

ÉCOLE DOCTORALE 414

Sciences de la vie et de la santé

INSERM U1118

THÈSE présentée par :

Laura ROBELIN

soutenue le : **15 décembre 2016**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Analyse de la composition en acides gras des lipides
dans la sclérose latérale amyotrophique : implications
dans le processus pathologique**

THÈSE dirigée par :

Mr. LOEFFLER Jean-Philippe

Directeur de Recherches INSERM,
Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr. COURATIER Philippe

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier,
Université de Limoges

Mr. OLIVIER Jean-Luc

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier,
Université de Nancy

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr. ZOLL Joffrey

Maître de Conférences - Praticien Hospitalier,
Université de Strasbourg

MEMBRES INVITES :

Mr. GONZALEZ DE AGUILAR José-Luis

Maître de Conférences, Université de Strasbourg

“It always seems impossible until it’s done”

-Nelson Mandela-

Remerciements

Cette thèse n'aurait pas été possible sans l'aide que j'ai reçue durant ces trois années. Je tiens à remercier les personnes suivantes.

En tout premier lieu, je souhaite remercier le **Dr. Jean-Philippe LOEFFLER** pour son accueil au sein du laboratoire et pour son aide dans toutes les étapes de ma thèse. Je lui fais part de toute ma gratitude pour son action à mon égard afin que ma thèse se déroule dans les meilleures conditions.

Je tiens également à remercier tout particulièrement le **Dr. José-Luis GONZALEZ DE AGUILAR**. Il aura su être un véritable guide dans cette délicate phase de « l'apprenti-chercheur ». Sa gentillesse, sa patience et sa motivation m'ont été d'une aide précieuse tout au long de ces 3 années, dans les bons moments, comme dans les instants de doute. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis d'aller au bout de ce travail doctoral.

Je remercie également Messieurs les membres du jury : le **Pr. Philippe COURATIER**, le **Dr. Jean-Luc OLIVIER** et le **Dr. Joffrey ZOLL** pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance envers les associations **AREMANE**, **ARSLA** et « **André combat la SLA** » ainsi que le consortium **EURO-MOTOR** pour m'avoir assuré un soutien financier me permettant de mener à bien mes travaux de recherche.

Je remercie également les **Dr. Pierre-François PRADAT** et **François SALACHAS** de Paris, les **Dr. Christian ANDRES** et **Philippe CORCIA** de Tours et les **Dr. Andoni ECHANIZ-LAGUNA** et **Marie-Céline FLEURY** de Strasbourg, ainsi que tout le personnel médical pour leur aide.

Je tiens à remercier aussi tous **les patients** ainsi que **leurs familles** pour leur engagement.

Je souhaite remercier les **Dr. Luc DUPUIS**, **Dr. Caroline ROUAUX** et **Dr. Frédérique RENE** pour leur aide, leurs commentaires et questions à chacune de mes présentations en réunion de laboratoire.

Je remercie également le **Dr. Martine BERGAENTZLE** et le **Pr. Eric MARCHIONI**, de la plateforme de chimie analytique des molécules bioactives à Illkirch, pour son aide dans l'analyse des chromatographies gazeuses.

Merci au **Dr. Alexandre HENRIQUES**, pour son soutien, son aide et ses conseils mais également pour toutes les longues discussions que l'on a pu avoir concernant les hypothèses, les résultats mais aussi à propos de l'après-thèse et de l'avenir.

Je tiens aussi à remercier **Thiebault LEQUEU** pour m'avoir donné toutes les petites astuces pour réaliser les chromatographies en phase gazeuse.

Un grand merci également à **Sylvie GROSCH**, **Annie PICCHINENNA** et **Marie-Jo RUIVO** pour leur aide technique, leur gentillesse et leur bonne humeur. Je remercie également **Brigitte KUENEMANN** pour avoir été disponible et pour m'avoir aidé à chaque fois que j'en ai eu besoin.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire avec qui j'ai eu la chance de travailler. Tout d'abord un grand merci à **Christine** et **Gina**, collègues mais aussi amies. Christine, merci d'avoir été là depuis le début de cette thèse, de m'avoir soutenue et écoutée. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, au labo comme en dehors. Gina, merci pour ta présence, ta gentillesse et surtout ta bonne humeur et ton humour permanents, qui sont comme un petit rayon de soleil au labo. Merci également à **Robin** et **Thibaut** pour avoir apporté encore plus de bonne humeur au sein du laboratoire. Vos combats de Pierre-Feuille-Ciseaux dans les bureaux vont me manquer ! **Mathieu**, merci pour ta positivité et tous tes sifflements musicaux. Merci également à **Hajer**, **Pauline**, **Jelena** et **Stéphane** pour votre gentillesse et pour tous les moments de détente, d'humour et d'amitié.

Enfin, je me dois de terminer ces remerciements en évoquant le soutien sans faille de mes sœurs, **Adeline** et **Marine**. Merci pour tout. Merci d'avoir été là, de m'avoir soutenue, écoutée et supportée quand j'en ai eu besoin. Vous êtes des sœurs en or ! Merci également à **mes parents** sans qui je n'en serais jamais arrivée là. Merci de m'avoir soutenue dans toutes mes décisions, tout au long de mes études. Une pensée toute particulière pour **mes grands-parents** qui ont toujours été pour moi des modèles de courage et de force malgré les épreuves. Merci de m'avoir donné la force d'aller jusqu'au bout.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

I. La Sclérose Latérale Amyotrophique	1
1. Généralités	1
2. Incidence et prévalence	3
3. Facteurs de risque	3
4. Diagnostic.....	5
4.1. Signes de début de la maladie.....	5
4.2. Critères de l'El Escorial	5
4.3. Diagnostics différentiels	7
4.4. Aspects génétiques.....	8
4.4.1. Diversité de la SLA.....	8
4.4.2. Mutations génétiques impliquées dans les SLAf.....	8
5. Facteurs pronostiques.....	11
5.1. Facteurs démographiques	11
5.1.1. Age	11
5.1.2. Genre	12
5.2. Facteurs cliniques.....	12
5.2.1. Site de début de la maladie.....	12
5.2.2. Délai du diagnostic	12
5.2.3. Antécédents familiaux	13
5.2.4. Statut nutritionnel.....	13
5.2.5. Statut respiratoire	14
5.2.6. Etat psychologique du patient	14
5.3. Evaluation de la progression de la SLA	14
6. Prise en charge des patients	17
6.1. Traitements médicamenteux	17
6.2. Traitements non médicamenteux	18
6.3. Traitements médicamenteux symptomatiques	19
7. Causes de décès	19
II. SLA et biomarqueurs	20
1. Biomarqueurs cliniques.....	20
1.1. Approches neurophysiologiques	20
1.2. Techniques de neuro-imagerie.....	22

2. Biomarqueurs moléculaires.....	23
2.1. Biomarqueurs du LCR	23
2.2. Biomarqueurs musculaires	24
2.3. Biomarqueurs sanguins (Article de revue).....	25
III. Modélisation de la SLA	26
1. Le modèle transgénique mSOD1	26
2. Modèle de dénervation.....	29
IV. Hypothèses physiopathologiques de la SLA	29
1. Stress oxydant.....	30
2. Excitotoxicité au glutamate	30
3. Agrégation protéique.....	32
4. Altération du transport axonal	33
5. Dysfonctionnement mitochondrial	33
6. Stress du réticulum endoplasmique	34
7. Neuroinflammation	35
8. Altération du métabolisme de l'ARN	36
V. Aspects périphériques de la SLA	38
1. La jonction neuro-musculaire	38
2. Altérations métaboliques de la SLA	39
VI. Les acides gras.....	41
1. Nomenclature des acides gras	41
1.1. Nomenclature.....	41
1.2. Classification et sources	42
1.2.1. Les acides gras saturés	42
1.2.2. Les acides gras mono-insaturés	43
1.2.3. Les acides gras poly-insaturés.....	45
1.3. Effets biologiques et propriétés	47
1.3.1. Stockage et source d'énergie	47
1.3.2. Composants des membranes cellulaires.....	47
1.3.3. Isolants thermiques.....	48
1.3.4. Signalisation	48
1.3.5. Précurseurs de médiateurs lipidiques.....	49
2. Les acides gras comme témoins du statut métabolique.....	50
3. Les acides gras et le système nerveux	55
OBJECTIFS	58

RESULTATS.....	59
-----------------------	-----------

CHAPITRE 1. Les acides gras saturés et mono-insaturés en tant que biomarqueurs dans la SLA : étude préliminaire (Article 1)	59
--	-----------

CHAPITRE 2. Modulation de l'activité SCD : étude pré-clinique dans un modèle de SLA.....	60
---	-----------

I. Introduction	60
------------------------------	-----------

II. Matériels et méthodes	60
--	-----------

1. Animaux et traitement.....	60
2. Suivi fonctionnel des animaux	61
3. Collecte des échantillons	61
4. Extractions des lipides totaux	62
5. Chromatographie en phase gazeuse.....	62
6. RT-qPCR	62
7. Histologie du muscle.....	63
8. Analyse statistique	64

III. Résultats	64
-----------------------------	-----------

1. Le MF-438 est biologiquement actif à toutes les doses	64
2. L'activité SCD est réduite aux niveaux systémique et tissulaire	65
3. Le MF-438 a un effet négatif sur le poids et la survie des animaux.....	65
4. Effet du MF-438 sur le phénotype des souris mSOD1	65
5. Le MF-438 inhibe l'activité SCD chez les souris mSOD1	66
6. Le MF-438 a un impact sur le poids et la survie des animaux mSOD1	66
7. Le MF-438 n'a pas d'effet sur l'état de dénervation.....	66
8. Le MF-438, à faible dose, n'a pas d'effet sur le phénotype métabolique.....	67
9. Le MF-438 n'a pas d'influence sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif	68

IV. Conclusion.....	68
----------------------------	-----------

CHAPITRE 3. Les acides gras poly-insaturés (PUFA) en tant que biomarqueurs de la SLA (Article 2)	70
---	-----------

CHAPITRE 4. Modulation de la composition en PUFA :	
étude pré-clinique sur un modèle de dénervation	71
I. Introduction	71
II. Matériels et méthodes	71
1. Animaux et traitement	71
2. Lésion nerveuse	72
3. Suivi des animaux	72
4. Collecte des échantillons	73
5. Extraction des lipides totaux et chromatographie gazeuse	73
6. Histologie du nerf sciatique	73
7. Marquages des jonctions neuro-musculaires	73
8. RT-qPCR	74
9. Analyse statistique	74
III. Résultats	74
1. Mise au point du traitement par gavage sur des souris sauvages	74
2. Effet du traitement au DPA sur la récupération fonctionnelle après lésion	76
2.1. Suivi fonctionnel	76
2.2. Les altérations motrices sont associées à une dénervation des unités motrices	77
2.3. Etat du nerf sciatique	78
IV. Conclusion	78
DISCUSSION	80
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	89
BIBLIOGRAPHIE	91
ANNEXE	

ABREVIATIONS

4-HNE	4-hydroxy-2,3-nonenal
AA	Arachidonic Acid
ADN	Acide Desoxyribonucléique
AG	Acide Gras
ALA	Alpha Linolenic Acid
ALSFRS	Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale
ALSS	Amyotrophic Lateral Sclerosis Severity Scale
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate
ANG	Angiogenin
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adenosine Triphosphate
ATXN2	Ataxine2
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
C9ORF72	Chromosome 9 Open Frame 72
Ca²⁺	Calcium
CHMP2B	Charged Multivesicular Body Protein 2B
COX-2	CycloOxygenase 2
CVF	Capacité vitale forcée
DCTN1	Dynactin
DFT	Démence Fronto-Temporale
DHA	Docosahexaenoic acid
DPA	Docosapentaenoic Acid
DTI	Imagerie par Tenseur de Diffusion
EAAT2	Excitatory Amino-Acid Transporter 2
ELOVL2	Elongase 2
ELOVL5	Elongase 5
EMG	Electromyographie
EPA	Eicosapentaenoic Acid
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
FADS1	Fatty Acid Desaturase 1
FADS2	Fatty Acid Desaturase 2
FUS	Fused in Sarcoma
GC	Gas Chromatography
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GLT-1	Glutamate Transporter 1
HDL	High Density Lipoprotein
HNFα	Hepatocyte Nuclear Factor α
HTLV-1	Virus T-Lymphotrophique Humain 1
IFNγ	Interféron γ
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
IMG	Indice de masse grasse
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JNM	Jonction Neuromusculaire
KCl	Chlorure de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
LA	Linoleic Acid
L-BMAA	L- β -methylaminoalanine
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LDL	Low Density Lipoprotein
LXR	Liver X Receptor
MCP-1	Protéine 1 Chimioattractive Monocytaire
ME	Moelle épinière
MMP	Métalloprotéinase
MNSB	MotoNeurones Spinaux et Bulbaires
MUFA	Mono-unsaturated Fatty Acid
NGF	Nerve Growth Factor
NMC	Neurones Moteurs Corticaux
NMDA	N-methyl-D-aspartate
OPTN	Optineurin
PET	Tomographie par Emission de Positons
PFN1	Profilin 2
PGE2	Prostaglandine E2
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activator Receptor
PUFA	Poly-unsaturated Fatty Acid
RE	Réticulum Endoplasmique
RXR	Retinoid X Receptor
SCD1	Stearoyl-CoEnzyme A Desaturase 1
SFA	Saturated Fatty Acid
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SLAf	Sclérose Latérale Amyotrophique familiale
SLAs	Sclérose Latérale Amyotrophique sporadique
SOD1	Superoxyde Dismutase 1
SPECT	Tomographie par Emission monophotonique
SQSTM1	Sequestosome 1
SREBP-1	Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1
TARDBP	TAR DNA Binding Protein
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TMS	Stimulation Magnétique Transcranienne
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
UBQLN2	Ubiquitine 2
UCP-1	Mitochondrial Uncoupling Protein
VAPB	Vesicle Associated Membrane Protein B
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humain
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Introduction

I. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

1. Généralités

La sclérose latérale amyotrophique (ou SLA) a été décrite pour la première fois en 1869 par le Docteur Jean-Martin Charcot (1825-1893), neurologue à la Pitié-Salpêtrière à Paris. Il décrit alors des patients atteints de fonte musculaire progressive, d'où le nom « d'amyotrophie », et présentant un rétrécissement du tractus cortico-spinal, d'où le terme de « sclérose latérale ». La maladie prendra rapidement le nom de « Maladie de Charcot » en France. Aux Etats-Unis, le terme de « Lou Gehrig's disease » est plus communément utilisé, en mémoire du célèbre joueur de base-ball décédé de cette maladie en 1941.

La SLA est une maladie neurodégénérative grave touchant l'adulte. Elle se caractérise principalement par la dégénérescence sélective et progressive des neurones moteurs cortico-spinaux, provenant du cortex moteur et formant le tractus pyramidal, mais aussi par celle des motoneurones spinaux et bulbaires, connectant la moelle épinière et le tronc cérébral aux muscles squelettiques (Brooks et al., 1995) (Figure 1).

La perte des neurones moteurs cortico-spinaux se traduit, entre autres, par une hyperréflexie, le signe de Babinski et une spasticité. Mais on sait aujourd'hui que d'autres populations de neurones sont touchées et sont en partie responsables de cette spasticité (El Oussini et al., 2016). La perte des motoneurones spinaux et bulbaires, quant à elle, se traduit par une faiblesse musculaire progressive, une hyporéflexie, des crampes ainsi que des fasciculations (Kinsley and Siddique, 2001).

Il est intéressant de noter que la SLA est une pathologie qui ne se présente pas toujours seule. En effet, elle peut être associée à une démence fronto-temporale (DFT) caractérisée par des troubles du comportement. Des données cliniques, génétiques et histopathologiques montrent aujourd'hui que ces deux maladies appartiennent à un même continuum, le syndrome SLA-DFT (Giordana et al., 2011).

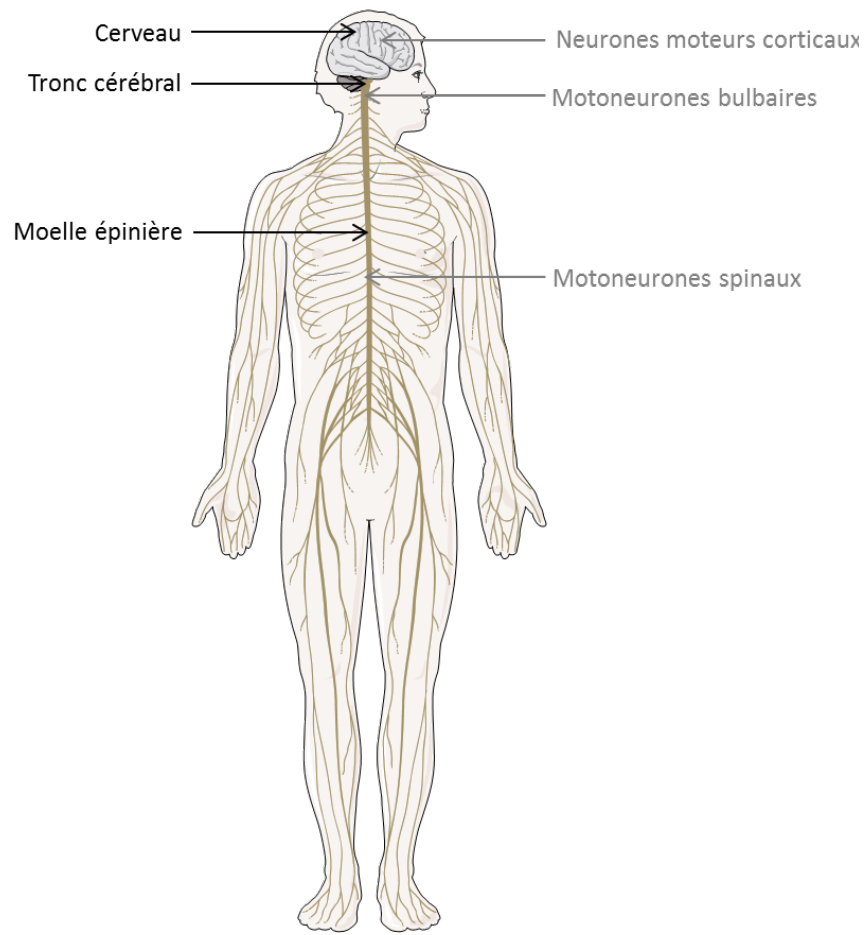


Figure 1 : populations neuronales touchées dans la SLA (adaptée de <http://www.servier.fr/slidekit/item>)

2. Incidence et prévalence

D'un point de vue épidémiologique, l'incidence de la SLA dans le monde est évaluée entre 0.4 et 2.6 pour 100 000 habitants par an (Beghi et al., 2006). En France, elle est estimée à 2.5 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an (Couratier et al., 2014), ce qui en fait la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte, bien qu'elle soit souvent considérée comme une maladie rare. Plusieurs études ont montré une augmentation de l'incidence de la maladie au cours du temps mais il est apparu plus récemment que celle-ci reste plutôt stable (Forbes et al., 2007; Soriani and Desnuelle, 2009). La prévalence de la maladie est estimée entre 4 et 6 pour 100 000 habitants (Orsini et al., 2015), ce qui est relativement faible comparé à d'autres maladies neurodégénératives. Cela est le résultat de la courte espérance de vie des personnes atteintes.

