

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG**

**Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur,
Strasbourg I**

Discipline: Sciences de la Vie et de la Santé

par

Andoni ECHANIZ-LAGUNA

**Etude de la fonction mitochondriale et de l'expression du
gène Nogo dans le muscle squelettique dans la sclérose
latérale amyotrophique sporadique chez l'homme**

Soutenue publiquement le 18 Mai 2006 devant le jury constitué par:

Directeur de Thèse:	Jean-Philippe LOEFFLER, Directeur de Recherche, Strasbourg
Rapporteur Interne:	Catherine FLORENTZ, Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg
Rapporteur Externe:	Jean POUGET, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Marseille
Rapporteur Externe:	Xavier LEVERVE, Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble
Examineur:	Vincent MEININGER, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Paris
Membre Invité:	Christine TRANCHANT, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Strasbourg

Remerciements

Cette thèse est l'aboutissement d'un travail de recherche que j'ai débuté il y a maintenant plus de 6 ans, en 1999, alors que je venais de soutenir ma thèse de Médecine. Bien que ce soit mon nom qui figure en première page, ce travail est une oeuvre collective et je tiens à remercier tous ceux qui y ont participé. Remerciements, donc:

A tous les membres du Service de Physiologie Clinique et des Explorations Fonctionnelles du Département de Physiologie de la Faculté de Médecine de Strasbourg, qui ont quasiment tous participé, à un moment ou à un autre, au projet "SLA/mitochondrie": **Joffrey Zoll, Florence Ribera, Jean Lonsdorfer, Eliane Lampert, Elodie Ponsot, Benoît N'Guessan, Ruddy Richard et Stéphane Doutreleau.**

A mes maîtres et à mes collègues du Département de Neurologie du CHU de Strasbourg, qui m'ont permis de surmonter les obstacles administratifs, qui m'ont adressé bon nombre des patients inclus dans ces études ou qui m'ont soutenu lorsque mon enthousiasme était au plus bas: **Jean-Marie Warter (†), Christine Tranchant, Sophie Carré, Marie Fleury et François Sellal.**

Aux membres de l'équipe INSERM U-692, qui m'ont accueilli et qui m'ont permis de participer au projet "SLA/Nogo": **Jean-Philippe Loeffler, Luc Dupuis, Jose-Luis Gonzalez de Aguilar, Yves Larmet, Frédérique René et Natasa Jokic.**

A tous mes collègues doctorants de l'équipe INSERM U-692, pour leur bonne humeur au quotidien et pour leurs précieux conseils techniques: **Anissa Fergani, Irina Pantaleeva, Bastien Fricker, Benoît Halter, Samir Benosman, Caroline Rouaux et Carole Honigmann.**

Aux membres du jury, qui ont accepté de juger ce travail: **le Professeur Catherine Lorentz, le Professeur Christine Tranchant, le Professeur Vincent Meininger, le Professeur Jean Pouget et le Professeur Xavier Leverve.**

Aux organismes qui m'ont soutenu financièrement: **la Faculté de Médecine de Strasbourg (Bourse Jeune Chercheur), l'Association pour la Recherche contre la Sclérose Latérale amyotrophique (ARS) et l'Académie Nationale de Médecine (Bourse Collery).**

A tous ceux qui ne m'ont pas aidé alors qu'ils auraient pu le faire; au final, ils m'ont fait avancer encore plus vite.

A mes parents, à Anne, à Marie et à Camille: sans vous, rien n'eût été possible.

Les travaux présentés dans cette thèse sont issus des 2 projets de recherche suivants:

1) "Etude de la respiration mitochondriale dans le muscle squelettique de patients avec une sclérose latérale amyotrophique".

- Promoteur: Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) (PRI n° 2548; 2000).
- Investigateur principal: Andoni Echaniz-Laguna, Praticien Hospitalier, Département de Neurologie, HUS.
- Recherche validée par le CCPPRB de Strasbourg le 11/12/2001.
- Recherche validée par la Direction Générale de la Santé (DGS) en 2002 (n° DGS 2002/0120).

2) "Etude de l'expression du gène Nogo et des réticulons dans le muscle squelettique de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique".

- Promoteur: HUS (PRI n° 3142; 2004).
- Investigateur principal: Andoni Echaniz-Laguna, Praticien Hospitalier, Département de Neurologie, HUS.
- Recherche validée par le CCPPRB de Strasbourg le 09/03/2004.
- Recherche validée par la DGS en 2004 (n° DGS 2004/0182).

"Rien n'est simple et tout se complique"
Anonyme

SOMMAIRE

La sclérose latérale amyotrophique (SLA)	07
Les mitochondries	17
SLA et mitochondries	27
SLA sporadique, muscle et mitochondries	33
SLA sporadique, muscle et mitochondries: publications	40
Publication n°1	40
Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients.	
A Echaniz-Laguna, J Zoll, F Ribera, C Tranchant, JM Warter, J Lonsdorfer, E Lampert.	
Ann Neurol 2002 ; 52:623-627.	
Publication n°2	41
Mitochondrial function in skeletal muscle of ALS patients is progressively altered as the disease develops: a temporal study in man.	
A Echaniz-Laguna, J Zoll, E Ponsot, B N'Guessan, C Tranchant, JP Loeffler, E Lampert.	
Exp Neurol 2006 ; 198:25-30.	
Annexe: commentaire sur la publication n°2	42
Is ALS a systemic disorder? Evidence from muscle mitochondria.	42
Stanley H Appel.	
Exp Neurol 2006; 198:1-3.	
SLA et réticulons	43
SLA et réticulons: publication	48
Publication n°3	48
Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity.	
N Jokic, JL Gonzalez de Aguilar, PF Pradat, L Dupuis, A Echaniz-Laguna, A Muller, O Dubourg, D Seilhan, JJ Hauw, JP Loeffler, V Meininger.	
Ann Neurol 2005 ; 57 :553-556.	
Conclusions et perspectives	49
Références bibliographiques	56

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ADNn	ADN nucléaire
ARN	acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ALSFRS	<i>amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale</i>
DFT	démence fronto-temporale
ATP	adénosine 5'-triphosphate
EMG	électromyogramme, électromyographie, électromyographique
LCR	liquide céphalo-rachidien
SLA	sclérose latérale amyotrophique
SLA-DFT	SLA associée à une DFT
SLAF	SLA familiale
SLAS	SLA sporadique
SOD1	superoxyde dismutase cytosolique à cuivre et zinc
SOD1-SLA	SLA liée à une mutation du gène de la SOD1
UCP	<i>Uncoupling proteins</i>

La sclérose latérale amyotrophique (SLA)

1. La sclérose latérale amyotrophique (SLA): données générales

Décrite pour la première fois en 1869 par Charcot, la SLA est une affection mortelle caractérisée par une dégénérescence des motoneurones spinaux, une dégénérescence des neurones moteurs corticaux et une atrophie musculaire (Adams, Rowland) (**Figure 1**). Cette maladie est à l'origine d'une faiblesse musculaire et d'une spasticité qui conduisent progressivement à la paralysie et au décès du patient en 2 à 5 ans, la plupart du temps en raison d'une insuffisance respiratoire (Adams, Rowland). Le diagnostic de SLA est posé sur des critères cliniques et il n'existe pas de marqueur diagnostique spécifique de la maladie (World Federation of Neurology). L'incidence annuelle de la SLA est estimée à environ 0.4 et 2.25 cas pour 100.000 personnes (Armon). Les hommes sont plus touchés que les femmes (ratio M/F : 1.5/1) et les symptômes débutent le plus souvent après 50 ans (Adams, Rowland). La SLA semble affecter plus souvent les personnes ayant une activité physique importante, comme par exemple les sportifs et les agriculteurs (Rossatti, Giagheddu, Granieri, Chio). Par ailleurs, le tabagisme chronique et la surcharge pondérale seraient des facteurs de risque d'apparition d'une SLA (Nelson 2000, Nelson 2000). Dans plus de 90% des cas, la SLA est une affection sporadique (SLAS) dont l'étiologie est inconnue.

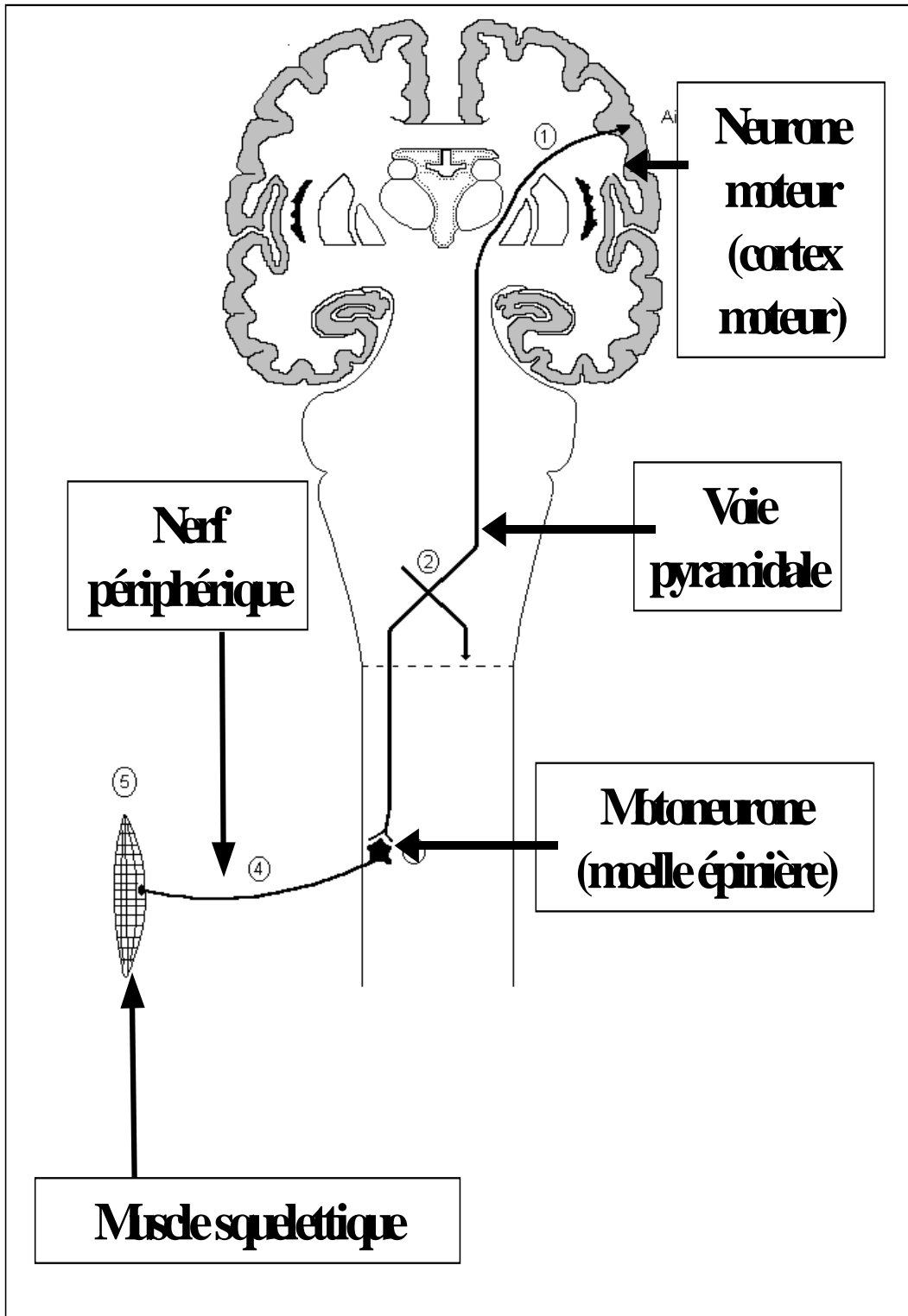
Environ 5 à 10% des SLA sont familiales (SLAF), avec un mode de transmission autosomique dominant dans la plupart des cas (Wong). Environ 15 à 20% des patients avec une SLAF autosomique dominante sont porteurs de mutations ponctuelles sur le gène codant pour l'enzyme antioxydante Cu,Zn-superoxyde dismutase (SOD1) (SOD1-SLA) (Deng, Rosen). Bien que la SLAS et la SLAF aient une présentation clinique le plus souvent identique, il existe néanmoins des différences entre ces 2 groupes de malades (Hand). Ainsi, l'âge moyen de début des symptômes est de 58 ans dans la SLAS alors qu'il est de 48 ans dans la SLAF. Par ailleurs, l'évolution de la SLAF est généralement plus rapide que celle de la SLAS (Hand).

2. LA SLA: diagnostic clinique, échelles fonctionnelles et diagnostic différentiel

La SLA est habituellement considérée comme une affection neurodégénérative caractérisée par une dégénérescence progressive des neurones moteurs. Une atteinte simultanée des neurones moteurs du cortex cérébral moteur ("centraux") et des motoneurones

FIGURE 1

Les tissus affectés dans la SLA.



bulbaires et spinaux ("périphériques") est nécessaire pour poser le diagnostic. Les critères diagnostics de la SLA ont été définis en 1994 par la Fédération Mondiale de Neurologie (critères dits de El Escorial) (World Federation of Neurology). Ces critères prennent en compte la présence de signes cliniques d'atteinte des neurones moteurs corticaux, de signes cliniques et/ou électrophysiologiques d'atteinte des motoneurons "périphériques", et une extension progressive de l'ensemble de ces signes dans les territoires spinaux et bulbaires. Le degré d'extension de l'atteinte motrice permet de classer les patients comme souffrant d'une SLA certaine, d'une SLA probable ou d'une SLA possible (**Tableau 1**).

L'atteinte des neurones moteurs corticaux se traduit sur le plan clinique par une hyper-réflexie ostéo-tendineuse, une spasticité et une inversion du réflexe cutané plantaire (signe de Babinski). L'atteinte des motoneurons spinaux et bulbaires se traduit sur le plan clinique par la présence d'une amyotrophie, d'un déficit moteur, de crampes et de fasciculations. Cette atteinte du motoneuron "périphérique" se traduit sur le plan électromyographique (EMG) par la présence dans le muscle au repos de potentiels musculaires anormaux à type de fibrillations et de fasciculations, qui peuvent être visibles avant même que le muscle exploré ne devienne cliniquement symptomatique.

Plusieurs échelles fonctionnelles reflétant l'état général du patient avec une SLA ont été développées au cours de ces dernières années. La plus fréquemment utilisée actuellement est l'échelle ALS-FRS (*amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale*) (Cedarbaum) (**Tableau 2**). Il s'agit d'une échelle comprenant 12 items, côtés chacun de 0 (le patient est incapable de réaliser une tâche) à 4 (le patient réalise normalement la tâche). Cette échelle évalue la capacité du patient à effectuer les activités de la vie quotidienne et tient compte du statut des muscles des membres, des muscles bulbaires et des muscles respiratoires.

Le diagnostic de SLA peut être difficile aux stades précoces de la maladie, lorsque le patient se présente avec une atteinte isolée du motoneuron "périphérique". En effet, de nombreuses affections s'accompagnant d'une atteinte du motoneuron, d'une atteinte des nerfs moteurs périphériques ou d'une atteinte musculaire peuvent mimer une SLA. Parmi ces affections, on retiendra en particulier l'amyotrophie bulbaire et spinale liée au chromosome X (aussi appelée maladie de Kennedy, liée à une mutation du gène du récepteur aux androgènes) (La Spada, Echaniz-Laguna 2005, Echaniz-Laguna 2005), l'amyotrophie spinale (liée à une mutation du gène SMN1) (Lefebvre, Echaniz-Laguna 1999), la neuropathie motrice multifocale avec blocs de conduction et la myosite à inclusions. Néanmoins, aucune de ces affections ne s'accompagne de l'atteinte du neurone moteur cortical qui caractérise la SLA et

TABLEAU 1: les critères diagnostiques de la SLA.

Critères diagnostiques de la SLA (d'après les critères révisés El Escorial)
SLA certaine Signes d'atteinte du NMC et du MNP dans la région bulbaire et dans 2 régions spinales
SLA probable Signes d'atteinte du NMC et du NMP dans au moins 2 territoires
SLA probable sur critères paracliniques Signes d'atteinte du NMC dans au moins 1 territoire et atteinte du MNP visible à l'EMG dans au moins 2 territoires
SLA possible Signes d'atteinte du NMC et du MNP dans un seul territoire, ou signes d'atteinte du NMC dans au moins 2 territoires, ou signes d'atteinte du MNP dans 1 territoire et signes d'atteinte du NMC dans les territoires sous-jacents

NMC: neurone moteur central

MNP: motoneurone périphérique

EMG: électromyogramme

TABLEAU 2: l'échelle fonctionnelle ALSFRS.

1- Langage	4 Normal 3 Discrètement perturbé 2 Compréhensible si répété 1 Associé à une communication non verbale 0 Perte du langage
2- Salivation	4 Normale 3 Hypersalivation modérée 2 Hypersalivation marquée 1 Hypersalivation marquée, écoulement mentonnier présent 0 Ecoulement permanent
3- Déglutition	4 Normale 3 Fausses routes occasionnelles 2 Fausses-routes fréquentes 1 Suppléments alimentaires nécessaires 0 Nutrition parentérale ou gastrostomie
4- Ecriture (main dominante)	4 Normale 3 Altérée, mais lisible 2 Tous les mots ne sont pas lisibles 1 Tient le stylo mais ne peut écrire 0 Ne peut tenir le stylo
5a- Couper la nourriture et tenir les couverts (patient sans gastrostomie)	4 Normal 3 Lent, mais peut le faire seul 2 Aide occasionnelle nécessaire 1 Nourriture coupée par un tiers 0 Gastrostomie
5b- Couper la nourriture et tenir les couverts (patient avec gastrostomie)	4 Normal 3 Lent, mais fait toutes les manipulations seul 2 Besoin d'aide pour refermer un tube ou moduler un débit 1 A besoin d'aide de temps en temps 0 incapable de faire une quelconque procédure
6- Habillage, hygiène	4 Normal 3 Lent mais indépendant 2 Aide intermittente 1 Aide permanente 0 Dépendance totale
7- Se tourner dans le lit/positionner les draps	4 Normal 3 Lent, mais peut le faire seul 2 Ajuste les draps avec difficulté 1 Initie le mouvement, sans aller plus loin 0 Totalement dépendant
8- Marche	4 Normale 3 Légères difficultés 2 Nécessite une aide 1 Peut initier le mouvement, sans plus 0 Jambes immobiles
9- Monter les escaliers	4 Normal 3 Lent, mais peut le faire seul 2 Lenteur, fatigue 1 A besoin d'une aide 0 Ne peut monter les escaliers
10- Dyspnée	4 Absente 3 A la marche 2 Lors d'une activité: repas, bain, habillage 1 Au repos 0 Ventilation mécanique
11- Orthopnée	4 Absente 3 Discrète 2 A besoin de 2 oreillers pour dormir 1 A besoin de plus de 2 oreillers pour dormir 0 Ne peut dormir qu'assis
12- Insuffisance respiratoire	4 Absente 3 Aide ventilatoire intermittente 2 Aide ventilatoire continue la nuit 1 Aide ventilatoire continue jour et nuit 0 Ventilation mécanique
SCORE TOTAL: / 48	

qui se manifeste habituellement dans les mois qui suivent l'apparition des signes d'atteinte du motoneurone "périphérique" (Rowland).

