sup> 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 <sup>6</sup> ALS Center, Département de Neurologie, CHU Gui de Chauliac, Montpellier, France, Motoneuron Disease: Pathophysiology and Therapy, INM, Univ. Montpellier, Montpellier, France <sup>7</sup> Motoneuron Disease: Pathophysiology and Therapy, INM, U1298, Univ. Montpellier, Montpellier, France

Considering the inheritance of ALS, 90% of cases are sporadic and 10% of cases are familial. More than 30 genes are associated with familial ALS, the major ones being *C9ORF72*, *SOD1*, *FUS* and *TARDBP*. Mutations within the *SOD1* gene account for up to 20% of familial ALS worldwide. Genome-wide association and next generation sequencing led respectively to an increasing number of ALS-associated genes and the discovery of multiple new variants. Molecular diagnosis of ALS is based on the analysis of patients' genetic sequences by seeking a disease-causing variant. The interpretation of variant pathogenicity refers to an international classification system. Functional analysis is considered an essential element for variant classification. One of the main issues in molecular diagnosis is the lack of experimental evidence for the effect of rare variants, which complicates the interpretation of their pathogenicity.

Our objective is to help molecular diagnosis of ALS by developing Zebrafish as a tool for functional analysis of variant pathogenicity. We validated our model using well known ALS-causing mutations in *SOD1* gene: A5V and G94An and tested the effect of 4 patient-derived variants: D126N; E134del; K137\*; I150M. This approach is further applied to *OPTN* gene using the pathogenic E478G as a control to test the patient-derived variant L492R. Transient overexpression of all tested variants in Zebrafish embryos led to significant reduction of swimming speed in 2days old larvae. Locomotor impairments were consistent with shorter axonal projections a in all larvae expressing candidate variants, showing a functional *in vivo* effect in Zebrafish.

Our approach allows to overcome the challenge of variant pathogenicity interpretation in a simple way and allows to study multiple genes, thus improving molecular diagnosis of ALS. Moreover, using Zebrafish has the potential to take patients a step further to treatment in view of the emerging antisense therapies.

### Key Words

ALS molecular diagnosis, Zebrafish

### Acknowledgements

Nîmes University Hospital

Nîmes Metropole

ARSLA

[aleks.chudi@gmail.com](mailto:aleks.chudi@gmail.com)

#### **P 04 : IDENTIFYING MOTOR NEURON SPECIFIC ALTERATIONS IN FUS DELETION MUTANT ZEBRAFISH MODEL OF ALS**

*Xhuljana Mingaj (1), Maria-Letizia Campanari (1), Annis Bourefis (1), Sorana Ciura (1), Edor Kabashi (1)*

1. Imagine Institute, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 1163, Translational research for neurological disorders, Paris, France.

FUS, mutated in ALS patients, is an RNA-binding protein, involved in multiple aspects of RNA metabolism, including RNA splicing, trafficking and translation. The majority of FUS mutations are localized in exon 15, which encodes for NLS (nuclear localization signal), causing FUS redistribution into the cytoplasm with consequent clearance from the nucleus.

Previous studies in our team report for the first time the generation and phenotypic characterization of a stable zebrafish line mutant for the unique FUS orthologue. In this genetic line, we demonstrated that the loss of its function reduces lifespan of homozygous individuals and leads to locomotor disabilities. Also post-synaptic features including alterations at the mitochondrial network specifically at the muscle level were observed in this model. These behavioral deficits were accompanied by anatomical defects, including reduced motor neuron length and fragmentation of neuromuscular junctions (NMJ). The motor deficits were significantly restored by expression of human FUS.

We have developed techniques to specifically purify neurons by FAC sorting and to perform various omics analysis. By crossing the FUS deletion mutants with the motor neuron specific marker (hbg), we have performed an extensive proteomic analysis of purified motor neurons to validate molecular markers that are deregulated upon FUS deletion. This analysis was performed on 3 dpf larvae (days after fertilization) where motor deficits are observed. Importantly, we have identified several dysregulated proteins that are altered in heterozygotes (+/-) and homozygous (-/-) lines. Validation of these altered markers in other pertinent models (iPSCs, mouse model) is underway.

The zebrafish model will provide specific alterations at the motor neuron level and will allow us to identify genetic and chemical modifiers that could rescue the phenotype due to FUS inactivation. Our objective will be to rapidly translate these findings to define therapeutics for the human pathophysiology of FUS-induced ALS.

Key words: fus, zebrafish, proteomics

[xhuljana.mingaj@institutimagine.org](mailto:xhuljana.mingaj@institutimagine.org), [sorana.ciura@institutimagine.org](mailto:sorana.ciura@institutimagine.org)

#### **P 05 : ALTERED ACTION POTENTIAL WAVEFORM AND SHORTER AXONAL INITIAL SEGMENT IN HIPSC-DERIVED MOTOR NEURONS WITH MUTATIONS IN VRK1**

*Bos R (1),(\*), Khalil Rihan K (2),(\*), El-Bazzal L (2), Bernard-Marissal M (2), Quintana P (2), Jabbour R (3), Mégarbané A (4), Bartoli M (2), Brocard F (1),(#), Delague V (2),(#)*

(1) Aix Marseille Univ, CNRS, INT, UMR 7289, Marseille, France, (2) Aix Marseille Univ, Inserm, MMG, U 1251, Institut Marseille Maladies Rares (MarMaRa), Marseille, France, (3) Neurology Division, Department of Internal Medicine, St George Hospital University Medical Center, University of Balamand, Beirut, Lebanon, Beirut, Liban, (4) Department of Human Genetics, Gilbert and RoseMary Chagoury Hospital, Lebanese American University, Byblos, Lebanon, (\*) Equal contribution, (#) Equal contribution

We recently described new pathogenic variants in VRK1, a mainly nuclear, ubiquitously expressed, serine/threonine kinase, in patients affected with distal Hereditary Motor Neuropathy associated with upper motor neurons signs<sup>1</sup>. Specifically, we provided evidences that hiPSC-derived Motor Neurons (hiPSC-MN) from the patients carrying those variants display Cajal bodies (CBs) disassembly and defects in neurite outgrowth and branching<sup>1</sup>.

Here, we sought to answer to the question whether these structural changes affect the firing pattern of hiPSC-MNs, by performing electrophysiological measurements in hiPSC-MNs from



patients as compared to controls. Our results demonstrate that hiPSC-MNs can recapitulate key disease-related feature and constitute an excellent model to study the pathophysiological mechanisms in VRK1-related diseases and in Peripheral Nerve or Motor Neuron disease in general. Indeed, we confirmed that the differentiation protocol used to obtain spinal MNs from hiPSCs induces functional MNs, which are capable of displaying sustained firing patterns. We also demonstrated that co-culture with mouse myoblasts enhance the functional maturation of hiPSC-MNs.

In hiPSC-MNs from patients with VRK1 mutations, we found that the Action Potential (AP) was smaller in amplitude, larger in duration, and displayed a more depolarized threshold while the firing patterns were not altered. These alterations were accompanied by a decrease in the AIS length measured in patients' hiPSC-MNs. This indicates that mutations in VRK1 impact the AP waveform and the AIS organization in MNs and may ultimately lead to the related motor neuron disease. Finally, our results place the group of VRK1-related motor neuron diseases, affecting lower +/- upper motor neurons, in the expanding group of diseases presenting alterations of AIS components, such as epilepsy, neurodegenerative and neuroinflammatory diseases and psychiatric disorders. Our findings open new avenues for a better understanding, and perspectives therapeutics, not only for VRK1- related motor neuron diseases, but also for Amyotrophic Lateral Sclerosis and Spinal Muscular Atrophy.

### Références

1. El-Bazzal, L. et al. (2019). Loss of Cajal bodies in motor neurons from patients with novel mutations in VRK1. *Hum Mol Genet* 28, 2378-2394. doi: 10.1093/hmg/ddzo60

### Mots Clés

Action Potential, VRK1, hiPSC

### Remerciements/Financements

We thank MaSC, the Cell Reprogramming and Differentiation Facility at U 1251/Marseille Medical Genetics (Marseille, France) for providing the control hiPSC line.

This work was supported by grants from the French associations: 'Association ADN' and the French Association against Myopathies (Association Française contre les Myopathies', Grant # TRIM-RD). This work has also been supported by a PRESTIGE programme (PRESTIGE-2017-1-0006, PCOFUND-GA-2013-609102).