Géographiquement, la SLA n'est pas une maladie qui suit une distribution particulière. Toutefois, certaines régions sont plus touchées que d'autres. C'est le cas notamment de quelques îles du Pacifique comme l'île de Guam, la péninsule de Kii au Japon ou encore à l'ouest de la Nouvelle-Guinée. Ces populations présentent une forme particulière de SLA puisqu'elle est associée à un syndrome parkinsonien ainsi qu'à une démence. Une hypothèse liée aux coutumes et aux traditions de ces populations a été proposée. La consommation régulière de viande de chauve-souris, se nourrissant elles-mêmes de noix de Cycas, contenant la toxine L- β -methylaminoalanine (L-BMAA) serait à l'origine de ces cas de SLA. Aujourd'hui, la limitation de la consommation de ces chauves-souris par la suite a permis une réduction de l'incidence de ces cas de SLA-démence parkinsonienne (Spencer et al., 1987; Kurland, 1988; Delzor et al., 2014).

3. Facteurs de risque

Deux grandes catégories de facteurs de risque ont été mises en évidence : les facteurs de risque de type endogène, qui sont des mutations génétiques causant, prédisposant ou aggravant la SLA (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>), et ceux de type exogène comme l'exposition à certains métaux lourds ou un mode de vie particulier (Tableau 1). Bien qu'il n'existe aucun lien prouvé, à ce jour, entre un facteur de risque exogène et la maladie, de nombreuses

études ont analysé les preuves qui appuient le fait que la SLA puisse être considérée comme une pathologie résultant de l'exposition à des facteurs de risque environnementaux combinée à un terrain génétique à risque (Al-Chalabi and Hardiman, 2013).

Tableau 1. Facteurs de risque de la sclérose latérale amyotrophique

Facteurs endogènes
SOD1
TARDBP
FUS
C9ORF72
Facteurs exogènes
Expositions
Exposition aux métaux lourds
Exposition aux pesticides et herbicides
Exposition aux solvants
Facteurs traumatiques
Mode de vie
Travail agricole
Activité physique
Activités militaires
Tabagisme et alcoolisme
Habitudes alimentaires et prise d'antioxydants
(adapté de Gil et al., 2007 et de Ajroud-Driss et al., 2014)

4. Diagnostic

4.1. Signes de début de la maladie

En fonction du type de neurones initialement atteints, on distinguera deux catégories de SLA présentant des signes variés. Il y a la SLA dite « bulbaire » qui se caractérise par une atteinte oro-faciale avec, au premier plan, des troubles articulatoires et une dysphagie. La SLA dite « spinale » quant à elle, se caractérise plutôt par une atteinte des membres supérieurs ou inférieurs avec l'apparition d'une faiblesse musculaire progressive, de fasciculations, de crampes ou encore des difficultés de coordination des mouvements ou un manque de précision dans certains gestes (Soriani and Desnuelle, 2009; Wijesekera and Leigh, 2009). Il a été montré que les personnes atteintes de la forme bulbaire présentent une évolution plus rapide que celles atteintes de la forme spinale (del Aguila et al., 2003). Quelle que soit la forme initiale de la maladie, elle se généralise inévitablement avec une progression de la paralysie jusqu'à l'atteinte des muscles respiratoires. Les patients décèdent en moyenne en 2 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes.

4.2. Critères de l'El Escorial

En réponse au besoin important de définir des critères reconnus de façon internationale pour le diagnostic de la SLA, les critères d'El Escorial ont été développés. En 1994, de nombreux médecins et chercheurs se sont réunis afin d'établir ces critères présentés dans le Tableau 2 (Brooks et al., 1994).

Tableau 2 : critères de l'El Escorial

Présence
Signes de dégénérescence des MNSB par observations clinique, électrophysiologique et neuropathologique
Signes de dégénérescence des NMC
Diffusion progressive des signes dans une ou plusieurs régions
Absence
Signes cliniques évoquant d'autres pathologies du NMC ou du MNSB
Signes en neuro-imagerie caractéristiques d'autres pathologies pouvant expliquer les observations cliniques et électrophysiologiques

(Adapté de Brooks et al., 1994) (MNSB : motoneurone spinaux et bulbaires ; NMC : neurones moteurs corticaux)

Selon l'observation clinique de base, et selon les régions touchées, on peut définir plusieurs niveaux de classification du diagnostic. On trouvera alors la SLA suspectée, la SLA possible, la SLA probable et la SLA définie (Figure 2) (Mitchell, 2000).

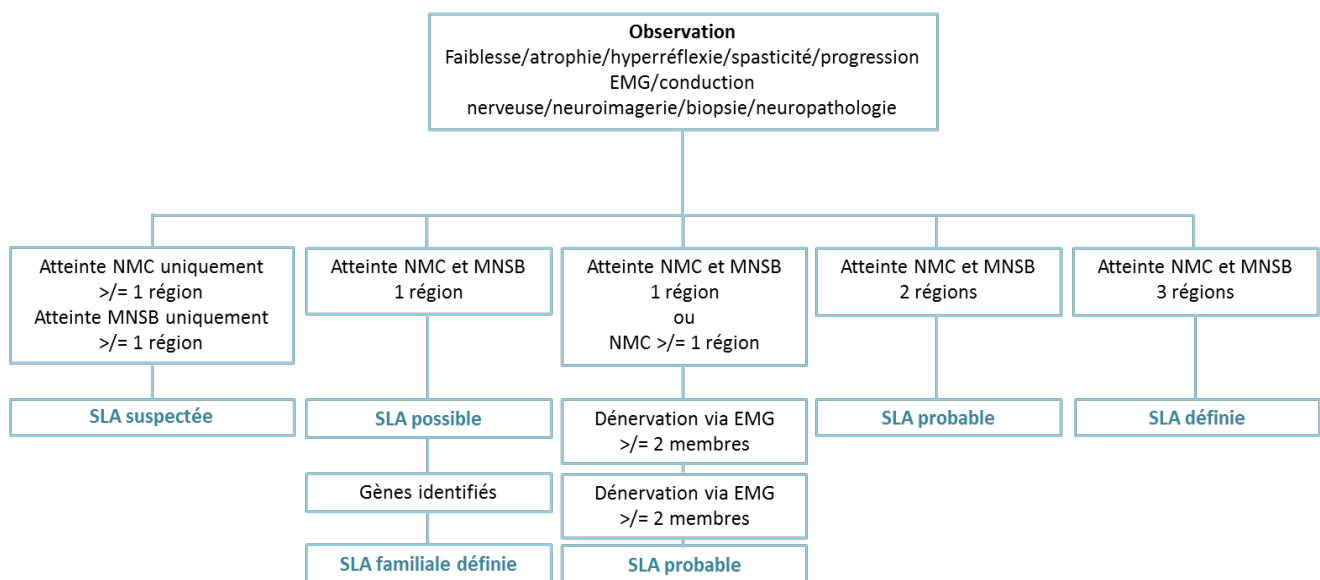


Figure 2 : différents niveaux de SLA adapté de Mitchell, 2000 (EMG : électromyographie ; NMC : neurones moteurs corticaux ; MNSB : neurones moteurs spinaux et bulbaires)

4.3. Diagnostic différentiel

Malgré l'établissement de ces nombreux critères, de la généralisation des examens cliniques et d'une meilleure compréhension par les cliniciens des autres pathologies pouvant mimer une SLA, en pratique, le diagnostic peut demeurer difficile à établir. Au stade initial de la pathologie, les signes cliniques ne sont pas spécifiques ce qui explique les erreurs diagnostiques. Les principaux diagnostics différentiels de la SLA sont regroupés dans le tableau 3 (Pradat, P. F. Bruneteau, 2006).

Tableau 3 : diagnostics différentiels

Atteinte anatomique	Diagnostic différentiel
Motoneurone périphérique	Amyotrophie spinale progressive de l'adulte Syndrome de Kennedy Syndrome post-poliomyélitique Amyotrophie monomélique bénigne Lymphome Syndrome crampes-fasciculations bénignes
Nerf périphérique	Neuropathie motrice multifocale avec blocs de conduction Neuropathie motrice post-radique Intoxication au plomb
Moelle	Myélopathie cervicarthrosique Paraparésie spastique familiale Syringomyélie Myélopathie à HTLV-1
Muscle	Myosite à inclusions
Jonction neuro-musculaire	Myasthénie
Maladies générales	Hyperparathyroïdie Hyperthyroïdie Connectivites (syndrome de Goujerot-Sjögren) Infection à VIH

(Adapté de Pradat, P. F. Bruneteau, 2006)

4.4. Aspects génétiques

4.4.1. Diversité de la SLA

Même si la SLA apparaît comme étant majoritairement une maladie survenant de façon sporadique, sans que les patients présentent une histoire familiale particulière, il existe néanmoins des formes héréditaires (10% des cas). Pour le clinicien, connaître les antécédents familiaux du patient et de ce fait, savoir si des cas de SLA sont recensés dans la famille, apparaît comme étant un élément déterminant pour établir le diagnostic.

D'un point de vue clinique, les deux formes de la maladie sont totalement indiscernables l'une de l'autre. Cependant, quelques différences entre les deux peuvent exister. Pour commencer, l'âge de début de la maladie semble différent entre les deux formes. Les formes familiales se développent plus précocement, aux alentours de 40 ans, contre 56 ans pour les formes sporadiques (Camu et al., 1999). De plus, les formes familiales débutent préférentiellement au niveau des membres inférieurs, les débuts bulbaires étant plus rares que dans les formes sporadiques (Corcia et al., 2012). Enfin, si la maladie touche aussi bien les hommes que les femmes, il semblerait néanmoins que le ratio homme/femme soit sensiblement modifié dans les cas de SLA sporadiques. En effet, pour les formes familiales, le ratio est de 1.3/1 tandis que pour les cas sporadiques, il est plutôt de 1.6/1 (Battistini et al., 2005).

4.4.2. Mutations génétiques impliquées dans les SLA familiales

L'étude des familles atteintes de SLA et des études génomiques ont permis d'identifier certains gènes impliqués dans la maladie. Dans ce chapitre, uniquement les gènes majeurs seront présentés. Les gènes plus minoritaires ne seront alors que cités (Tableau 4) (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>).

✓ *La Superoxide Dismutase cytosolique à Cuivre et Zinc (SOD1)*

En 1993, le premier gène impliqué dans les formes familiales de SLA est découvert, il s'agit du gène codant pour la superoxide dismutase cytosolique à cuivre et zinc (SOD1), enzyme responsable de la détoxification cellulaire et de la protection contre les radicaux libres. A

cette époque, Rosen et collaborateurs décrivent 11 mutations existantes dans ce gène liées à la SLA (Rosen et al., 1993a). Depuis ces travaux, plus de 140 mutations différentes ont été identifiées sur l'ensemble des 5 exons du gène (Andersen et al., 2003; Turner and Talbot, 2008).

Les mutations SOD1 sont retrouvées dans environ 20% des cas familiaux de SLA mais également dans 3% des cas sporadiques (Andersen et al., 2003). Il faut savoir que toutes les mutations SOD1 sont à transmission dominante à l'exception de la mutation D90A qui est récessive (Robberecht et al., 1996). Il a été noté que toutes ces mutations n'entraînaient pas le même phénotype chez tous les patients. En effet, la mutation A4V, qui est la plus représentée, est associée à un âge précoce de début de la maladie, à un début spinal ainsi qu'à une progression extrêmement rapide (Cudkowicz et al., 1997; Juneja et al., 1997). De manière similaire, les mutations A4T, C6F, C6G ou encore G10V sont également caractérisées par ce phénotype agressif. En revanche, d'autres mutations, et particulièrement les mutations G41D, H46R et G93D, se caractérisent par un phénotype plus « doux » de la maladie, avec des patients qui peuvent survivre jusqu'à 20 ans après l'apparition des symptômes (Cudkowicz et al., 1997).

✓ *TAR DNA Binding Protein (TDP-43)*

Le gène TDP-43 code pour une protéine de liaison à l'ADN et à l'ARN et participe ainsi à des fonctions telles que la transcription, l'épissage de l'ARN et le transport de l'ARNm. La plupart des mutations retrouvées dans ce gène sont des mutations « faux-sens » qui entraînent la formation d'inclusions ubiquitinylées dans le cytoplasme des neurones, qui conduiraient à leur mort (cf chapitre IV). A l'heure actuelle, 40 mutations dans le gène TDP-43 ont été recensées et elles sont responsables d'environ 4% des formes familiales de la maladie (Lattante et al., 2013).

✓ *Fused in Sarcoma (FUS)*

Le gène FUS (Fused in Sarcoma) code pour une protéine de liaison à l'ADN et l'ARN qui est impliquée dans de nombreux processus tels que l'activation transcriptionnelle, la régulation de l'épissage, la biogénèse de l'ARNm, la formation de granules de stress ou encore dans la

stabilisation des introns (Deng et al., 2014). La plupart des mutations de FUS entraînent une localisation anormale de FUS dans le cytoplasme des neurones. Parmi les hypothèses actuellement proposées, la formation de granules de stress pourrait être responsable de la mort de ces neurones.

Les patients portant une mutation de ce gène présentent un phénotype particulier. En effet, chez ces patients, la maladie se déclare plus précocement et progresse plus rapidement. A ce jour, plus de 50 mutations dans ce gène ont été identifiées, et elles représentent 4% des formes familiales et 1% des formes sporadiques (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009).

✓ *Chromosome 9 Open Reading Frame 72 (C9ORF72)*

En 2011, un nouveau gène impliqué dans la SLA a été découvert : le gène C9ORF72 (Chromosome 9 Open-Reading Frame 72). Il a été montré qu'une répétition de l'expansion GGGGCC, dans une région non-codante de ce gène, est impliquée dans 40% des cas familiaux et 25% des cas sporadique de SLA mais également dans la démence fronto-temporale (Dejesus-hernandez et al., 2011; Majounie et al., 2012; Renton et al., 2012; Koppers et al., 2015).

A ce jour, le rôle exact de C9ORF72 dans la maladie reste encore méconnu mais trois mécanismes pathologiques ont été proposés. Tout d'abord, cette mutation pourrait entraîner la séquestration des protéines de liaison à l'ARN. Ensuite, il pourrait y avoir présence d'une toxicité liée à la formation de dipeptides due à la répétition. Et enfin, il pourrait s'agir d'une haplo-insuffisance. Des preuves expérimentales tendent à laisser penser qu'il y aurait une action conjointe de ces 3 mécanismes (Koppers et al., 2015).

Tableau 4 : principaux gènes impliqués dans les cas de SLAf

Gène	Protéine	Transmission	Locus	Activité
<i>SOD1</i>	SOD1	AD	21q22.1	Détoxification cellulaire
<i>C9ORF72</i>	-	AD	9p21	Liaison à l'ARN
<i>FUS</i>	FUS	AR	16p11	Métabolisme de l'ARN
<i>TDP-43</i>	TDP-43	AD	1p36	Métabolisme de l'ARN
<i>VAPB</i>	VAPB	AD	20q13	Trafic vésiculaire
<i>OPTN</i>	Optineurine	AR/AD	10p13	Trafic vésiculaire
<i>DCTN1</i>	Dynactine	AD	2p13	Transport axonal
<i>ANG</i>	Angiogénine	AD	14q11.1	Angiogénèse
<i>ATXN2</i>	Ataxine 2	-	12q23-q24.1	Traduction ARN
<i>UBQLN2</i>	Ubiquitine 2	XD	Xp11.21	Protéasome
<i>CHMP2B</i>	CHMP2B	AD	3p12.1	Trafic vésiculaire
<i>PFN1</i>	Profiline 1	AD	17p13.3	Cytosquelette
<i>SQSTM1</i>	Sequestosome	AD	5q35	Autophagie

(Adapté de Andersen and Al-Chalabi, 2011)

5. Facteurs pronostiques

Une fois le diagnostic de la SLA posé, il est important de suivre la progression de la maladie afin d'anticiper au mieux les déficits et les handicaps qui en découlent. Un certain nombre de facteurs peuvent faire varier cette progression.

5.1. Facteurs démographiques

5.1.1. Age

De nombreuses études se basant sur des populations d'origines différentes ont montré que l'âge, que ce soit au moment de l'apparition des premiers symptômes ou lors du diagnostic, est un fort facteur pronostique. En effet, un âge avancé est associé à une survie plus courte (Louwerse et al., 1997; Couratier et al., 2014; Moura et al., 2015). Une étude basée sur une population néerlandaise a montré que des patients diagnostiqués à l'âge de 40 ans, ou moins, présentaient une médiane de survie de 5 ans, alors que des patients diagnostiqués à

l'âge de 60 ans, quant à eux, présentaient une médiane de survie de seulement 1 an (Louwerse et al., 1997).