3. La SLA: apport de la génétique

3.1. Génétique de la SLAS

Plusieurs études suggèrent que des polymorphismes de plusieurs gènes sont associés au développement d'une SLAS. Parmi ces gènes, on retrouve le gène NF-H codant pour la sous-unité lourde des neurofilaments, le gène EAAT2 codant pour un transporteur glial du glutamate, mais également les gènes SMN1 et SMN2 codant pour la protéine SMN et le gène vegf codant pour le facteur de croissance vasculaire VEGF (Figlewitz, Al-Chalabi, Lin, Veldink, Corcia, Echaniz-Laguna 2002, Lambrechts). Ces associations entre polymorphismes génétiques et SLAS restent cependant incertaines et très controversées à l'heure actuelle. Des variants alléliques des gènes DCTN1 (dynactine) et SPG4 (spastine) ont également été mis en évidence chez quelques patients avec une SLAS ou une SLAF et pourraient constituer un facteur de risque génétique de cette affection (Meyer, Munch 2004, Munch 2005). Là encore, des études complémentaires sont indiquées pour prouver l'existence d'un lien entre ces variants génétiques et la SLA.

En revanche, en ce qui concerne les SLAF, la génétique a permis de réaliser des progrès significatifs. Ainsi, l'étude par génétique moléculaire des SLAF a mené à la découverte de mutations dans plusieurs gènes au cours de ces 13 dernières années (**Tableau 3**). Parmi ces gènes, le plus étudié et le mieux connu est le gène codant pour la SOD1.

3.2. Le gène de la SOD1

Ce gène est situé sur le bras long du chromosome 21 et code pour l'enzyme antioxydante SOD1 (Rosen). Plus de 100 mutations responsables de SLA ont déjà été décrites dans ce gène depuis 1993 (www.alsod.org). La plupart de ces mutations sont transmises sur un mode autosomique dominant mais des formes récessives, liées à la mutation D90A de la SOD1, ont également été décrites (Andersen). Les mutations de la SOD1 conduisent à des phénotypes variables. Ainsi, la mutation A4V, la plus fréquente des mutations SOD1 dans la population des Etats-Unis, provoque une SLA d'évolution très rapide. A l'opposé, les mutations G37R, G41D et G93C correspondent à des formes d'évolution lente. Les mutations G37R, L38V et L106V sont associées à des formes de début précoce alors que les mutations G85R, H46R et I113T sont à l'origine de formes de début tardif (Hand).

TABLEAU 3: génétique de la SLA.

Maladie	Mode de Transmission	Localisation chromosomique	Gène/protéine	Age de début	Caractéristiques cliniques
SLA	Sporadique	Aucune	Largement inconnu(s). NFH? EAAT2? DCTN1? SMN1? SMN2? SPG4? VEGF?	Adulte	Plus de 90% de toutes les SLA
SLA	Dominant	21q22 (ALS1)	SOD1	Adulte	Représente environ 20% des SLAF de transmission dominante
SLA et démence fronto-temporale	Dominant	9q21	?	Adulte	Démence associée
SLA	Lié au chromosome X	Xp11-Xq12	?	Adulte	
SLA juvénile type 1	Récessif	15q15-22 (ALS5)	?	Adolescence	Evolution lente
SLA juvénile type 3	Récessif	2q33 (ALS2)	Alsine	Adolescence	Phénotype variable Evolution lente
SLA juvénile	Dominant	9q34 (ALS4)	Senataxine (SETX)	Avant l'âge de 25 ans	Evolution lente Mutations récessives responsables d'AOA2
SLA	Dominant	18q21 (ALS6)	?	Adulte	
SLA	Dominant	20q13 (ALS8)	VAPB	Adulte	Phénotype variable: SLA typique, SLA d'évolution lente, amyotrophie spinale

3.3. Les autres gènes impliqués dans la SLAF

Des mutations de l'alsine ont été mises en évidence chez des patients avec une SLAF juvénile de transmission récessive et avec une survie longue (Yang). Cette protéine possède 3 domaines de régulation des GTPases de la famille Rho et serait impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires qui restent à déterminer avec précision (Tudor). Des mutations du gène de la senataxine (SETX) ont été décrites chez des patients avec une SLAF de transmission dominante, de début précoce et d'évolution lente (Chen). Le gène SETX code pour une DNA/RNA hélicase et des mutations de ce gène ont été décrites dans des ataxies cérébelleuses avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2) de transmission récessive (Moreira). Des mutations du gène VAPB ont également été décrites chez des patients avec une SLAF de phénotype très variable d'un patient à l'autre, incluant des SLA typiques, des SLA d'évolution lente et des tableaux d'amyotrophie spinale (Nishimura). D'autres loci génétiques associés à des SLAF sont connus, dont le locus ALS6 sur le chromosome 18 et le locus ALS5 sur le chromosome 15. Enfin, un locus sur le chromosome 9 est lié à des SLAF associées à une démence fronto-temporale.

4. La SLA: hypothèses physiopathologiques

Les mécanismes qui mènent à la dégénérescence du motoneurone dans la SLA sont aujourd'hui encore inconnus. La découverte de mutations du gène de l'enzyme antioxydante SOD1 au début des années 1990 a conduit à l'élaboration d'hypothèses physiopathologiques impliquant le stress oxydatif, les agrégats toxiques et la mitochondrie. Les études histologiques, biochimiques et épidémiologiques réalisées chez l'homme ont quant à elles conduit à mettre en cause les neurofilaments, l'excitotoxicité glutamatergique, l'apoptose et des infections virales. Plus récemment, le rôle de la réponse altérée à l'hypoxie, le rôle de l'inflammation, le rôle du métabolisme et le rôle du muscle squelettique ont été soulevés sur la base de travaux réalisés sur des modèles murins et sur l'homme.

4.1. Le stress oxydatif

La découverte de mutations du gène codant pour l'enzyme SOD1 dans des cas de SLAF suggère que le stress oxydant pourrait avoir un rôle à jouer dans cette pathologie. SOD1 est une enzyme responsable de la détoxification des radicaux oxygénés. Elle catalyse la

conversion d'anions superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui est ensuite transformé en eau et en oxygène par l'intermédiaire de la catalase et de la glutathion peroxydase. Les mécanismes par lequel ces mutations provoquent une SLA restent mal connus mais il semble maintenant acquis qu'il s'agit d'un gain de fonction toxique de SOD1 (Reaume). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce gain de fonction toxique, dont la nitration anormale de protéines au niveau des résidus de tyrosine (Beckman), une activité peroxydasique anormale (Wiedau-Pazos) et un métabolisme cuprique anormal (Culotta).

4.2. Les agrégats toxiques

Des changements de conformation de la SOD1 mutée pourraient conduire à la formation d'agrégats toxiques pour le motoneurone. Ces agrégats ont été observés dans les astrocytes et dans les motoneurones de modèles murins de SOD1-SLA et contiennent non seulement de la SOD1, mais également de l'ubiquitine et des molécules chaperonnes telles que Hsp40, Hsp70 et l'alpha-béta-crystalline (Bruijn 1998, Watanabe, Shinder). L'accumulation de SOD1 mutée pourrait également altérer l'activité du protéasome, comme cela a été observé dans des modèles cellulaires et murins de SOD1-SLA (Allen, Kato).

4.3. Les neurofilaments

L'un des premiers signes histologiques de la SLA est la formation d'agrégats de neurofilaments dans les corps cellulaires et dans les axones proximaux des motoneurones (Hirano). Les données expérimentales recueillies chez des modèles murins exprimant diverses mutations de gènes de sous-unités de neurofilaments (NF-H, NF-L, périphérine) restent néanmoins actuellement encore contradictoires et difficiles à interpréter. Ainsi, des souris porteuses de mutations de la NF-L ou surexprimant la périphérine présentent une dégénérescence des motoneurones (Lee, Beaulieu). En revanche, ni la surexpression, ni la suppression des différentes isoformes de la périphérine n'a d'effet sur la perte de motoneurones chez les souris SOD1-SLA, ce qui suggère un rôle physiopathologique mineur de ces molécules dans la maladie (Larivière). Il reste par conséquent difficile de dire à l'heure actuelle si les anomalies des neurofilaments observées dans la SLA ne sont qu'une conséquence du dysfonctionnement neuronal ou bien si elles sont un facteur physiopathologique essentiel de la maladie.

4.4. La toxicité glutamatergique

Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur abondant dans le système nerveux central et susceptible d'induire, lorsqu'il est en excès, la mort des motoneurons (Hugon). Dans ce contexte, une augmentation des taux de glutamate dans le LCR de patients avec une SLA a été mise en évidence, de même qu'une altération du transporteur astroglial du glutamate EAAT2 (Rothstein 1990, Rothstein 1995). Plus récemment, il a été montré que la ceftriaxone stimulait l'expression d'EAAT2 et retardait la mort des motoneurons dans un modèle murin de SOD1-SLA (Rothstein 2005). Par ailleurs, de nombreux travaux expérimentaux réalisés sur des modèles murins de SOD1-SLA suggèrent que l'excitotoxicité glutamatergique a effectivement un rôle central à jouer dans la physiopathologie de la SLA (Kawahara, Rembach). Enfin, l'hypothèse "glutamatergique" est à la base du développement du traitement par riluzole, molécule antiglutamatergique qui permet un allongement du temps de survie des patients avec une SLA (Bensimon). Néanmoins, l'origine de cet excès de glutamate dans la SLA reste encore à déterminer avec précision.

4.5. La réponse cellulaire à l'hypoxie

Les symptômes et la neuropathologie de la SLA peuvent être reproduits chez des souris en supprimant l'élément de réponse à l'hypoxie du promoteur du gène codant pour le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Oosthuysen). Ces souris ont une expression basale de VEGF normale mais sont incapables d'augmenter sa production en réponse à l'hypoxie. L'injection d'un vecteur lentiviral exprimant VEGF dans plusieurs muscles de la souris avec la mutation G93A-SOD1 retarde le début et ralentit la progression de la maladie, même lorsque le traitement est débuté après le début de la paralysie (Azzouz). De même, l'injection intracérébroventriculaire de VEGF chez le rat G93A-SOD1 retarde l'apparition des symptômes, prolonge la durée de vie et augmente les performances motrices (Storkebaum). Chez l'homme, des polymorphismes du gène *vegf* sont associés à un risque accru de SLA et les taux de VEGF sont diminués dans le LCR dès le début de la maladie (Lambrechts, Devos). L'expression du gène *vegf* est induite par des facteurs de transcription répondant à l'hypoxie et cette expression est cruciale pour maintenir et reconstituer la perfusion vasculaire des tissus. Les motoneurons pourraient être particulièrement sensibles à l'hypoxie en raison de leur grande taille et de leurs besoins énergétiques importants. Par conséquent, une anomalie de fonctionnement du gène *vegf* et/ou des taux diminués de VEGF pourraient se révéler particulièrement néfastes pour ces cellules. Par ailleurs, le VEGF est un facteur

neurotrophique et neuroprotecteur qui peut protéger les motoneurons en culture de la mort induite par l'hypoxie ou par la privation de sérum (Oosthuysse, Van den Bosch). Certaines formes de SLA chez l'homme pourraient donc être le résultat d'une réponse altérée à l'hypoxie.

4.6. Les infections virales

L'hypothèse d'une origine virale de la SLA est évoquée depuis de nombreuses années en raison de la similitude de cette affection avec la poliomyélite antérieure aiguë et avec le syndrome post-polio (Julien). Plusieurs arguments militent en faveur d'une origine virale dans certains cas de SLA. Ainsi, certains auteurs ont retrouvé des séquences d'entérovirus dans les motoneurons de patients avec une SLA (Berger). Par ailleurs, des cas de SLA régressive sous traitement antirétroviral ont été décrits chez des patients infectés par le VIH (Moulinier, McGowan). Cependant, cette hypothèse « virale » semble être loin de pouvoir expliquer la majorité des cas de SLA.

4.7. L'inflammation

L'implication de molécules pro-inflammatoires dans la physiopathologie d'affections neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson a conduit à rechercher des arguments en faveur d'une inflammation locale ou systémique dans la SLA. Il s'est avéré que cette inflammation existe effectivement dans le système nerveux central dans la SLA. Ainsi, une augmentation des taux de PGE₂, enzyme proinflammatoire, a été décrite dans le LCR de patients atteints de la maladie (Almer 2002). Par ailleurs, les niveaux d'expression de la COX₂, une enzyme contrôlant la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, sont élevés dans la moelle épinière des souris SOD1-SLA et dans la moelle épinière des patients (Almer 2001, Yasojima). Enfin, des lésions inflammatoires sévères ont été mises en évidence au niveau de la moelle épinière chez certains patients avec des formes atypiques de SLA associées à une polyneuropathie démyélinisante inflammatoire sévère (Echaniz-Laguna 2006). Néanmoins, comme dans les autres affections neurodégénératives, il est difficile de dire si cette inflammation de la moelle épinière dans la SLA est un élément physiopathologique central de la maladie ou bien s'il ne s'agit que d'une réaction aspécifique consécutive à la perte massive de cellules nerveuses (MacGeer).

4.8. L'hypermétabolisme

Il est connu depuis plusieurs années que certains patients avec une SLA présentent un hypermétabolisme marqué (Desport). Par ailleurs, il a été remarqué que l'expression de la protéine découplante UCP3 était fortement augmentée dans les muscles de souris SOD1-SLA et dans le muscle des patients avec une SLA (Dupuis 2003). Enfin, une diète enrichie en lipides hautement énergétiques augmente la durée de vie des souris SOD1-SLA de plus de 20% (Dupuis 2004). Cet hypermétabolisme paraît être essentiellement d'origine musculaire et son rôle physiopathologique dans la SLA reste encore aujourd'hui à élucider.

4.9. Le rôle du muscle

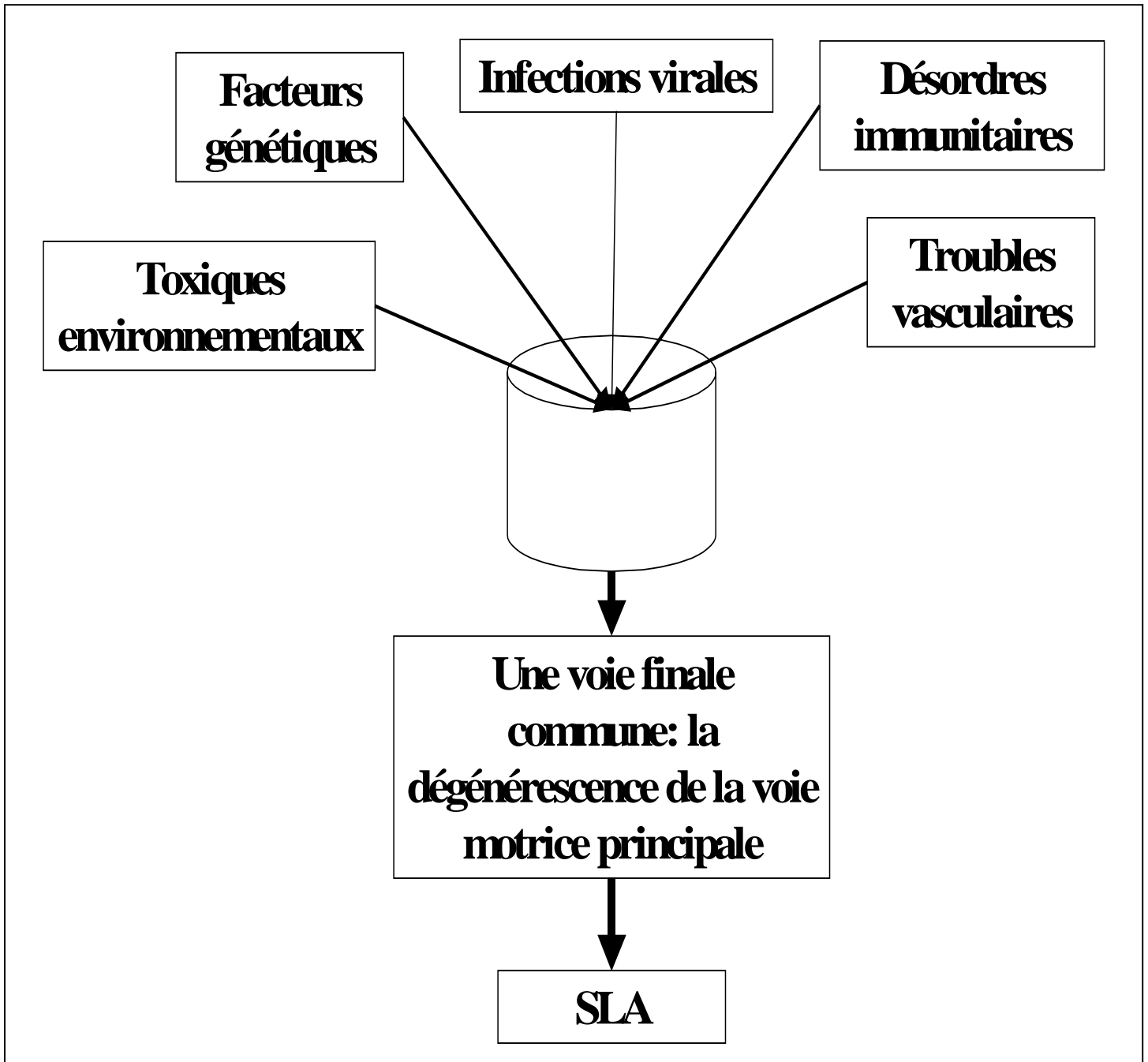
L'origine cellulaire de la SLA est à l'origine d'un débat intense entre ceux qui estiment qu'il s'agit d'une affection essentiellement neurodégénérative affectant primitivement le motoneurone au niveau du corps cellulaire et/ou de son axone et ceux qui pensent que le muscle a un rôle important à jouer dans le déclenchement de la maladie. Dans le premier cas de figure, la dégénérescence musculaire résulterait de la dégénérescence du motoneurone alors que dans le deuxième cas de figure le muscle pourrait être, du moins partiellement, responsable de la dégénérescence du motoneurone. Les modèles murins SOD1-SLA ont contribué à ranimer cette controverse dans la mesure où il semble maintenant clair que ces souris développent une affection systémique et que la SOD1 mutée a un effet délétère non seulement au niveau des motoneurones, mais également au niveau des astrocytes et au niveau du muscle squelettique (Bruijn 1997, Leclerc). Dans ce contexte, il convient de rappeler que le terme "SLA" recouvre très vraisemblablement une population hétérogène de patients souffrant d'affections aux mécanismes physiopathologiques différents mais aboutissant toutes à une voie finale commune: la mort du motoneurone et la dégénérescence de la voie motrice principale (**Figure 2**). Des facteurs immunologiques, vasculaires, infectieux, génétiques, toxiques et métaboliques sont susceptibles d'intervenir et de déclencher la maladie et il est donc concevable que le muscle contribue à la physiopathologie de la maladie chez certains patients.