We declare no conflicts of interest

Contact: [valerie.delague@univ-amu.fr](mailto:valerie.delague@univ-amu.fr)

## P o6 : INVOLVEMENT OF INHIBITORY NEURONS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND FRONTOTEMPORAL DEMENTIA LINKED TO FUSED IN SARCOMA PROTEIN

*Lorenc F (1), Cassel R (1), Dupuis L (1)*

(1) INSERM UMR-S 1118, Central and Peripheral Mechanisms of Neurodegeneration, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, University of Strasbourg, Strasbourg (France)

Mutations in the *Fused in Sarcoma (FUS)* gene, encoding a ubiquitous and multifunctional RNA/DNA-binding protein, cause the most severe forms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), particularly when the nuclear localisation signal (NLS) of FUS is truncated. This truncation leads to the cytoplasmic mislocalisation of the protein, which is also observed in ALS and frontotemporal dementia (FTD) patients devoid of *FUS* mutations. Knowing that pathogenic mechanisms linked to FUS mislocalisation and the potential role of FUS in either ALS or FTD still need to be understood, our laboratory generated a mouse model displaying a constitutive and ubiquitous NLS deletion. In

2016 and 2017 Scekcic-Zahirovic et al. showed that this effectively induced a cytoplasmic delocalisation of FUS and motor impairments. More recently several alterations of the inhibitory GABAergic network were highlighted in these mice alongside FTD-like behavioural dysfunctions [1] [2].

The aim of my PhD is then to understand the role of inhibitory neurons in *FUS*-ALS and *FUS*-FTD. To do so we are developing two new mouse models with a Cre-Lox recombination technology. (A) By crossing mice in which FUS can be truncated upon recombination and mice expressing Cre recombinase in vesicular GABA transporter (VGAT)-positive neurons, we will be able to truncate FUS solely in inhibitory neurons. (B) At the contrary, by crossing mice displaying a constitutive NLS deletion which can be rescued to the WT situation upon recombination and mice expressing Cre recombinase in VGAT-positive neurons, we will obtain mice in which FUS is truncated in every cell type except inhibitory neurons. With histological studies we will investigate the recombination efficiency as well as the potential effects on neurons degeneration and pathological hallmarks appearance. Then, behavioural and cognitive studies will allow to determine if FUS truncation in inhibitory neurons is (A) sufficient and/or (B) necessary to induce ALS and FTD-like symptoms.

#### References:

[1] Sahadevan S., et al. Synaptic FUS accumulation triggers early misregulation of synaptic RNAs in a mouse model of ALS, *Nature Communications*, 2021, volume 12, article number 3027, pages 1-17.

[2] Scekcic-Zahirovic J., Sanjuan-Ruiz I., et al. Cytoplasmic FUS FUS triggers early behavioural alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects, *Nature Communications*, 2021, volume 12, article number 3028, pages 1-19.

**Keywords:** Fused in Sarcoma, Inhibitory neurons, Characterisation of mouse models.

The authors declare no conflict of interest and thank the University of Strasbourg for funding the project.

Lorenc F [felicie.lorenc@etu.unistra.fr](mailto:felicie.lorenc@etu.unistra.fr)

Cassel R [raphaelle.cassel@inserm.fr](mailto:raphaelle.cassel@inserm.fr)

Dupuis L [ldupuis@unistra.fr](mailto:ldupuis@unistra.fr)

#### **P 07 : EFFETS DE MUTATIONS DE KIF5A SUR LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE CHEZ LA DROSOPHILE.**

*Oorghani S, Lopez C, Aimond F, Raoul C, Soustelle L\* et Layalle S\**

Institut des Neurosciences de Montpellier, INSERM U1298, Université de Montpellier, 34091 Montpellier, France.

Environ 10% des cas de SLA sont d'origine familiale et le séquençage de génomes de patients a récemment permis d'identifier des mutations du gène KIF5A associées à la SLA.

Le gène KIF5A code pour une kinésine qui est un moteur moléculaire responsable du transport vésiculaire antérograde dans les axones notamment des motoneurons (MNs). Deux types de mutations ont été identifiées dans KIF5A : une mutation entraînant une substitution d'une proline en leucine en position 986 (mutant P986L) et une délétion de l'exon 27 entraînant un décalage du cadre de lecture de l'extrémité C-terminale (mutant  $\Delta$ 27). Cependant, les mécanismes moléculaires altérés par ces mutations et responsables de la SLA restent à étudier.

Nous avons développé un modèle génétique chez la drosophile qui permet d'exprimer spécifiquement dans les MNs les formes sauvage ou mutées de KIF5A et ainsi connaître l'effet de cette surexpression sur la physiologie des MNs.

Mon but est d'étudier la morphologie des jonctions neuromusculaires (JNMs) (longueur des branches axonales, nombre de boutons synaptiques et de zones actives) dans les différentes

conditions génétiques. De plus, des enregistrements électrophysiologiques vont permettre d'accéder à la fonctionnalité des JNMs dans les différents contextes génétiques de surexpression de KIF5A sauvage ou mutées. Une autre partie de mon projet consiste à analyser *in vivo* sur animal entier le transport axonal afin de déterminer si la surexpression des formes sauvage ou mutées entraîne des perturbations de ce transport dans les MNs.

Ainsi ce projet de recherche va permettre de caractériser phénotypiquement les effets de la surexpression de KIF5A sauvage ou mutée dans un modèle drosophile aux niveaux des MNs et des JNMs, et ainsi de mieux comprendre les mécanismes qui chez l'homme amènent à la neurodégénérescence et à la SLA.

**Mots-clés** : kinésine KIF5A, jonction neuromusculaire, drosophile.

**Contact** : [sarah.ourghani@inserm.fr](mailto:sarah.ourghani@inserm.fr)

## II. Biomarqueurs et thérapies dans les maladies du neurone moteur

### **P 08 : INVESTIGATING THE MOLECULAR AGING PROCESS OF MOTOR NEURONS AS A FACTOR CONTRIBUTING TO SELECTIVE VULNERABILITY AND DISEASE IN ALS**

*Roman O (1), Haddad AT (1), Berriat F (1), Nichterwitz S (2), Bohl D (1), Millecamps S (1), Hedlund E (2), Boillée S (1), Lobsiger CS (1).*

(1) Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Université, équipe Boillée, Paris, France. (2) Karolinska Institutet, Department of Cell and Molecular Biology, Hedlund Lab, Stockholm, Sweden.

The majority of ALS cases are linked to late onset and age considered a risk factor. The known deterioration of the motor system during aging has been well described for the muscle (sarcopenia), but less is known about if and how motor neurons (MN) change with age. This is a fundamental biological question, but could also reveal novel pathways to help protect MN in ALS. Some hypotheses exist, but were mostly assessed on a global tissue level, and less so on the level of individual MN. An additional challenge is linked to if such age-linked changes in MN are deleterious or beneficial responses. Our approach was to exploit the known selective vulnerability in ALS - e.g. lumbar spinal cord MN (LMN) are more vulnerable than oculomotor nucleus MN (OMN) - and ask: (1) are there molecular changes in ALS vulnerable LMN during normal aging? - and if so, (2) are such age-linked changes also present, or different, in ALS resistant OMN?

We used mice as a model and transcriptomics as a tool. Pools of LMN and OMN were isolated by laser-microdissection from young, middle-aged and aged C57BL/6J mice and RNAseq was performed. Importantly, we found actual presence of several pathways deregulated during aging in LMN, but - surprisingly - there were almost none in OMN during aging, indicating a possible deleterious aging response in LMN. Interestingly, when comparing the deregulated genes in LMN during aging with our existing dataset of transcriptional changes in LMN of onset mutant SOD1 mice, we found significant overlap, suggesting accelerated aging for ALS, but also deregulated pathways unique to aging only. This includes induction of axonal stress pathways, but also downregulation of specific homeostatic pathways, respectively. Our results help to better understand selective vulnerability and identified new candidates to slow ALS MN degeneration.