5.1.2. Genre

Des études de populations ou hospitalières avaient montré, au départ, que le genre n'avait aucun effet sur la maladie (Christensen et al., 1990; Lee et al., 1995). Mais plus récemment, des études ont mis en évidence une incidence et une prévalence plus importantes chez les hommes (Manjaly et al., 2010). Par ailleurs, la forme spinale est prédominante chez les hommes alors que la forme bulbaire est plus représentée chez les femmes. Toutefois, en définitive, le genre ne semble pas avoir d'effet sur la survie malgré ces différences (McCombe and Henderson, 2010).

5.2. Facteurs cliniques

5.2.1. Site de début de la maladie

Les nombreuses études sur l'effet du site de début de la maladie ont montré que la forme bulbaire est associée à un mauvais pronostic (Tysnes et al., 1991; Lee et al., 1995; Couratier et al., 2014). Les patients atteints d'une forme bulbaire décèdent en général plus tôt et aucun de ces patients ne survit au-delà de 6 ans (Louwerse et al., 1997). Les patients présentant une forme bulbaire sont généralement plus âgés que ceux ayant une forme spinale. Il avait alors été avancé que l'effet négatif de la forme bulbaire sur l'espérance de vie était dû à l'âge avancé de ces patients. Mais plus tard, il a été montré que l'âge et le début bulbaire sont deux facteurs influençant la survie de manière indépendante. Cela suggère que l'âge n'est donc pas la cause de la progression plus rapide, mais qu'il s'agit bien de l'effet de la forme bulbaire (Chiò et al., 2002).

5.2.2. Délai du diagnostic

Des études corrélatives, basées sur des populations d'origines différentes, ont mis en évidence qu'un délai plus long entre le moment d'apparition des premiers symptômes et le

diagnostic est associé à une survie plus longue des patients (Haverkamp et al., 1995; Louwerse et al., 1997; Beghi et al., 2008; Couratier et al., 2014).

5.2.3. Antécédents familiaux

Une étude sur une population néerlandaise, avait mis en évidence que la SLA de type sporadique est associée à une survie réduite. Et la survie plus longue des patients atteints de la forme familiale pourrait s'expliquer par leur âge généralement plus bas (Louwerse et al., 1997). Toutefois, la plupart des études ultérieures n'ont révélé aucune différence de survie entre les formes familiale et sporadique (Chiò et al., 2012).

5.2.4. Statut nutritionnel

L'état de malnutrition est fréquemment observé chez les patients atteints de SLA du fait de leurs difficultés de mastication, de déglutition, la difficulté à bouger les membres ou encore du fait de la réduction de leur apport calorique (Bouteloup et al., 2009; Dupuis et al., 2011). Cet état est évalué à l'aide de marqueurs tels que l'indice de masse corporelle (IMC), la perte de poids ou encore l'indice de masse grasse (IMG).

La perte de poids est un facteur déterminant dans la survie des patients. Il a été montré que des patients qui perdent l'équivalent de 5% ou plus de leur poids initial au moment du diagnostic ont une survie d'environ 20 mois contre 29 mois pour ceux qui ont une perte de poids plus faible ou qui restent stables (Marin et al., 2011).

L'impact de l'IMC sur l'évolution de la maladie et sur la survie a souvent également été décrit. De récentes études ont montré que l'IMC est un facteur pronostique important pour la survie. L'étude de Paganoni et collaborateurs montre que la survie est diminuée pour des IMC faibles (inférieurs à 18) mais aussi pour des IMC élevés (supérieurs à 35), l'espérance de vie la plus importante étant pour des IMC compris entre 25 et 35 (Paganoni et al., 2011).

5.2.5. Statut respiratoire

Ces dernières années, des études ont montré que le statut respiratoire des patients, mesuré par un test de capacité vitale forcée (CVF), joue un rôle important dans l'évolution de la maladie. Les patients ayant une CVF inférieure à 75% ont une médiane de survie de 3 ans contre 4 ans pour ceux ayant une CVF supérieure à 75%. Dans le même sens, une CVF inférieure à 75% est associée à une progression plus rapide de la maladie (Magnus et al., 2002; Czaplinski et al., 2006; Couratier et al., 2015).

5.2.6. Etat psychologique du patient

L'état psychologique des patients est un paramètre important qui influence fortement leur qualité de vie. Il a été montré que la détresse psychologique des patients, qui peut se traduire par la dépression, l'anxiété, la perte d'espoir, la paranoïa ou encore des idées obsessionnelles, est associée à une survie plus courte. Beaucoup de patients atteints de SLA souffrent d'un point de vue psychologique et il apparaît donc nécessaire de prendre en compte cet aspect pour améliorer l'issue de la maladie et le pronostic (Felgoise et al., 2010).

5.3. Evaluation de la progression de la SLA

Il existe un certain nombre d'échelles fonctionnelles qui ont été créées ces dernières décennies dans le but d'évaluer la progression de la maladie. On trouve ainsi les échelles de Norris et d'Appel qui permettent d'évaluer l'atteinte motrice de façon générale (Norris et al., 1974; Appel et al., 1987). On trouve également l'ALSS (Amyotrophic Lateral Sclerosis Severity Scale) de Hillel (Hillel et al., 1989). La dernière à avoir été mise en place, puis révisée, est l'ALSFRS (ALS Functional Rating Scale), par Cedarbaum en 1999, et elle reste à ce jour la plus utilisée (Cedarbaum et al., 1999). Cette dernière est constituée de 12 actions de la vie quotidienne graduées chacune de 0 à 4 (0 : perte totale de la fonction testée et 4 : fonction normale). Trois fonctions évaluées permettent d'apprécier l'atteinte bulbaire (l'élocution, la salivation et la déglutition), quatre autres l'atteinte des membres supérieurs et inférieurs (couper la nourriture, l'habillage, la marche et la montée des escaliers), deux autres items

explorent d'autres fonctions (se tourner dans le lit et l'hygiène) et enfin, un dernier critère permet d'évaluer les fonctions respiratoires (Couratier et al., 2016).

Tableau 5 : échelle ALSFRS-R

1. Parole 4- normale 3- difficultés perceptibles 2- intelligible avec répétition 1- parole combinée avec communication non verbale 0- perte de la parole
2. Salivation 4- normale 3- hyper sialorrhée discrète avec bavage nocturne 2- hyper sialorrhée modérée mais permanente 1- hyper sialorrhée gênante 0- bavage continu nécessitant l'utilisation d'un mouchoir
3. Déglutition 4- alimentation normale 3- quelques fausses routes 2- modification de la consistance des aliments 1- nécessité de suppléments alimentaires 0- alimentation entérale exclusive
4. Ecriture 4- normale 3- lente et imprécise mais compréhensible 2- certains mots non compréhensibles 1- capable de tenir un stylo mais pas d'écrire 0- alimentation entérale exclusive
5a. Préparation des aliments (patients sans gastrostomie) 4- normale 3- lente et maladroite mais seul 2- coupe seul tous les aliments parfois besoin d'aide 1- les aliments sont coupés mais mange seul lentement 0- doit être nourri
5b. Préparation des aliments (patients avec gastrostomie) 4- normale 3- maladroite mais seul 2- besoin d'aide pour la mise en place 1- fournit une aide minime aux soignants 0- doit être nourri

6. Habillage et hygiène 4- normale 3- indépendant mais efficacité diminuée 2- assistance ponctuelle ou méthodes de substitution 1- besoin de l'assistance d'une tierce personne 0- dépendance totale
7. Mobilisation au lit 4- normale 3- lent et maladroit mais pas besoin d'aide 2- peut se tourner seul ou ajuster les draps mais avec difficultés 1- peut bouger mais pas se tourner seul 0- dépendant
8. Marche 4- normale 3- difficultés de déambulation 2- marche avec assistance 1- mouvement sans déambulation 0- pas de mouvement des jambes
9. Montée des escaliers 4- normale 3- lente 2- fatigue 1- besoin d'assistance 0- ne peut pas
10. Dyspnée 4- aucune 3- à la marche 2- dans 1 ou plus des situations suivantes : repas, toilette, habillage 1- au repos, difficultés en position assise ou allongée 0- difficultés importantes, besoin d'aide respiratoire
11. Orthopnée 4- aucune 3- quelques difficultés la nuit, souffle court 2- besoin de plus de 2 oreillers pour dormir 1- ne peut dormir qu'assis 0- ne peut pas dormir
12. Insuffisance respiratoire 4- aucune 3- utilisation intermittente d'une aide respiratoire 2- utilisation continue d'une aide respiratoire 1- utilisation continue d'une aide respiratoire jour et nuit 0- ventilation mécanique par intubation ou trachéostomie

(Adapté de Cedarbaum et al., 1999).

6. Prise en charge des patients

La prise en charge doit permettre d'apprécier l'évolution des patients et de rechercher d'éventuelles complications. Elle permet de mettre en place des soins adaptés et un accompagnement du patient le plus tôt possible. Elle permet aussi d'anticiper la fin de vie avec des soins palliatifs adaptés. La prise en charge est multidisciplinaire et fait intervenir une multitude de professions médicales et paramédicales. Des neurologues mais aussi des pneumologues, des gastro-entérologues, des nutritionnistes, des ORL ainsi que des médecins des soins palliatifs sont impliqués dans cette prise en charge. De plus, les handicaps inhérents à la maladie nécessitent l'intervention de kinésithérapeutes, d'ergothérapeutes, d'orthophonistes, de diététiciens ou encore d'assistantes sociales et de psychologues.

6.1. Traitements médicamenteux

Le Riluzole est le seul traitement qui s'est avéré efficace dans la SLA. C'est un dérivé des benzothiazoles et il a pour action d'inhiber l'excitotoxicité liée au glutamate (Bryson et al., 1996). Les premiers essais cliniques avec le Riluzole datent des années 90. En 1994, Bensimon et son équipe lancent le premier essai clinique en double aveugle avec le Riluzole incluant la France et la Belgique (Bensimon et al., 1994). Une dose de 100mg par jour (2 fois 50mg) est administrée à 155 patients sur une période d'un an. Les principaux critères étudiés étaient la survie et la vitesse d'évolution de la maladie. En second plan était analysé le changement de la force musculaire. Après 12 mois de traitement, 58% des patients ayant reçu le placebo étaient toujours en vie contre 74% pour le groupe traité au Riluzole. La perte de force musculaire était plus importante dans le groupe placebo que dans le groupe traité. De manière générale, les résultats ont montré que le traitement au Riluzole permet de ralentir la progression de la maladie et permet d'augmenter la survie des patients ayant une forme bulbaire. En 2002, une seconde étude est lancée, toujours en double aveugle, sur 168 patients atteints de SLA (Bensimon et al., 2002). Cette étude n'a pas révélé d'effet bénéfique du traitement, ce qui contredit les résultats de l'étude précédente. De nombreuses autres études ont été réalisées à ce jour. Dans l'ensemble, elles ont montré que le Riluzole est indiqué pour prolonger la durée de vie ou pour retarder le recours à la ventilation

mécanique assistée. Aucune action thérapeutique sur la motricité, la fonction respiratoire, les fasciculations et la force musculaire n'a été mise en évidence. Le Riluzole n'a pas non plus montré d'effet bénéfique aux stades avancés de la SLA. Il représente néanmoins la médication standard habituellement utilisée.

La vitamine E, est également utilisée dans le traitement de la SLA. Il avait été montré, quelques années auparavant, dans une étude sur un modèle animal, qu'un traitement à la vitamine E permettait de ralentir le début de la maladie ainsi que sa progression (Gurney et al., 1996). Une étude en 2001 a testé l'effet combiné du Riluzole et de la vitamine E chez des patients SLA (Desnuelle et al., 2001). Après 12 mois de suivi, les résultats ont montré, bien que le traitement n'ait pas d'effet sur la survie, qu'il permettait toutefois un ralentissement du passage des stades initiaux aux stades avancés de la maladie selon le score de l'ALSS. Les résultats ont également montré qu'après 3 mois de traitement, certains marqueurs du stress oxydant, caractéristiques de la maladie, étaient diminués dans le sang des patients. Ces résultats ont été controversés depuis qu'une seconde étude, plus récente, n'a pas pu mettre en évidence un quelconque effet de la vitamine E sur l'évolution de la maladie (Graf et al., 2005).

6.2. Traitements non médicamenteux

Une thérapie physique adaptée doit être mise en place pour le patient tout au long de l'évolution de la maladie. Elle inclut des séances de kinésithérapie, d'ergothérapie ou encore d'orthophonie. Des soins d'hygiène et de confort doivent aussi être programmés. Ceux-ci doivent prendre en charge la perte d'autonomie concernant l'hygiène corporelle, l'habillement, les transferts, les soins infirmiers, entre autres.

Une aide à l'alimentation est bien souvent nécessaire et elle a pour but de limiter la dénutrition et l'amaigrissement. Il peut s'agir d'une simple aide à la prise des repas apportée, soit par un membre de la famille, soit par une auxiliaire de vie, mais il peut aussi s'agir, aux stades plus avancés, d'une prise en charge plus lourde de type gastrostomie.

Une aide à la communication peut également être nécessaire. La perte partielle ou totale de la communication orale peut devenir très stressante pour le patient, il est donc important

d'aider ce dernier à verbaliser de simples besoins quotidiens tout autant que son angoisse. Les séances d'orthophonie permettent alors la préservation de la communication jusqu'au stade dernier de la maladie, en mettant en place, par exemple, différentes techniques de communication alternative comme des mimiques, des écrits, des sms ou encore des synthèses vocales.

Enfin, une part tout aussi importante est le suivi psychologique du patient. Il est également nécessaire de mettre en place, si besoin, une prise en charge psychologique de l'entourage dont la souffrance psychique est bien souvent négligée ou sous-estimée (<http://www.has-sante.fr>).

6.3. Traitements médicamenteux symptomatiques

Ils sont mis en place de façon générale pour soulager les douleurs, la spasticité et les autres troubles inhérents à la maladie tels que les problèmes salivaires, la fatigue, les troubles du sommeil, la dépression ou encore l'anxiété.

7. Causes de décès

Les données de la littérature montrent, de manière générale, que les causes de décès des patients atteints de SLA sont, en majorité, d'origine respiratoire. L'étude de Gil et collaborateurs en 2008, réalisée sur 302 patients suivis dans 16 centres de référence français, a démontré que dans 77% des cas, le décès est dû à une défaillance respiratoire avec une insuffisance respiratoire terminale, une bronchopneumopathie, une asphyxie ou une embolie pulmonaire (Gil et al., 2008). En 2008 aussi, l'étude de Corcia et collaborateurs menée sur 100 patients, à l'aide de rapports d'autopsie, a révélé, là encore, que la plupart des décès sont d'origine respiratoire dûs à des hypoxies, bronchopneumopathies, détresses respiratoires aiguës ou embolies pulmonaires mais on trouve également des causes telles que la mort subite ou l'arrêt cardiaque (Corcia et al., 2008). Dans le même sens, l'étude de Kurian et collaborateurs en 2009, réalisée selon les rapports d'autopsie de 44 patients, montre aussi que la cause principale de décès chez les patients est d'origine respiratoire

(Kurian et al., 2009). Finalement, il est intéressant de noter que la majorité des décès ont lieu en milieu hospitalier.

II. SLA et biomarqueurs

A ce jour, le diagnostic de SLA se base sur des examens cliniques et électrophysiologiques, les antécédents familiaux des patients ainsi que sur l'exclusion de facteurs confondants. Malheureusement, cela ne permet pas de poser un diagnostic précoce. Il faut, en général, entre 13 et 18 mois de délai, et de ce fait, les patients se trouvent déjà à un stade avancé lorsqu'il est établi (Radunovic et al., 2007). Nous ne disposons, à l'heure actuelle, d'aucun biomarqueur diagnostique qui permettrait d'éviter ce délai considérable. Il y a également un manque important de biomarqueurs pronostiques, permettant d'évaluer la progression de la maladie et l'espérance de vie des patients dans un contexte clinique.

Dans ce chapitre seront abordés brièvement deux grandes catégories de biomarqueurs : les biomarqueurs cliniques et les biomarqueurs moléculaires.

1. Biomarqueurs cliniques

1.1. Approches neurophysiologiques

Les approches neurophysiologiques sont un outil important permettant de mettre en évidence une atteinte des motoneurones. Parmi les différents outils neurophysiologiques, on trouve l'étude de conduction nerveuse, l'électromyographie (EMG), l'estimation du nombre d'unités motrices (MUNE), la stimulation magnétique transcrânienne (TMS) ou encore la myographie d'impédance électrique (EIM) (Inghilleri and Iacovelli, 2011; Joyce and Carter, 2013; Turner et al., 2013).

L'étude de la conduction nerveuse est une part essentielle du diagnostic électrophysiologique chez les patients suspectés de SLA. Elle est utilisée pour évaluer la dégénérescence axonale (Joyce and Carter, 2013). L'EMG, quant à elle, est plutôt utilisée pour confirmer l'atteinte des motoneurones. Certaines caractéristiques sont requises afin de poser le diagnostic de la SLA. On doit y retrouver des altérations du tracé dites aigues, caractérisées par des fibrillations et des potentiels de fasciculations, mais aussi des

altérations dites chroniques comme une diminution du recrutement des unités motrices et une décharge électrique à vitesse élevée, de large amplitude et de longue durée (Joyce and Carter, 2013). Toutefois, l'EMG présente certaines limites. En effet, elle ne permet pas d'évaluer la progression de la maladie ni l'effet de traitements dans le cas d'essais cliniques. La technique d'estimation du nombre d'unités motrices est plus adaptée pour cela (Turner et al., 2013). C'est un critère de mesure intéressant, puisqu'il évalue directement la perte des motoneurones. C'est donc une technique sensible à la progression de la maladie (Inghilleri and Iacovelli, 2011). Cependant, il existe de nombreuses techniques de comptage et aucun consensus sur la méthode à utiliser n'a été réalisé aujourd'hui à ce jour (Wang et al., 2004).