4.10. La mitochondrie

Le rôle de la mitochondrie dans la physiopathologie de la SLA est l'objet d'un chapitre ultérieur (SLA et mitochondries, page 27).

FIGURE 2

Mécanismes physiopathologiques proposés dans la SLA.



5. La SLA: traitement

La prise en charge de la SLA est encore actuellement essentiellement symptomatique et repose en particulier sur la kinésithérapie, l'aide ventilatoire et l'aide nutritionnelle. Sur le plan pharmacologique, seule une molécule antiglutamatergique, le riluzole, a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le cadre du traitement de la SLA sur la base de 2 études cliniques indépendantes dans lesquelles il a permis un allongement du temps de survie des patients (Bensimon, Lacomblez). Le riluzole ne permet néanmoins pas de ralentir le déclin fonctionnel des patients (Rivière) et son effet thérapeutique, mal connu, ne semble pas être uniquement lié à son action antiglutamatergique (Miller).

Plusieurs autres traitements pharmacologiques ont été tentés, sans succès, chez l'homme: la gabapentine, la vitamine E, la N-acétyl-cystéine, la créatine, le BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) et l'IGF (*insulin growth factor*) en sont quelques-uns. Néanmoins, malgré ces échecs retentissants, plusieurs pistes thérapeutiques non-pharmacologiques se sont ouvertes ces dernières années et semblent actuellement prometteuses. Parmi ces pistes thérapeutiques, on retiendra d'une part l'utilisation de vecteurs viraux pour délivrer des facteurs neurotrophiques directement dans le muscle ou dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients (Kaspar), et d'autre part l'utilisation de cellules souches injectées dans le LCR des malades et destinées à remplacer les neurones perdus (Mazzini).

La SLA: synthèse

Au total, la SLA est une affection mortelle dont la caractéristique essentielle est la dégénérescence des motoneurones et pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif. Il s'agit d'une affection le plus souvent sporadique mais il existe de rares formes familiales, dont celles liées à des mutations du gène codant pour l'enzyme antioxydante SOD1. Le terme "SLA" recouvre très vraisemblablement une population hétérogène de patients souffrant d'affections aux mécanismes physiopathologiques différents mais aboutissant toutes à une voie finale commune: la mort du motoneurone. Des facteurs immunologiques, vasculaires, infectieux, génétiques, toxiques et métaboliques sont susceptibles d'intervenir et de déclencher la maladie. Dans ce contexte, un important travail clinique de démembrement de l'entité "SLA" reste encore à réaliser avant de parvenir à élaborer des traitements adaptés à chaque patient.

Les mitochondries

Une des différences les plus significatives entre les eucaryotes et les procaryotes est la possession de mitochondries. Ces organites ont été décrits pour la première fois en 1850 par un auteur allemand, La Valette Saint-Georges, et chaque cellule humaine contient en moyenne 1500 mitochondries. Les mitochondries sont les organites des cellules eucaryotes chargés d'emmagasiner, sous forme d'adénosine 5'-triphosphate (ATP), l'énergie libérée par la dégradation des combustibles cellulaires. Elles consomment 80% de l'oxygène que nous respirons et produisent 90% de l'énergie que nos cellules utilisent. Les mitochondries ont d'autres fonctions: elles participent à la thermogénèse, à la synthèse des hèmes et des stéroïdes et à la mort cellulaire programmée, ou apoptose (Delbart, Karp). Par ailleurs, il existe différentes atteintes d'organes regroupées sous le terme de maladies mitochondriales ou mitochondriopathies, dont le dénominateur commun est l'existence d'un déficit dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale en raison de mutations dans les gènes situés au niveau de l'ADN nucléaire (ADNn) ou mitochondrial (ADNmt). Enfin, les mitochondries sont impliquées dans le vieillissement et dans la physiopathologie de nombreuses affections neurodégénératives.

1. Les mitochondries: données générales

1.1. Structure et relations des mitochondries

La forme générale des mitochondries est très variable, allant de la sphère au bâtonnet en passant par des disques ou des anneaux. Les mitochondries changent de forme et peuvent fusionner en mitochondries plus grandes ou en structures plus ramifiées. Quel que soit le type observé, les mitochondries présentent une ultrastructure standard, elles sont entourées par 2 membranes qui déterminent 2 cavités. **La membrane externe** est doublée par une **membrane interne** définissant ainsi **l'espace intermembranaire ou chambre externe**, mais il existe des zones d'accolement où la chambre externe est inexistante. La membrane interne délimite une cavité centrale appelée **matrice mitochondriale ou chambre interne**. Les mitochondries ont des relations morphologiques privilégiées avec le reticulum endoplasmique et elles se déplacent dans le cytosol grâce au cytosquelette (Delbart, Karp).

La membrane externe ne présente (6 à 7 nm d'épaisseur) ne présente aucun caractère morphologique distinctif. En revanche, la membrane interne est légèrement plus fine et se distingue par de nombreux replis qui cloisonnent plus ou moins la matrice mitochondriale et

qui augmentent considérablement sa surface, estimée à 3 à 5 fois la surface de la membrane externe. La matrice mitochondriale contient de petits ribosomes (mitoribosomes quelquefois regroupés en polyribosomes) et plusieurs molécules (5 à 10 copies) d'ADN bicaténaire circulaire qui constituent l'ADNmt. La membrane externe est une membrane classique (40% de lipides et 60% de protéines) caractérisée par sa grande perméabilité aux ions et aux petites molécules. Cette perméabilité est en partie assurée par des **canaux de porine, encore appelées VDAC, pour *voltage-dependent anion channel***. La membrane interne est très particulière, caractérisée par sa grande richesse en protéines (80%) et imperméable à la plupart des ions (en particulier les protons) et des métabolites. La membrane interne dispose de systèmes très sélectifs pour assurer le transport intermembranaire des combustibles et des ions calcium. Parmi ces systèmes on trouve **la translocase pour l'ADP et l'ATP, ou ANT (*adenine nucleotide translocator*)** (Delbart, Karp).

Les sites de contact entre la membrane interne et la membrane externe sont des structures dynamiques dans lesquelles se trouvent les pores de translocation constitués de protéines des 2 membranes et servant à l'importation de protéines synthétisées dans le cytosol pour la mitochondrie. Dans certaines conditions, les mitochondries sont le siège d'une transition de perméabilité par ouverture de **mégacanaux ou MTP (*mitochondrial permeability transition pores*)**. Par ces mégacanaux fuiraient vers le cytosol des composés appartenant aux 2 chambres mitochondriales. La structure de ces mégacanaux n'est pas entièrement élucidée; ils rassembleraient des protéines appartenant aux 2 membranes: la porine et le récepteur périphérique des benzodiazépines pour la membrane externe, la cyclophiline D et la translocase ANT pour la membrane interne (Delbart, Karp).

1.2. Renouvellement des mitochondries

Les mitochondries ont une durée de demi-vie de l'ordre de 6 à 10 jours selon les cellules. Le remplacement des mitochondries est assuré par la division binaire de mitochondries préexistantes en mitochondries-filles plus petites qui augmenteront ensuite de volume. Le mécanisme de division est rapide, de l'ordre de 60 secondes.

Les constituants mitochondriaux sont renouvelés en permanence soit par des synthèses se déroulant dans la mitochondrie, soit par des importations. Les mécanismes d'importation protéique de la mitochondrie sont extrêmement complexes et font intervenir des **séquences d'adressage protéique** (comme par exemple des séquences de type MTS, pour *mitochondrial targeting sequence*), des **molécules chaperons** (comme par exemple les protéines Hsp, pour *heat shock proteins*), le passage des protéines au travers des 2 membranes par un **pore de**

translocation (comme par exemple les protéines *Tim* et *Tom* de la levure) et enfin la prise de configuration des protéines dans le compartiment définitif (grâce en particulier à des peptidases spécifiques de type MPP et MIP) (Delbart, Karp).

Les mitochondries sont détruites par un mécanisme d'autophagie, qui fait intervenir le reticulum endoplasmique et les lysosomes. Il existerait un lien entre l'autophagie et la dépolarisation des mitochondries provoquée par l'ouverture des mégacanaux. Les lésions qui commandent la destruction des mitochondries sont les mêmes que celles qui ouvrent les mégacanaux et déterminent la transition de perméabilité: surcharge en ions calcium, production de radicaux libres, oxydation du glutathion et manque de combustible. L'autophagie jouerait un rôle capital en éliminant les mitochondries dépolarisées et dont les mégacanaux sont ouverts (Delbart, Karp).

1.3. Phylogénèse des mitochondries

L'hypothèse d'une origine endosymbiotique des mitochondries est ancienne. D'une manière générale, cette théorie postule que l'origine des mitochondries est un évènement bien défini dans l'évolution des cellules eucaryotes et que les mitochondries sont les descendants d'une bactérie qui se serait établie dans une cellule-hôte possédant déjà un noyau (Gray, Strauss). L'analyse des séquences de gènes indique une filiation entre les mitochondries et un ancêtre bactérien appartenant au sous-groupe des alpha-protéobactéries. Cependant, des travaux récents réalisés sur des eucaryotes unicellulaires (protistes) ont permis de reformuler cette hypothèse (Gray, Strauss). Les mitochondries modernes dériveraient d'un ancêtre mitochondrial commun à tous les eucaryotes existants actuellement et qui serait apparu en même temps que le noyau (Gray, Strauss).

Jusqu'à présent, les informations sur l'organisation mitochondriale étaient fragmentaires et disparates, rendant difficile l'établissement de filiations phylogénétiques. De nombreux résultats sont venus grossir les informations sur les divers génomes mitochondriaux (*organelle genome database*) et ont permis de retrouver les caractéristiques du génome protomitochondrial (Gray, Strauss). Ce génome protomitochondrial ancestral contient encore des vestiges évidents de son ancêtre eubactérien et il se caractérise par la présence de nombreux gènes supplémentaires codant en particulier des protéines ribosomales de type eubactérie, un ensemble complet de gènes pour les ARNt, une organisation des gènes de type eubactérie, une compaction de l'information génétique, peu de séquences non codantes, peu ou pas d'introns et un code génétique standard (Gray, Strauss). Les ADNmt actuels diffèrent, parfois énormément, de l'archétype ancestral par une réduction notable de leur taille, une

perte importante de gènes, des divergences dans la structure des ARNr et l'adoption d'un code génétique biaisé comportant des codons non standard. La question qui se pose est de savoir pourquoi les ADNmt ont évolué si différemment dans les divers eucaryotes. Les études récentes indiquent que l'ADNmt serait devenu hautement actif du point de vue de la recombinaison, ce qui aurait permis des réarrangements géniques importants (Gray, Strauss).

La symbiose de l'eubactérie parasite a eu pour conséquence directe la réduction du nombre de ses gènes contenus dans l'ADNmt, probablement en raison des risques importants de délétions dans le parasite et/ou de la possibilité d'obtenir une compensation de la part de l'hôte. Au départ il s'agissait des gènes qui codaient la synthèse des acides aminés, des nucléotides, et pour la glycolyse anaérobie. Ce transfert de l'information génétique vers le génome de l'hôte s'est fait très tôt et s'est par la suite amplifié (Gray, Strauss).

2. Rôles des mitochondries

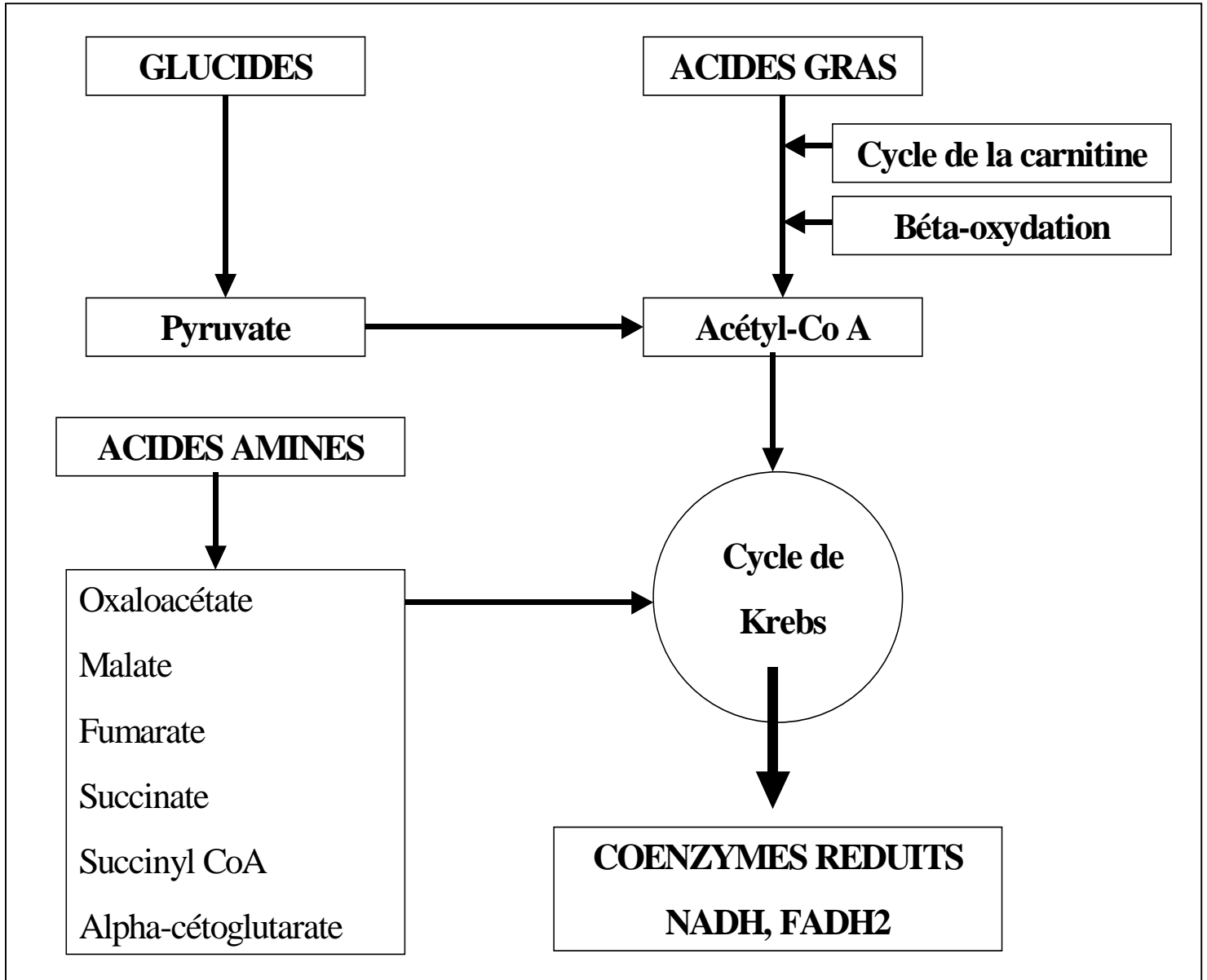
2.1. La production d'ATP

Chez les eucaryotes non photosynthétiques, l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire est apportée par l'oxydation des nutriments. L'oxydation de ces combustibles par l'oxygène libère une grande quantité d'énergie qui est mise en réserve sous forme d'une liaison anhydride lors de la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP. La dégradation de l'ATP redonnera ensuite une partie de cette énergie à des fonctions biologiques endergoniques. Un humain adulte forme et décompose environ 40 kg d'ATP par jour. Comme cette réaction de production d'ATP consomme de l'oxygène, elle est assimilée à une respiration cellulaire. Les combustibles cellulaires sont le glucose, les acides gras ou encore certains acides aminés (Delbart, Karp). La mise en réserve de l'énergie sous forme d'ATP implique une succession d'étapes auxquelles participent tous les compartiments mitochondriaux:

2.1.1. La première étape est la constitution d'un pool matriciel de coenzymes réduits qui seront des donneurs d'électrons pour l'étape suivante. La dégradation des glucides et des acides gras mène à la formation d'acétyl-CoA qui intègre le cycle de Krebs en même temps que certains acides aminés pour former les coenzymes réduits que sont le NADH et le FADH₂ (**Figure 3**).

FIGURE 3

Dégradation des combustibles et production de coenzymes réduits dans la mitochondrie.



2.1.2. La deuxième étape est le transfert des électrons des coenzymes réduits à l'oxygène moléculaire par une série d'étapes d'oxydoréduction. Cette étape se déroule dans la membrane interne au niveau d'un complexe constitué d'une cinquantaine de sous-unités polypeptidiques qui constituent la chaîne respiratoire (**Tableau 4**). Les molécules de NADH et FADH₂ vont servir de donneurs d'électrons à l'oxygène moléculaire; le transfert se fera par l'intermédiaire d'une succession de couples redox appartenant à la chaîne respiratoire. **Ce transfert des électrons est couplé à un transport actif de protons vers la chambre externe et à la création d'une différence de potentiel électrochimique au niveau de la membrane interne.**

2.1.3. La troisième étape est la dissipation de ce potentiel électrochimique par retour des protons dans la matrice et la synthèse d'ATP au niveau de l'ATP-synthase. La synthèse d'ADP est catalysée par un complexe multiprotéique de 550 kDa appelé ATPase à protons ou ATP-synthase ou facteur de couplage F₀/F₁ situé au niveau de la membrane interne et qui couple un flux transmembranaire de protons à la phosphorylation de l'ADP. Ainsi, l'ATP-synthase transforme une énergie électrochimique (force motrice) en une énergie chimique (potentiellement contenue dans l'ATP).