**Mots clés**: aging, motor neurons, selective vulnerability

**Financements**: ARSLA, ARMC, S.L.A.F.R., La longue route des malades de la SLA, Un pied devant l'autre.

**Note**: These are the final results from the ARSLA funded project to C.S.L. (Jan 2019 - Mar 2021, 25k€)

[christian.lobsiger@icm-institute.org](mailto:christian.lobsiger@icm-institute.org) / [olga.roman@orange.fr](mailto:olga.roman@orange.fr)

## **P 09 : MORTALITE LIEE A LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE EN AMERIQUE LATINE : UNE META-ANALYSE BASEE SUR LA POPULATION GENERALE.**

*Erazo D.<sup>1</sup>, Luna J.<sup>1,2</sup>, Preux P.M.<sup>1,3</sup>, Boumediene F.<sup>1</sup>, Couratier P.<sup>1,2</sup>*

1. INSERM, Univ. Limoges, CHU Limoges, IRD, U1094 Neuroépidémiologie Tropicale, Institut d'Epidémiologie et de Neurologie Tropicale, GEIST, Limoges, France 2. CHU Limoges, Service de Neurologie, Centre de référence SLA et autres maladies du neurone moteur, Limoges, France. 3. CHU Limoges, Centre d'Epidémiologie, de Biostatistique et de Méthodologie de la Recherche, Limoges, France.

**Introduction :** Des études récentes ont décrit une plus faible occurrence de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) en Amérique latine par rapport à l'Europe et à l'Amérique du Nord (1). Des différences significatives ont notamment été décrites entre les groupes ethniques de la macro région (2,3). Nous avons réalisé une méta-analyse afin de décrire les taux de mortalité de la SLA en Amérique latine. Nous avons également exploré la relation entre les taux de mortalité nationaux et la proportion de la population caucasienne.

**Méthodes :** Les registres nationaux de mortalité des pays d'Amérique latine ont été consultés pour identifier les décès dus à la SLA selon la Classification Internationale des Maladies (codes : 335.2 et G12.2). Les taux de mortalité bruts et standardisés ont été calculés. Une méta-analyse à effet aléatoire a été réalisée pour estimer le taux de mortalité groupé. Une régression linéaire a évalué la relation entre le taux de mortalité et la proportion de la population caucasienne.

**Résultats :** Au total, 28 548 décès dus à la SLA et 819 millions de personnes-années (PA) ont été pris en compte dans 10 pays d'Amérique latine. Le taux de mortalité brut poolé était de 0,38 (IC95% : 0,27 - 0,52) et le taux standardisé poolé était de 0,61 (IC95% : 0,49 - 0,77) pour 100 000 PA. L'hétérogénéité était significative ( $I^2$ : 99,9%,  $p < 0,001$ ). Une corrélation positive a été rapportée entre le taux de mortalité SLA et la proportion de caucasiens ( $r=0,83$ ;  $p=0,004$ ).

**Conclusion :** Cette méta-analyse confirme une plus faible occurrence de la SLA en Amérique latine par rapport à l'Europe et à l'Amérique du Nord. Elle soutient également une association épidémiologique entre les populations ethniques et la SLA. D'autres études sont nécessaires pour étudier le rôle de l'origine ancestrale sur la SLA.

**Remerciements :** Nous tenons à remercier les Docteurs Tatiana Zaldivar (Cuba) et Mirian Moura (Brésil) qui ont répondu à notre sollicitation et pour le matériel utile qu'ils ont pu nous fournir.

### **References:**

1. Erazo D, Luna J, Preux P-M, Boumediene F, Couratier P. Epidemiological and genetic features of amyotrophic lateral sclerosis in Latin America and the Caribbean: a systematic review. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2021;1–13. Available from: <https://doi.org/10.1080/21678421.2021.1909066>.

2. Luna J, Preux P-M, Logroscino G, Erazo D, Del Brutto OH, Boumediene F, et al. Amyotrophic lateral sclerosis mortality rates among ethnic groups in a predominant admixed population in Latin America: a population-based study in Ecuador. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2019;20:1–9.

3. Zaldivar T, Gutierrez J, Lara G, Carbonara M, Logroscino G, Hardiman O. Reduced frequency of ALS in an ethnically mixed population: a population-based mortality study. *Neurology.* 2009;72(19):1640–5.

**Mots clés :** SLA, Épidémiologie, Mortalité, Amérique latine.

**Déclaration d'intérêt :** Les auteurs ne signalent aucun conflit d'intérêt.

Email de la présentatrice : Erazo Daniells : [daniellsandrea7@gmail.com](mailto:daniellsandrea7@gmail.com)

Senior Author : Couratier Philippe, [philippe.couratier@unilim.fr](mailto:philippe.couratier@unilim.fr)

## P 10 : PAS INDUCED RECOVERY OF INTRACORTICAL INHIBITION IN PATIENTS WITH ALS

*A Lackmy-Vallée<sup>1</sup>, I Peyre<sup>1,2</sup>, G Querin<sup>3,4</sup>, PF Pradat<sup>1,5</sup> & V Marchand-Pauvert<sup>1</sup>*

1- Sorbonne Université, Inserm U1146, CNRS UMR 7371, Laboratoire d’Imagerie Biomédicale (LIB), Paris, France. 2- Sorbonne Université, CNRS, Institut de Recherche et de Coopération en Acoustique Musique (IRCAM), UMR Sciences et Technologies de la Musique et du Son (STMS), Paris, France. 3- Institut de Myologie, Plateforme I-Motion Adultes, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris, France. 4-Service de Neuromyologie, APHP GH Pitié Salpêtrière, Paris, France 5-Département de Neurologie-Pôle des Maladies du Système Nerveux, APHP GH Pitié Salpêtrière, Paris, France.

**Backgrounds:** Evidence from transcranial magnetic stimulation (TMS) studies indicated that cortical hyperexcitability is an early mechanism involved in selective motor neuron death in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) <sup>[1]</sup>. In this view, electrophysiological methods used to modulate cortical excitability may help to improve the balance between excitation and inhibition in the motor cortex in attempt to slow down the disease progression. Paired associative stimulation (PAS) combines low-frequency TMS applied over the motor cortex with stimulation of peripheral nerve afferents. In healthy subjects, PAS induces changes in synaptic transmission in cortical and spinal neuron networks that outlast the period of application <sup>[2]</sup>. To date, only one study has revealed modifications in motor evoked potentials (MEPs) after PAS in ALS <sup>[3]</sup>.

**Objective:** This study aims to explore effects induced by PAS on intracortical inhibitions (ICI) evoked in the motor cortex and described as impaired in sporadic and familial ALS <sup>[1]</sup>.

**Methods:** Fourteen newly-diagnosed ALS patients were included. Short and long-latency ICI were explored in wrist muscles using electromyogram recordings and paired-pulse TMS methods. The degrees of both inhibitions were estimated before and 60 minutes after one session of repeated PAS (N=200, TMS over arm motor area combined with electrical stimulations of radial nerve afferents).

**Results:** One session of PAS failed to modulate long-latency ICI. However, PAS enhanced short-latency ICI, especially in patients exhibiting the more impaired inhibition at baseline. This supports that PAS may help to recover GABA<sub>A</sub>-mediated ICI to counteract cortical hyperexcitability in ALS.

**Conclusion:** This study provides evidence that PAS paradigm may induce plastic changes in sensorimotor networks in ALS patients. Further investigations are needed to shed light on potential of PAS to induce long-term neuroplasticity to develop new therapeutic approaches in ALS.

### Bibliography

- 1.Vucic S, Kiernan MC (2013). Utility of transcranial magnetic stimulation in delineating amyotrophic lateral sclerosis pathophysiology. *Handb Clin Neurol.* 116, 561-575.
- 2.Stefan K, Kunesch E, Cohen LG, Benecke R, Classen J. Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain.* 2000 Mar;123 Pt 3:572-84.
- 3.Ceccanti M, Onesti E, Rubino A, et al. Modulation of human corticospinal excitability by paired associative stimulation in patients with amyotrophic lateral sclerosis and effects of Riluzole. *Brain Stimul.* 2018;11(4):775-781.

**Key words:** Electrophysiology, humans, amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

**Conflict of interest:** The authors have no conflicts of interest to declare and have no competing financial interests.