La TMS est une technique visant à délivrer une impulsion magnétique brève, intense et indolore au niveau de la boîte crânienne, générant un courant électrique dans le cortex et se propageant via des voies neuronales impliquant à la fois les neurones moteurs et les motoneurones. La réponse à cette stimulation peut ensuite être mesurée dans les muscles des extrémités supérieures et inférieures (Inghilleri and Iacovelli, 2011). Grâce à la TMS, on est capable de mesurer l'intégrité fonctionnelle de ces neurones, et de détecter des anomalies. C'est une technique utilisée à la fois pour le diagnostic de la maladie et pour le suivi de son évolution (Turner et al., 2013).

L'EIM, basée sur l'application d'un courant électrique de haute fréquence et de basse intensité sur une zone localisée d'un muscle, permet d'évaluer l'intégrité fonctionnelle et la structure de ce muscle. En 2012, Rutkove et collaborateurs ont réalisé une étude multicentrique, dans le but de comparer le potentiel pronostique de cette technique avec celui d'autres méthodes. Des mesures d'impédance ont été réalisées sur 60 patients, sur une période d'un an, et comparées avec des mesures de scores ALSFRS-R et de dynamométrie. Les résultats ont montré que l'EIM était plus performante que les deux autres techniques dans la détection du déclin des patients (Rutkove et al., 2013). Malgré des résultats prometteurs, à ce jour, la TMS et l'EIM restent encore essentiellement utilisées dans un contexte de recherche (Vucic et al., 2013).

1.2. Techniques de neuro-imagerie

Les techniques de neuroimagerie ont connu un développement important ces dernières années dans la course aux biomarqueurs de la SLA. Cela inclut la tomographie par émission monophotonique (SPECT), la tomographie par émission de positons (PET), l'imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle (IRMf) ou l'imagerie en tenseur de diffusion (DTI).

La SPECT a été l'une des premières techniques à être utilisée. En 1989, l'équipe de Ludolph et collaborateurs a montré que l'intensité de fixation du traceur était corrélée avec le degré de sévérité de la maladie (Ludolph et al., 1989). C'est aussi grâce à cette technique que des anomalies frontotemporales ont été mises en évidence dans des cas de SLA (Talbot et al., 1995).

La PET a été une technique très utilisée afin de décrire la SLA comme étant un phénomène de dégénérescence multi-système. En 1993, l'équipe de Takahashi et collaborateurs qui, en utilisant un analogue de la dopamine, a pu mettre en avant, chez les patients atteints de SLA, une réduction de la fonction dopaminergique (Takahashi et al., 1993). En 2000, l'équipe de Lloyd et collaborateurs, à l'aide d'un analogue de GABA cette fois-ci, a mis en évidence la présence de dysfonctionnements dans les aires motrices, prémotrices et extramotrices chez les patients atteints de SLA et plus précisément une perte de l'inhibition interneuronale GABAergique dans ces aires (Lloyd et al., 2000). En 2005, Turner et collaborateurs ont pu mettre en avant l'implication du système dopaminergique dans la réduction du volume des aires frontotemporales chez les patients atteints SLA et ce, de façon accrue, chez ceux ayant une forme bulbaire (Turner et al., 2005).

Cependant, la SPECT et la PET présentent certaines limites. La sensibilité et la résolution spatiale ne sont pas toujours suffisamment adaptées. De plus, ces techniques nécessitent l'exposition des patients à des radiations ionisantes, ce qui, à long terme, peut être néfaste. Enfin, les analogues utilisés comme traceurs ont des demi-vies relativement courtes, ce qui peut restreindre parfois l'observation de certains phénomènes ou régions.

L'IRMf est une technique qui présente l'avantage de pouvoir étudier l'activité cérébrale de façon non-invasive mais également d'évaluer l'effet de certaines tâches motrices sur cette activité cérébrale. L'IRM a été utilisée dans l'aide au diagnostic de la SLA ainsi que dans

l'évaluation de sa progression. Elle est l'un des outils de neuro-imagerie les plus prometteurs (Turner et al., 2009).

La DTI est une technique d'imagerie plus avancée permettant d'évaluer l'intégrité des faisceaux de matière blanche du cerveau (Chenevert et al., 1990). Cette technique est particulièrement utile pour mettre en évidence une atteinte des neurones moteurs (Turner et al., 2011). Toutefois, très peu d'études se sont intéressées au réel potentiel diagnostique de cette technique. Par ailleurs, la DTI ne permet pas non plus d'évaluer le pronostic de la maladie (Turner et al., 2013).

2. Biomarqueurs moléculaires

Le diagnostic de la SLA ainsi que l'évaluation de sa progression nécessitent de combiner, non seulement des approches neurophysiologiques et de neuroimagerie, mais aussi des paramètres moléculaires pouvant être mesurés dans des tissus et des fluides biologiques. Parmi les sources potentielles, on retrouve le muscle, la moelle épinière et d'autres tissus post-mortem, le liquide céphalo-rachidien (LCR), le sang, la salive ou encore l'urine (Hu et al., 2006). Dans ce chapitre, seulement certaines d'entre elles seront abordées.

2.1. Biomarqueurs du LCR

Le LCR représente une source importante de biomarqueurs du fait de sa communication directe avec le cerveau et la moelle épinière. Il contient ainsi une concentration plus importante de métabolites et de protéines que les autres fluides biologiques. Durant ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au LCR comme source de biomarqueurs. Ils peuvent être classés en différentes catégories selon le phénomène biologique auquel ils font référence. On trouvera ainsi, à titre d'exemples, des marqueurs du LCR spécifiques du dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique (BHE), de la dégénérescence axonale, du stress oxydant ou encore de l'inflammation (Tarasiuk et al., 2012).

Parmi les marqueurs du dysfonctionnement de la BHE, on trouve notamment les métalloprotéinases 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9) dont le niveau est augmenté chez les patients

SLA, ce qui témoigne de la dégradation de la perméabilité de cette barrière (Demestre et al., 2005; Fang et al., 2010; Niebroj-Dobosz et al., 2010). Les neurofilaments à chaîne lourde et à chaîne légère, ou encore la protéine Tau, ont été montrés comme étant des marqueurs de la dégénérescence axonale trouvés dans le LCR. Une augmentation de leur niveau témoigne de l'atteinte du tractus cortico-spinal (Süssmuth et al., 2003; Menke et al., 2015; Steinacker et al., 2015). Toujours de façon non exhaustive, nous pouvons citer le 4-hydroxy-2,3-nonanal (4-HNE), la 3-nitrotyrosine et le 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine, présents dans le LCR comme témoins du stress oxydant caractéristique de la pathologie. Ils sont respectivement impliqués de la peroxydation lipidique, de la nitration protéique, de la modification de l'ADN (Hideo Tohgi et al., 1999; Simpson et al., 2004). Enfin, les interleukines 6 et 8 (IL-6 et IL-8), la prostaglandine E2 (PGE2) ou la protéine chimio-attractrice monocyttaire 1 (MCP-1) entre autres, sont des marqueurs de l'inflammation qui sont retrouvés dans le LCR des patients SLA (Tanaka et al., 2006; Mitchell et al., 2009; Ganesalingam et al., 2012).

Malgré certains résultats prometteurs, comme c'est le cas pour les neurofilaments, les biomarqueurs du LCR ne sont pas encore assez spécifiques et semblent avoir de meilleures applications pour l'évaluation de la progression de la maladie (Turner et al., 2009; Tarasiuk et al., 2012).

2.2. Biomarqueurs musculaires

De prime abord, le muscle apparaît comme le tissu le plus approprié à étudier du fait de son implication majeure dans le processus de dénervation caractéristique de la SLA. Des modifications au niveau moléculaire ont été mises en évidence ces dernières années dans les muscles des patients. C'est le cas de la protéine inhibitrice de la croissance neuritique Nogo-A. En 2002, Dupuis et collaborateurs avaient démontré que la protéine Nogo-A voit son expression augmentée chez les patients SLA mais pas chez les sujets sains (Dupuis et al., 2002). En 2005, l'étude de Jokic et collaborateurs a révélé que l'augmentation de l'expression de Nogo-A musculaire corrèle avec le score ALSFRS-R (Jokic et al., 2005). Enfin, en 2007, Pradat et collaborateurs avaient démontré que le niveau d'expression de Nogo-A permet de différencier, chez des patients présentant une atteinte des motoneurones, ceux

qui vont développer une SLA de ceux qui vont développer un autre trouble (Pradat et al., 2007).

Par ailleurs, des études transcriptomiques ont révélé, en 2012, l'existence de modifications de l'expression de certains groupes de gènes. Ces changements d'expression permettent de discriminer des patients à un stade précoce de ceux à un stade plus avancé de la maladie (Pradat et al., 2012).

Cependant, l'utilisation de tissus musculaires présente deux limitations majeures. D'une part, la biopsie musculaire est une technique invasive et douloureuse. De ce fait, cette approche n'est pas obligatoire dans l'examen diagnostique des patients, et il apparaît difficile de mettre en place des études de suivi longitudinal. D'autre part, l'existence de différents sites de début de la maladie et d'une propagation hétérogène de la maladie, le choix du muscle à prélever apparaît difficile.

2.3. Biomarqueurs sanguins

Le sang apparaît comme étant une source de biomarqueurs plus facile d'accès et pouvant être utilisée pour de nombreux tests à moindre coût. Ces 20 dernières années, la recherche de biomarqueurs d'origine sanguine a été particulièrement importante et a permis de mettre en avant un grand nombre de biomarqueurs potentiels. Les altérations détectées dans les fractions sanguines reflètent des atteintes à la fois du système nerveux central et de la périphérie. La revue qui suit reprend les résultats de nombreuses études qui ont mis en évidence des changements systémiques pouvant servir de biomarqueurs potentiels.

Review Article

Blood Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Myth or Reality?

Laura Robelin^{1,2} and Jose Luis Gonzalez De Aguilar^{1,2}

¹ *Université de Strasbourg, UMR-S 1118, Strasbourg, France*

² *INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France*

Correspondence should be addressed to Laura Robelin; laura.robelin@etu.unistra.fr and Jose Luis Gonzalez De Aguilar; gonzalez@unistra.fr

Received 5 March 2014; Accepted 12 May 2014; Published 2 June 2014

Academic Editor: Ana Cristina Calvo

Copyright © 2014 L. Robelin and J. L. Gonzalez De Aguilar. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal condition primarily characterized by the selective loss of upper and lower motor neurons. At present, the diagnosis and monitoring of ALS is based on clinical examination, electrophysiological findings, medical history, and exclusion of confounding disorders. There is therefore an undeniable need for molecular biomarkers that could give reliable information on the onset and progression of ALS in clinical practice and therapeutic trials. From a practical point of view, blood offers a series of advantages, including easy handling and multiple testing at a low cost, that make it an ideal source of biomarkers. In this review, we revisited the findings of many studies that investigated the presence of systemic changes at the molecular and cellular level in patients with ALS. The results of these studies reflect the diversity in the pathological mechanisms contributing to disease (e.g., excitotoxicity, oxidative stress, neuroinflammation, metabolic dysfunction, and neurodegeneration, among others) and provide relatively successful evidence of the usefulness of a wide-ranging panel of molecules as potential biomarkers. More studies, hopefully internationally coordinated, would be needed, however, to translate the application of these biomarkers into benefit for patients.

1. A Brief Definition of ALS

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), also named as motor neuron disease or Lou Gehrig's disease, is a fatal condition primarily characterized by the selective loss of upper motor neurons, which originate in the motor cortex and form the pyramidal tract, and lower motor neurons, which connect the spinal cord and brainstem to skeletal muscles. Progressive muscle weakness and atrophy, fasciculations, hyperreflexia, dysarthria, and dysphagia are common features of ALS. Of note, a significant proportion of cases presents with cognitive impairment in the form of frontotemporal lobe degeneration. Death often occurs by respiratory complications within two to five years of diagnosis. The disease typically appears between 40 and 70 years of age, and affects about two per 100,000 of people. About 90% of cases are considered as sporadic, without any documented family history. The remainder cases are most often dominantly inherited. Both

forms are clinically and pathologically undistinguishable, which suggests common pathogenic mechanisms. Riluzole, which is assumed to protect motor neurons from glutamate-induced excitotoxicity, is the only accepted medication for the treatment of ALS, although its benefit is quite limited [1].

Defects in a very heterogeneous group of genes have been shown to increase the risk or to be the cause of ALS (see updated information on ALS genes at <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>) [2]. According to the relative abundance among familial (and sporadic) cases, the four most important genes causing ALS are *c9orf72* (about 40% of familial cases and 5–7% of sporadic cases), which gives rise to an expansion of an intronic hexanucleotide repeat, *sod1* (about 20% of familial cases and 2–7% of sporadic cases), which encodes Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), *fus* (about 5% of familial cases and less than 1% of sporadic cases), which encodes fused in sarcoma/translocated in liposarcoma (FUS/TLS), and *tardbp* (about 3% of familial cases and 1.5% of sporadic cases), which

encodes TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) [3–6]. As a result of such a genetic diversity, many mechanisms have been proposed to underlie motor neuron degeneration. Thus, excitotoxicity, oxidative stress, aberrant protein aggregation, defective axonal transport, mitochondrial dysfunction, and altered RNA metabolism have been incriminated in one way or another in the molecular and cellular pathways leading to ALS [7–12]. However, the exact nature of the selective degeneration of motor neurons still remains elusive. It is commonly accepted that the disease is the consequence of a combination of multiple pathogenic processes, which take place not only in motor neurons but also in nonneuronal neighboring cells, such as astrocytes and microglial cells and, beyond the central nervous system, skeletal myocytes and, likely, other cells in the body [13–17].

2. The Need for ALS Biomarkers

At present, the diagnosis of ALS is based on clinical examination, electrophysiological findings, medical history, and exclusion of confounding disorders. Although the disease is easily recognized in its full-blown presentation, during the early stages, the diagnostic process takes as long as between 13 to 18 months, since only the deterioration of symptoms and the presence of signs indicating both upper and lower motor neuron involvement can assess the existence of ALS [18]. In spite of intensive research conducted over the past 20 years, we do not currently have practical diagnostic biomarkers. This often leads to diagnostic delays before the appropriate treatment is administered. Even if riluzole is very limited in scope, it is generally acknowledged that the earlier the treatment, the more effective it is. There is also an undeniable lack of robust biomarkers that indicate the progression of ALS in clinical practice and in the context of therapeutic trials. Indeed, these are complex and long trials, because the only indicator frequently used is the average cohort survival rate. A reliable progression marker would make it possible to conduct shorter trials, on a smaller number of patients, thereby opening up the prospect of more diversified trials [19, 20].

In search of valid biomarkers to recognize ALS and pronosticate its evolution, neurophysiological approaches, such as electromyography and motor unit number estimation (MUNE), routinely play a key part in detecting lower motor neuron pathology [21, 22]. However, these methods fail to reliably monitor disease progression and hence effects of treatment. More advanced techniques, such as motor unit number index, Bayesian MUNE, and electrical impedance myography, are more accurate but still need further validation against neuropathological correlates [23–25]. As far as upper motor neuron involvement is concerned, transcranial magnetic stimulation (TMS) and its variants are useful tools to evaluate motor cortical and corticospinal dysfunction and discriminate between ALS and mimic disorders. However, at the present time, TMS techniques are mostly conducted only in the context of clinical research [26]. Besides these neurophysiological tools, neuroimaging techniques are experiencing an unprecedented development in the field of ALS research, as attested by the variety of approaches under investigation. These include radionuclide

imaging techniques such as single-photon emission computed tomography and positron emission tomography, as well as conventional magnetic resonance imaging (MRI) and its derived applications: diffusion tensor imaging, functional MRI (both blood-oxygen-level dependent and resting-state), and magnetic resonance spectroscopy [27]. Over the last two decades, ALS neuroimaging has provided compelling evidence of the pathological processes occurring *in vivo* at the whole brain level, extending the notion of ALS as a multisystem disease. It has also offered promising candidate biomarkers [28]. Additional efforts must be done, however, to standardize operating procedures between clinical centers that would make these imaging techniques more widely applicable at an individual level [29].

The objective assessment of ALS and the monitoring of its progression most probably need the implementation of multipanel biomarkers, which combine neurophysiological and neuroimaging criteria with molecular parameters measured in tissues and biological fluids. At first glance, skeletal muscles represent privileged “observers” of the process of motor neuron degeneration. Thus, modifications in this tissue at the molecular level, such as alterations in gene expression or protein amounts, can appropriately monitor disease progression and the effects of disease-modifying drugs. Previous studies revealed that the neurite outgrowth inhibitor Nogo-A was expressed in muscles of ALS patients at levels that correlated with the severity of the disease [30]. Also, the analysis of the transcriptome of muscle biopsies showed that the expression of selected groups of genes distinguished between early and advanced muscle pathology in ALS patients [31]. A major limitation of these approaches relies on the fact that performing a muscle biopsy, though easily accessible, remains invasive and is not mandatory for the diagnostic examination of patients. Cerebrospinal fluid (CSF) also represents an important source of biomarkers, since it communicates directly with the brain parenchyma, and hence contains proteins and metabolites, at a concentration relatively higher than in other fluids, that can indicate the presence and extent of a neurodegenerative process. Nevertheless, from a practical point of view, blood appears to be the most suitable source for biomarker discovery; it is easy to access and handle and allows unharmed multiple testing at a low cost [20, 32]. On the other hand, it must be assumed that its composition is affected by biochemical changes in the brain and the spinal cord (or the skeletal muscles) as a result of a pathological process. Alternatively, alterations in the blood compartment could intrinsically reflect a more widespread disease sharing both central and peripheral manifestations. This minireview revisits the results of many studies that investigated systemic changes at the molecular and cellular levels in patients with ALS. When appropriate, we compared these studies to observations in the CSF, as a means to reinforce the potential of the identified blood candidate biomarkers. In essence, we performed a PubMed-based literature search on keywords related to ALS biomarkers and blood, including plasma and serum. The results are presented according to major mechanisms involved in motor neuron degeneration.