2.2. Autres rôles

Les mitochondries sont impliquées dans la thermogénèse et le contrôle du poids corporel. Ainsi, une proportion significative de la respiration mitochondriale n'est pas couplée à la synthèse de l'ATP et une partie de l'énergie libérée par les réactions d'oxydoréduction est dissipée sous forme de chaleur. Dans la graisse brune, une protéine de 33 kDa appartenant à la membrane interne va dissiper le gradient de protons en procurant aux protons une voie de retour vers la matrice différente de l'ATP-synthase. Cette protéine découple la chaîne respiratoire et l'ATP-synthase, d'où son nom d'UCP1 (*uncoupling protein 1*). D'autres UCP existent, dont UCP3 dans le muscle et UCP2 dans de nombreux tissus. La dépense énergétique est une composante importante de la régulation du poids corporel. Une faible thermogénèse s'accompagne d'une prise de poids et toute variation de l'équilibre énergétique s'accompagne de modifications de l'expression des gènes des UCP. Ainsi, la restriction calorique induit une perte de poids et l'augmentation de la quantité d'UCP2, alors qu'UCP3 augmente après injection de substances pyrétiques (Delbart, Karp).

Les mitochondries interviennent également dans le cycle de l'urée, la synthèse des hormones stéroïdes et dans le cycle de l'hème (Delbart, Karp).

TABLEAU 4: les grands complexes protéiques de la chaîne respiratoire des mammifères.

Complexe	Masse moléculaire (kDa)	Nombre de sous-unités	Inhibiteur
Complexe I NADH-UQ réductase	900	42	Amital, roténone
Complexe II succinate-UQ réductase	200	4	Malonate
Complexe III UQH ₂ -cyt-c réductase	250	11	Antimycine
Complexe IV cytochrome c oxydase	200	13	Cyanure

Treize sous-unités de la chaîne respiratoire sont codées par l'ADNmt et 57 sous-unités sont codées par l'ADNn.

3. Pathologies humaines et mitochondries

3.1. Mitochondries et vieillissement

Le vieillissement est un processus biologique caractérisé par un déclin des fonctions physiologiques conduisant à la morbidité et à la mort. L'oxydation est le principal responsable du vieillissement cellulaire. Les mitochondries sont la principale source d'oxydants et constituent donc leur cible privilégiée (Delbart, Karp).

Le terme "espèces réactives de l'oxygène" (communément appelées ROS, pour *reactive oxygen species*) inclut les différentes formes de l'oxygène, les hyperoxydes et les espèces radicalaires ou radicaux libres. Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules présentant un ou plusieurs électrons célibataires, source d'instabilité et de réactivité puisque l'espèce radicalaire a tendance à les apparier en captant un électron d'une autre molécule ou à les céder. La chaîne respiratoire est une source importante de ROS puisque 2 à 4% de l'oxygène réagissant avec la chaîne respiratoire sont incomplètement réduits et donne naissance aux ROS. Les mitochondries contiennent des systèmes antioxydants enzymatiques comme la SOD, qui ne constituent cependant pas une arme de défense parfaite (Delbart, Karp).

Le stress oxydatif se traduit au niveau des mitochondries par une peroxydation lipidique, une oxydation protéique et des mutations dans l'ADNmt. Ces mutations de l'ADNmt sont transmises pendant la division mitochondriale et vont entraîner des altérations de la chaîne respiratoire qui à leur tour vont entraîner une augmentation de la production de ROS qui vont à leur tour endommager à nouveau l'ADNmt. Ainsi, le taux de mutations de l'ADNmt augmente graduellement et le fonctionnement mitochondrial s'altère progressivement avec l'âge (Delbart, Karp).

3.2. Mitochondries et mort cellulaire

Les mitochondries sont un élément central de l'apoptose, ou suicide cellulaire provoqué par l'activation de protéases particulières, les caspases. Les mitochondries disposent de plusieurs moyens pour participer à la mise à mort d'une cellule: l'interruption du transport d'électrons, la surproduction de ROS, mais surtout la libération d'agents apoptogènes. Ainsi, le cytochrome c, constituant de la chaîne respiratoire, devient apoptogène quand il est libéré dans le cytosol. L'apoptosome des vertébrés est composé de cytochrome c, d'Apaf-1 et de procaspase 9. Quand cette dernière est convertie en caspase 9, elle active les caspases

orchestrant l'exécution biochimique de la cellule. Il suffit de libérer ces protéines dans le cytosol pour tuer la cellule. Un dérèglement des mécanismes de l'apoptose intervient dans des pathologies comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington et l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Delbart, Karp).

3.3. Anomalies de la dégradation des combustibles

Les désordres majeurs de la dégradation des combustibles cellulaires correspondent aux erreurs du métabolisme des acides gras, de l'acide pyruvique ou des acides aminés et au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire en raison de la sous-production d'équivalents réduits. En pathologie humaine, les erreurs du métabolisme des acides gras comprennent les défauts du cycle de la carnitine et les défauts de la bêta-oxydation qui se traduisent le plus souvent par des tableaux d'atteinte musculaire diffuse. Les erreurs du métabolisme de l'acide pyruvique sont le plus souvent à l'origine d'une affection néonatale systémique sévère conduisant au décès rapide du patient. Les erreurs de la dégradation des acides aminés sont à l'origine de tableaux sévères associant le plus souvent une atteinte neurologique centrale et une myopathie (Delbart, Karp).

3.4. Désordres de la phosphorylation oxydative (OXPHOS)

Le fonctionnement d'un grand nombre d'organes dépend de l'énergie fournie par les mitochondries et une anomalie au niveau des constituants de la chaîne respiratoire et du facteur de couplage peut avoir des répercussions au niveau d'un grand nombre d'entre eux. Ces défauts OXPHOS se caractérisent en effet le plus souvent par une très grande variabilité d'expressions cliniques et par l'atteinte simultanée de plusieurs organes dont le système nerveux, le muscle squelettique, le foie et le pancréas. Ces défauts OXPHOS peuvent résulter de mutations de l'ADNmt (de transmission le plus souvent maternelle) mais également de mutations de l'ADNn (de transmission mendélienne). Une classification en troubles primaires et en troubles secondaires peut être proposée (**Tableau 5**).

3.5. Mitochondries et affections neurodégénératives

Des anomalies mitochondriales ont été mises en évidence dans de nombreuses affections neurodégénératives (Beal 2005). Ainsi, certaines formes familiales récessives de maladie de Parkinson sont provoquées par des mutations du gène PINK1, qui code pour une kinase mitochondriale. D'autres formes familiales de maladie de Parkinson sont provoquées par des mutations des gènes Parkin et DJ1 qui, lorsqu'ils sont inactivés chez la souris ou chez

TABLEAU 5: classification des désordres de la phosphorylation oxydative.

<p>I. OXPHOS primaires Les mutations affectent directement les complexes I à V</p> <p>1) Mutations de l'ADNmt</p> <ul style="list-style-type: none">- grands remaniements (délétion, insertion) touchant les gènes des protéines et des ARNt- petits remaniements (mutations ponctuelles) touchant les gènes des protéines- mutations dans les ARNt et ARNr <p>2) Mutations nucléaires</p>
<p>II. OXPHOS secondaires Les mutations affectent indirectement les complexes I à V</p> <p>1) Mutation dans le gène nucléaire d'une protéine n'appartenant pas à la chaîne respiratoire mais entraînant un déficit de la chaîne respiratoire</p> <ul style="list-style-type: none">- protéine intervenant dans la réplication, la transcription ou la traduction de l'ADNmt- protéine intervenant dans l'importation des éléments de la chaîne respiratoire- protéine intervenant dans le système de maturation protéique <p>2) Agent toxique entraînant une diminution de l'ADNmt</p> <ul style="list-style-type: none">- ROS endogènes- agents exogènes (méthyl-4-phényl par exemple)

Le groupe des OXPHOS primaires avec mutations de l'ADNmt comprend notamment la neuropathie optique de Leber (LHON), l'ophtalmoplégie externe progressive (PEO), le syndrome NARP (*neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa*), le syndrome KSS (*Kearns-Sayre syndrome*), le syndrome MERFF (*myoclonic epilepsy with ragged red fibers*) et le syndrome MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes*).

Le groupe des OXPHOS primaires avec mutations de l'ADNn comprend notamment le syndrome de Leigh lié à des mutations du gène SURF1.

Le groupe des OXPHOS secondaires avec mutations de l'ADNn comprend notamment l'ataxie de Friedreich liée à des mutations du gène FRDA et la paraplégie spastique familiale liée à des mutations de la paraplégine.

(On trouvera une revue complète et détaillée des désordres de la phosphorylation oxydative dans les références suivantes : Dimauro 2005a, Dimauro 2005b, Dimauro 2005c, Taylor)

la drosophile, provoquent des anomalies mitochondriales. Par ailleurs, les inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale provoquent des syndromes parkinsoniens. Dans la maladie d'Alzheimer, les mutations de l'ADNmt sont plus fréquentes dans le cerveau des patients atteints par la maladie que chez les sujets contrôles et le peptide bêta-amyloïde est retrouvé à l'intérieur des mitochondries, où il module de manière pathologique la production de radicaux libres. La maladie de Huntington est provoquée par des mutations du gène codant pour la huntingtine qui, lorsqu'elle est mutée, se fixe à la membrane externe de la mitochondrie, diminue le recaptage calcique mitochondrial et se lie à la protéine p53 pour induire une dépolarisation anormale de la membrane mitochondriale. Des mutations de la parapléine, une métalloprotéase mitochondriale, provoquent une paraplégie spastique familiale autosomique dominante et des mutations de la pantothénate kinase 2 (PANK2), enzyme mitochondriale, provoquent une neurodégénérescence avec accumulation de fer dans le cerveau (maladie de Hallervorden-Spatz). La maladie de Wilson, affection concernant le métabolisme du cuivre, a été classée dans les maladies mitochondriales car la mutation responsable touche une ATPase spécifique du cuivre située dans les membranes mitochondriales. Des mutations de la frataxine, protéine mitochondriale, provoquent une diminution de l'incorporation du fer dans les mitochondries et sont à l'origine d'un syndrome neurodégénératif: la maladie de Friedreich. Enfin, des mutations de protéines impliquées dans la fission des mitochondries sont à l'origine d'une neuropathie optique autosomique dominante (OPA1, gène de la *dynamine-related protein*) et d'une affection dégénérative du système nerveux périphérique, la maladie de Charcot-Marie-Tooth axonale autosomique dominante (CMT2A, gène de la mitofuscine 2 [MFN2]).

Les mitochondries: synthèse

Au total, les mitochondries sont des organites cellulaires essentiels chargés d'emmagasiner l'énergie libérée par la dégradation des combustibles cellulaires et jouant également un rôle central dans la thermogenèse, les phénomènes d'apoptose et de vieillissement cellulaire. Sur le plan pathologique, les mitochondries occupent une place de plus en plus importante dans le domaine des affections neurodégénératives humaines. Ainsi, un dysfonctionnement mitochondrial est à la base d'affections neurodégénératives aussi diverses que la maladie de Friedreich (mutations de la frataxine, protéine de la membrane interne mitochondriale), la maladie de Wilson (mutations d'une ATPase mitochondriale), la maladie de Hallervorden-Spatz (mutations de PANK2, enzyme mitochondriale), certaines paraplégies spastiques familiales (mutations de la paraplégine, métalloprotéase mitochondriale) et certaines formes familiales de maladie de Parkinson (mutations de PINK1, kinase mitochondriale).

SLA et mitochondries

1. Contexte

Nous avons vu dans le chapitre précédent que des anomalies mitochondriales avaient été mises en évidence dans de nombreuses affections neurodégénératives. Dans ce contexte, des anomalies mitochondriales ont naturellement été recherchées dans la SLA, affection classiquement considérée comme un syndrome neurodégénératif. Ces anomalies ont été recherchées d'une part dans les modèles animaux de SLA, à savoir les souris SOD1-SLA, mais également dans la SOD1-SLA et dans la SLAS chez l'homme.

Nous n'aborderons pas dans ce chapitre le problème des études de la fonction mitochondriale réalisées dans le muscle squelettique dans la SLAS; ce sujet est spécifiquement discuté dans un chapitre ultérieur (SLA sporadique, muscle et mitochondries, page 33).

2. Mitochondries et SOD1-SLA

Des mutations de la SOD1 sont responsables de la SOD1-SLA, affection familiale de transmission autosomique dominante. L'expression de la SOD1 mutée dans des cultures cellulaires mène à des perturbations du fonctionnement mitochondrial (Menziès). Les souris exprimant la mutation G93A de la SOD1 présentent des anomalies du métabolisme énergétique mitochondrial dans la moelle épinière et dans le cerveau (Jung, Mattiazzi). De plus, les premières anomalies observées dans les motoneurones des souris exprimant les mutations G93A et G37R de la SOD1 sont des vacuoles issues de mitochondries dégénérantes (Higgins). L'apparition de mitochondries dégénérantes à l'intérieur des motoneurones immédiatement avant le début des symptômes chez la souris G93A-SOD1 suggère que des anomalies mitochondriales pourraient jouer un rôle fondamental dans la physiopathologie de la maladie. Par ailleurs, des études réalisées chez la souris G93A-SOD1 ont mis en évidence une altération des propriétés respiratoires des mitochondries au niveau des fibres musculaires oxydatives (Leclerc). De plus, il a été démontré chez la souris G86R-SOD1 une surexpression précoce de la protéine découplante mitochondriale UCP3 au niveau du muscle squelettique (Dupuis 2003). Enfin, le traitement par créatine, molécule tampon palliant au déficit en ATP, et le traitement par diète hypercalorique allongent l'espérance de vie de la souris SOD1 (Dupuis 2004, Klivenyi). L'ensemble de ces éléments suggère que les

souris avec une SOD1-SLA présentent un dysfonctionnement mitochondrial et un hypermétabolisme essentiellement d'origine musculaire (Gonzalez de Aguilar).

L'enzyme SOD1 est classiquement considérée comme étant une protéine exclusivement cytoplasmique. Cependant, de nombreuses études récentes ont mis en évidence la présence de cette protéine à l'intérieur des mitochondries. Des études faites chez des souris transgéniques exprimant la SOD1 normale ou mutée ont démontré qu'une fraction de la SOD1 cellulaire était présente à l'intérieur de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (Higgins, Jaarsma). La proportion de SOD1 intramitochondriale est estimée à environ 2% du total de la SOD1 intracellulaire, ce qui pourrait représenter une charge tout à fait considérable au vu du volume limité de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (Mattiuzzi).

De nombreuses données suggèrent qu'un dysfonctionnement mitochondrial pourrait être un élément central de la physiopathologie de la SOD1-SLA. A l'inverse de la SOD1 sauvage, la SOD1 mutante se lie aux protéines du choc thermique (*heat shock proteins*, ou HSP), conduisant à la formation d'agrégats qui empêchent l'entrée de ces protéines dans les mitochondries (Okado-Matsumoto). L'expression chez la levure de la SOD1 avec les mutations A4V ou G93A mène à une diminution du transport d'électrons dans la mitochondrie (Gunther). D'autres études ont montré que la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP étaient sévèrement perturbées chez la souris SOD1 avec la mutation G93A (Mattiuzzi). De plus, ces souris présentent d'importants dommages oxydatifs au niveau des lipides et des protéines mitochondriales (Mattiuzzi). On observe au niveau de la moelle épinière des souris SOD1-G93A des mitochondries contenant des agrégats de SOD1 de haut poids moléculaire et qui ont une capacité de recaptage du calcium effondrée, et cela dès l'âge de 35 jours, c'est-à-dire avant l'apparition des symptômes (Damiano). Les variants SOD1 sont préférentiellement captés au niveau de la moelle épinière par rapport aux SOD1 sauvages (Liu). Cette localisation préférentielle des protéines SOD1 mutées au niveau des mitochondries de la moelle épinière a également été retrouvée chez un patient avec une SOD1-SLA (Liu). Les protéines SOD1 mutées étaient étroitement agrégées et entremêlées avec des protéines de la membrane mitochondriale externe (Liu).

LA SOD1 sauvage et la SOD1 mutée se lient toutes 2 à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Pasinelli). Cette interaction a été observée *in vitro* mais également *in vivo* chez les souris SOD1-G93A et au niveau des mitochondries de la moelle épinière chez un patient avec une SOD1-SLA (Pasinelli). Les protéines SOD1 mutées forment des agrégats de haut poids moléculaire au niveau des mitochondries de la moelle épinière mais pas au niveau des mitochondries du foie (Pasinelli).

Ces données suggèrent que la séquestration de Bcl-2 et le déclenchement subséquent de l'apoptose pourrait être l'un des mécanismes par lesquels les protéines SOD1 mutées pourraient provoquer la maladie. Des études récentes ont montré que les protéines SOD1 mutées sont présentes non seulement au niveau de la membrane externe de la mitochondrie mais également au niveau de la matrice mitochondriale, où elles forment des agrégats qui pourraient contribuer à la dysfonction mitochondriale (Virjayvergiya). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que l'expression ciblée *in vitro* de la SOD1 mutée au niveau de la matrice mitochondriale déclenche la libération de cytochrome c par la mitochondrie et induit par conséquent les cascades apoptotiques intra-cellulaires (Takeuchi).

L'ensemble de ces données suggère de manière convaincante qu'un dysfonctionnement mitochondrial est bien un élément clef de la physiopathologie de la SOD1-SLA. Il faut néanmoins garder à l'esprit que la SOD1-SLA, qui représente moins de 2% des cas de SLA chez l'homme, est une affection vraisemblablement très différente de la SLAS malgré de nombreux points communs cliniques et anatomo-pathologiques (Hervias). Il faut donc rester extrêmement prudent et se garder d'extrapoler inconsidérément les données obtenues dans la SOD1-SLA à toutes les formes de SLAS, notamment en ce qui concerne les traitements qui ciblent des événements pathologiques qui pourraient n'être spécifiques que de certaines formes de la maladie.

3. Mitochondries et SLAS

Un certain nombre d'études, réalisées pour la plupart sur du tissu humain post-mortem ou sur des biopsies, suggèrent qu'un dysfonctionnement mitochondrial pourrait être impliqué dans la physiopathologie de la SLAS. Ainsi, des anomalies morphologiques ont été observées au niveau des mitochondries de la partie proximale des axones et au niveau des mitochondries de la corne antérieure de la moelle épinière chez des patients avec une SLAS (Hirano, Sasaki). Des agrégats sub-sarcolemmiques de mitochondries anormales ont été observés dans les nerfs intramusculaires et dans le muscle squelettique et une augmentation du volume mitochondrial et des taux de calcium a été identifiée au niveau de la partie distale des axones des motoneurones (Afifi, Atsumi, Siklos).