Email: [alexandra.lackmy-vallee@sorbonne-universite.fr](mailto:alexandra.lackmy-vallee@sorbonne-universite.fr); [veronique.marchand-pauvert@inserm.fr](mailto:veronique.marchand-pauvert@inserm.fr)

## **P 11 : "OMICS" PROFILING OF PLASMA-DERIVED EXOSOMES: THE SEARCH OF BIOMARKERS FOR EARLY-STAGE ALS**

*Lanznaster D(1), Bruno C(1), Vourc'h P(1), Corcia P(1), Andres CR(1), Duguez S(2), Duddy W(2), Blasco H(1)*

1-UMR 1253, iBrain, Université de Tours, INSERM, Tours, France 2-University's Northern Ireland Centre for Stratified Medicine, Londonderry, Northern Ireland

An urgent and unmet need in ALS is the identification of reliable biomarkers for this disease. Biomarkers may improve diagnosis, especially in early stages and could improve therapeutics efficiency. Plasma biomarkers or biomarkers from other peripheral tissues easy to be obtained and analyzed in a daily clinical practice have to be developed. Interestingly, brain-derived extracellular vesicles (EVs) can be found in plasma and used as a direct read-out of the status of the central nervous system. EVs have unique membrane composition, regarding lipids and proteins. However, no characterization was done so far for EVs derived from ALS patients. Here, we aimed to characterize the composition of plasma EVs from ALS patients to identify putative biomarkers using omics approaches. We obtained plasma EVs from 10 controls and 10 ALS patients included in the protocol METABOMU (NCT02670226, N°IdRCB: 215-AO1629-40). EVs were purified through Size Exclusion Chromatography method. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) revealed no differences regarding average size of EVs (Controls:  $141.4 \pm 9.75$  nm; ALS:  $16.5 \pm 13.2$  nm; mean  $\pm$  SD) nor concentration of particles (Controls:  $4.61 \times 10^{10}$  particles/mL; ALS:  $4.25 \times 10^{10}$  particles/mL). Interestingly, ALS- and controls-derived EVs presented different Zeta potential (Controls:  $-22.53 \pm 4.3$  mV; ALS:  $-8.01 \pm 7.9$  mV; mean  $\pm$  SD;  $p=0.001$  Unpaired  $t$  test). Proteomics analysis were performed by LC-MS/MS followed by TimS TOF Pro Mass Spectrometer. Proteomics analysis revealed 203 proteins significantly different between groups ( $P_{adj} < 0.05$ ). Further analysis with PLGEM algorithm revealed 45 different proteins ( $p < 0.05$ ), 35 being increased in ALS patients in comparison to controls' EVs (for example, serum amyloid proteins and proteins S100-A9 and S100-A7) while other 10 proteins presented higher levels in Controls-EVs (ex. destrin). Western blot, metabolomics and lipidomics analysis are currently being performed to confirm the differences suggested so far between Controls- and ALS-derived plasma EVs. We will further validate the application of the identified molecules or profile of molecules from EVs as putative biomarkers for ALS diagnosis.

**Key-words:** proteomics, biomarkers, plasma, extracellular vesicles

**Acknowledgements:** This study was supported by funds obtained for H. Blasco from the Foundation Patrick Brou de Lauriere and the French Association of ALS (ARSLA).

**E-mail:** [debora.lanznaster@univ-tours.fr](mailto:debora.lanznaster@univ-tours.fr)

## **P 12 : RADIOTHÉRAPIE DES GLANDES SALIVAIRES COMME TRAITEMENT DE LA SIALORRHÉE RÉFRACTAIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE**

*Assouline A (1), Schernberg A (1), Del Mar Amador M (2), Morelot-Panzini C (3), Gonzalez-Bermejo J (3), Lenglet T (2), Le Forestier N (2,4), Bruneteau G (2), Hesters A (2), Salachas F (2), Delanian S (1,5), Pradat PF (2)*

(1) Département de radiothérapie, Centre de Cancérologie de la Porte de Saint-Cloud, Boulogne-Billancourt, (France), (2) Département des maladies du système nerveux, centre SLA de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, (France), (3) Département de Pneumologie et de Soins Intensifs, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, (France), (4) Département de recherche EA1610 : Études scientifiques et technologiques. Université de Paris Sud/Paris Saclay (France), (5) Département de radiothérapie, Hôpital Saint Louis, APHP, Paris, (France)

### **INTRODUCTION**

Cette étude vise à évaluer l'efficacité et la tolérance de la radiothérapie (RT) des glandes salivaires principales dans une large cohorte de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (SLA) avec une sialorrhée réfractaire.

## MATERIEL ET METHODES

Les patients réfractaires aux traitements médicamenteux classiques de la sialorrhée, traités dans notre institution entre 2010 et 2020 par RT, ont été analysés rétrospectivement.

La RT ciblant les deux glandes sub-mandibulaires et les deux glandes parotides avec une dose totale délivrée de 10 Gy en 2 fractions ou 20 Gy en 4 fractions.

L'efficacité de la RT a été évaluée à l'aide de l'échelle de notation de la sialorrhée en 9 points (SSS), validée dans une étude prospective chez les patients atteints de SLA.

## RESULTATS

Au total, 212 patients ont été inclus, et 254 traitements (42 ré-irradiations). L'âge médian était de 68 ans [38 – 95 ans], 118 femmes (56%) et 94 hommes (44%). Le score SSS médian avant la radiothérapie était de 8 (fourchette : 6 - 9), et le score SSS médian à 1 mois d'irradiation était de 2 (fourchette : 1 - 6). Il n'y a pas eu de toxicité de grade supérieure à 1.

A la fin de l'irradiation, tous les patients sauf un ont vu leur score SSS s'améliorer : 246 ont eu une réponse complète (RC) (96%, SSS 1-3) et 7 une réponse partielle (RP) (3%, SSS 4-5) ; un patient a eu un score SSS stable (<1%). La RC 1 mois après la RT a été obtenue chez 96% des 212 patients qui ont subi une primo RT, et 100% des 42 patients qui ont reçu une ré-irradiation.

Les patients traités par 20 Gy contre 10 Gy lors de la primo RT étaient plus susceptibles d'obtenir une RC à 1 mois (99% contre 91%,  $p = 0,01$ ), et avaient une meilleure diminution du score SSS ( $p < 0,001$ ).

## CONCLUSION

Notre étude en vie réelle confirme que la radiothérapie des glandes salivaires est efficace et bien tolérée pour réduire l'hypersialorrhée résistante aux traitements médicamenteux chez les patients atteints de SLA.

**MOTS CLES :** Sclérose latérale amyotrophique (SLA), Radiothérapie, Glandes salivaires.

**Adresse mail de l'auteur présentateur :** [avi.assouline@ccpsc.fr](mailto:avi.assouline@ccpsc.fr)

## P 13 : EPIDEMIOLOGIE DE LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE EN REGION LIMOUSIN ENTRE 2000-2020 : REGISTRE FRALIM.

*Defressigne O<sup>1</sup>, Luna J<sup>1,2</sup>, Erazo D<sup>1</sup>, Lautrette G<sup>2</sup>, Boumédiène F<sup>1</sup>, Preux P-M<sup>1,3</sup>, Couratier P<sup>1,2</sup>*

1. INSERM, Univ. Limoges, CHU Limoges, IRD, U1094 Neuroépidémiologie Tropicale, Institut d'Epidémiologie et de Neurologie Tropicale, GEIST, Limoges, France 2. CHU Limoges, Service de Neurologie, Centre de référence SLA et autres maladies du neurone moteur, Limoges, France. 3. CHU Limoges, Centre d'Epidémiologie, de Biostatistique et de Méthodologie de la Recherche, Limoges, France.

**Introduction :** La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative du motoneurone pour laquelle les registres ont un rôle clé pour améliorer sa compréhension. L'objectif principal est de décrire l'incidence et les caractéristiques sociodémographiques et cliniques des cas incidents en Limousin sur une période de 21 ans (2000 - 2020) puis de comparer deux sous périodes 2000-2011 et 2012-2020.

**Méthodologie :** Les cas incidents inclus respectaient les critères Airlie House et étaient identifiés par au moins une de ces 3 sources : (1) les centres de référence SLA ; (2) les hôpitaux publics et privés de la région ; (3) les données de l'assurance maladie. Une vérification des cas a été faite de manière centralisée afin de confirmer le diagnostic. Des analyses statistiques ont permis de décrire l'incidence brute et standardisée puis de décrire la population d'étude afin de comparer les caractéristiques démographiques et cliniques entre les deux périodes.