3. Biomarkers Related to Excitotoxicity

Excitotoxicity is a pathological process caused by the excessive stimulation of glutamatergic receptors. It occurs when the balance between release and reuptake of glutamate is disrupted, which leads to disproportionate glutamate-induced calcium influx, and subsequent neuronal toxicity and death [7]. Several blood biomarkers have been proposed in relation to this toxic pathway (Table 1). Ferrarese and coworkers [33] showed a decrease in glutamate reuptake by platelets obtained from ALS patients, and Pouloupoulou and coworkers [34] found that the expression of the metabotropic glutamate receptor subtype mGLUR2, which is known to provide protection against excitotoxicity, was diminished in ALS T lymphocytes. Therefore, these findings reflected the characteristic alterations of glutamate metabolism in the central nervous system of ALS. This was confirmed by the high concentration of glutamate detected in the CSF of many patients [35]. Homocysteine has been shown to facilitate both excitotoxicity and production of reactive oxygen species. Several studies reported increased levels of homocysteine in ALS patients that correlated with the progression of the disease [36, 37]. On the other hand, it was also observed that the amount of folate, which is involved in homocysteine catabolism, was decreased, thus reinforcing the potential toxic mechanism induced by homocysteine accumulation [36].

4. Biomarkers Related to Oxidative Stress

Oxidative stress is the result of an imbalance between the production of reactive oxygen species, usually generated by the mitochondrial respiratory chain, and their removal from the cellular environment by antioxidant defenses. Strong evidence supports the implication of an excess of reactive oxygen species in inducing cell death in ALS [8]. Thus, numerous biomarkers indicating the presence of oxidative stress in the periphery have been proposed (Table 1). Babu and coworkers [38] reported a reduction of the activity of catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and glutathione reductase in erythrocytes of ALS patients, and this reduction was shown to be correlated with the duration of the disease. In another study, the enzymatic activity of glutathione peroxidase and SOD1 was also found to decrease in ALS erythrocytes; in addition, reduced SOD1 activity correlated with the functional status of the patients [39]. Contrasting with these findings, Tuncel and coworkers [40] reported rather high levels of SOD activity in erythrocytes of ALS patients that did not correlate with the disease status. Further discrepancies came from measures in the CSF, because both increased and decreased SOD activities were revealed [41, 42]. Along with the alteration of the activity of antioxidant enzymes, it must be added that the overall peroxyl-scavenging capacity was shown to be high in ALS patients, which was interpreted as a protective mechanism [43]. However, the amount of uric acid, which also possesses free radical scavenging activity, was decreased, and this reduction was shown to be correlated with the rate of disease progression [44]. Again, the fact that the concentration of uric acid appeared rather increased in the CSF of ALS patients contrasted with these findings [42].

Several metabolites involved in or derived from oxidative stress reactions have also been proposed as biomarkers (Table 1). Babu and coworkers [38] showed that the concentration of antioxidant glutathione was decreased in erythrocytes of ALS patients, and this reduction was correlated with the duration of the disease. On the other hand, Bogdanov and coworkers [45] found increased amounts of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2'dG), which is a product of the oxidative injury to DNA. Furthermore, these authors observed that 8OH2'dG levels were higher in ALS patients with limb onset than in those with bulbar onset. The increase in the concentration of 8OH2'dG was also found in the CSF of ALS patients [46]. Similarly, the amounts of 4-hydroxy-2,3-nonenal, a product of lipid peroxidation, and prostaglandin E2, involved in free radical production, were found to be increased in the serum, as well as in the CSF [47, 48]. Furthermore, the concentration of nitric oxide, which is also involved in free radical production, was high in ALS patients, and this increase correlated with the duration of the disease [49]. Finally, it is known that alterations in the metabolism of cellular iron can induce oxidative stress. Mitchell and coworkers [50] showed increased levels of L-ferritin but decreased levels of transferrin in ALS patients, suggesting an aberrant transport and storage of iron that could lead to toxicity.

5. Biomarkers Related to Inflammation

ALS is characterized by an uncontrolled recruitment of microglial cells in the central nervous system and other immune cells, which contribute to motor neuron degeneration via complex and as yet misunderstood mechanisms [14]. Many of the factors involved in these inflammatory reactions can be followed in the periphery as potential biomarkers (Table 2). Therefore, the circulating levels of eosinophil-derived neurotoxin, eotaxin, granzyme A and granzyme B, high mobility group box 1 (HMGB1) autoantibody, interleukin-6, interferon- γ , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor receptor, and wide-range C-reactive protein (wrCRP) were found to be increased in ALS patients [48–51, 57–63, 67]. In contrast, levels of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), OX40, soluble receptor for advanced glycation end products, and soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand were shown to be decreased [50, 64, 66, 68]. In some cases, these changes were associated with clinical parameters. The concentrations of interferon- γ , MCP-1, TNF- α , and GM-CSF correlated with the duration of the disease [49, 50], and the levels of granzyme B, HMGB1 autoantibody, and wrCRP correlated with the degree of severity [59, 60, 63]. As observed in blood, increased levels of MCP-1 were detected in the CSF of ALS patients [58]. However, other studies reported an increase of this chemokine only in the CSF [78].

Gene expression changes in immune cells have also been proposed as candidate biomarkers for ALS (Table 2). Thus, the expression of C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) was decreased in monocytes obtained from ALS patients [51, 52]. In addition, it was found that patients with limb onset had less peripheral blood mononuclear

TABLE 1: Blood biomarkers related to excitotoxicity and oxidative stress.

Biomarker	ALS	Controls	Finding	Reference
8OH2'dG	57	27H 14ND	High plasma level Higher level in limb versus bulbar onset	[45]
Antioxidant enzyme	20	20H	Low erythrocyte activity Correlated with duration	[38]
Antioxidant status	28	20H	High serum level	[43]
Glutamate	42	40H 21ND	Low platelet uptake	[33]
Glutathione	20	20H	Low erythrocyte level Correlated with duration	[38]
GPX	88	50H	Low erythrocyte activity	[39]
HNE	85	16H 33ND	High serum level	[48]
L-Ferritin	29	36H	High plasma level	[50]
Folate	62	88H	Low plasma level	[36]
Homocysteine	62	88H	High plasma level Correlated with progression	[36]
	65	67ND	High plasma level	[37]
mGLUR2	20	20H 20ND	Low T lymphocyte expression	[34]
Nitric oxide	22	20H	High serum level Correlated with duration	[49]
Prostaglandin E2	20	20H	High serum level	[47]
Red cell SOD	25	10H	High level	[40]
SOD1	88	50H	Low erythrocyte activity Correlated with disease status	[39]
Transferrin	29	36H	Low plasma level	[50]
Uric acid	86	86H	Low serum level Correlated with ALSFRS-R	[44]

H: healthy; ND: neurological/neurodegenerative disease; 8OH2'dG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; ALSFRS-R: revised ALS functional rating scale; GPX: glutathione peroxidase; HNE: 4-hydroxy-2,3-nonenal; mGLUR2: metabotropic glutamate receptor subtype 2; SOD1: Cu/Zn superoxide dismutase.

cells expressing CCR2 than patients with bulbar onset [53]. Similarly, Mantovani and coworkers [52] also reported a decrease in the expression of human leukocyte antigen-DR by ALS monocytes. Reinforcing the extent of the inflammatory process, ALS patients also showed high levels of E-selectin, which is a known cytokine-induced activator of endothelial cells [56]. Finally, not only inflammatory factors but also immune cells themselves underwent quantitative modifications that could have biomarker potential for ALS. Thus, the amount of CD16+ peripheral mononuclear leukocytes was higher in patients with bulbar palsy or predominant upper motor neuron involvement than in patients with peripheral symptoms [54]. Mantovani and coworkers [52] observed less CD14+ monocytes but more CD4+ T lymphocytes in the blood of ALS patients. These authors also found less CD8+ cytotoxic T lymphocytes, although other studies rather showed opposite findings [55]. Additional studies reported an increase in the amount of natural killer T lymphocytes [55], a high neutrophil-to-lymphocyte ratio [63], and a decrease in the number of regulatory T cells [52, 55]. Moreover, the amounts of these regulatory T cells correlated with the disease progression rates [65].

6. Biomarkers Related to Metabolic Dysfunction

Beyond motor neuron pathology, ALS is characterized by several defects in energy homeostasis, including weight loss, hypermetabolism, and hyperlipidemia [17]. Therefore, measures of this metabolic dysfunction at the blood level can have biomarker potential (Table 3). An increase in low- to high-density lipoprotein cholesterol ratio, which is a typical index of a metabolic syndrome, was observed in ALS patients, and this increased ratio correlated with the survival rates [75]. In this respect, although the contribution of genetic variants of apolipoprotein E (APOE) to ALS is debated [79], its role in the regulation of cholesterol metabolism could influence the course of the disease. Thus, Lacomblez and coworkers [70] reported that APOE concentrations correlated with both the rate of deterioration of the patients and their survival times. As a more direct reflect of the degree of motor neuron degeneration, other studies measured the circulating concentration of the key neuronal metabolite N-acetylaspartate and found increased levels in ALS patients that correlated with the disease progression rates [76]. Similarly, the enzymatic activity

TABLE 2: Blood biomarkers related to inflammation.

Biomarker	ALS	Controls	Finding	Reference
CCR2	42	38H 34ND	Low monocyte expression	[51]
	51	75H	Low monocyte expression	[52]
	50	40H	Low PBMC expression Less CCR2 + PBMCs in limb versus bulbar onset	[53]
CD14 + monocyte	51	75H	Low level	[52]
CD4 + T lymphocyte	51	75H	High level	[52]
CD16 + leucocyte	27	8H 9ND	High level in ALS subtypes	[54]
CD8 + T lymphocyte	51	75H	Low level	[52]
	36	35H	High level	[55]
E-selectin	25	14ND	High serum level	[56]
EDN	44	44H 82ND	High serum level	[57]
Eotaxin	20	20ND	High serum level	[58]
GM-CSF	29	36H	Low plasma level	[50]
			Correlated with duration	
Granzyme A and B	30	30H	High serum level	[59]
			Granzyme B level correlated with severity	
HLA-DR	51	75H	Low monocyte expression	[52]
HMGB1 autoantibody	61	40H 80ND	High serum level	[60]
			Correlated with severity	
IL-6	20	20ND	High serum level in hypoxic patients	[61]
Interferon- γ	22	20H	High serum level	[49]
			Correlated with duration	
MCP-1	85	16H 33ND	High serum level but low in later stages	[48]
	27	30ND	High serum level	[62]
	42	38H 34ND	High plasma level	[51]
	29	36H	High plasma level Correlated with duration	[50]
NK T lymphocyte	36	35H	High level	[55]
NLR	80	80H	High ratio	[63]
OX40	25	15H	Low serum level	[64]
	51	75H	Low level	[52]
Regulatory T cell	36	35H	Low level	[55]
	54	33H	Correlated with progression	[65]
sRAGE	54	33H	High level in slow progression illness	[66]
	20	20H	Low level in rapid progression illness	
TNF- α	20	20ND	Low serum level	[66]
	20	20ND	High serum level in hypoxic patients	[61]
	22	20H	High serum level	[49]
TNF receptor	88	40H	Correlated with duration	[67]
	88	40H	High plasma level	
TRAIL	25	20H	High plasma level	[67]
wrCRP	80	80H	Low serum level	[68]
			High level	
			Correlated with ALSFRS-R	[63]

H: healthy; ND: neurological/neurodegenerative disease; ALSFRS-R: revised ALS functional rating scale; CCR2: C-C chemokine receptor type 2; EDN: eosinophil-derived neurotoxin; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor; HLA-DR: human leukocyte antigen-DR; HMGB1: high mobility group box 1; IL: interleukin; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; NK: natural killer; NLR: neutrophil-to-lymphocyte ratio; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end products; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; wrCRP: wide-range C-reactive protein.

TABLE 3: Blood biomarkers related to endocrinology and metabolism.

Biomarker	ALS	Controls	Finding	Reference
Angiogenin	79	72H	High serum level High level in limb versus bulbar onset	[69]
Apolipoprotein E	403	1091ND	Plasma level correlated with progression and survival	[70]
CNTF	36	13H 30ND	High serum level	[71]
Creatine kinase	30	—	High serum level in limb versus bulbar onset	[72]
Endoglin	25	25H	Low serum level	[73]
IGF	28	28H 41ND	High serum level	[74]
IGFBP-1	28	28H 41ND	Low serum level	[74]
LDL/HDL ratio	286	369H	High plasma level Correlated with survival	[75]
N-acetylaspartate	112	51H	High serum level Correlated with progression	[76]
Transglutaminase	17	21ND	Serum activity correlated with disease status	[77]

H: healthy; ND: neurological/neurodegenerative disease; CNTF: ciliary neurotrophic factor; HDL: high-density lipoprotein; IGF: insulin-like growth factor; IGFBP: insulin-like growth factor binding protein-1; LDL: low-density lipoprotein.

of transglutaminase, viewed as an index proportional to the extent of neuronal loss, appeared, both in blood and CSF, high at the initial stages of the disease but very low at the end stages [77]. Several angiogenic factors, connected with the control of neovascularization, neurotrophicity, and metabolism, have been proposed to be involved in ALS neurodegeneration [80]. Thus, Cronin and coworkers [69] reported an increase in the levels of angiogenin that was more important in limb onset patients than in bulbar onset patients. In contrast, the amount of endoglin, another angiogenic factor, was found to be reduced [73]. Levels of insulin-like growth factor (IGF), which is known to activate anabolic pathways, were higher in ALS patients, whereas those of IGF binding protein-1 were lower, thus suggesting an impairment in the bioavailability of this trophic factor [74]. Also, levels of creatine kinase, which make ATP rapidly available to cope with energy demands, were shown to be higher in ALS patients with lumbar onset, as compared to those with bulbar onset [72]. Along with this, the concentration of ciliary neurotrophic factor (CNTF), a potent survival factor for motor neurons, was also high [71]. Taken as a whole, these changes would probably indicate leakage and/or overexpression of creatine kinase and CNTF from diseased muscles.

7. Biomarkers Related to Neurodegeneration

The loss of motor neurons is the primary neuropathological hallmark of ALS and, for this reason, many studies attempted to identify blood biomarkers reflecting this cell death process (Table 4). Apoptosis has been shown to play a crucial role in motor neuron cell loss in ALS [81]. Thus, Ilzecka and coworkers [82, 83] showed increased amounts of proapoptotic interleukin-1 β converting enzyme/caspase-1 and caspase-9 in ALS patients; in addition, the increased levels of caspase-9 correlated with both the degree of severity and the duration of

the disease. Similarly, a nonnegligible proportion of patients contained high levels of anti-Fas antibody, which is known to activate Fas-dependent programmed cell death [84]. Also, the concentration of cystatin C, which is a cysteine protease inhibitor involved in apoptotic neuronal cell death, was increased [85]. This study showed, however, that the amount of cystatin C in the CSF of ALS patients was rather decreased in a manner that correlated with disease progression and survival [85].

It has been postulated that the release of components of the degenerating axons into the circulation could indicate the degree of axonal pathology and hence serve as potential biomarkers for ALS (Table 4). Gaiottino and coworkers [86] reported high levels of neurofilament light chain in the serum of ALS patients, as also observed in the CSF [87]. Similarly, the concentration of phosphorylated neurofilament heavy chain (pNF-H) was increased in ALS patients [88], and this increase correlated with a faster decline [89]. In agreement with these findings, other studies also reported increased CSF levels of pNF-H in patients with ALS [90, 91]. Finally, the amount of S100- β , the release of which would reflect the astrogliosis accompanying the dying motor neurons, decreased during the course of the disease [92], as was also the case in the CSF [93].

8. Other Blood Biomarkers

Many other blood alterations have been proposed as candidate biomarkers for ALS (Table 5). The amounts of the extracellular matrix enzyme metalloproteinase-9 (MMP-9) [99] and its extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) [95] were shown to be elevated in ALS patients. In addition, increased levels of EMMPRIN and MMP-2, another metalloproteinase, correlated with the severity of the disease [95, 98]. Contrasting with these findings, other

TABLE 4: Blood biomarkers related to neurodegeneration.

Biomarker	ALS	Controls	Finding	Reference
Anti-Fas	52	20H 22ND	High serum level in ALS subtype	[84]
Caspase-9	30	30ND	High serum level	[83]
Cystatin C	44	35H 25ND	Correlated with severity and duration	[85]
ICE/Caspase-1	25	15H	High plasma level	[82]
NFL	46	67H 97ND	High serum level	[86]
pNF-H	62	—	Plasma and serum level correlated with ALSFRS-R decline	[89]
	71	40H 52ND	High plasma level	[88]
S100- β	41	32H	Serum level correlated with progression	[92]

H: healthy; ND: neurological/neurodegenerative disease; ALSFRS-R: revised ALS functional rating scale; ICE: interleukin-1 β converting enzyme; NFL: neurofilament light chain; pNF-H: phosphorylated neurofilament heavy chain.

TABLE 5: Other blood biomarkers.