Sur le plan fonctionnel, des anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été décrites dans la moelle épinière de patients avec une SLA (Borthwick, Wiedemann 2002). Des anomalies mitochondriales fonctionnelles et morphologiques ont également été observées

dans le tissu hépatique, obtenu par biopsie, de patients avec une SLAS (Masui, Nakano). Une étude a également montré que les lymphocytes circulants de patients avec une SLAS avaient une réponse anormale aux inhibiteurs de la phosphorylation oxydative, suggérant ainsi l'existence d'un dysfonctionnement mitochondrial (Curti). Des études réalisées sur des hybrides cytoplasmiques (cellules sans ADNmt repeuplées avec de l'ADNmt d'un donneur) obtenus à partir de mitochondries de patients avec une SLAS ont montré que ces mitochondries présentaient des défauts de la chaîne respiratoire, produisaient des radicaux libres en excès et présentaient une homéostasie calcique défectueuse (Swerdlow). Ces anomalies ont été observées dans des hybrides cytoplasmiques générés à partir de cellules de neuroblastome mais n'ont pas été observées lorsque des cellules non-neuronales étaient utilisées (Gajewski). Cette différence suggère que les anomalies mitochondriales ne pourraient être présentes dans la SLAS qu'au niveau des cellules exprimant un phénotype neuronal.

Bien que les données précédentes soient en faveur de l'existence d'un dysfonctionnement mitochondrial dans la SLAS, il est utile de rappeler ici que des études réalisées sur du tissu post mortem ou sur des biopsies de patients déjà symptomatiques sont d'utilité très limitée en ce qui concerne l'étude la fonction mitochondriale (Hervias). En effet, ces travaux ne pourraient refléter que le processus neurodégénératif à son stade ultime. En l'absence d'un modèle fiable de SLAS dans lequel il serait possible de suivre les modifications de la fonction mitochondriale avant et après le début des symptômes, il est actuellement virtuellement impossible de déterminer si la mitochondrie est impliquée de manière causale dans la physiopathologie de la SLAS ou bien si elle n'est que la victime d'un processus pathologique situé en amont.

SLA et mitochondries: synthèse

Au total, il existe actuellement de nombreux arguments expérimentaux solides en faveur de l'existence d'un dysfonctionnement mitochondrial dans la SOD1-SLA. Ce dysfonctionnement est systémique et semble être particulièrement marqué dans le tissu nerveux et dans le tissu musculaire. Ces anomalies mitochondriales ont été pour la plupart identifiées grâce à l'étude de modèles murins SOD1-SLA. En revanche, les données concernant la fonction mitochondriale dans la SLAS en dehors du muscle squelettique sont rares et d'interprétation délicate. En effet, ces études ont été réalisées le plus souvent sur du tissu post mortem ou sur des biopsies de patients déjà symptomatiques; les anomalies observées pourraient donc n'être que le reflet d'un processus pathologique à son stade ultime. Il n'y a en tout cas actuellement aucun argument définitif permettant d'affirmer que les mitochondries jouent un rôle physiopathologique central dans la SLAS.

SLA sporadique, muscle et mitochondries

1. SLA sporadique, muscle et mitochondries: le contexte

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'un dysfonctionnement mitochondrial pourrait être en partie responsable de la SOD1-SLAF et qu'un tel dysfonctionnement pourrait être impliqué dans la physiopathologie de la SLAS. Plusieurs équipes européennes, dont la nôtre, se sont attachées dans ce contexte à étudier le fonctionnement mitochondrial chez des patients avec une SLAS au niveau d'un tissu affecté par la maladie et facilement accessible par biopsie : le muscle squelettique. Dans ce chapitre, nous reprenons de manière exhaustive l'ensemble des données publiées dans la littérature concernant le fonctionnement mitochondrial dans le muscle squelettique dans la SLAS; nous décrivons ensuite nos travaux personnels dans ce domaine avant de terminer par une tentative de synthèse sur ce sujet controversé.

2. SLA sporadique, muscle et mitochondries: les données de la littérature

Les données concernant la fonction mitochondriale dans le muscle squelettique de patients avec une SLAS sont le plus souvent contradictoires et globalement difficiles à interpréter. Ainsi, il a été montré que la production de lactates était augmentée chez le patient avec une SLAS par rapport à des sujets sains lors de la réalisation d'une épreuve d'effort sur bicyclette ergométrique, suggérant l'existence d'un défaut du métabolisme oxydatif dans le muscle à l'effort dans la SLAS (Siciliano). Néanmoins, des anomalies similaires ont été observées chez des patients avec une dénervation chronique non-liée à la SLA, suggérant ainsi que ce défaut n'est pas spécifique de la SLA mais résulte plutôt de la dénervation musculaire qui accompagne l'affection (Karpati). De même, une augmentation significative de mutations de l'ADNmt a été décrite dans le muscle squelettique de patients avec une SLAS (Ro). Néanmoins, le taux de ces mutations restait faible (<0.5%) par rapport aux taux retrouvés chez des patients avec des myopathies mitochondriales (30-80%) ce qui suggère que cette anomalie a un impact marginal sur le plan physiopathologique dans la SLAS et qu'elle ne constitue donc vraisemblablement qu'un événement musculaire secondaire à la dégénérescence du motoneurone et/ou à la dénervation (Ro). Une augmentation des taux d'ARNm de la protéine UCP3 dans le muscle squelettique de 7 patients avec une SLAS par rapport à 3 sujets avec une myopathie et par rapport à 6 sujets avec une dénervation non-liée à

une SLAS a également été récemment démontrée (Dupuis 2003). Dans ce même travail, les taux de protéine UCP3 étaient augmentés de façon massive dans le muscle squelettique de 14 patients avec une SLAS par rapport à des sujets normaux (Dupuis 2003). Ces données suggèrent qu'il existe dans la SLAS une dérégulation de l'expression des protéines découplantes et donc un dysfonctionnement mitochondrial dans le muscle squelettique. Ces observations portent néanmoins sur un petit nombre de cas et mériteraient certainement d'être confirmées sur une plus large série de patients.

Plusieurs travaux réalisés par une même équipe allemande ont été consacrés à l'étude de la fonction mitochondriale dans des biopsies de muscle de patients avec une SLAS (Wiedemann 1998, Vielhaber 1999, Vielhaber 2000). La première étude mettait en évidence des anomalies de la fonction respiratoire dans les fibres perméabilisées à la saponine, une activité NADH :CoQ oxydoréductase très réduite et une diminution significative de la chaîne respiratoire mitochondriale chez 14 patients avec une SLAS en comparaison avec 28 sujets contrôles (Wiedemann 1998). La deuxième étude révélait une activité très réduite du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, de distribution très hétérogène entre les différentes fibres musculaires, chez 26 patients avec une SLAS en comparaison avec 28 sujets contrôles (Vielhaber 1999). Sur le plan expérimental, les techniques utilisées dans ces deux travaux comprenaient une mesure de l'activité respiratoire et des activités enzymatiques mitochondriales sur des fibres perméabilisées à la saponine, ainsi qu'une étude des fibres musculaires marquées avec des flavoprotéines par microscopie à fluorescence. La troisième étude mettait en évidence dans le muscle squelettique de certains patients avec une SLAS des délétions multiples de l'ADN mitochondrial, une diminution globale des taux musculaires d'ADNmt et une diminution des taux de l'enzyme manganèse-SOD (Mn-SOD) (Vielhaber 2000). Cependant, ces 3 études sont soumises à des biais majeurs. Premièrement, ces études ont été réalisées chez des patients avec une SLAS évoluant depuis plusieurs années (entre 2 et 4 ans) et il est donc possible que les altérations relevées ne soient que le résultat de la dénervation (Beal 2000). Dans ce contexte, l'étude d'un groupe contrôle avec une dénervation chronique non-liée à une SLA aurait certainement été utile. Deuxièmement, le niveau d'activité physique des patients et des sujets contrôles n'est indiqué dans aucune de ces 3 études alors même qu'il s'agit d'une donnée fondamentale puisque le niveau d'entraînement physique d'un sujet est directement corrélé à sa fonction respiratoire mitochondriale musculaire (Hoppeler, Mettauer). Ainsi, l'exercice non seulement augmente le contenu mitochondrial des cellules du muscle squelettique, mais il augmente également le niveau d'activité des enzymes oxydatives musculaires et la production d'ATP musculaire (Holloszy

1967, Henriksson, Holloszy 1984). Par conséquent, en l'absence d'un appariement correct, les différences constatées au niveau de la respiration mitochondriale entre les sujets contrôles et les patients avec une SLAS pourraient n'être que le reflet d'une différence d'activité physique entre ces 2 groupes. Enfin, les sujets contrôles n'étaient pas *stricto sensu* des sujets sains puisqu'ils avaient pour la plupart de discrètes anomalies myogènes à l'examen EMG.

D'autres études consacrées à la respiration mitochondriale dans la SLAS ont été réalisées depuis et ne retrouvent pas les anomalies observées précédemment. Ainsi, une étude de la chaîne respiratoire mitochondriale dans des homogénats de muscle squelettique et dans des cultures cellulaires de patients avec une SLAS n'a retrouvé aucune anomalie (Bradley). Il était cependant noté une discrète diminution de l'expression des protéines mitochondriales chez les patients avec une SLAS par rapport aux contrôles (Bradley). Une étude de la fonction mitochondriale dans le muscle squelettique de 24 patients avec une SLAS (groupe SLAS), de 21 sujets contrôles et de 23 patients avec une dénervation musculaire non-liée à une SLA (groupe NA) a récemment été réalisée (Krasnianski). Cette étude a retrouvé des signes de diminution focale de l'activité oxydative mitochondriale dans certaines fibres musculaires, une diminution très modérée des ratios mt/nADN et une augmentation de l'activité des marqueurs mitochondriaux citrate synthase et succinate déshydrogénase dans les groupes SLAS et NA en comparaison avec le groupe contrôle. L'activité des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale était similaire dans les 3 groupes. Ces observations suggèrent qu'il existe effectivement bien de discrètes anomalies mitochondriales dans le muscle squelettique dans la SLAS, mais que ces anomalies résultent de la dénervation et ne sont pas spécifiques de la SLAS (Krasnianski).

3. SLA sporadique, muscle et mitochondries: travaux personnels

Au vu des données précédentes, notre projet de recherche s'est articulé autour de 2 interrogations: premièrement, des anomalies mitochondriales sont-elles réellement présentes dans la SLAS ? Deuxièmement, si des anomalies mitochondriales sont effectivement présentes, sont-elles un facteur physiopathologique central de la maladie ou bien ne sont-elles qu'un épiphénomène non spécifique, résultant par exemple de la dénervation?

3.1. Considérations techniques

Pour répondre à ces questions, nous avons décidé d'utiliser la technique des fibres musculaires perméabilisées à la saponine mise au point par Veksler en 1987 pour réaliser des

études oxygraphiques de la fonction mitochondriale *in situ* (Veksler). La saponine, glycoside d'origine végétale et analogue de la digitonine, est capable d'induire à très faible concentration (50-100 μ l/ml) la perméabilisation du sarcolemme tout en laissant toutes les structures intracellulaires, mitochondries comprises, intactes (Saks). Cette technique combine trois avantages majeurs pour étudier le fonctionnement de la mitochondrie: premièrement, un très petit prélèvement tissulaire est suffisant pour réaliser l'étude; deuxièmement, toute la population mitochondriale cellulaire peut être explorée; troisièmement, les mitochondries sont étudiées dans leur milieu naturel (Saks). L'étude de la consommation d'oxygène des fibres musculaires perméabilisées à la saponine a constitué un apport innovant à la connaissance de la biologie du muscle. Cette consommation d'oxygène est enregistrée à l'aide d'une électrode de Clark dans un oxygraphe relié à un ordinateur (**Figure 4**). Cette technique permet d'étudier non seulement la capacité oxydative des fibres musculaires, mais également la perméabilité de la mitochondrie à l'ADP (**Figure 5**). Enfin, l'étude de la chaîne respiratoire est rendue possible grâce à l'utilisation de différents substrats et inhibiteurs spécifiques permettant d'évaluer les complexes I-III-IV, II-III-IV et le complexe IV de la chaîne respiratoire (**Figures 6 et 7**).

3.2. Etude de la fonction mitochondriale chez le patient souffrant d'une SLAS (publication n°1 et publication n°2)

Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés des mitochondries musculaires *in situ* chez 14 patients avec une SLAS à un stade précoce de la maladie (durée moyenne d'évolution: 9 mois; score ALSFRS moyen: 40) en utilisant la technique des fibres perméabilisées à la saponine sur des fragments musculaires obtenus par biopsie (Echaniz-Laguna 2002). Les données obtenues ont été comparées à celles obtenues dans un groupe contrôle de 7 sujets normaux appariés pour l'âge, le sexe et le niveau d'activité physique. Le niveau d'activité physique des sujets sains et des patients avec une SLAS avait été déterminé par une épreuve d'effort incrémentale sur cycloergomètre avec mesure de la consommation d'oxygène (VO_2). Les patients avec une SLAS ne présentaient ni insuffisance respiratoire, ni perte de poids significative, deux paramètres qui auraient pu influencer sur les résultats des études de respiration mitochondriale. Les biopsies avaient par ailleurs été réalisées uniquement au niveau du muscle *vastus lateralis* gauche chez tous les patients afin d'éviter la variabilité inter-musculaire des mesures. Nous avons ainsi observé que les niveaux de respiration mitochondriale basale (V_0) et maximale (V_{MAX}) étaient identiques dans les 2 groupes. Nous avons également montré que l'activité des complexes de la chaîne respiratoire

FIGURE 4

Mesure oxygraphique de la consommation mitochondriale d'oxygène.

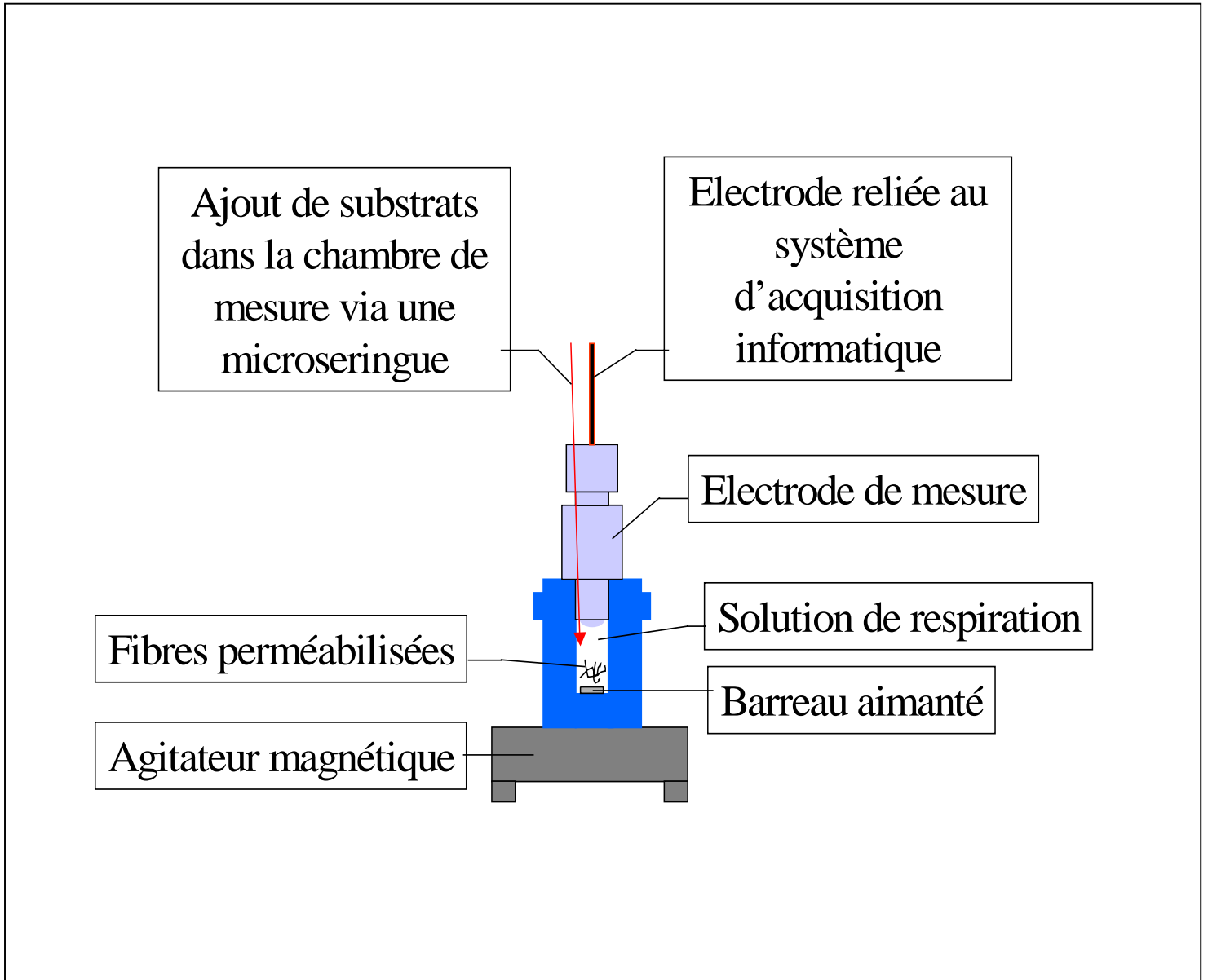


FIGURE 5

Etude de la respiration mitochondriale (I).

L'oxygraphie permet non seulement de mesurer la consommation basale d'oxygène (V_0), mais également la consommation maximale d'oxygène (V_{MAX}) après addition successive d'ADP. Le K_m apparent pour l'ADP est calculé en utilisant l'équation de Michaelis-Menten.