**Résultats** : Le registre FRALim a ainsi permis d'identifier 506 cas incidents entre 2000 et 2020. L'incidence brute était de 3,29/100 000 PA (IC95% : 3,01 - 3,58) et l'incidence standardisée était de 2,22/100 000 PA (IC95% : 2,02 - 2,43). L'âge médian au diagnostic était de 70 ans (IQQ : 62 - 77). Le sexe ratio homme/femme a diminué passant de 1,28 (2000-2011) à 1,02 (2012-2020). Le délai diagnostique médian a augmenté avec 8 mois (IQQ : 5 - 12) pour 2000-2011 à 11,5 mois (IQQ : 6 - 17) pour 2012-2020 ( $p < 0,001$ ). Il a été observé que la répartition des critères Airlie House étaient statistiquement différente entre les deux périodes ( $p = 0,05$ ).

**Conclusion** : L'incidence standardisée se situe dans la fourchette supérieure des données rapportées dans les pays occidentaux aujourd'hui. Des variations comme le délai diagnostique ou la répartition des critères Airlie House entre les deux périodes sont notables.

**Keywords** : SLA ; Épidémiologie ; Registre FRALim

Defressigne O : [ophelie.defressigne@etu.unilim.fr](mailto:ophelie.defressigne@etu.unilim.fr)

Luna J : [jaimelandreslunam@gmail.com](mailto:jaimelandreslunam@gmail.com)

#### **P 14 : SOME CSF KYNURENINE PATHWAY INTERMEDIATES ASSOCIATED WITH DISEASE EVOLUTION IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

*Alarcán H (1), Chaumond R (1), Emond P (2,3), Benz-De Bretagne I (1), Lefèvre A (2), Bakkouche SE (4), Veyrat-Durebex C (1,2), Vourc'h P (1,2), Andres CR (1,2), Corcia P (2,4) and Blasco H (1,2)*

(1) Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, CHRU Bretonneau, Tours, France, (2) INSERM U1253 iBrain, Université de Tours, Tours, France, (3) Laboratoire de médecine nucléaire in vitro, CHRU Bretonneau, Tours, France, (4) Service de neurologie, CHRU Bretonneau, Tours, France.

**Objectives:** The aim of the study was to evaluate the Kynurenine Pathway and amino-acids (AA) profile in CSF of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) patients at the diagnosis to early detect a putative disorder of these pathways and to assess their diagnostic or prognostic ability. **Methods:** In this context, we explored AA and tryptophan metabolism intermediates, including KP, using mass spectrometry, in the cerebrospinal fluid (CSF) of 40 ALS patients and 42 controls. Diagnostic and predictive ability (based on weight loss, forced vital capacity, ALS Functional Rating Scale - Revised evolution over 12 months, survival time) of these molecules were evaluated using univariate analysis followed by supervised multivariate analysis (PLS-DA). **Results:** Multivariate model to discriminate ALS and controls was not significant but highlighted some KP metabolites (kynurenine (KYN), kynurenic acid (KYNA), 3-Hydroxynurenine (3-HK)/KYNA) and AA (Lysine, asparagine) as involved in the discrimination between groups (accuracy 62%). It revealed a probable KP impairment toward neurotoxicity in ALS patients and in bulbar forms (3-HK/KYN (FC: 1.44,  $p = 0.13$ ), 3-HK/KYNA (FC: 1.44,  $p = 0.19$ ) and Quinolinic acid (QUIN)/KYN ratios (FC: 1.35,  $p = 0.19$ ) ratios). Regarding the prognostic effect of metabolites, we observed that the following metabolites were commonly discriminant for at least 3 or 4 disease evolution criteria : QUIN, 3-HK, 5OH-tryptophan, 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), glycine, arginine, KYN, asparagine, Indole-3-acetic acid, serotonin, lysine and serine. **Conclusion:** This early investigation in CSF was crucial as it did not show significant changes in concentrations of AA and KP intermediates in early ALS evolution. However, trends of KP modifications suggest further exploration. The unclear kinetics of neuroinflammation linked to KP support the interest in exploring these pathways during disease evolution through a longitudinal strategy.

**Mots clés:** kynurenine pathway, amino-acids, cerebrospinal fluid

[Hugo.alarcan@etu.univ-tours.fr](mailto:Hugo.alarcan@etu.univ-tours.fr) : présentateur

[helene.blasco@univ-tours.fr](mailto:helene.blasco@univ-tours.fr) : sénior



**P 15 : COMPARAISON DES PARAMETRES LATERALISES IMPEDANCEMETRIQUES ET DU TESTING MUSCULAIRE DANS UNE COHORTE DE PATIENTS ATTEINTS DE SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE.**

*Cane M (1), Jésus P (1, 2), Misset B (1), Arnal Couderc M (1), Calmel N (1), Couratier P (2, 3), Fayemendy P (1, 2)*

(1) Unité Transversale de Nutrition, CHU DE LIMOGES, France, (2) INSERM, U1094, NET, Université de Limoges, LIMOGES, France, (3) Centre SLA, CHU DE LIMOGES, France

**Introduction :** Au cours du suivi des patients souffrant de SLA, le testing musculaire manuel (MMT) permet de déterminer la latéralité de l'atteinte fonctionnelle. L'examen impédancemétrique, qui peut être latéralisé, détermine la composition corporelle et donc la masse maigre (MM), reflet de la masse musculaire. Les objectifs de ce travail étaient de déterminer s'il existait un lien entre les modifications de composition corporelle latéralisées en impédancemétrie et le déficit moteur latéralisé objectivé par le MMT, et de déterminer si ce lien était stable au cours de l'évolution.

**Méthodes :** L'étude observationnelle concernait les patients SLA suivis au CHU de Limoges entre 2005 et 2017. Les patients avaient une évaluation impédancemétrique et un MMT réalisés de façon rapprochée (délai < 1 mois) lors de l'évaluation initiale et finale. Les variables quantitatives étaient exprimées en moyenne  $\pm$  écart type, les variables qualitatives en pourcentage. La liaison entre les données impédancemétriques latéralisées et les données de MMT latéralisée était étudiée par régression linéaire simple.

**Résultats :** 55 patients étaient inclus, âgés de  $66 \pm 12,6$  ans au diagnostic et de sexe ratio Hommes/Femmes à 1,1. La MM en impédancemétrie était de  $45,4 \pm 9,1$  kg lors de l'évaluation initiale et de  $44,4 \pm 9,1$  lors de l'évaluation finale. Le MMT initial était à  $134,9 \pm 13,7$  et final à  $98 \pm 38,2$ . La corrélation entre les données latéralisées impédancemétriques et les données latéralisées au MMT était positive, modérée, et significative lors de l'évaluation initiale ( $r = 0,38$  [0,12-0,59],  $p = 0,0039$ ) et positive, faible, et significative lors de l'évaluation finale ( $r = 0,27$  [0-0,50],  $p = 0,0446$ ).

**Conclusion :** Il existait une corrélation positive entre les données impédancemétriques et de MMT latéralisées lors des évaluations initiales et finales. Cette association est faible : l'impédancemétrie ne semble pas être un bon examen pour prédire l'évolution fonctionnelle neurologique.

**Mots clefs :** Sclérose latérale amyotrophique, Testing musculaire manuel, impédancemétrie

**Conflits d'intérêts :** Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt en rapport avec ce travail

**Auteur correspondant – présentateur :** [philippe.fayemendy@chu-limoges.fr](mailto:philippe.fayemendy@chu-limoges.fr)

### III. Physiopathologie des maladies du neurone moteur

**P 16 : DEFINING THE COMPONENTS STRESS GRANULES IN VITRO AND IN VIVO CONDITIONS**

*Gilles M (1), Pasho E (1), Renault S (1), Jung V (2), Guerrero C (2), Ciura S (1) and Kabashi E (1)*

(1) INSERM U1163, Institut Imagine, University Paris Descartes, Hospital Necker-Enfants Malades, Paris (France) (2) Faculté de Médecine, Université de Paris, Paris (France)

Stress granules (SG) are transient and cytoplasmic protein-RNA aggregates, assembled in response to cellular stress, and associated to the development of several neurodegenerative diseases, including Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Since SG composition has been well established under acute stress; to better understand the impact of stress duration on SG composition and functions, these aggregates were monitored under a chronic-like stress in our different models: *in vitro* (stable cell line and iPSC-derived motor neurons) and *in vivo* (zebrafish), using various stressors (heat shock or sodium arsenite). Firstly, we established SH-SY5Y cell line stably overexpressing a key marker of stress granules: G3BP1 fused to fluorescent molecule and we developed a new method of SG purification combining differential centrifugation and sort by FACS (protocol adapted

from P-body purification [1]). We validated the efficiency of this method in SH-SY5Y and U2-OS cells expressing fluorescently marked G3BP1 to purify SG components. These samples were then used for proteomic and transcriptomic analysis. The initial analysis of SG components has allowed us to validate well-known SG markers, such as G3BP1, TIA-1, PABPC1, FRX1..., and to identify novel markers that have not been previously associated with functional SGs. Finally, we were also able to induce G3BP1 aggregates in the spinal cord of zebrafish correlated to the development of locomotor problems. The ongoing establishment of *in vivo* stress granule reporter using CRISPR/Cas9 in zebrafish should allow us also to purify SG using the FAPS method and to validate our markers *in vivo*. This study permits the development of a new method of stress granules purification easily adaptable in our zebrafish model and should allow us to better understand their role in ALS as well as to emerge new potential therapeutic targets that target the formation and dissociation of SGs under various conditions of stress.