Biomarker	ALS	Controls	Finding	Reference
C9orf72	2	2H	Mononuclear cell binding of mutant c9orf72 to tri-CH ₃ histone residues	[94]
EMMPRIN	50	50H	High serum level	[95]
ICTP	21	16ND	Correlated with severity	[96]
Lead	184	194H	High serum level	[97]
MMP-2	30	15H	Correlated with risk of ALS	[98]
MMP-9	14	20H 45ND	Correlated with severity	[99]
PICP	21	16ND	High serum level	[96]
TDP-43	16	13H	Low serum level	[100]
	219	100H	Cytoplasmic lymphomonocyte location in ALS subtype	[101]
Type IV collagen	30	30H 14ND	High plasma level	[102]
			Correlated with duration	[102]

H: healthy; ND: neurological/neurodegenerative disease; EMMPRIN: extracellular matrix metalloproteinase inducer; ICTP: cross-linked telopeptide of type I collagen; MMP: matrix metalloproteinase; PICP: propeptide of type I procollagen; TDP-43: TAR DNA binding protein-43.

studies did not observe increased levels of MMP-9 in the CSF of ALS patients, suggesting that the systemic upregulation of this metalloproteinase could indicate distal neuromuscular degeneration [99, 103]. Markers of the disruption of the extracellular milieu were also reported. Thus, the concentration of the propeptide of type I procollagen, which is an index of collagen biosynthesis, appeared low in ALS patients. In contrast, the amount of the cross-linked telopeptide of type I collagen, which is an index of its degradation, was shown to be increased in a way that correlated with the disease duration [96]. Similarly, levels of type IV collagen also correlated with the duration of the disease [102].

In accordance with studies implicating heavy metals in the pathogenesis of ALS, Fang and coworkers [97] found increased levels of lead, which was considered as a risk factor. In support of these findings, high concentrations of lead were also present in the CSF [104]. Thanks to the discovery of mutations in *tardbp* and *c9orf72*, recent studies have provided new insight into the genetic causes of ALS [3, 6]. Based

on these studies, de Marco and coworkers [100] reported the accumulation of TDP-43 in the cytoplasm of circulating lymphomonocytes obtained from patients bearing *tardbp* mutations as well as from some patients without these mutations. In addition, levels of TDP-43 were increased in both blood and CSF [101, 105]. Finally, it was shown that the characteristic binding of mutant forms of C9orf72 to trimethylated residues of histones can be detected in mononuclear cells obtained from ALS patients [94].

9. Concluding Remarks

ALS is one of the most complex neurodegenerative diseases for which satisfactory therapeutic strategies are still lacking. Insufficient understanding of the mechanisms underlying ALS together with the absence of reliable and powerful diagnostic and prognostic biomarkers is a major cause for concern. Over the last two decades, the search for biomarkers, in particular from blood origin, has been huge. However,

despite intensive research, none of the proposed biomarkers has been translated into effective tools in the clinical setting. Several obstacles must be overcome before achieving the desired results. First, the robustness of numerous studies in terms of statistical power was often not enough, because of the use of small cohorts of patients. Second, the cellular and molecular changes that were shown to be significant in ALS patients, as compared to healthy subjects, lacked specificity in many cases when compared to other neurodegenerative or neurological conditions. In this regard, potential biomarkers should also be evaluated in more appropriate control conditions that can mimic ALS, the exclusion of which causes regularly diagnostic delays during early disease stages, when patients present with only upper or lower motor neuron signs [106]. Third, different studies on the same candidate biomarker reported sometimes contradictory results. To avoid this unwanted inconsistency, both the choice of well-defined individuals and the standardization of quantification methods should be mandatory. In this respect, recent studies obtained more reassuring results when measuring pNF-H levels in the CSF to discriminate between ALS and control patients in a centralized, multicenter sample collection approach [107]. Last but not least, it should be strengthened that blood biomarkers might not always reflect the motor neuron degenerative process of ALS as those present in the CSF [108]. In fact, the blood-CSF barrier and, in particular, the blood-brain barrier could impede the crossing of diseased brain biomarkers towards the systemic compartment. Contrasting with this view, it must be also noted that the CSF is normally absorbed into the circulation on a daily basis, allowing detection of potential biomarkers in the periphery [109]. In addition, it is relatively accepted that the integrity of the blood-brain barrier is perturbed during the course of the neuropathological process of ALS [110], which would favor a leakage of molecules into the blood flow. In all, this could explain why many (but not all) of the systemic alterations affecting candidate biomarkers were associated with parallel changes in the CSF. Despite limitations and contradictory results, blood stands as an ideal source of biomarkers. A more realistic perspective arises from recent studies in the “omics” era (not treated in this review) supporting that it is likely more appropriate to identify panels of biomarkers, rather than focusing on a single gene, protein, or metabolite, in order to gain sensitivity and specificity [111–116]. Further investigations are therefore warranted.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by funds from the European Community's Health Seventh Framework Programme under Grant agreement no. 259867 and “Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres Maladies du Motoneurone.” Laura Robelin is supported by “Association pour la Recherche et le Développement de

Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives.” Jose Luis Gonzalez De Aguilar is the recipient of a “Chaire d'Excellence INSERM/Université de Strasbourg.”

References

- [1] P. H. Gordon, “Amyotrophic lateral sclerosis: an update for 2013 clinical features, pathophysiology, management and therapeutic trials,” *Aging and Disease*, vol. 4, pp. 295–310, 2013.
- [2] W. Robberecht and T. Philips, “The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 14, no. 4, pp. 248–264, 2013.
- [3] M. DeJesus-Hernandez, I. R. Mackenzie, B. F. Boeve et al., “Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS,” *Neuron*, vol. 72, no. 2, pp. 245–256, 2011.
- [4] D. R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson et al., “Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis,” *Nature*, vol. 362, no. 6415, pp. 59–62, 1993.
- [5] T. J. Kwiatkowski Jr., D. A. Bosco, A. L. LeClerc et al., “Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis,” *Science*, vol. 323, no. 5918, pp. 1205–1208, 2009.
- [6] J. Sreedharan, I. P. Blair, V. B. Tripathi et al., “TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis,” *Science*, vol. 319, no. 5870, pp. 1668–1672, 2008.
- [7] E. Bogaert, C. D'Ydewalle, and L. van den Bosch, “Amyotrophic lateral sclerosis and excitotoxicity: from pathological mechanism to therapeutic target,” *CNS and Neurological Disorders. Drug Targets*, vol. 9, no. 3, pp. 297–304, 2010.
- [8] S. C. Barber and P. J. Shaw, “Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 48, no. 5, pp. 629–641, 2010.
- [9] A. M. Blokhuis, E. J. N. Groen, M. Koppers, L. H. van den Berg, and R. J. Pasterkamp, “Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis,” *Acta Neuropathologica*, vol. 125, pp. 777–794, 2013.
- [10] L. R. Fischer-Hayes, T. Brotherton, and J. D. Glass, “Axonal degeneration in the peripheral nervous system: implications for the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis,” *Experimental Neurology*, vol. 246, pp. 6–13, 2013.
- [11] M. Cozzolino and M. T. Carri, “Mitochondrial dysfunction in ALS,” *Progress in Neurobiology*, vol. 97, no. 2, pp. 54–66, 2012.
- [12] S. C. Ling, M. Polymenidou, and D. W. Cleveland, “Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis,” *Neuron*, vol. 79, pp. 416–438, 2013.
- [13] M. R. Vargas and J. A. Johnson, “Astroglialosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes,” *Neurotherapeutics*, vol. 7, no. 4, pp. 471–481, 2010.
- [14] T. Philips and W. Robberecht, “Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease,” *The Lancet Neurology*, vol. 10, no. 3, pp. 253–263, 2011.
- [15] L. Dupuis, J.-L. Gonzalez de Aguilar, A. Echaniz-Laguna et al., “Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons,” *PLoS ONE*, vol. 4, no. 4, Article ID e5390, 2009.
- [16] J. G. Boyer, A. Ferrier, and R. Kothary, “More than a bystander: the contributions of intrinsic skeletal muscle defects in motor neuron diseases,” *Frontiers in Physiology*, vol. 4, article 356, 2013.

- [17] L. Dupuis, P.-F. Pradat, A. C. Ludolph, and J.-P. Loeffler, "Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis," *The Lancet Neurology*, vol. 10, no. 1, pp. 75–82, 2011.
- [18] A. Radunović, H. Mitsumoto, and P. N. Leigh, "Clinical care of patients with amyotrophic lateral sclerosis," *The Lancet Neurology*, vol. 6, no. 10, pp. 913–925, 2007.
- [19] H. Ryberg and R. Bowser, "Protein biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis," *Expert Review of Proteomics*, vol. 5, no. 2, pp. 249–262, 2008.
- [20] M. R. Turner, M. C. Kiernan, P. N. Leigh, and K. Talbot, "Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis," *The Lancet Neurology*, vol. 8, no. 1, pp. 94–109, 2009.
- [21] N. C. Joyce and G. T. Carter, "Electrodiagnosis in persons with amyotrophic lateral sclerosis," *PM & R*, vol. 5, supplement 5, pp. S89–S95, 2013.
- [22] O. Rashidipour and K. M. Chan, "Motor unit number estimation in neuromuscular disease," *Canadian Journal of Neurological Sciences*, vol. 35, no. 2, pp. 153–159, 2008.
- [23] S. D. Nandedkar, P. E. Barkhaus, and E. V. Stålberg, "Reproducibility of mUNIX in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Muscle and Nerve*, vol. 44, no. 6, pp. 919–922, 2011.
- [24] R. D. Henderson, P. G. Ridall, N. M. Hutchinson, A. N. Pettitt, and P. A. McCombe, "Bayesian statistical mUNE method," *Muscle and Nerve*, vol. 36, no. 2, pp. 206–213, 2007.
- [25] S. B. Rutkove, H. Zhang, D. A. Schoenfeld et al., "Electrical impedance myography to assess outcome in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials," *Clinical Neurophysiology*, vol. 118, no. 11, pp. 2413–2418, 2007.
- [26] S. Vucic, U. Ziemann, A. Eisen, M. Hallett, and M. C. Kiernan, "Transcranial magnetic stimulation and amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiological insights," *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 84, pp. 1161–1170, 2013.
- [27] M. R. Turner, F. Agosta, P. Bede, V. Govind, D. Lulé, and E. Verstraete, "Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis," *Biomarkers in Medicine*, vol. 6, no. 3, pp. 319–337, 2012.
- [28] B. R. Foerster, R. C. Welsh, and E. L. Feldman, "25 years of neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis," *Nature Reviews Neurology*, vol. 9, pp. 513–524, 2013.
- [29] P. Bede and O. Hardiman, "Lessons of ALS imaging: pitfalls and future directions—a critical review," *NeuroImage: Clinical*, vol. 4, pp. 436–443, 2014.
- [30] N. Jokic, J.-L. Gonzalez De Aguilar, P.-F. Pradat et al., "Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity," *Annals of Neurology*, vol. 57, no. 4, pp. 553–556, 2005.
- [31] P.-F. Pradat, O. Dubourg, M. de Tapia et al., "Muscle gene expression is a marker of amyotrophic lateral sclerosis severity," *Neurodegenerative Diseases*, vol. 9, no. 1, pp. 38–52, 2011.
- [32] J. Tarasiuk, A. Kułakowska, W. Drozdowski, J. Kornhuber, and P. Lewczuk, "CSF markers in amyotrophic lateral sclerosis," *Journal of Neural Transmission*, vol. 119, no. 7, pp. 747–757, 2012.
- [33] C. Ferrarese, G. Sala, R. Riva et al., "Decreased platelet glutamate uptake in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Neurology*, vol. 56, no. 2, pp. 270–272, 2001.
- [34] C. Pouloupoulou, P. Davaki, V. Koliarakis, D. Kolovou, I. Markakis, and D. Vassilopoulos, "Reduced expression of metabotropic glutamate receptor 2 mRNA in T cells of ALS patients," *Annals of Neurology*, vol. 58, no. 6, pp. 946–949, 2005.
- [35] O. Spreux-Varoquaux, G. Bensimon, L. Lacomblez et al., "Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 193, no. 2, pp. 73–78, 2002.
- [36] S. Zoccolella, I. L. Simone, P. Lamberti et al., "Elevated plasma homocysteine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Neurology*, vol. 70, no. 3, pp. 222–225, 2008.
- [37] F. Valentino, G. Bivona, D. Butera et al., "Elevated cerebrospinal fluid and plasma homocysteine levels in ALS," *European Journal of Neurology*, vol. 17, no. 1, pp. 84–89, 2010.
- [38] G. N. Babu, A. Kumar, R. Chandra et al., "Oxidant-antioxidant imbalance in the erythrocytes of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients correlates with the progression of disease," *Neurochemistry International*, vol. 52, no. 6, pp. 1284–1289, 2008.
- [39] E. Cova, P. Bongioanni, C. Cereda et al., "Time course of oxidant markers and antioxidant defenses in subgroups of amyotrophic lateral sclerosis patients," *Neurochemistry International*, vol. 56, no. 5, pp. 687–693, 2010.
- [40] D. Tuncel, N. Aydin, P. Aribal Kocatürk, G. Özelçi Kavas, and S. Sarikaya, "Red cell superoxide dismutase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis," *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 13, no. 10, pp. 991–994, 2006.
- [41] M.-C. Boll, M. Alcaraz-Zubeldia, S. Montes, L. Murillo-Bonilla, and C. Rios, "Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ALS patients," *Neurochemical Research*, vol. 28, no. 5, pp. 699–703, 2003.
- [42] A. N. Kokić, Z. Stević, S. Stojanović et al., "Biotransformation of nitric oxide in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients," *Redox Report*, vol. 10, no. 5, pp. 265–270, 2005.
- [43] J. Ilzecka, "Total antioxidant status is increased in the serum of amyotrophic lateral sclerosis patients," *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 63, no. 4, pp. 297–302, 2003.
- [44] D. Keizman, M. Ish-Shalom, S. Berliner et al., "Low uric acid levels in serum of patients with ALS: further evidence for oxidative stress?" *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 285, no. 1–2, pp. 95–99, 2009.
- [45] M. Bogdanov, R. H. Brown Jr., W. Matson et al., "Increased oxidative damage to DNA in ALS patients," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 29, no. 7, pp. 652–658, 2000.
- [46] Y. Ihara, K. Nobukuni, H. Takata, and T. Hayabara, "Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu, Zn-superoxide dismutase mutation," *Neurological Research*, vol. 27, no. 1, pp. 105–108, 2005.
- [47] J. Ilzecka, "Prostaglandin E2 is increased in amyotrophic lateral sclerosis patients," *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 108, no. 2, pp. 125–129, 2003.
- [48] E. P. Simpson, Y. K. Henry, J. S. Henkel, R. G. Smith, and S. H. Appel, "Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden," *Neurology*, vol. 62, no. 10, pp. 1758–1765, 2004.
- [49] G. N. Babu, A. Kumar, R. Chandra, S. K. Puri, J. Kalita, and U. K. Misra, "Elevated inflammatory markers in a group of amyotrophic lateral sclerosis patients from northern India," *Neurochemical Research*, vol. 33, no. 6, pp. 1145–1149, 2008.
- [50] R. M. Mitchell, Z. Simmons, J. L. Beard, H. E. Stephens, and J. R. Connor, "Plasma biomarkers associated with ALS and their relationship to iron homeostasis," *Muscle and Nerve*, vol. 42, no. 1, pp. 95–103, 2010.