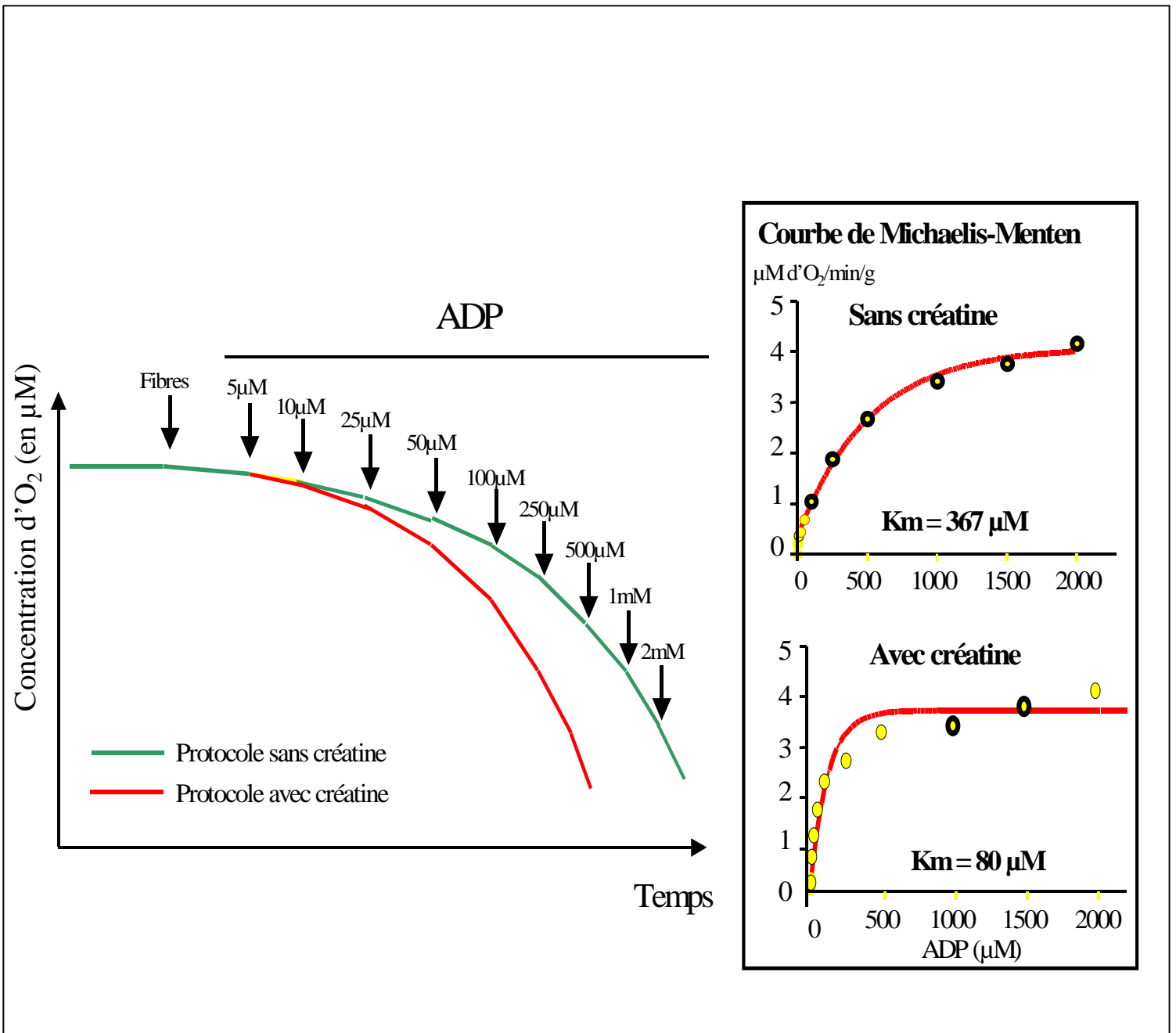
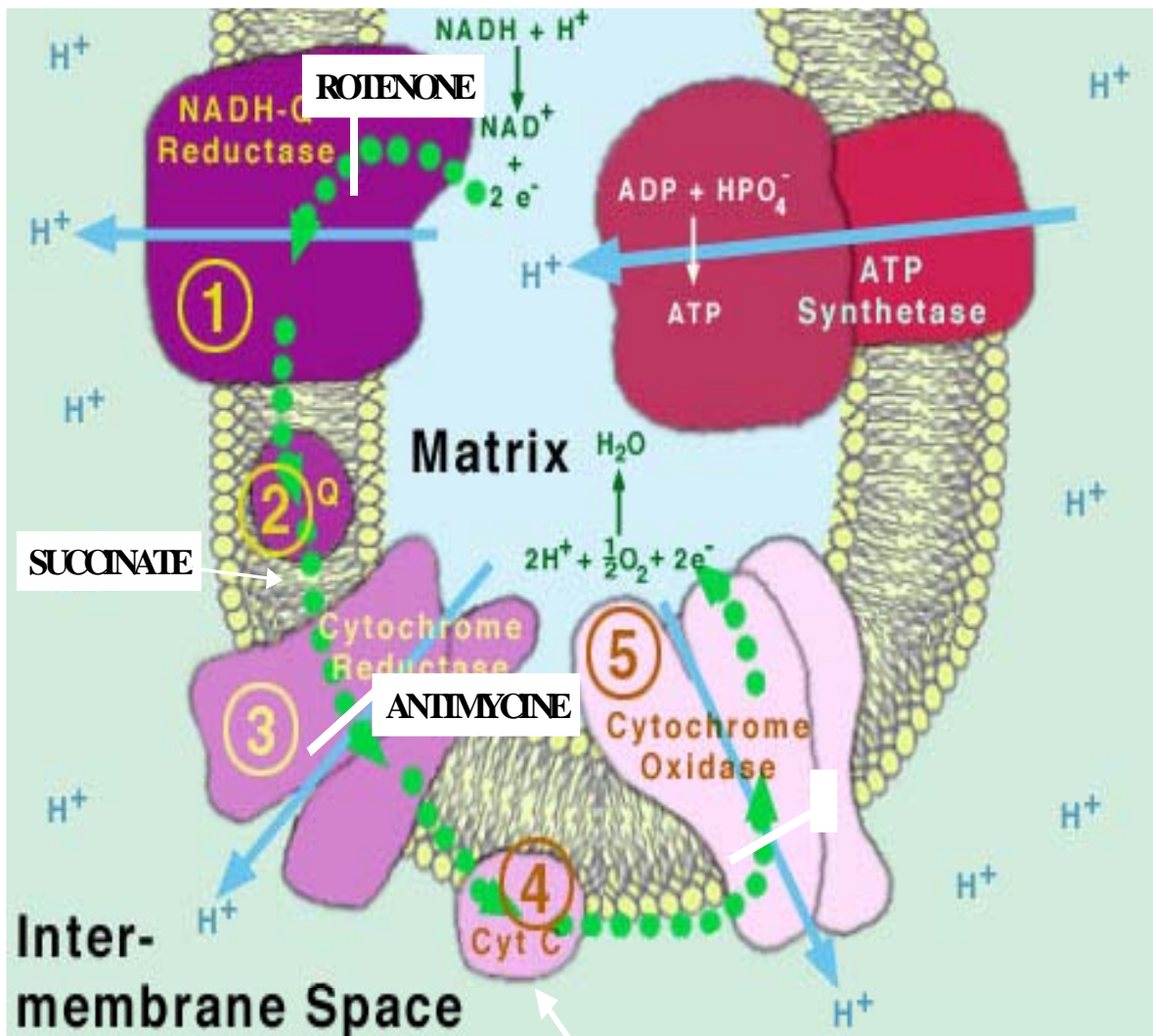


FIGURE 6

Étude de la chaîne respiratoire mitochondriale (II).



TMPD-ASCORBATE

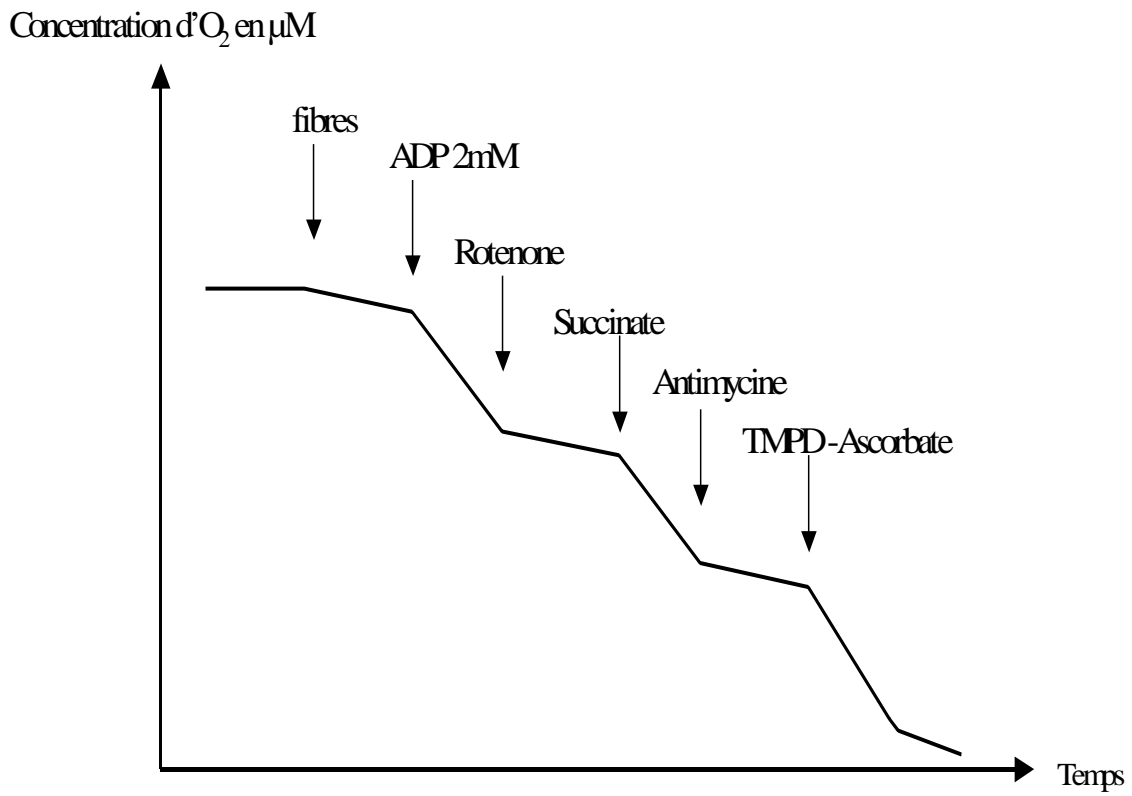
Evaluation des complexes I, III et IV ($V_{\text{glu-mal}}$) : le glutamate est utilisé comme substrat

Evaluation des complexes II, III et IV ($V_{\text{succinate}}$) : le complexe I est bloqué avec de la roténone et le succinate est utilisé comme substrat.

Evaluation du complexe IV ($V_{\text{TMPD-ascorbate}}$) : le complexe III est bloqué avec de l'antimycine A et le TMPD-ascorbate est utilisé comme donneur d'électrons.

FIGURE 7

Etude de la chaîne respiratoire mitochondriale (III) : déroulement chronologique.



était identique dans les 2 groupes. Ces résultats obtenus à partir d'une mesure ponctuelle suggèrent qu'il n'existe pas de dysfonctionnement mitochondrial majeur dans le muscle squelettique dans la SLAS à un stade précoce de la maladie. Néanmoins, ces résultats ne nous permettent pas d'exclure une anomalie mitochondriale musculaire apparaissant plus tardivement au cours de l'évolution de la maladie (Echaniz-Laguna 2003).

Nous avons par conséquent étudié dans un deuxième temps les propriétés des mitochondries musculaires *in situ* chez 7 patients avec une SLAS à un stade précoce de la maladie (durée moyenne d'évolution: 9 mois; score ALSFRS moyen: 40), chez ces mêmes 7 patients 3 mois plus tard (durée moyenne d'évolution: 12 mois; score ALSFRS moyen: 35), et chez 7 sujets normaux appariés pour l'âge, le sexe et le niveau d'activité physique (Echaniz-Laguna 2006). Là encore, les patients avec une SLAS ne présentaient ni insuffisance respiratoire, ni perte de poids significative, et les biopsies ont toutes été réalisées au niveau du muscle *vastus lateralis* gauche. Il convient par ailleurs de noter que les patients étaient traités lors de la deuxième biopsie avec du riluzole, molécule capable d'induire des modifications du fonctionnement mitochondrial *in vitro*. Nous avons observé une augmentation significative de la VMAX et une diminution significative du niveau d'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale lors de la deuxième biopsie chez les patients avec une SLAS par rapport à la première biopsie chez ces mêmes patients 3 mois plus tôt. Ces résultats suggèrent qu'il existe donc bien une altération progressive de la fonction mitochondriale dans le muscle squelettique dans la SLAS au fur et à mesure que la maladie progresse. Néanmoins, dans la mesure où ces anomalies mitochondriales ne sont pas présentes aux stades précoces de l'affection et qu'elles n'apparaissent qu'assez tardivement, il apparaît comme très probable qu'elles ne soient pas spécifiques de la SLAS et qu'elles résultent de la dénervation musculaire progressive observée dans cette affection. Ces résultats tendent à montrer qu'un dysfonctionnement mitochondrial musculaire n'est pas un élément physiopathologique central de la SLAS.

SLA sporadique, muscle et mitochondries: synthèse

Au total, les données obtenues jusqu'à présent dans le domaine de la respiration mitochondriale dans le muscle squelettique dans la SLAS apparaissent à première vue contradictoires. Cette variabilité extrême des observations résulte en très grande partie de nombreux biais jouant sur la respiration mitochondriale et difficiles à contrôler dans une étude incluant des patients le plus souvent hétérogènes en termes de durée d'évolution de la maladie, de niveau d'activité physique, de perte de poids, d'insuffisance respiratoire, d'intensité et d'étendue de la dénervation, de traitement par riluzole et de muscle biopsié. Néanmoins, au fur et à mesure que des études méthodologiquement correctes sont publiées, il apparaît de plus en plus clairement que, contrairement à ce qui peut être observé dans la SOD1-SLA, un dysfonctionnement mitochondrial dans le muscle n'est pas un élément physiopathologique central dans la SLAS chez l'homme au stade précoce de la maladie.

Publication n°1

Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients

**A Echaniz-Laguna, J Zoll, F Ribera, C Tranchant, JM Warter, J Lonsdorfer
& E Lampert**

Ann Neurol 2002; 52:623-627

Publication n°2

Mitochondrial function in skeletal muscle of ALS patients is progressively altered as the disease develops: a temporal study in man

A Echaniz-Laguna, J Zoll, E Ponsot, B N'Guessan, C Tranchant, JP Loeffler & E Lampert.

Exp Neurol 2006; 198:25-30.

Annexe

Commentaire sur la publication n°2

Is ALS a systemic disorder? Evidence from muscle mitochondria

Stanley H Appel.

Exp Neurol 2006; 198:1-3.

SLA et réticulons

1. SLA et réticulons: le contexte

Le diagnostic de SLAS ne peut être actuellement posé que sur des arguments cliniques. En effet, un patient doit obligatoirement présenter des signes d'atteinte du motoneurone spinal (amyotrophie, fasciculations, atrophie neurogène à l'EMG) et des signes d'atteinte du neurone moteur cortical (hyper-réflexie ostéo-tendineuse, spasticité, signe de Babinski) pour que le diagnostic définitif de SLAS puisse être posé. Il n'existe actuellement aucun marqueur, biologique ou autre, spécifique de cette affection. Plusieurs études récentes semblent néanmoins indiquer que le niveau d'expression du gène NogoA dans le muscle pourrait constituer un marqueur diagnostique de la maladie.

2. SLA et réticulons: données de la littérature

Le gène NogoA, aussi appelée RTN4A, appartient à la famille des gènes dits «réticulons» (RTNs), qui comprend trois autres gènes : RTN1, RTN2 et RTN3 (Brittis, Oertle). Chacun de ces gènes est l'objet d'un épissage alternatif qui est à l'origine de plusieurs isoformes protéiques. Ainsi, le gène NogoA peut être exprimé sous la forme de trois transcrits : RTN4A (NogoA), RTN4B (NogoB) et RTN4C (NogoC) (Brittis, Oertle). NogoA est exprimé dans les oligodendrocytes, certaines populations neuronales, le cœur et le testicule (Brittis, Oertle). Par contre, NogoA n'est exprimé dans le muscle squelettique qu'au stade embryonnaire et post-natal précoce, alors que NogoC est exprimé dans le muscle squelettique adulte (Magnusson). Sur le plan cellulaire, les RTNs sont localisés au niveau de la membrane du reticulum endoplasmique (RE) (Oertle). La protéine NogoA est également retrouvée dans l'appareil de Golgi et, en petites quantités, dans la membrane plasmique des oligodendrocytes et des fibroblastes (Oertle). Les RTNs sont des protéines trans-membranaires avec deux domaines trans-membranaires putatifs qui leur permettent vraisemblablement de prendre deux conformations trans-membranaires différentes, à deux ou trois domaines intra-membranaires (Oertle). L'expression de NogoA semble être réprimée dans certains neurones et dans le muscle squelettique après la différenciation cellulaire (Oertle). La dé-différenciation des cellules musculaires, par exemple après dénervation, semble conduire à une répression de l'expression de NogoC et à une sur-expression de NogoA (Dupuis 2002, Magnusson). Cette sur-expression de NogoA ne serait retrouvée que dans la dénervation consécutive à une SLA, alors qu'elle ne serait pas retrouvée dans la dénervation consécutive à une polyneuropathie ou

à une myopathie (Dupuis 2002). La fonction exacte des RTNs n'est pas connue. Il a été suggéré que ces protéines pourraient jouer le rôle de transporteurs dans le RE et dans l'appareil de Golgi, mais également qu'elles pourraient être impliquées dans la stabilisation structurale de l'ER et dans la division cellulaire (Oertle). NogoA est un puissant inhibiteur de la croissance du neurite et constitue un régulateur négatif fondamental des phénomènes de plasticité et de régénérescence du système nerveux central (Oertle).

Par northern-blot, il a été montré qu'il existe des variations de l'expression des trois isoformes de Nogo dans la moelle épinière lombaire de souris avec la mutation G86R de la SOD1 au cours du développement de la SLA (Dupuis 2002). Il a également été montré que Nogo était exprimé dans le muscle squelettique avec, chez les souris G86R, une expression ectopique de l'isoforme A et une répression de l'isoforme C sans que le niveau de l'isoforme B soit modifié. Comme l'ont montré les expériences d'axotomie, cette répression de l'expression de l'isoforme C est le reflet de l'état de dénervation des muscles alors que l'expression ectopique de NogoA semble spécifique à la SLA (Dupuis 2002). L'étude de l'expression de Nogo dans des biopsies musculaires d'individus sains, de patients atteints de SLA, de patients souffrant de polyneuropathies ou d'autres maladies musculaires a permis de montrer que le profil global d'expression de Nogo observé chez les souris G86R est retrouvé spécifiquement chez les patients atteints de SLA (Dupuis 2002). Ces observations ont permis de proposer l'étude de l'expression de Nogo, et tout particulièrement de NogoA, dans les biopsies musculaires comme marqueur diagnostique précoce de la SLA (Dupuis 2002).

2. SLA et réticulons: travaux personnels

2.1. Etude de l'expression du gène NogoA dans le muscle squelettique de patients avec une atteinte isolée du motoneurone spinal

En pratique quotidienne, certains patients présentant une atteinte isolée du motoneurone spinal (amyotrophie, fasciculations, crampes, atrophie neurogène à l'EMG) d'origine inexplicée posent un défi diagnostique particulièrement ardu. En effet, bien que ces patients soient très fortement suspects de souffrir d'une SLAS débutante, le diagnostic définitif ne peut être posé en l'absence de signes d'atteinte du neurone moteur cortical. Il faut quelquefois attendre plusieurs mois avant que cette atteinte n'apparaisse, retardant d'autant le diagnostic et l'instauration du traitement par riluzole. Dans ce contexte, il serait intéressant de disposer d'un test qui permette de poser précocement le diagnostic de SLAS chez ces patients.