References: [1] Hubstenberger A et al., P-body Purification Reveals the Condensation of repressed mRNA Regulons. *Mol Cell*. 2017 Oct 5;68(1):144-157.

Key words: stress granules, aggregates purification, zebrafish

Mélissa GILLES : [melissa.gilles@institutimagine.org](mailto:melissa.gilles@institutimagine.org)

#### **P 17 : METABOLOMICS ANALYSIS HIGHLIGHT THE INVOLVEMENT OF MUSCLE ENERGETIC METABOLISM IN ALS PATHOPHYSIOLOGY**

*Lanznaster D(1)\*, Bruno C(1,2)\*, Emond P(1,3), Zemmoura I(1,4), Lefèvre A(1), Reynier P(5,6), Vourc'h P(1,2), Andres CR(1,2), Bakkouche S(1,7), Corcia P(1,7), Blasco H(1,2)*

1-UMR 1253, iBrain, Université de Tours, INSERM, Tours, France 2- Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU de Tours, France 3-Service de Médecine Nucléaire in vitro, CHU de Tours, Tours, France 4-Service de Neurochirurgie, CHU de Tours, Tours, France 5- Département de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers, France 6-Mitovasc-Mitolab, UMR CNRS6015-INSERM1083, Angers, France 7- Service de Neurologie, CHU de Tours, France

Many pathological actors identified as putative diagnosis biomarkers or involved in neurodegeneration have been identified in muscle of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients, but few studies reported a broad analysis of the changes in the muscular energetic metabolism. Here, we investigated the metabolism of the skeletal muscle and evaluated the mitochondrial function in ALS compared to controls. A biopsy from the deltoid muscle was collected from 17 ALS patients at diagnosis and 20 healthy controls (HC). We performed transmission electronic microscopy (TEM), metabolomics analysis (LC-MSMS) and analysis of mitochondrial enzymatic activity. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism, Metaboanalyst or JMP, depending on the variables analyzed. Median age ( $\pm$ SD) was HC: 66.1 $\pm$ 19.2 years and ALS: 67.2 $\pm$ 9.9 years. Disease duration was 9.4 $\pm$ 6.8 months and diagnosis delay was 9.0 $\pm$ 4.7 months. TEM analysis revealed a discrete accumulation of mitochondria in the subsarcolemmic compartment in ALS muscle. Univariate volcano plot analysis showed 13 metabolites increased in ALS muscle, between them citramalate ( $p=0.04$ ). Multivariate analysis revealed different muscle metabolomes from HC and ALS patients ( $p$ -CV-ANOVA $<0.0012$ ); 5 metabolites had VIP $>1$ : 4-methyl-2-oxovaleric acid, 4-methyl-2-oxo-pentanoic acid, L-alanine, creatine and glycine, with impact in the metabolism of glycine, serine and threonine ( $p<0.001$ ); biosynthesis ( $p=0.002$ ) and degradation ( $p=0.04$ ) of valine, leucine and isoleucine. Analysis of mitochondrial enzymatic activity revealed higher complex II/CS ratio in ALS (0.37 $\pm$ 0.09) than in HC (0.32 $\pm$ 0.06;  $p=0.04$ ). LDH activity was lower in ALS (HC: 6060 $\pm$ 3045 nmol/min/mg protein; ALS: 3705 $\pm$ 1458 nmol/min/mg protein;  $p=0.03$ ). In ALS patients, LDH activity correlated positively with carnitine, creatinine and lactate levels, while it correlated negatively with alpha-glucose-1-phosphate. At database lock, six patients were alive. Multivariate analysis revealed correlation of muscle C10-carnitine levels ( $p=0.047$ ) with survival. Metabolomics analysis in muscle showed major alterations in aminoacids metabolism, oxidation of fatty acids and carnitine synthesis, highlighting the mitochondrial dysfunction described in ALS.

**Key-words:** metabolomics, muscle, mitochondria dysfunction

**Acknowledgements:** We would like to thank the “attachés de recherche clinique” for the collection of clinical data, and the technicians of the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of the CHRU of Tours. This study was supported by funds obtained for H. Blasco from the Foundation Patrick Brou de Lauriere and the French Association of ALS (ARSLA).

**E-mail:** [deboralanznaster@univ-tours.fr](mailto:deboralanznaster@univ-tours.fr)

**P 18 : LA PERTE DE NORADRENALINE CONTRIBUE AU DYSFONCTIONNEMENT DES RESEAUX CORTICAUX DANS LES MODELES MURINS *SOD1<sup>G86R</sup>* ET *FUS<sup>ANLS</sup>* DE LA SLA**

*Stuart-Lopez G (1), Brunet A (1)\*, Scekcic-Zahirovic J (1,2)\*, Douchamps V (3) Chavant V (4), Goumon Y (4), Goutagny R (3) et Rouaux C (1)*

(1) Inserm UMR5\_1118, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, Université de Strasbourg (France) (2) Adresse actuelle : Neurology department, ZBMF, Systems Neurology Laboratory, Universität Ulm, Ulm, Germany (3) LNCA, CNRS UMR7364, Université de Strasbourg, France (4) CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Université de Strasbourg (France) \* contribution similaire

Les patients atteints de SLA présentent une hyperexcitabilité corticale précoce, qui précède la dénervation musculaire, est négativement corrélée à la survie, et est temporairement régulée par un traitement au Riluzole [1]. Au laboratoire, l'électrocorticographie combinée à l'analyse de couplage interférence et au test de sensibilité au pentylènetétrazole nous a permis de mettre en évidence un dysfonctionnement des réseaux corticaux (Dysf\_Cortical) précoce et persistant dans les modèles murins *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>ANLS</sup>*. Partant de ces résultats, nous avons cherché à mettre en évidence les causes possibles du Dysf\_Cortical au cours de la SLA, et notamment la possible contribution de différents neuromodulateurs connus pour influencer l'excitabilité du cortex moteur [2]. Une analyse en spectrométrie de masse a révélé une baisse des niveaux de noradrénaline d'environ 30% chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et 10% chez les souris *Fus<sup>ANLS</sup>*. L'analyse histologique du système noradrénergique de ces animaux a montré une baisse d'innervation noradrénergique dans les aires motrices dans les deux modèles murins, ainsi qu'une baisse du nombre de neurones noradrénergiques du locus coeruleus des souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Pour déterminer le rôle de la baisse de noradrénaline dans le Dysf\_Cortical, nous avons d'une part induit expérimentalement une baisse de noradrénaline chez des animaux sauvages par administration de la neurotoxine DSP-4, et d'autre part induit une augmentation des niveaux de noradrénaline sélectivement dans le système nerveux central des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* par un co-traitement Droxidopa + Benserazide, avant de procéder à l'analyse du fonctionnement des réseaux corticaux par électrocorticographie. Nos résultats indiquent que la baisse de noradrénaline suffit à induire un Dysf\_Cortical similaire à celui observé chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fus<sup>ANLS</sup>*, et qu'à l'inverse, l'augmentation des niveaux de noradrénaline chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* permet d'améliorer significativement le fonctionnement cortical. Nous sommes dans l'attente de tissus de patients pour vérifier la pertinence de nos résultats chez l'homme.

**Références :**

[1] Vucic S. & Kiernan M C Transcranial Magnetic Stimulation for the Assessment of Neurodegenerative Disease. *Neurotherapeutics* (2017) **14**, 91–106.