- [51] R. Zhang, R. Gascon, R. G. Miller et al., "MCP-1 chemokine receptor CCR2 is decreased on circulating monocytes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS)," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 179, no. 1-2, pp. 87-93, 2006.
- [52] S. Mantovani, S. Garbelli, A. Pasini et al., "Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 210, no. 1-2, pp. 73-79, 2009.
- [53] P. K. Gupta, S. Prabhakar, N. K. Sharma, and A. Anand, "Possible association between expression of chemokine receptor-2 (CCR2) and Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients of North India," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, Article ID e38382, 2012.
- [54] W. Schubert and H. Schwan, "Detection by 4-parameter microscopic imaging and increase of rare mononuclear blood leukocyte types expressing the FcγRIII receptor (CD16) for immunoglobulin G in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS)," *Neuroscience Letters*, vol. 198, no. 1, pp. 29-32, 1995.
- [55] M. Rentzos, E. Evangelopoulos, E. Sereti et al., "Alterations of T cell subsets in ALS: a systemic immune activation?" *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 125, no. 4, pp. 260-264, 2012.
- [56] J. Ikeda, T. Kohriyama, and S. Nakamura, "Elevation of serum soluble E-selectin and antisulfoglucuronyl paragloboside antibodies in amyotrophic lateral sclerosis," *European Journal of Neurology*, vol. 7, no. 5, pp. 541-547, 2000.
- [57] G. T. Liu, C. S. Hwang, C. H. Hsieh et al., "Eosinophil-derived neurotoxin is elevated in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Mediators of Inflammation*, vol. 2013, Article ID 421389, 7 pages, 2013.
- [58] J. Kuhle, R. L. P. Lindberg, A. Regeniter et al., "Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis," *European Journal of Neurology*, vol. 16, no. 6, pp. 771-774, 2009.
- [59] J. Ilzecka, "Granzymes A and B levels in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Clinical Biochemistry*, vol. 44, no. 8-9, pp. 650-653, 2011.
- [60] C. S. Hwang, G. T. Liu, M. D. Chang, I. L. Liao, and H. T. Chang, "Elevated serum autoantibody against high mobility group box 1 as a potent surrogate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis," *Neurobiology of Disease*, vol. 58, pp. 13-18, 2013.
- [61] C. Moreau, D. Devos, V. Brunaud-Danel et al., "Elevated IL-6 and TNF-α levels in patients with ALS: inflammation or hypoxia?" *Neurology*, vol. 65, no. 12, pp. 1958-1960, 2005.
- [62] P. Baron, S. Bussini, V. Cardin et al., "Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis," *Muscle and Nerve*, vol. 32, no. 4, pp. 541-544, 2005.
- [63] D. Keizman, O. Rogowski, S. Berliner et al., "Low-grade systemic inflammation in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 119, no. 6, pp. 383-389, 2009.
- [64] J. Ilzecka, "Serum soluble OX40 in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Acta Clinica Croatica*, vol. 51, no. 1, pp. 3-7, 2012.
- [65] D. R. Beers, J. S. Henkel, W. Zhao et al., "Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Brain*, vol. 134, no. 5, pp. 1293-1314, 2011.
- [66] J. Ilzecka, "Serum-soluble receptor for advanced glycation end product levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 120, no. 2, pp. 119-122, 2009.
- [67] C. Cereda, C. Baiocchi, P. Bongioanni et al., "TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 194, no. 1-2, pp. 123-131, 2008.
- [68] J. Ilzecka, "Decreased serum-soluble TRAIL levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 117, no. 5, pp. 343-346, 2008.
- [69] S. Cronin, M. J. Greenway, S. Ennis et al., "Elevated serum angiogenin levels in ALS," *Neurology*, vol. 67, no. 10, pp. 1833-1836, 2006.
- [70] L. Lacomblez, V. Doppler, I. Beucler et al., "APOE: a potential marker of disease progression in ALS," *Neurology*, vol. 58, no. 7, pp. 1112-1114, 2002.
- [71] J. Ilzecka, "Increased serum CNTF level in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *European Cytokine Network*, vol. 14, no. 3, pp. 192-194, 2003.
- [72] J. Ilzecka and Z. Stelmasiak, "Creatine kinase activity in amyotrophic lateral sclerosis patients," *Neurological Sciences*, vol. 24, no. 4, pp. 286-287, 2003.
- [73] J. Ilzecka, "Decreased serum endoglin level in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a preliminary report," *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 68, no. 4, pp. 348-351, 2008.
- [74] S. Hosback, O. Hardiman, C. M. Nolan et al., "Circulating insulin-like growth factors and related binding proteins are selectively altered in amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis," *Growth Hormone and IGF Research*, vol. 17, no. 6, pp. 472-479, 2007.
- [75] L. Dupuis, P. Corcia, A. Fergani et al., "Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis," *Neurology*, vol. 70, no. 13, pp. 1004-1009, 2008.
- [76] I. L. Simone, M. Ruggieri, R. Tortelli et al., "Serum N-acetylaspartate level in amyotrophic lateral sclerosis," *Archives of Neurology*, vol. 68, no. 10, pp. 1308-1312, 2011.
- [77] K. Fujita, M. Honda, R. Hayashi et al., "Transglutaminase activity in serum and cerebrospinal fluid in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a possible use as an indicator of extent of the motor neuron loss," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 158, no. 1, pp. 53-57, 1998.
- [78] H. Wilms, J. Sievers, R. Dengler, J. Bufler, G. Deuschl, and R. Lucius, "Intrathecal synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in amyotrophic lateral sclerosis: further evidence for microglial activation in neurodegeneration," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 144, no. 1-2, pp. 139-142, 2003.
- [79] A. Jawaid, M. Poon, A. M. Strutt et al., "Does apolipoprotein E genotype modify the clinical expression of ALS?" *European Journal of Neurology*, vol. 18, no. 4, pp. 618-624, 2011.
- [80] A. Anand, K. Thakur, and P. K. Gupta, "ALS and oxidative stress: the neurovascular scenario," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, Article ID 635831, 14 pages, 2013.
- [81] J.-L. González De Aguilar, J. W. Gordon, F. René et al., "Alteration of the Bcl-x/Bax ratio in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: evidence for the implication of the p53 signaling pathway," *Neurobiology of Disease*, vol. 7, no. 4, pp. 406-415, 2000.
- [82] J. Ilzecka, Z. Stelmasiak, and B. Dobosz, "Interleukin-1β converting enzyme/Caspase-1 (ICE/Caspase-1) and soluble APO-1/Fas/CD 95 receptor in amyotrophic lateral sclerosis patients," *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 103, no. 4, pp. 255-258, 2001.
- [83] J. Ilzecka, "Serum caspase-9 levels are increased in patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Neurological Sciences*, vol. 33, no. 4, pp. 825-829, 2012.
- [84] I. S. Sengun and S. H. Appel, "Serum anti-Fas antibody levels in amyotrophic lateral sclerosis," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 142, no. 1-2, pp. 137-140, 2003.

- [85] M. E. Wilson, I. Boumaza, D. Lacomis, and R. Bowser, "Cystatin C: a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 12, Article ID e15133, 2010.
- [86] J. Gaiottino, N. Norgren, R. Dobson et al., "Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases," *PLoS ONE*, vol. 8, Article ID e75091, 2013.
- [87] R. Tortelli, M. Ruggieri, R. Cortese et al., "Elevated cerebrospinal fluid neurofilament light levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a possible marker of disease severity and progression," *European Journal of Neurology*, vol. 19, no. 12, pp. 1561–1567, 2012.
- [88] J. Ganesalingam, J. An, C. E. Shaw, G. Shaw, D. Lacomis, and R. Bowser, "Combination of neurofilament heavy chain and complement C3 as CSF biomarkers for ALS," *Journal of Neurochemistry*, vol. 117, no. 3, pp. 528–537, 2011.
- [89] K. B. Boylan, J. D. Glass, J. E. Crook et al., "Phosphorylated neurofilament heavy subunit (pNF-H) in peripheral blood and CSF as a potential prognostic biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis," *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 84, no. 4, pp. 467–472, 2013.
- [90] J. Brettschneider, A. Petzold, S. D. Süßmuth, A. C. Ludolph, and H. Tumani, "Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS," *Neurology*, vol. 66, no. 6, pp. 852–856, 2006.
- [91] J. Ganesalingam, J. An, R. Bowser, P. M. Andersen, and C. E. Shaw, "pNFH is a promising biomarker for ALS," *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, vol. 14, no. 2, pp. 146–149, 2013.
- [92] M. Otto, E. Bahn, J. Wiltfang, I. Boekhoff, and W. Beuche, "Decrease of S100 beta protein in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Neuroscience Letters*, vol. 240, no. 3, pp. 171–173, 1998.
- [93] S. D. Süßmuth, H. Tumani, D. Ecker, and A. C. Ludolph, "Amyotrophic lateral sclerosis: disease stage related changes of tau protein and S100 beta in cerebrospinal fluid and creatine kinase in serum," *Neuroscience Letters*, vol. 353, no. 1, pp. 57–60, 2003.
- [94] V. V. Belzil, P. O. Bauer, M. Prudencio et al., "Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood," *Acta Neuropathologica*, vol. 126, pp. 895–905, 2013.
- [95] J. Ilzecka, "EMMPRIN levels in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 124, no. 6, pp. 424–428, 2011.
- [96] S. Ono, T. Imai, N. Shimizu, M. Nakayama, T. Yamano, and M. Tsumura, "Serum markers of type I collagen synthesis and degradation in amyotrophic lateral sclerosis," *European Neurology*, vol. 44, no. 1, pp. 49–56, 2000.
- [97] F. Fang, L. C. Kwee, K. D. Allen et al., "Association between blood lead and the risk of amyotrophic lateral sclerosis," *American Journal of Epidemiology*, vol. 171, no. 10, pp. 1126–1133, 2010.
- [98] B. Sokolowska, A. Jozwik, I. Niebroj-Dobosz, P. Janik, and H. Kwiecinski, "Evaluation of matrix metalloproteinases in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis with pattern recognition methods," *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 60, pp. 117–120, 2009.
- [99] W. Beuche, M. Yushchenko, M. Mäder, M. Maliszewska, K. Felgenhauer, and F. Weber, "Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis," *NeuroReport*, vol. 11, no. 16, pp. 3419–3422, 2000.
- [100] G. de Marco, E. Lupino, A. Calvo et al., "Cytoplasmic accumulation of TDP-43 in circulating lymphomonocytes of ALS patients with and without TARDBP mutations," *Acta Neuropathologica*, vol. 121, no. 5, pp. 611–622, 2011.
- [101] E. Verstraete, H. B. Kuiperij, M. M. Van Blitterswijk et al., "TDP-43 plasma levels are higher in amyotrophic lateral sclerosis," *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, vol. 13, no. 5, pp. 446–451, 2012.
- [102] K. Houi, T. Kobayashi, S. Kato, S. Mochio, and K. Inoue, "Serum type IV collagen increases with duration of amyotrophic lateral sclerosis," *Muscle & Nerve*, vol. 23, pp. 430–432, 2000.
- [103] I. Niebroj-Dobosz, P. Janik, B. Sokolowska, and H. Kwiecinski, "Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis," *European Journal of Neurology*, vol. 17, no. 2, pp. 226–231, 2010.
- [104] P. M. Roos, O. Vesterberg, T. Syversen, T. P. Flaten, and M. Nordberg, "Metal concentrations in cerebrospinal fluid and blood plasma from patients with amyotrophic lateral sclerosis," *Biological Trace Element Research*, vol. 151, pp. 159–170, 2013.
- [105] Y.-I. Noto, K. Shibuya, Y. Sato et al., "Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: specificity, sensitivity, and a possible prognostic value," *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, vol. 12, no. 2, pp. 140–143, 2011.
- [106] J. A. Rocha, C. Reis, F. Simões, J. Fonseca, and J. Mendes Ribeiro, "Diagnostic investigation and multidisciplinary management in motor neuron disease," *Journal of Neurology*, vol. 252, no. 12, pp. 1435–1447, 2005.
- [107] S. Lehnert, J. Costa, M. de Carvalho et al., "Multicentre quality control evaluation of different biomarker candidates for amyotrophic lateral sclerosis," *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 2014.
- [108] A. Freischmidt, K. Müller, A. C. Ludolph, and J. H. Weishaupt, "Systemic dysregulation of TDP-43 binding microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis," *Acta Neuropathologica Communications*, vol. 1, article 42, 2013.
- [109] K. Henriksen, S. E. O'Bryant, H. Hampel et al., "Blood-Based Biomarker Interest Group. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease," *Alzheimer's & Dementia*, vol. 10, pp. 115–131, 2014.
- [110] S. Garbuzova-Davis and P. R. Sanberg, "Blood-CNS barrier impairment in ALS patients versus an animal model," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 8, article 21, 2014.
- [111] S. Rozen, M. E. Cudkowicz, M. Bogdanov et al., "Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease," *Metabolomics*, vol. 1, no. 2, pp. 101–108, 2005.
- [112] J.-L. C. Mougeot, Z. Li, A. E. Price, F. A. Wright, and B. R. Brooks, "Microarray analysis of peripheral blood lymphocytes from ALS patients and the SAFE detection of the KEGG ALS pathway," *BMC Medical Genomics*, vol. 4, article 74, 2011.
- [113] G. Nardo, S. Pozzi, M. Pignataro et al., "Amyotrophic lateral sclerosis multiprotein biomarkers in peripheral blood mononuclear cells," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 10, Article ID e25545, 2011.
- [114] B. de Felice, M. Guida, M. Guida, C. Coppola, G. De Mieri, and R. Cotrufo, "A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis," *Gene*, vol. 508, no. 1, pp. 35–40, 2012.
- [115] K. A. Lawton, M. E. Cudkowicz, M. V. Brown et al., "Biochemical alterations associated with ALS," *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, vol. 13, no. 1, pp. 110–118, 2012.
- [116] T. Krüger, J. Lautenschläger, J. Grosskreutz, and H. Rhode, "Proteome analysis of body fluids for amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery," *Proteomics. Clinical Applications*, vol. 7, no. 1-2, pp. 123–135, 2013.

III. Modélisation de la SLA

Afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques au niveau de l'organisme et aux niveaux cellulaire et moléculaire, mais également pour la réalisation d'études pré-cliniques, des modèles animaux ont été créés. Il en existe certains qui se basent sur les mutations identifiées dans la SLA, et d'autres qui sont des modèles lésionnels. Dans ce chapitre, nous en aborderons plus spécifiquement deux : les modèles mSOD1 et la compression nerveuse. Toutefois, il est important de noter qu'il existe actuellement un fort développement des modèles génétiques. Ces dernières années, de nombreux nouveaux modèles ont été créés. Il existe plusieurs souris transgéniques basées sur le gène TDP-43. On trouve un modèle de délétion totale et des modèles de surexpression des gènes TDP-43 murin ou humain (Wegorzewska et al., 2009; Chiang et al., 2010). Il existe également différents modèles FUS qui ont été générés soit en supprimant le gène FUS, soit en introduisant une forme tronquée de ce gène (Scekic-Zahirovic et al., 2016). Enfin, concernant le gène C9ORF72, on dénombre deux modèles existants basés sur une perte de fonction et un gain de fonction (Koppers et al., 2015). Malgré ce développement considérable, ces nouveaux modèles animaux restent difficiles à utiliser car, d'une part, la surexpression des gènes sauvages en elle-même, est déjà toxique pour les animaux, mais d'autre part, la caractérisation du phénotype de ces souris est encore peu connue.

1. Le modèle transgénique mSOD1

Les premiers en date à avoir été produits sont les modèles basés sur les mutations SOD1. En 1993, Rosen et collaborateurs (Rosen et al., 1993) ont découvert que certains patients atteints de la forme familiale de SLA présentent des mutations dans le gène codant pour la sod1. A la suite de cette découverte, un modèle animal a été créé par introduction d'une mutation substitutive de l'arginine par la glycine en position 86 dans le gène murin codant pour la sod1 (Ripps et al., 1995). Cette mutation correspond à un des changements retrouvés dans les cas familiaux de SLA, la mutation G85R.

Il existe d'autres modèles murins basés sur des mutations de la SOD1. Créée en 1994 par Gurney et collaborateurs (Gurney et al., 1994), la souris mSOD1^{G93A} possède plusieurs copies du gène sod1 humain muté par substitution, en position 93 cette fois-ci, de la glycine par

l'alanine. Le modèle SOD1^{G37R} (Wong et al., 1995) repose également sur la surexpression de la SOD1 humaine, mutée en position 37. Enfin, créé en 1997 par Bruijn et collaborateurs (Bruijn et al., 1997), la souris SOD1^{G85R} possède une SOD humaine inactive. De tous ces modèles, la souris SOD1^{G93A} a été la plus utilisée pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la SLA depuis ces 20 dernières années. Il faut néanmoins noter que le transgène humain SOD1^{G93A} conserve son activité dismutase et cela nécessite l'utilisation de souris surexprimant la forme sauvage de la SOD1 humaine comme contrôle (Hayward et al., 2002). En revanche, au sein de notre laboratoire, le modèle que l'on utilise est la lignée SOD1^{G86R} car elle présente certains avantages. Tout d'abord, la mutation G86R se trouve dans le gène *sod1* murin ce qui permet d'éviter d'éventuels dysfonctionnements de l'activité transcriptionnelles liées à des différences inter-espèces. Deuxièmement, le transgène SOD1^{G86R} ne possède plus d'activité dismutase. Cela présente alors l'avantage d'utiliser des souris sauvages comme contrôles.

D'un point de vue phénotypique, la souris SOD1^{G86R} est asymptomatique jusqu'à l'âge de deux mois et demi environ. Ensuite, elle va commencer à manifester, au niveau musculaire, des activités électriques spontanées anormales, visibles par EMG et témoins de la dénervation, sans toutefois présenter des signes de paralysie. On observe également une diminution de l'amplitude du potentiel musculaire composé ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'ARN messager du récepteur cholinergique α , reflet de la dénervation (Figure 3). Puis, vers approximativement l'âge de 3 mois, la pathologie s'installe et on voit apparaître des symptômes moteurs entraînant une altération des réflexes d'extension des pattes postérieures. Ce phénomène évolue progressivement jusqu'à une paralysie totale et au décès de l'animal.

D'un point de vue histopathologique, la souris SOD1^{G86R} présente, dès l'âge de 2 mois et demi, une diminution du nombre de motoneurones dans la moelle épinière, une dégénérescence des fibres myélinisées dans le nerf sciatique ainsi une atrophie musculaire (Figure 4).

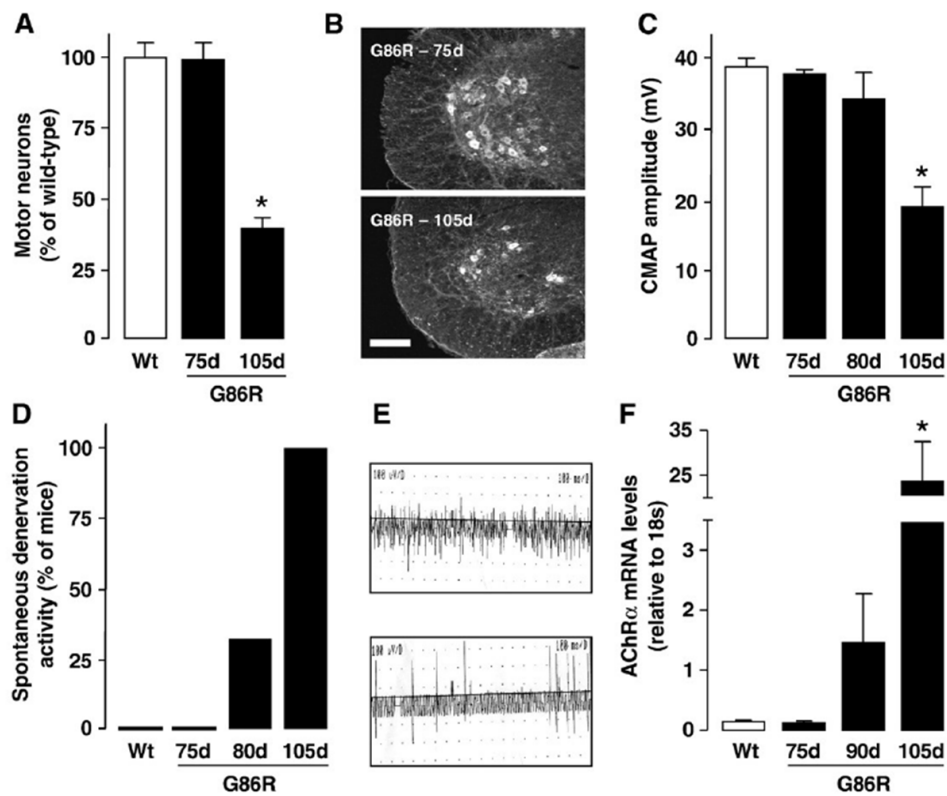


Figure 3 : caractéristiques de dénervation de la souris SOD1^{G86R} (tiré de Halter et al., 2010)



Figure 4 : caractéristiques histopathologiques de la souris SOD1^{G86R} (tiré de Dupuis et al., 2000).