Nous avons étudié par western blot (WB) le pattern d'expression du gène Nogo dans le muscle squelettique de six patients qui présentaient cliniquement une atteinte isolée du motoneurone spinal afin de déterminer si l'expression du gène NogoA dans le muscle de ces patients était un facteur prédictif d'évolution vers une SLAS. Les caractéristiques cliniques et les résultats des examens complémentaires de ces patients sont résumés dans le **Tableau 6**. Sur les six patients étudiés, cinq ne présentaient pas de bande NogoA et un seul présentait une bande NogoA de 250 kD au WB. Le bilan de réévaluation clinique et paraclinique réalisé 3 à 12 mois après le bilan initial nous a permis de corriger un certain nombre de diagnostics et nous a permis de poser le diagnostic de SLAS chez un seul patient, qui était justement celui qui exprimait NogoA dans le muscle squelettique (**Tableau 7**). Ces résultats suggèrent que l'expression de NogoA dans le muscle squelettique pourrait constituer un marqueur diagnostique de la SLAS à un stade précoce de la maladie, lorsque le tableau clinique n'est pas encore complet. Néanmoins, les données présentées ici ne portent que sur une population de patients extrêmement réduite et leur valeur statistique est faible. Ces résultats se doivent maintenant d'être confirmés sur une plus large série de patients.

2.2. Etude de l'expression du gène NogoA dans le muscle squelettique de patients avec une SLAS (publication n°3)

Nous avons également participé à un travail de recherche visant à mettre en évidence une corrélation entre les niveaux d'expression des isoformes de Nogo dans le muscle et l'état d'avancement de la SLAS humaine. Cette étude de l'expression de Nogo par WB a été réalisée au niveau de biopsies musculaires chez 15 patients avec une SLAS et a montré que les niveaux protéiques de NogoA et NogoB étaient corrélés à l'état fonctionnel du patient, mesuré par l'intermédiaire de l'échelle ALSFRS, ainsi qu'à la surface transversale des fibres oxydatives atrophiques des patients (Jokic). Ces résultats suggèrent que le niveau d'expression de NogoA et NogoB constitue un marqueur moléculaire de sévérité de la maladie.

TABLEAU 6: caractéristiques cliniques et résultats des examens complémentaires chez 6 patients avec une atteinte isolée du motoneurone spinal.

Patients	Signes d'atteinte MNP	Signes d'atteinte NMC	Durée d'évolution (mois)	EMG	IRM et LCR	Etude génétique SMN1 SMN2 RA	Biopsie Musculaire
Patient 1	+	-	96	Neurogène	N	N	Neurogène
Patient 2	+	-	72	Neurogène/ Myogène	N	N	N
Patient 3	+	-	6	Neurogène	N	N	Neurogène
Patient 4	+	-	36	Neurogène	ND	N	Neurogène
Patient 5	+	-	120	Neurogène/ Myogène	ND	N	Neurogène
Patient 6	+	-	12	Neurogène	ND	N	Neurogène

EMG: électromyogramme

IRM : imagerie par résonance magnétique

LCR : liquide céphalo-rachidien

N : normal

ND : non documenté

MNP: motoneurone périphérique

NMC: neurone moteur central

RA : récepteur aux androgènes

SMN1, SMN2 : *survival of motor neuron gene 1 & 2*

- : absence

+ : présence.

TABLEAU 7: résultats du western blot, diagnostics initiaux et diagnostics finaux.

Patients	Présence de la bande NogoA au western blot musculaire	Diagnostic au moment de la biopsie musculaire	Evolution	Diagnostic 3 à 12 mois plus tard
Patient 1	-	AMP	Décès	AMP
Patient 2	-	AMP	Stable	AMP
Patient 3	+	AMP	Apparition signes d'atteinte du NMC	SLAS
Patient 4	-	AMP	Anomalies LCR et IRM médullaire	Myélopathie
Patient 5	-	AMP	Deuxième biopsie musculaire: inclusions	Myosite à inclusions
Patient 6	-	AMP	Anomalies LCR, VCS et VCM	CIDP

AMP : atrophie musculaire progressive

CIDP : *chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy* (polyradiculonévrite chronique)

IRM : imagerie par résonance magnétique

LCR : liquide céphalo-rachidien

NMC: neurone moteur central

VCM : vitesses de conduction motrices

VCS : vitesses de conduction sensitives

- : absence

+ : présence

SLA et réticulons: synthèse

Au total, plusieurs études suggèrent que le niveau d'expression du gène NogoA dans le muscle squelettique pourrait constituer non seulement un marqueur diagnostique précoce de la SLAS, mais également un marqueur de sévérité de l'affection. Ces résultats doivent néanmoins être maintenant confirmés sur de plus larges séries de patients.

Publication n°3

Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity

N Jokic, JL Gonzalez de Aguilar, PF Pradat, L Dupuis, **A Echaniz-Laguna**,
A Muller, O Dubourg, D Seilhan, JJ Hauw, JP Loeffler & V Meininger

Ann Neurol 2005; 57:553-556.

Conclusions et Perspectives

1. Conclusions

1.1. La SLAS n'est pas une maladie mitochondriale.

Nos travaux ont démontré qu'il existe bien une altération progressive de la fonction mitochondriale dans le muscle squelettique dans la SLAS (Echaniz-Laguna 2002, Echaniz-Laguna 2006). Néanmoins, ces anomalies mitochondriales ne sont pas présentes aux stades précoces de l'affection et n'apparaissent que tardivement, suggérant ainsi qu'elles ne sont pas spécifiques de la SLAS et qu'elles résultent plutôt de la dénervation musculaire progressive observée dans cette affection (Echaniz-Laguna 2002, Echaniz-Laguna 2006). Notre hypothèse a récemment été confirmée par un groupe de recherche allemand qui a démontré, en étudiant un groupe de patients avec une SLAS et un groupe de patients avec une atteinte musculaire neurogène non-liée à une SLA, que les anomalies mitochondriales musculaires observées dans la SLAS étaient non seulement minimales, mais en outre non spécifiques puisque liées à la dénervation (Krasnianski). L'ensemble de ces données suggère qu'un dysfonctionnement mitochondrial musculaire n'est pas un élément physiopathologique pertinent dans la SLAS chez l'homme au stade précoce de la maladie, contrairement à ce qui a pu être observé dans la SOD1-SLA. Ces résultats confirment donc que la SLAS n'est pas une affection mitochondriale.

1.2. NogoA est un marqueur biologique de la SLAS.

Les travaux auxquels nous avons participé confirment l'intérêt de l'étude de l'expression du gène NogoA dans le muscle squelettique dans la SLAS chez l'homme en tant que marqueur diagnostique spécifique et précoce de la maladie. Ces études montrent également que Nogo est un marqueur de sévérité de la maladie. Ces résultats doivent néanmoins être maintenant confirmés sur de plus larges séries de patients.

2. Perspectives

Les travaux que j'ai engagés dans ce travail de thèse se poursuivent actuellement au sein de l'unité INSERM U692. Ces travaux sont toujours centrés sur l'étude du métabolisme énergétique et sur l'étude de l'expression du gène Nogo dans la SLA.

2.1. Homéostasie énergétique, affections neurodégénératives et SLA

L'homéostasie énergétique est une fonction très finement coordonnée de tous les organismes. Tout un système complexe de signaux hormonaux, endocriniens et nerveux contrôle l'homéostasie énergétique d'un organisme entier par l'intermédiaire d'une régulation hautement organisée de l'apport (alimentation) et de la consommation des nutriments. De nouveaux effecteurs régulant ces fonctions d'homéostasie énergétique sont régulièrement découverts depuis plusieurs années. Néanmoins, alors même que les défauts de l'homéostasie énergétique sont étudiés de longue date dans des pathologies telles que l'obésité et l'athérosclérose, ces anomalies ont longtemps été considérées comme ne faisant pas partie du champ d'investigation des affections neurodégénératives. Il apparaît cependant de manière de plus en plus claire que les affections dégénératives du système nerveux central sont effectivement associées à des défauts de l'homéostasie énergétique. Ainsi, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington sont souvent associées à une insulino-résistance et à un diabète de type 2 (Sandyk, Podolski). Plus récemment, cette association a été retrouvée dans la maladie d'Alzheimer (Janson). Par ailleurs, il est connu depuis plusieurs années que le métabolisme de base est augmenté dans la maladie de Huntington, dans la SLA et très vraisemblablement également dans la maladie de Parkinson (Pratley, Desport, Chen).

L'étude des modèles animaux d'affections neurodégénératives a permis de mettre en évidence des anomalies métaboliques similaires à celles observées chez l'homme. Ainsi, les modèles murins de maladie de Huntington présentent un diabète et une lipodystrophie (Hurlbert, Andreassen, Fain). Par ailleurs, il a récemment été observé que l'induction d'un diabète chez des modèles murins de maladie d'Alzheimer augmentait le nombre de dépôts de plaques amyloïdes et aggravait les déficits cognitifs de ces animaux. De même, la restriction calorique et un traitement par agents hypolipémiants améliorent les symptômes cognitifs de ces modèles murins de maladie d'Alzheimer (Zhu, Cao, Hutter-Paier, Refolo). Dans le même

registre, la restriction calorique atténue les anomalies cliniques et biochimiques observées dans un modèle de singe parkinsonien (Maswood). L'ensemble de ces données suggère que des anomalies de l'homéostasie énergétique sont associées aux affections neurodégénératives les plus fréquentes et contribuent peut-être également à leur physiopathologie. Il est néanmoins difficile de dire actuellement si ces anomalies métaboliques suffisent à elles seules à provoquer une neurodégénérescence.

Les modèles murins de SLA, à savoir les souris SOD1-G86R et les souris SOD1-G93A, présentent une masse corporelle réduite et une très nette diminution de la masse grasseuse en comparaison avec des souris sauvages. Ces souris présentent également une altération des taux d'insuline et de corticostérone qui révèlent un déficit métabolique et une mobilisation accrue des stocks énergétiques corporels. Il est intéressant de noter que ces anomalies apparaissent bien avant l'apparition de symptômes moteurs. Malgré une masse corporelle réduite, les souris SLA-SOD1 consomment autant de nutriments, si ce n'est plus, que les souris sauvages, excluant ainsi l'hypothèse d'un hypermétabolisme consécutif à une diminution des apports énergétiques. Ces animaux ont en outre une consommation accrue d'oxygène au repos (Dupuis, 2004). Une étude détaillée du métabolisme lipidique chez ces animaux révèle une lipolyse augmentée, une diminution musculaire de l'expression des gènes impliqués dans le stockage des acides gras et une oxydation accrue des acides gras (Dupuis 2004). Les souris SOD1-SLA consomment en outre le glucose plus rapidement que les souris sauvages, elles incorporent plus facilement les sucres dans le tissu adipeux blanc et dans le muscle squelettique, et elles présentent enfin une surexpression musculaire des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres et des lipides (Dupuis, 2004). On observe également chez ces animaux une surexpression des protéines découplantes UCP (*uncoupling proteins*), et en particulier une surexpression de la protéine UCP3 (Dupuis 2003). Enfin, un régime riche en graisses allonge l'espérance de vie de ces animaux d'environ 20% (Dupuis 2004). L'ensemble de ces données indique non seulement que la souris SOD1-SLA souffre d'un hypermétabolisme d'origine essentiellement musculaire, mais suggère en outre que ce défaut énergétique joue sur la survie des motoneurones.

Dans ce contexte, nous allons poursuivre notre travail de recherche sur la fonction mitochondriale et sur le métabolisme énergétique musculaire dans la SLA, mais cette fois-ci dans des modèles murins de SOD1-SLA et non plus sur l'homme. Dans la continuité de nos travaux sur le fonctionnement mitochondrial dans le muscle chez les patients SLA, nous avons entrepris, sous la direction de Luc Dupuis, de poursuivre plus loin l'exploration des anomalies métaboliques observées dans cette affection. Nous avons acquis dans le laboratoire

une lignée de souris surexprimant la protéine UCP1 uniquement dans le muscle squelettique (souris MCK UCP1) et nous allons tenter de déterminer si cette surexpression musculaire d'UCP1 induit chez ces animaux une dégénérescence des motoneurones. **Le but ultime de ce travail est de déterminer si un hypermétabolisme musculaire est susceptible d'induire une dégénérescence rétrograde des motoneurones et de prouver ainsi que des anomalies métaboliques peuvent effectivement provoquer une affection neurodégénérative.**

2.2. Expression de Nogo dans le muscle squelettique dans la SLA, dans les atteintes isolées du motoneurone spinal et dans la SLA associée à une démence fronto-temporale (SLA-DFT)

Expression de Nogo dans le muscle squelettique dans la SLA. Nous allons continuer notre travail de validation de l'expression musculaire du gène Nogo en tant que marqueur diagnostique de la SLA. Ce travail est en cours de réalisation au sein de l'unité INSERM U-692 sous la direction de J.P. Loeffler et J.L. Gonzalez de Aguilar, en collaboration avec le Département de Neurologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Strasbourg (Pr C. Tranchant) et en collaboration avec le Service de Neurologie de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière à Paris (Pr V. Meininger). Notre but est de pouvoir obtenir un prélèvement musculaire chez au moins une centaine de patients souffrant de SLA et chez des sujets sains contrôles afin de pouvoir déterminer la sensibilité et la spécificité de l'expression musculaire de Nogo dans ces différents groupes. **Le but ultime de ce travail est de déterminer si l'étude de l'expression du gène Nogo dans le muscle squelettique est un test diagnostique fiable utilisable en pratique clinique.**

Expression de Nogo dans le muscle squelettique dans les atteintes isolées du motoneurone spinal. Le travail que nous avons réalisé suggère que l'expression de NogoA dans le muscle squelettique pourrait constituer un marqueur diagnostique de la SLAS à un stade précoce de la maladie, lorsque le tableau clinique n'est pas encore complet. Nous avons donc prévu de réaliser une biopsie musculaire chez d'autres patients avec une atteinte isolée du motoneurone spinal. **Le but de cette étude est de déterminer de manière statistiquement fiable si l'expression musculaire de NogoA est effectivement un facteur prédictif permettant de déterminer de manière précoce quels patients avec une atteinte isolée du motoneurone spinal vont développer une SLA.**

Expression de Nogo dans le muscle squelettique dans la SLA associée à une démence fronto-temporale (SLA-DFT). La SLA associée à une démence fronto-temporale (SLA-DFT) est une démence non-alzheimerienne caractérisée par une dégénérescence fronto-temporale et une atteinte des motoneurons spinaux et corticaux. Sur le plan neuropathologique, ce groupe d'affections se caractérise par des inclusions intraneuronales ubiquitine-positives, tau-négatives et alpha-synucléine-négatives ainsi que par des neurites dystrophiques (Yoshida, Neary). Le tableau clinique est extrêmement variable, allant de la SLA-DFT typique à la SLA atypique associée à une DFT, en passant par la SLA typique associée à de discrets signes cliniques d'atteinte fronto-temporale sans véritable démence (Yoshida). Certaines formes familiales de SLA-DFT ont été associées à des altérations de la séquence du gène *DCTN1* (Munch 2005) et à des mutations du gène *MAPT* (Zarranz 2005). Par ailleurs, un certain nombre de patients avec une SLA développent au cours de l'évolution de leur maladie une DFT. A l'inverse, certains patients avec une DFT développent après plusieurs années d'évolution de leur maladie une SLA. Pour finir, certains patients avec une DFT ont des antécédents familiaux de SLA, alors que d'autres patients avec une SLA ont des antécédents familiaux de DFT (Munch 2005, Zarranz 2005, Yoshida, Neary). Dans ce contexte, il est actuellement extrêmement difficile de dire si la SLA, la DFT et la SLA-DFT sont une même affection à spectre clinique et neuropathologique large ou bien s'il s'agit de 3 maladies différentes. Pour tenter de répondre, du moins en partie, à cette question, nous allons étudier l'expression de Nogo sur des prélèvements musculaires de patients avec une SLA, avec une SLA-DFT et avec une DFT seule. Ce travail est réalisé sous la direction de J.L. Gonzalez de Aguilar et de J.-P. Loeffler (INSERM U692), en collaboration avec le Pr Christine Tranchant (Département de Neurologie, CHU, Strasbourg), le Dr François Sellal (Département de Neurologie, CHU, Strasbourg) et le Pr Vincent Meininger (Département de Neurologie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris). **Le but de ce travail est de déterminer le pattern d'expression musculaire du gène Nogo dans la SLA-DFT et dans la DFT et de comparer ce pattern à celui observé dans la SLA. L'analyse de ce pattern d'expression musculaire de Nogo nous donnera peut-être une indication quand aux relations nosologiques existant entre la SLA, la SLA-DFT et la DFT.**

2.3. Développement de techniques électrophysiologiques chez la souris

Outre ces travaux de recherche, je développe actuellement au sein de l'unité INSERM U692 plusieurs techniques d'électrophysiologie sur la souris, dont la mesure des vitesses de conduction motrices, la mesure des vitesses de conduction sensibles, l'électromyographie, mais également des techniques de stimulation répétitive d'un nerf périphérique. J'ai pu mettre au point ces techniques après un stage de formation à l'Institut Clinique de la Souris de Strasbourg (Pr Pierre Chambon). **Ces techniques sont un outil précieux d'exploration fonctionnelle du système nerveux périphérique de modèles murins d'affections neuromusculaires utilisés en routine dans notre équipe, comme par exemple les souris SLA-SOD1 et les souris MCK UCP1.**

Références bibliographiques

Adams RD, Victor M, Ropper AH. Principles of Neurology, 6th Edition, p1089-1097. McGraw-Hill, New-York, 1997.

Afifi AK, Aleu FP, Goodgold J et al. Ultrastructure of atrophic muscle in ALS. Neurology 1966;16:475-481.

Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P et al. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in ALS. Hum Mol Gen 1999;8:157-164.

Almer G, Guegan C, Teismann P et al. Increased expression of the pro-inflammatory enzyme COX2 in ALS. Ann Neurol 2001; 49:176-185.

Almer G, Teismann P, Stevic Z et al. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. Neurology 2002;58:1277-1279.

Allen S, Heath PR, Kirby J et al. Analysis of the cytosolic proteome in a cell culture model of FALS reveals alterations to the proteasome, antioxidant defenses, and nitric oxide synthetic pathways. J Biol Chem 2003;278 :6371-6383.

Andersen PM, Forsgren L, Binzer M et al. Autosomal recessive adult-onset ALS associated with homozygosity for Asp90Ala SOD1 mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. Brain 1996;119:1153-1172.

Andreassen OA, Dedeoglu A, Stanojevic V, et al. Huntington's disease of the endocrine pancreas: insulin deficiency and diabetes mellitus due to impaired insulin gene secretion. Neurobiol Dis 2002; 11:410-424.