[2] Brunet A et al. Cortical Circuit Dysfunction as a Potential Driver of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurosci* (2020) **14**:363.

**Mots clés :** Dysfonctionnement des réseaux corticaux ; Hyperexcitabilité Corticale ; Noradrénaline

**Financements :** Ces travaux sont financés par une ERC Starting Grant (CR) et un contrat doctoral du MENESR (AB).

**Contacts :** [geoffrey.stuart.lopez@inserm.fr](mailto:geoffrey.stuart.lopez@inserm.fr), [caroline.rouaux@inserm.fr](mailto:caroline.rouaux@inserm.fr)

## P19: ANNULATION

### P 20 : SLEEP AND OREXINERGIC PATHWAY ALTERATIONS IN MICE MODELS OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

*Guillot SJ, Stuart-Lopez G, Rouaux C, Dupuis L and Bolborea M*

INSERM UMR-S 1118, Central and Peripheral Mechanisms of Neurodegeneration, Centre de Recherche en BioMedecine de Strasbourg CRBS, University of Strasbourg, Strasbourg, France

Amyotrophic lateral sclerosis is a progressive motor neuron disease inexorably leading to an early death. Sleep disturbances have been described and appear at a later stage of the disease [1]. However, sleep changes were rarely studied in the context of ALS. We used two murine models, Superoxide Dismutase 1 G86R (SOD1<sup>G86R</sup>) and Fused in Sarcoma (FUS) to underpin the molecular and cellular mechanism involved. FUS mice electroencephalograms were recorded longitudinally over a 120-days period. The recordings show a decrease in rapid eye movement (REM) episodes, lower non-rapid eye movement (NREM) episodes and higher wakefulness compared to wild-type (WT) mice.

Concomitantly, immunostaining of melanin-concentrating hormone (MCH) and orexin (Ox) neurons in SOD1<sup>G86R</sup> mice, as well as MCH labelling in FUS mice, have revealed a 50% decreased in the numbers of neurons in the lateral hypothalamus while compared to WT. MCH and Ox neurons have an antagonist correlation with one another regarding sleep cycles, with Ox neurons actively firing during active wake and MCH being more active during sleep periods. Though, MCH and Ox neurons are also regulating other pathways such as food intake, arousal, and circadian rhythms. The loss of those neurons is correlated with increased wakefulness and decreased REM and NREM episodes.

In order to improve sleep, we used an existing pharmacological tool, called Suvorexant®, a dual orexin receptor antagonist. We performed oral gavage of this drug before symptoms onset (75 days of age) on WT and SOD1<sup>G86R</sup> mice. We observed a decrease in the percentage of wake episodes, an increase in the percentage of REM episodes but no significant changes in the percentage of NREM episodes when comparing SOD1<sup>G86R</sup> mice with Suvorexant® and vehicle.

#### References:

[1] Gabery, S. *et al.* Loss of the metabolism and sleep regulating neuronal populations expressing orexin and oxytocin in the hypothalamus in amyotrophic lateral sclerosis, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2021

[2] Etori, K. *et al.* Effects of a newly developed potent orexin-2 receptor-selective antagonist, compound 1 m, on sleep/wakefulness states in mice, *Frontiers in Neuroscience*, 2014; vol. 8: page 8

**Keywords:** Hypothalamus, Sleep, Amyotrophic Lateral Sclerosis

The authors declare no conflict of interest. The authors would like to thank the region Alsace for funding this project, as well as the platform of functional experimentation and the PIC-STRA platform.

Guillot SJ [simon.guillot@inserm.fr](mailto:simon.guillot@inserm.fr)

Bolborea M [matei.bolborea@inserm.fr](mailto:matei.bolborea@inserm.fr)

Dupuis L [ldupuis@unistra.fr](mailto:ldupuis@unistra.fr)

## **P 21 : PROPAGATION AND TOXICITY OF PATHOLOGIC DETERMINANTS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

*Coline Jost Mousseau (1), Elise Liu (1), Lea Karpf (1), Alexandre Mezghrani (2), Cédric Raoul (2), Christian Lobsiger (1), Stéphanie Millecamps (1), Séverine Boillée (1), Delphine Bohl (1)*

(1) Institut du Cerveau, ICM, Inserm U1127, CNRS UMR7225, Sorbonne Université, Paris, France. (2) Institut des Neurosciences de Montpellier, INM, Inserm UMR1298, Hôpital Saint Eloi, Montpellier

ALS is a fatal neurodegenerative disease that progressively paralyzes patients due to the degeneration of motor neurons (MNs) in the motor cortex and the spinal cord. A major hallmark is protein inclusions in MNs and in glial cells including oligodendrocytes (OLs). As disease onset is often anatomically localized, a hypothesis is that MN degeneration and glial activation could spread to contiguous regions. Recently, a novel cellular mechanism was reported, allowing the secretion of misfolded proteins through the MAPS (misfolding-associated proteins secretion) pathway USP19 deubiquitinase-dependent (Ubiquitin Specific Peptidase 19). In this context, we ask whether the MAPS pathway could be involved in the spreading of ALS pathologic determinants (SOD1, TDP-43, FUS, dipeptide repeat (DPR)), especially between MNs and OLs.

To answer this question, we generate MNs and OLs from iPSC of patients with mutations in the 4 main ALS causing genes (SOD1, TARDBP, FUS, C9orf72). To generate OLs, we first set up a protocol allowing the production of OL precursors (OPCs) within 21 days. We are now developing a MACS-sorting protocol to purify OPCs and differentiate them into OLs with or without MNs. We also show that USP19 mRNA and protein are expressed in MNs and OPCs. To assess the propagation of pathological determinants between cells, we are currently setting up tools to detect by immunofluorescence SOD1, FUS, TDP43 and DPR accumulations in iPS-derived ALS MNs and OPCs, and to analyze their USP19-dependent secretion. Objectives are to assess whether the different pathological determinants can propagate through cell-cell contacts and if the propagation from cell to cell is toxic for the recipient cell. Blocking the propagation of the ALS pathological determinants could be a new therapeutic option to slow down disease progression in patients.

**Key words:** iPSC, USP19-dependant propagation, oligodendrocytes

**Acknowledgements:** This work is funded by ANR (ANR-19-CE17-0016).

**Contacts :** [coline.jostmousseau@icm-institute.org](mailto:coline.jostmousseau@icm-institute.org) , [delphine.bohl@icm-institute.org](mailto:delphine.bohl@icm-institute.org)

## **P 22 : NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF CONDITIONED MEDIUM DERIVED FROM HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS ON MOTONEURONS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS MICE MODEL SOD1<sup>G93A</sup>**

*Younes R. (1, 2, 3), Jdaa N (1), Scamps F (1), Raoul C (1), Cuisinier F (2), Hilaire C (1)*

(1) INSERM U1298, Institut des Neurosciences de Montpellier-Déficits sensoriels et moteur, Université de Montpellier, France (2) Laboratoire de Bioingénierie et Nanosciences, Université de Montpellier, France (3) neuroscience Research Center, Faculty of Medical Sciences, Lebanese University, Beirut, Lebanon

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable neurodegenerative disease that leads to the death of patients after 3 to 5 years of diagnosis. One of the ALS mice model is the SOD1<sup>G93A</sup>, overexpressing the human mutant toxic SOD1. Human dental pulp stem cells (DPSCs) secretome could be an affordable perspective for the treatment of ALS due to their content of neurotrophic factors and their lack of immunogenicity. In my project, human DPSCs - conditioned medium (DPSCs-CM) was tested on SOD1<sup>G93A</sup> and wild type (WT) spinal cord motoneurons extracted from the E12.5 mice embryos. The *in vitro* experiments show improvement on the survival and the axonal growth of both SOD1<sup>G93A</sup> and WT mice treated by the human DPSCs secretome. These effects are specifically obtained with DPSCs compared to conditioned media from other mesenchymal stem cells (adipose stem cells and bone marrow stem cells) and fibroblast cells that have the same origin ectodermal as DPSCs.

We selected two candidate proteins from this MC-CSPD to explore their neuroprotective effect on motoneurons of SOD1<sup>G93A</sup> mice. The GDF-15 and HB-EGF will be tested on the survival and the axonal growth in order to see if they can rescue the SOD1<sup>G93A</sup> motoneurons after glutamate excitotoxicity and oxidative stress. These experiments will be followed by *in vivo* assay using an ALS zebrafish model in order to check the motor behavioral and histological changes.

The main objectives of my PhD project are to improve the understanding of the effect of DPSCs-CM toward the motoneuron survival, axonal growth and to identify the active proteins that are involved. Finally the ambition of this project is to propose a transfer of this technology toward ALS patient's treatment

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis; dental pulp stem cells-conditioned medium; motoneurons

### **P 23 : IS COMBINED PATELAR TENDON REFLEX- MOTOR EVOKED POTENTIALS TO LOWER LIMB (T-MEP-LL) COULD BE A USEFUL TOOL TO SHOW CORTICOSPINAL IMPAIRMENT AND DIAGNOSE ALS? A MONOCENTRIC COHORT**

*Annaick Desmaison<sup>1</sup>, André Truffert<sup>2</sup>, Nathalie GUY<sup>1</sup>*

1-CRCSLAet maladie du motoneurone – CHU de clermont ferrand-France 2-HUG- CeSLA-departement de neurologie-Genève

#### **Objective**

To evaluate whether Combined Patelar Tendon Reflex- Motor Evoked Potentials to lower limb (T-MEP-LL) is relevant to assess corticospinal function in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in a monocenter retrospective study.

#### **Methods**

T-MEP-LL was performed on 100 SLA patients and 35 patients with other neurological pathologies, during routine diagnosis explorations. Clinical evaluation of the patients included neurological examination, the revised ALS Functional Rating Scale (ALSFRS-R) and Medical Research Council (MRC) score. Awaji and Gold Coast criteria was determined for each patient.

#### **Results**

T-MEP-LL shows a sensitivity of 66% and a specificity of 68.6% to detect motor neuron disease (MND). T-MEP-LL was abnormal in 66% of the MND patients and 31.43% of patients with other neurological pathologies ( $p < 0,001$ ). Among MND patients without sign of upper motor neuron, T-MEP-LL show a greater specificity. T-MEP-LL can help to improve diagnosis criteria's. T-MEP-LL results were not correlated with ALSFRS-R and MRC score but it could be a prognosis factor knowing that T-MEP-LL alteration was associated with a shorter survival from time of examination to death (2,03 [1,26-4,80] vs 3,16 [2,29-4,59],  $p = 0.04$ ).

#### **Conclusions**

T-MEP-LL is an easy and painless technique applicable in daily clinical practice, and it has a good sensitivity and specificity to detect motor neurone. T-MEP-LL might be an interesting prognosis factor that need to be confirmed by other studies.

## P 24 : LE RÔLE DES OLIGODENDROCYTES DANS UN MODELE MURIN DE SLA/DFT PORTANT LA MUTATION FUS $\Delta$ NLS

Jamet M. (1) Dupuis L. (1) Gonzalez De Aguilar J.L. (1)

(1) INSERM UMR-S 1118, Central and Peripheral Mechanisms of Neurodegeneration, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, University of Strasbourg, Strasbourg (France)

Dans le système nerveux central, les oligodendrocytes ont un rôle essentiel de soutien des neurones via deux mécanismes principaux : ils fabriquent une gaine de myéline autour des axones, permettant d'accélérer la propagation des potentiels d'action, et ils assurent le soutien métabolique de l'axone grâce aux transporteurs monocarboxylates. Certaines altérations des oligodendrocytes ont été observés dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA), à la fois chez les patients et dans le modèle murin SOD1, ce qui pose la question de leur implication dans la maladie.

Un dixième des cas familiaux de SLA, ainsi qu'un nombre réduit des cas de SLA/DFT, présentent une mutation dans le gène *Fused in Sarcoma* (FUS). Cette mutation affecte le plus souvent le domaine de localisation nucléaire de la protéine, et entraîne sa délocalisation dans le cytoplasme de la cellule. Les patients touchés par cette mutation développent une forme particulièrement précoce et fulgurante de la maladie. Notre laboratoire a développé un modèle murin dans lequel le domaine de localisation nucléaire de FUS est supprimé (FUS $\Delta$ NLS) (1). Mon travail de thèse porte sur la caractérisation d'altérations oligodendrocytaires dans ce modèle de SLA/DFT. Dans un premier temps nous nous intéressons à l'identification de modifications de la myéline dans le cerveau et la moelle épinière des animaux FUS $\Delta$ NLS, ainsi qu'à la capacité des oligodendrocytes à remyéliniser suite à un stress démyélinisant. Il a été montré *in vitro* que des oligodendrocytes altérés peuvent entraîner la mort des motoneurones (2). Afin de déterminer si la présence ou l'absence de la mutation FUS dans les oligodendrocytes contribue au processus dégénératif caractéristique de la SLA, nous sommes en train de produire deux modèles de souris dans lesquels la mutation FUS sera spécifiquement exprimée dans les oligodendrocytes ou exprimée par toutes les cellules sauf les oligodendrocytes. Nous réaliserons une étude longitudinale sur ces animaux afin de caractériser leurs anomalies motrices et comportementales.

**Mots clés :** ALS ; FUS ; Oligodendrocyte

### Références :

(1) Scekic-Zahirovic et al., « Motor Neuron Intrinsic and Extrinsic Mechanisms Contribute to the Pathogenesis of FUS-Associated Amyotrophic Lateral Sclerosis », *Acta Neuropathol*, 2017, Volume 133, Numéro 6, pages 887-906

(2) Ferraiuolo et al., « Oligodendrocytes Contribute to Motor Neuron Death in ALS via SOD1-Dependent Mechanism », *PNAS*, 2016, Volume 113, Numéro 42, pages 6496-6505

Ce travail est financé par l'ANR (ANR-19-CE17-0016).

[jametm@etu.unistra.fr](mailto:jametm@etu.unistra.fr)

[ldupuis@unistra.fr](mailto:ldupuis@unistra.fr)

[gonzalez@unistra.fr](mailto:gonzalez@unistra.fr)

**P 25: JNK INHIBITION PATHWAY PROMOTES SPINAL MOTOR NEURONS SURVIVAL AND MUSCLE IMPROVEMENT ON A HUMAN *IN VITRO* SMA CO-CULTURE SYSTEM**

*Januel C (1), Tahraoui J (1), Côme J (2), Lesueur L (2), Morizur L (2), Leteur C (2), Polentes J (2), Tournois J (2), Roussange F (2), Mouly V (3), Peschanski M (2) and Martinat C (1)\**

(1) INSERM/UEPS UMR 861, I-STEM (Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases), AFM, Evry, France. (2) CECS, I-STEM, AFM, Evry, France. (3) Sorbonne Université, INSERM, Association Institut de Myologie, Centre de recherche en myologie, UMR-S 974, Paris, France.

Spinal muscular atrophy is the most common genetic form of motoneuron diseases in childhood. SMA etiology relates to an insufficient amount of SMN (survival motor neuron) protein, which results from mutations in the SMN1 gene. In the pathogenesis of SMA, abnormalities at the neuromuscular junction (NMJ) have been reported, these pathological changes of the NMJ seem to even precede the motor neuronal loss. However, these motor unit defects have been mainly described in animal models. Hence, it is critical to analyse the NMJ in a human SMA model, and to evaluate the efficacy of new therapeutic approaches. In this study, we used the ability to generate a large amount of hiPSC-derived spinal motor neurons that offers a unique opportunity to access normal and pathological populations of interest in sufficient quantities for systematic analysis. We demonstrated that the reduced expression of SMN lead to a decreased survival of hiPSC-derived MNs rather than a defect in their generation. We identified that this phenotype can be rescued by kenpaullone, likely through a JNK dependent mechanism. We also developed a human *in vitro* co-culture strategy in order to analyse the interaction between spinal MNs and its skeletal muscle target in healthy, SMA or hybrid conditions, and found morphological and functional synaptic defects in SMA. JNK inhibition pathway ameliorates spinal MNs survival and leads to muscle improvement, and thus seem to be a potential target for SMA. Thus, our current human *in vitro* SMA models are useful for dissecting the pathophysiological mechanisms underlying the development of SMA, and for evaluating related therapeutic strategies.

**Keywords:** Spinal Muscular Atrophy, Human induced pluripotent stem cells, Motoneurons.

\*Corresponding author: Januel C, [cjanuel@istem.fr](mailto:cjanuel@istem.fr); Martinat C, [cmartinat@istem.fr](mailto:cmartinat@istem.fr)