Armon C, Kurland LT, Daube JR et al. Epidemiologic correlates of sporadic ALS. Neurology 1991;41:1077-1084.

Atsumi T, Miyatake T. Morphometry of the degenerative process in the hypoglossal nerves in ALS. Acta Neuropathol (Berl) 1987;73:25-31.

Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse model of ALS. *Nature* 2004;429:413-417.

Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 2005;58:495-505.

Beal MF. Mitochondria and the pathogenesis of ALS. *Brain* 2000;123:1291-1292.

Beckmann JS, Carson M, Smith CD et al. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 1993;364:584.

Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V et al. A controlled trial of riluzole in ALS. ALS/riluzole study group. *N Engl J Med* 1994;330:585-591.

Berger MM, Kopp N, Vital C et al. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology* 2000;54:20-25.

Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP. Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. *J Cell Biol* 1999;147:531-544.

Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG et al. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann Neurol* 1999; 46:787-790.

Bradley LJ, Muddle JR, Taanman JW et al. Investigation of intercellular differences of mitochondrial protein expression in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2003; 4 (supp 1):87-88.

Brittis PA, Flanagan J. Nogo domains and a Nogo receptor: implications for axon regeneration. *Neuron* 2001; 30:11-14.

Brujin LI, Houseweart MK, Kato S et al. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 1998; 281:1851-1854.

Bruijn LI, Becher MW, Lee MK et al. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 1997;18:327-338.

Cao D, Fukuchi KI, Wan H, et al. Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2006; sous presse.

Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E et al. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci* 1999;169:13-21.

Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile ALS (ALS4). *Am J Hum Genet* 2004 ;74 :1128-1135.

Chen H, Zhang SM, Hernan MA, et al. Weight loss in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53:676-679.

Chio A, Benzi G, Dossena M. Severely increased risk of ALS among Italian professional football players. *Brain* 2005 ;128 :472-476.

Culotta VC, Klomp LW, Strain J et al. The copper chaperone for SOD1. *J Biol Chem* 1997; 272:23469-23472.

Corcia P, Mayeux-Portas V, Khoris J et al. Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2002; 51:243-246.

Curti D, Malaspina A, Facchetti G et al. Amyotrophic lateral sclerosis: oxidative energy metabolism and calcium homeostasis in peripheral blood lymphocytes. *Neurology* 1996;47:1060-1064.

Damiano M, Starkov AA, Petri S et al. Early impairment of neuronal mitochondrial Ca²⁺ capacity in SOD1 mutant mice. *J Biol Chem*; sous presse.

Delbart C. Les mitochondries: biologie et incidences physiopathologiques. Editions TEC & DOC, Londres-Paris-New York, 2000.

Deng HX, Hentati A, Tainer JA et al. ALS and structural defects in Cu/Zn SOD. *Science* 1993; 261:1047-1051.

Desport JC, Preux PM, Magy L et al. Factors correlated with hypermetabolism in patients with ALS. *Am J Clin Nutr* 2001;74:328-334.

Devos D, Moreau C, Lassalle P et al. Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients. *Neurology* 2004; 62:2127-2129.

Dimauro S, Gurgel-Giannetti J. The expanding phenotype of mitochondrial myopathy. *Curr Opin Neurol* 2005;18:538-542.

Dimauro S, Hirano M. Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromusc Disord* 2005; 15:276-286.

Dimauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005; 37:222-232.

Dupuis L, di Scala F, Rene F et al. Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.* 2003 ; 17:2091-2093.

Dupuis L, Oudart H, Rene F et al. Evidence for defective energy homeostasis in ALS: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101,11159-11164.

Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, di Scala F et al. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Disease* 2002; 10:358-365.

Echaniz-Laguna A, Rousso E, Anheim M et al. L'amyotrophie bulbaire et spinale liée au chromosome X : une étude clinique, neurophysiologique et moléculaire de 12 patients issus de 4 familles. *Rev. Neurol. (Paris)* 2005 ; 161:437-444.

Echaniz-Laguna A, Rousso E, Anheim M et al. A family with early-onset and rapidly progressive X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology* 2005 ; 64 :1458-1460.

Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D et al. The promoters of the survival motor neuron gene (SMN1) and its copy (SMN2) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet* 1999 ; 64 :1365-1370.

Echaniz-Laguna A, Guiraud-Chaumeil C, Tranchant C et al. Homozygous exon 7 deletion of the SMN centromeric gene (SMN2): a potential susceptibility factor for adult-onset lower motor neuron disease. *J Neurol* 2002 ; 249:290-293.

Echaniz-Laguna A, Degos B, Mohr M et al. A study of 3 patients with amyotrophic lateral sclerosis and a polyneuropathy resembling chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve* 2006 ; 33:356-362.

Echaniz-Laguna A, Zoll J, Ribera F et al. Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients. *Ann Neurol* 2002; 52, 623-627.

Echaniz-Laguna A, Zoll J, Ribera F et al. Is there mitochondrial dysfunction in ALS muscle? Reply. *Ann Neurol* 2003; 53:687-688.

Echaniz-Laguna, Zoll J, Ponsot E et al. Mitochondrial function in skeletal muscle of ALS patients is progressively altered as the disease develops : a temporal study in man. *Exp Neurol* 2006 ; 198:25-30.

Fain JN, Del Mar NA, Meade CA, et al. Abnormalities in the functioning of adipocytes from R6/2 mice that are transgenic for the Huntington's disease mutation. *Hum Mol Genet* 2001; 10:145-152.

Figlewitz DA, Krizus A, Martinoli MG et al. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of ALS. *Hum Mol Genet* 1994 ;3 :1757-1761.

Gajewski CD, Lin MT, Cudkowicz ME et al. Mitochondrial DNA from platelets of sporadic ALS patients restores normal respiratory functions in rho(0) cells. *Exp Neurol* 2003;179:229-235.

Giagheddu M, Puggioni G, Masala C et al. Epidemiologic study of ALS in Sardinia, Italy. *Acta Neurol Scand* 1983;68:394-404.

Gonzalez de Aguilar J, Dupuis L, Oudart H et al. The metabolic hypothesis in ALS: insights from mutant SOD1 mice. *Biomed Pharmacotherapy* 2005; 59:190-196.

Granieri E, Carreras M, Tola R et al. Motor neuron disease in the province of Ferrara, Italy, in 1964-1982. *Neurology* 1988;38:1604-1608.

Gray MW et al. Mitochondrial evolution. *Science* 1999; 283:1476.

Gunther MR, Vangilder R, Fang J et al. Expression of a familial ALS-associated mutant human SOD1 in yeast leads to decreased mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 2004;231:207-214.

Hand CK, Rouleau GA. Familial ALS. *Muscle Nerve* 2002;25 :135-159.

Henriksson J, Reitman JS. Time course of changes in human skeletal muscle succinate dehydrogenase and cytochrome oxydase activities and maximal oxygen uptake with physical activity and inactivity. *Acta Physiol Scand* 1977;99:91-97.

Hervias I, Beal MF, Manfredi G. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Muscle Nerve* 2006; sous presse.

Higgins CM, Jung C, Xu Z. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* 2003;4:16.

Hirano A, Nakano I, Kurland LT et al. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984;43:471-480.

Hirano A, Nakano I, Kurland LT et al. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984;43:471-480.

Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 1984;56:831-838.

Holloszy JO. Biochemical adaptation in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1967; 242:2278-2282.

Hoppeler H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 1986;7:187-204.

Hugon J, Vallat JM, Spencer PS et al. Kainic acid induces early and delayed degenerative neuronal changes in rat spinal cord. *Neurosci Lett* 1989;104:258-262.

Hurlbert MS, Zhou W, Wasmeier C, et al. Mice transgenic for an expanded CAG repeat in the Huntington's disease gene develop diabetes. *Diabetes* 1999; 48:649-651.

Hutter-Paier B, Huttunen HJ, Puglielli L, et al. The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 2004; 44:227-238.

Jaarsma D, Rognoni f, van Duijn W et al. SOD1 accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing ALS-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;102:293-305.

Janson J, Laedtke T, Parisi JE et al. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 2004; 53:474-481.

Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Pradat PF et al. Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* 2005 ; 57 :553-556.

Julien J, Leparc-Goffart I, Lina B et al. Postpolio syndrome: poliovirus persistence is involved in the pathogenesis. *J Neurol* 1999;246:472-476.

Jung C, Higgins CM, Xu Z; Measuring the quantity and activity of mitochondrial electron transport chain complexes in tissues of central nervous system using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 2000;286:214-223.

Karpati G, Klassen G, Tanser P. The effects of partial chronic denervation on forearm metabolism. *Can J Neurol Sci* 1979;6:105-112.

Kaspar BK, Llado J, Sherkat N et al. Retrograde viral delivery of IGF1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 2003;301:839-842.

Kato S, Horiuchi S, Liu J et al. Advanced glycation endproduct-modified SOD1-positive inclusions are common to FALS patients with SOD1 mutations and transgenic mice expressing human SOD1 with a G85R mutation. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000;100:490-505.

Karp G. La respiration aérobie et la mitochondrie. *Biologie cellulaire et moléculaire*, p183-211. Editions De Boeck, Paris, 2004.

Kawahara Y, Ito K, Sun H et al. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 2004;427:801.

Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Medicine* 1999;5:347-350.

Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S et al. Mitochondrial changes in skeletal muscle in ALS and other neurogenic atrophies. *Brain* 2005;128:1870-1876.

Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN. A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. ALS/Riluzole study group II. *Neurology* 1996;47:S242-S250.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M et al. VEGF is a modifier of ALS in mice and humans and protects against ischemic death. *Nat Genet* 2003; 34:383-294.

Larivière RC, Beaulieu JM, Nguyen MD et al. Peripherin is not a contributing factor to motor neuron disease in a mouse model of ALS caused by mutant SOD1. *Neurobiol Dis* 2003; 131:58-66.

La Spada A, Wilson EM, Lubahn DB et al. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991; 352:77-79.

Leclerc N, Ribera F, Zoll J et al. Selective changes in mitochondria respiratory properties in oxidative or glycolytic muscle fibers isolated from G93A human SOD1 transgenic mice. *Neuromusc Disord* 2001; 11:722-727.

Lee MK, Marszalek JR, Cleveland DW. A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron* 1994; 13:975-988.

Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995 ; 80:155-165.

Lin CL, Bristol LA, Jin L et al. Aberrant RNA processing in neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in ALS. *Neuron* 1998; 20:589-602.

Liu J, Lillo C, Jonsson PA et al. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* 2004;43:5-17.

MacGeer PL, McGeer EG. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2002;26:459-470.

MacGowan DJ, Scelsa SN, Waldron M. An ALS-like syndrome with new HIV infection and complete response to antiretroviral therapy. *Neurology* 2001;57:1094-1097.

Magnusson C, Libelius R, Tagerud S. Nogo (reticulon 4) expression in innervated and denervated mouse skeletal muscle. *Mol Cell Neuroscience* 2003; 22:298-307.

Masui Y, Mozai T, Kakehi K. Functional and morphometric study of the liver in motor neuron disease. *J Neurol* 1985;232:15-19.

Maswood N, Young J, Tilmont E, et al. Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioural deficits in a primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:18171-18176.

Mattiazzi M, d'Aurelio M, Gajewski CD et al. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria in transgenic mice. *J Biol Chem* 2002; 277:29626-29633.

Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R et al. Stem cell therapy in ALS: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2003;4:158-161.

Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW et al. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial ALS. *Brain* 2002; 125:1522-1533.

Mettauer B, Zoll J, Sanchez H et al. Oxidative capacity of skeletal muscle in heart failure: patients versus sedentary or active control subjects. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:947-954.

Meyer T, Schwan A, Dullinger JS et al. Early-onset ALS with long-term survival associated with spastin gene mutation. *Neurology* 2005;65:141-143.

Miller RG, Moore DH, Gelinas DF et al. Phase III randomized trial of gabapentin in patients with ALS. *Neurology* 2001;56:843-848.

Moreira MC, Klur S, Watanabe M et al. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nature Genetics* 2004; 36:225-227.

Moullignier A, Moulouguet A, Pialoux G et al. Reversible ALS-like disorder in HIV infection. *Neurology* 2001;57:995-1001.

Munch C, Sedlmeier R, Meyer T et al. Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology* 2004; 63:724-726.

Munch C, Rosenbohm A, Sperfeld AD et al. Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD. *Ann Neurol* 2005;58:777-780.

Nakano K, Hirayama K, Terao K. Hepatic ultrastructural changes and liver dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 1987;44:103-106.

Neary D, Snowden J, Mann D. Frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2005; 4:771-780.

Nelson LM, Matkin C, Longstreth WTJ et al. Population-based case-control study of ALS in western Washington state. II. Diet. *Am J Epidemiol* 2000; 151:164-173.

Nelson LM, McGuire V, Longstreth WTJ et al. Population-based case-control study of ALS in western Washington state. I. Cigarette smoking and alcohol consumption. *Am J Epidemiol* 2000; 151:156-163.

Nishimura AL, Mitne-Neto A, Silva HCA et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and ALS. *Am J Hum Genet* 2004;75:822-831.

Oertle T, Schwab ME. Nogo and its paRTNers. *Trends Cell Biology* 2003;13:187-194.

Okado-Matsumoto A, Fridovich I. ALS: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9010-9014.

Oosthuyse B, Moons L, Storkebaum E et al. Deletion of the hypoxia-response element in the VEGF promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001; 28:131-138.

Pasinelli P, Belford ME, Lennon N et al. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 2004;43:19-30.

Podolski S, Leopold NA, Sax DS. Increased frequency of diabetes mellitus in patients with Huntington's chorea. *Lancet* 1972; 1 (7765):1356-1358.

Pratley RE, Salbe AD, Ravussin E, et al. Higher sedentary energy expenditure in patients with Huntington's disease. *Ann Neurol* 2000; 47:64-70.

Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK et al. Motor neurons in SOD1 deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 1996;13:43-47.

Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, et al. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2001; 8:890-899.

Rembach A, Turner BJ, Bruce S et al. Antisense peptide nucleic acid targeting GluR3 delays disease onset and progression in the SOD1 G93A mouse model of FALS. *J Neurosci Res* 2004; 77:573-582.

Riviere M, Meininger V, Zeisser P et al. An analysis of extended survival in patients with ALS treated with riluzole. *Arch Neurol* 1998;55:526-528.

Ro LS, Lai SL, Chen CM et al. Deleted 4977-bp mitochondrial DNA mutation is associated with sporadic ALS: a hospital-based case-control study. *Muscle Nerve* 2003;28:737-743.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al. Mutations in Cu/Zn SOD gene are associated with FALS. *Nature* 1993; 362:59-62.

Rosati G, Pinna L, Granieri E et al. Studies on epidemiological, clinical, and etiological aspects of ALS disease in Sardinia, Italy. *Acta Neurol Scand* 1977;55 :231-244.

Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in ALS. *Ann Neurol* 1990;28:18-25.

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI et al. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in ALS. *Ann Neurol* 1995;38:73-84.

Rothstein JD, Patel S, Regan MR et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 2005;433:73-77.

Rowland LP. Diagnosis of ALS. *J Neurol Sci* 1998 ;160 (supplement 1) :S6-S24.

Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV et al. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem* 1998;184:81-100.

Sandyk R. The relationship between diabetes mellitus and Parkinson's disease. *Int J Neurosci* 1993; 69:125-130.

Sasaki S, Iwata M. Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 1996; 204:53-56.

Siciliano G, Pastorini E, Pasquali L et al. Impaired oxidative metabolism in exercising muscle from ALS patients. *J Neurol Sci* 2001;191:61-65.

Shinder GA, Lacourse MC, Minotti S et al. Mutant SOD1 proteins have altered solubility and interact with HSP in models of ALS. *J Biol Chem* 2001;276 :12791-12796.

Siklos L, Engelhardt J, Harati Y et al. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:203-216.

Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* 2005;8:85-92.

Strauss E. Can mitochondrial clocks keep time? *Science* 1999; 283:1435.

Swerdlow RH, Parks JK, Cassarino DS et al. Mitochondria in sporadic ALS. *Exp Neurol* 1998;153:135-142.

Takeuchi H, Kobayashi Y, Ishigaki S et al. Mitochondrial localization of mutant SOD1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial ALS. *J Biol Chem* 2002;277:50966-50972.

Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, et al. The diagnosis of mitochondrial muscle disease. *Neuromusc Disord* 2004; 14:237-245.

Tudor EL, Perikinton MS, Schmidt A et al. ALS2/alsin regulates Rac-PAK signaling and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 2005;41:34735-34740.

Van den Bosch L, Storkebaum E, Vleminckx V et al. Effects of VEGF on motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* 2004; 17:21-28.

Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG et al. Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue : a novel method of measurement by using saponin-skinned fibers. *Biochem Biophys Acta* 1987; 892:191-196.

Veldink JH, Kalmijn S, van der Hout AH et al. SMN genotypes producing less SMN protein increase susceptibility to and severity of sporadic ALS. *Neurology* 2005 ;65:820-825.

Vijayvergiya C, Beal MF, Buck J et al. Mutant SOD1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of ALS mice. *J Neurosci* 2005;25:2463-2470.

Vielhaber S, Winkler K, Kirches E et al. Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1999; 169: 133-139.

Vielhaber S, Kunz D, Winkler K et al. Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2000; 123:1339-1348

Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC et al. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in ALS neural tissues. *Neurobiol Dis* 2001;8:933-941.

Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S et al. Altered reactivity of SOD1 in FALS. *Science* 1996;271:515-518.

Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C et al. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem* 2002;80:616-625.

Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV et al. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1998;156:65-72.

Wong PC, Rothstein JD, Price DL. The genetic and molecular mechanisms of motor neuron disease. *Curr Opin Neurobiol* 1998 ; 8 :791-799.

World Federation of Neurology. El Escorial criteria for diagnosis of ALS. *J Neurol Sci* 1994 ; 124 (suppl) :96-107.

Yang Y, Hentati A, Deng HX et al. The gene encoding alsin, a protein with 3 guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive ALS. *Nat Genet* 2001;29 :160-165.

Yasojima K, Tourtelotte WW, McGeer EG et al. Marked increase in COX2 in ALS spinal cord: implications for therapy. *Neurology* 2001; 57:952-956.

Yoshida M. Amyotrophic lateral sclerosis with dementia : the clinicopathological spectrum. *Neuropathology* 2004; 24:87-102.

Zarranz JJ, Ferrer I, Lezcano E, et al. A novel mutation (K317M) in the MAPT gene causes FTDT and motor neuron disease. *Neurology* 2005; 64:1578-1585.

Zhu H, Guo Q, Mattson MP. Dietary restriction protects hippocampal neurons against the death-promoting action of a presenilin-1 mutation. *Brain res* 1999; 842:224-229.