2. Modèle de dénervation

En parallèle des modèles génétiques qui tente de reproduire la SLA dans sa globalité, on peut mimer seulement certains aspects de la SLA. C'est le cas soit par compression nerveuse, soit par la section du nerf ou axotomie (Wood et al., 2011). Dans ce chapitre sera présenté le modèle de compression nerveuse car c'est ce modèle qui a été utilisé au cours de mes travaux.

La compression du nerf sciatique est un modèle de dénervation périphérique couramment utilisé. Une lésion du nerf sciatique entraîne des dommages au niveau des axones moteurs et sensoriels, et permet d'évaluer le potentiel de régénération du système nerveux périphérique, puisque les axones doivent repousser jusqu'à leurs cibles musculaires. Ce modèle présente l'avantage de pouvoir se focaliser sur les phénomènes de dénervation et réinnervation, qui sont aussi retrouvés au cours de la SLA. En effet, il a été observé dans les muscles des patients, des jonctions réinnervées présentant un appareil post-synaptique aplati et fragmenté, témoignant de l'existence d'un phénomène de réinnervation compensatoire dans la SLA (Bruneteau et al., 2015).

IV. Hypothèses physiopathologiques de la SLA

Pendant de nombreuses années, la SLA a été considérée comme une pathologie affectant le motoneurone de façon restreinte. En effet, la toxicité due à la protéine SOD1 mutée était vue comme un phénomène autonome du motoneurone et sans implication dans d'autres types cellulaires. Mais les études de ces dernières années ont laissé place à une nouvelle vision des choses. De nombreuses données ont mis en évidence que d'autres types cellulaires avaient un rôle tout aussi important dans le processus pathologique. Dans cette section, nous allons décrire brièvement l'implication de différents types cellulaires dans plusieurs mécanismes contribuant au processus pathologique de la SLA.

1. Stress oxydant

Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives à l'oxygène, appelées radicaux libres, principalement produits par la chaîne de respiration mitochondriale, et leur élimination par l'environnement cellulaire via des défenses anti-oxydantes. La SOD1 se trouve parmi les défenses anti-oxydantes que possède la cellule pour lutter contre l'accumulation de ces radicaux libres.

Différents mécanismes pouvant expliquer la toxicité due aux mutations de la SOD1 ont alors été proposés. Tout d'abord, il a été envisagé une perte de la fonction dismutase de la SOD1 conduisant à la surproduction de superoxydes. En effet, il avait été montré que chez les patients présentant un allèle muté de la SOD1, on observait une diminution de l'activité dismutase d'au moins 50% ce qui conduisait à l'augmentation des concentrations de peroxy-nitrite, puissant oxydant (Beckman et al., 1993; Deng et al., 1993). Cette hypothèse a été, par la suite, remise en question car il a également été montré que certaines mutations de la SOD1 n'entraînaient pas de perte d'activité (Hayward et al., 2002). La deuxième hypothèse proposée concernait un mécanisme par lequel la forme mutée de la SOD1 ne serait pas seulement inactive mais empêcherait également la fonction de la SOD1 non mutée exprimée par l'autre allèle (Rosen et al., 1993b). Il a également été proposé une augmentation d'activité SOD1 conduisant à une augmentation des niveaux de peroxyde d'hydrogène et de radicaux hydroxyles (Lee et al., 2001). Quelques années plus tard, un autre courant de pensées a vu le jour. Les hypothèses proposaient alors l'existence d'une altération de la structure de la SOD1 conduisant à des modifications de conformation tridimensionnelle (Museth et al., 2009; Perry et al., 2010; Araki et al., 2012) (Figure 5).

2. Excitotoxicité au glutamate

L'excitotoxicité est un processus pathologique causé par une stimulation excessive des récepteurs glutamatergiques NMDA (N-méthyl-D-aspartic acid) et AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid) se trouvant sur les neurones post-synaptiques. Cela se produit lorsque la balance entre le relargage et la recapture du glutamate est déséquilibrée. Il a été montré que ce déséquilibre pouvait être dû à une activité

inappropriée du neurone pré-synaptique, à une réponse inadaptée du neurone post-synaptique ou encore aux deux à la fois. Cela conduit à une sur-activation des cascades calcium-dépendantes activées par le glutamate et donc une toxicité neuronale puis la mort des cellules.

Parmi tous les processus pathologiques mis en avant dans la SLA, il existe de nombreuses preuves quant à l'implication d'une neurotransmission excitatrice altérée comme facteur clé (Figure 5). Tout d'abord, des taux plasmatiques de glutamate significativement plus élevés chez les patients atteints de SLA ont été observés par comparaison avec des sujets sains, et cette augmentation de glutamate corrèle avec la durée de la maladie (Plaitakis and Constantakakis, 1993; Andreadou et al., 2008). Des anomalies dans la recapture du glutamate ainsi que dans l'expression des transporteurs du glutamate ont également été mises en avant chez les personnes souffrant de la SLA. En 1992, Rothstein et collaborateurs démontrent que les patients SLA présentent une diminution significative de la vitesse de recapture du glutamate par comparaison avec des patients atteints d'autres troubles neurologiques (Rothstein et al., 1992). Plus tard, une diminution des transporteurs du glutamate EAAT2 est observée chez les patients (Ferrarese et al., 2001). Toutes ces observations peuvent être expliquées par une hypothèse qui est basée sur l'implication des astrocytes dans cette excitotoxicité au glutamate. En effet, les astrocytes ont la propriété à réguler les concentrations extracellulaires de glutamate. Ils jouent un rôle fondamental dans la modulation de l'excitabilité neuronale et dans la neurotransmission puisqu'ils permettent, via leurs transporteurs EAAT2 et GLT-1, de recapter le glutamate libéré dans la fente synaptique, afin d'éviter une trop grande stimulation des récepteurs glutamatergiques post-synaptiques AMPA et NMDA. Une diminution de l'expression des transporteurs EAAT2 et/ou GLT-1, entraînant une augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate, est observée chez la plupart des patients et des souris mSOD1 (Bruijn et al., 1997; Howland et al., 2002).

Il a également été mis en évidence que les motoneurones avaient une forte vulnérabilité à l'excitotoxicité glutamatergique. En effet, l'étude de Van den Bosch et collaborateurs en 2000, visant à évaluer les effets d'une toxicité induite par exposition à l'acide kaïnique sur des cultures de motoneurones et de neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, montre qu'après une courte exposition à cet analogue du glutamate, les motoneurones

meurent tandis que les neurones de la moelle épinière restent inaffectés. De plus, les résultats démontrent que l'entrée excessive de Ca^{2+} , conduisant à la mort des neurones, serait régulée par la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA, puisque l'absence de cette sous-unité accroît la sensibilité au glutamate et donc la perméabilité au Ca^{2+} (Van Den Bosch et al., 2000).

3. Agrégation protéique

A la manière d'autres pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington ou les maladies génétiques à prions, la SLA se caractérise par la présence, dans les neurones moteurs atteints, d'inclusions cytoplasmiques et d'agrégats protéiques (Xiao et al., 2006) (Figure 5).

Les inclusions cytoplasmiques peuvent être classées en deux catégories. On retrouve, de façon récurrente chez tous les patients, des inclusions ubiquitinylées. De morphologie variable, elles sont de deux types : les inclusions filamenteuses dites « Shein-like inclusions » et les inclusions compactes de forme sphérique (Lowe et al., 1988). On observe également les corps de Bunina qui sont des inclusions granulaires éosinophiliques présentes chez la plupart des patients atteints de SLA (Tomonaga et al., 1978; Blokhuis et al., 2013).

Plusieurs protéines accumulées sous forme d'agrégats, dont les gènes sont connus pour être mutés dans la SLA, ont été identifiées. La première d'entre elles à avoir été identifiée est la SOD1. Elle est retrouvée uniquement dans les formes familiales de SLA (Rosen et al., 1993; Blokhuis et al., 2013). Dans les cas de SLA non liés à la SOD1, d'autres protéines sont impliquées. On observe de façon majoritaire, des agrégats ubiquitinylés de TDP-43 (Arai et al., 2006). Ces agrégats TDP-43 sont présents dans les neurones spinaux et corticaux, dans l'hippocampe, ainsi que dans les cellules gliales, chez les patients atteints d'une forme sporadique de SLA et chez les patients atteints d'une forme familiale mais non liée à la SOD1 (Mackenzie et al., 2007; Tan et al., 2007). Des agrégats cytoplasmiques de FUS sont également retrouvés chez les patients SLA porteurs de mutations de FUS, mais aussi dans d'autres pathologies telles que la DFT (Neumann et al., 2009; Doi et al., 2010). Enfin, d'autres protéines sont impliquées. Par exemple, de façon plus minoritaire, il y a des

agrégats d'optineurine uniquement dans des populations japonaises. Il existe aussi des agrégats d'ataxine-2 ou d'ubiquiline-2 (Blokhuis et al., 2013).

4. Altération du transport axonal

Il existe un mouvement continu de matériel, comme des protéines, des organites et des ARNm, depuis le corps cellulaire du neurone jusqu'à sa terminaison axonale. On parle de transport axonal antérograde, et inversement, on parle de transport axonal rétrograde. Ce transport est indispensable au maintien du bon fonctionnement et de la structure de l'axone et de sa terminaison. Il est assuré par les éléments du cytosquelette tels que les microtubules, les microfilaments (appelés dans ce cas des neurofilaments) et les filaments intermédiaires. Une perturbation dans l'organisation du cytosquelette du neurone peut alors avoir de lourdes conséquences sur ce transport et conduire à la mort du neurone.

Dans la SLA, plusieurs altérations du cytosquelette, et par conséquent du transport axonal, ont été observées (Figure 5). Des mutations ont été détectées dans les gènes codant pour les neurofilaments à chaîne lourde et pour la périphérine conduisant ainsi à l'accumulation de neurofilaments et d'inclusions de périphérine dans les neurones (Al-Chalabi et al., 1999 ; Corbo and Hays, 1992; Corrado et al., 2011). Le gène codant la profiline, protéine impliquée dans la polymérisation des filaments d'actine, présente également des mutations (Wu et al., 2012). Par ailleurs, des mutations dans le gène codant la dynactine, protéine indispensable au transport rétrograde, ont été documentées, montrant ainsi le rôle direct d'un dysfonctionnement du transport axonal rétrograde dans la dégénérescence des motoneurones (Puls et al., 2003). Un autre composant a également été mis en évidence comme étant un facteur pouvant moduler la survie dans les formes sporadiques de la SLA : la kinésine. Un polymorphisme dans le gène de la kinésine est associé à une expression réduite de ce dernier et cela corrèle avec une augmentation de la survie des patients (Landers et al., 2009).

5. Dysfonctionnement mitochondrial

Des altérations de la structure et du fonctionnement des mitochondries constituent un trait caractéristique de la SLA (Figure 5). A l'origine, des analyses histologiques de tissus

provenant de patients SLA ont révélé une vacuolisation et un gonflement des mitochondries et ce dans les neurones, les muscles et les nerfs intra-musculaires (Afifi et al., 1966). Ces observations morphologiques ont été confirmées des années plus tard et confortées par des altérations au niveau fonctionnel. Une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire a été observée dans la moelle épinière de souris SOD1^{G93A}, entraînant une réduction du ratio respiratoire et de la production d'ATP, (Mattiazzi et al., 2002). Ces anomalies fonctionnelles ne se limitent pas seulement au système nerveux central puisqu'elles ont également été documentées dans d'autres régions comme le foie ou les muscles squelettiques (Dupuis et al., 2003; Echaniz-Laguna et al., 2006).

6. Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite multifonctionnel impliqué dans la synthèse de protéines et de lipides, le stockage du Ca²⁺ mais également dans le transport de ces protéines fraîchement synthétisées vers leurs cibles. Lorsque le bon fonctionnement de ce RE est perturbé, par exemple, par la présence de protéines ayant une conformation anormale, cela entraîne un stress. Des capteurs de stress localisés au niveau du RE sont présents pour permettre à la cellule de réagir en induisant une réponse médiée par des protéines chaperonnes. Si cette réponse échoue à la restauration de l'intégrité cellulaire, alors des cascades de signalisation conduisant à la mort cellulaire sont activées (Schroder and Kaufman, 2005).

Dans la SLA, des anomalies morphologiques du RE ont été décrites à la fois chez les patients et dans le modèle animal SOD1^{G93A} (Figure 5). Chez les souris, le RE rugueux apparaît comme étant dilaté avec un détachement des ribosomes et le Golgi est fragmenté. Chez les patients, ce RE rugueux est également fragmenté (Oyanagi et al., 2008). De plus, au cours de la maladie, il a été montré que la protéine mutée SOD1 s'accumule dans le RE où elle forme des agrégats et interagit avec certaines protéines chaperonnes impliquées dans la réponse au stress du RE. Par exemple, la mSOD1 interagit avec la protéine Derlin-1 qui est responsable du transfert des protéines mal repliées vers le protéasome pour être dégradées. De ce fait, il y a une accumulation de protéines anormales dans le RE provoquant un stress (Nishitoh et al., 2008).

7. Neuroinflammation

La neuroinflammation est une réponse qui fait intervenir un certain nombre d'éléments cellulaires et moléculaires de l'inflammation dans le système nerveux central, en présence d'un processus neurodégénératif ou d'une lésion. Les principaux acteurs de cette réponse inflammatoire sont les astrocytes, les microglies et les cellules immunitaires qui peuvent être, selon le contexte, neuroprotecteurs ou neurotoxiques. Depuis plusieurs années maintenant, il est devenu évident que la neuroinflammation est un processus clé de la SLA (Figure 5).

✓ *Les astrocytes*

En condition non-pathologique, les astrocytes sont à l'état quiescent. En cas de souffrance, ils vont changer de morphologie pour s'activer et proliférer afin de sécréter différentes molécules telles que des cytokines et des facteurs de croissance : on parle d'astrocytose. Ce phénomène est largement observé dans la SLA, que ce soit chez les patients ou dans les modèles animaux. Les zones cérébrales touchées par la dégénérescence, tout comme la moelle épinière, sont caractérisées chez les patients, par la présence d'une importante astrocytose (Kushner et al., 1991; Schiffer et al., 1996). Mais ce sont les modèles animaux qui ont permis de mieux comprendre le rôle que joue ce phénomène d'astrocytose dans le processus neurodégénératif. En 2003, une étude réalisée sur le modèle SOD1^{G93A} montre que les motoneurones portant la SOD1 mutée survivent mieux lorsqu'ils sont entourés par des astrocytes non mutés (Clement, 2003). De façon complémentaire, éliminer la SOD1 mutée dans les astrocytes des souris G85R permet de repousser le début de la maladie (Wang et al., 2011). Cela démontre bien que les astrocytes jouent un rôle primordial dans la pathologie.

Une hypothèse concernant le rôle des astrocytes dans le processus neurodégénératif est basée sur la sécrétion de facteurs neurotoxiques. Des études ont montré que des cytokines, comme l'interféron gamma, sont retrouvées dans le LCR, le sérum et la moelle épinière des patients SLA (Babu et al., 2008; Liu et al., 2015). Une augmentation de la présence du NGF (Nerve Growth Factor) a également été observée dans les astrocytes de la moelle épinière de souris SOD1^{G93A}, au même moment que l'expression motoneuronale accrue de son

récepteur de mort cellulaire p75 (Pehar et al., 2004). Enfin, il a aussi été montré que les astrocytes réactifs expriment fortement la COX-2 (Cyclooxygénase-2), enzyme responsable de la production de PGE2 qui est un médiateur aux propriétés pro-inflammatoires. L'expression de la COX-2 est augmentée dans les astrocytes de la moelle épinière chez les souris SOD1^{G93A} aux stades présymptomatique et symptomatique, tout comme chez les patients SLA (Almer et al., 2001; Maihöfner et al., 2003).

✓ *Les microglies*

De façon similaire aux astrocytes, les microglies sont, en condition basale, à l'état de repos et sont activées en cas de dommage neuronal, entraînant une forte réponse inflammatoire. Une fois activées, les microglies vont passer par deux états d'activation différents : d'abord l'état M1 qui est pro-inflammatoire, afin de sécréter des facteurs pour la réparation des dommages, puis par l'état M2 qui est anti-inflammatoire et qui va prévenir la mort neuronale (Crain et al., 2013).

Dans la SLA, des microglies actives sont retrouvées dans le cortex moteur, la moelle épinière, le tronc cérébral ou encore dans le LCR des patients (Kawamata et al., 1992; Bowerman et al., 2013). Lors de l'état M1, pro-inflammatoire, les microglies vont produire des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α (Tumor Necrosis Factor), les interleukines 1 β , IL-6, IL-23, IL-12 et IL-8 ainsi que des chimiokines. Mais le passage à l'état M2, caractérisé par la sécrétion de molécules anti-inflammatoires comme les interleukines IL-3, IL-4 et le TGF β (Transforming Growth Factor β), semble être altéré dans la maladie, et il va y avoir, de ce fait, une accumulation de signaux toxiques conduisant à la mort neuronale.

8. Altération du métabolisme de l'ARN

La découverte de l'implication des gènes TDP-43 et FUS dans la SLA, tous deux codant pour des protéines de liaison à l'ARN impliquées dans de nombreux aspects du traitement de l'ARN (régulation de la transcription, épissage alternatif ou traitement des microARN), a rapidement attiré l'attention sur l'altération du métabolisme de l'ARN comme mécanisme physiopathologique impliqué dans la maladie. L'expression de mutants TDP-43 et FUS pourrait conduire à la formation d'un grand nombre de granules de stress dans le

cytoplasme, qui deviennent alors toxiques pour les neurones, mais également à une perturbation générale des phénomènes d'épissage (Ferraiuolo et al., 2011).

La figure 5 illustre la diversité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA comme le stress oxydant, l'excitotoxicité au glutamate, l'agrégation protéique, l'altération du transport axonal, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress du réticulum endoplasmique, la neuroinflammation ou encore, comme il vient d'être présenté, l'altération du métabolisme de l'ARN.

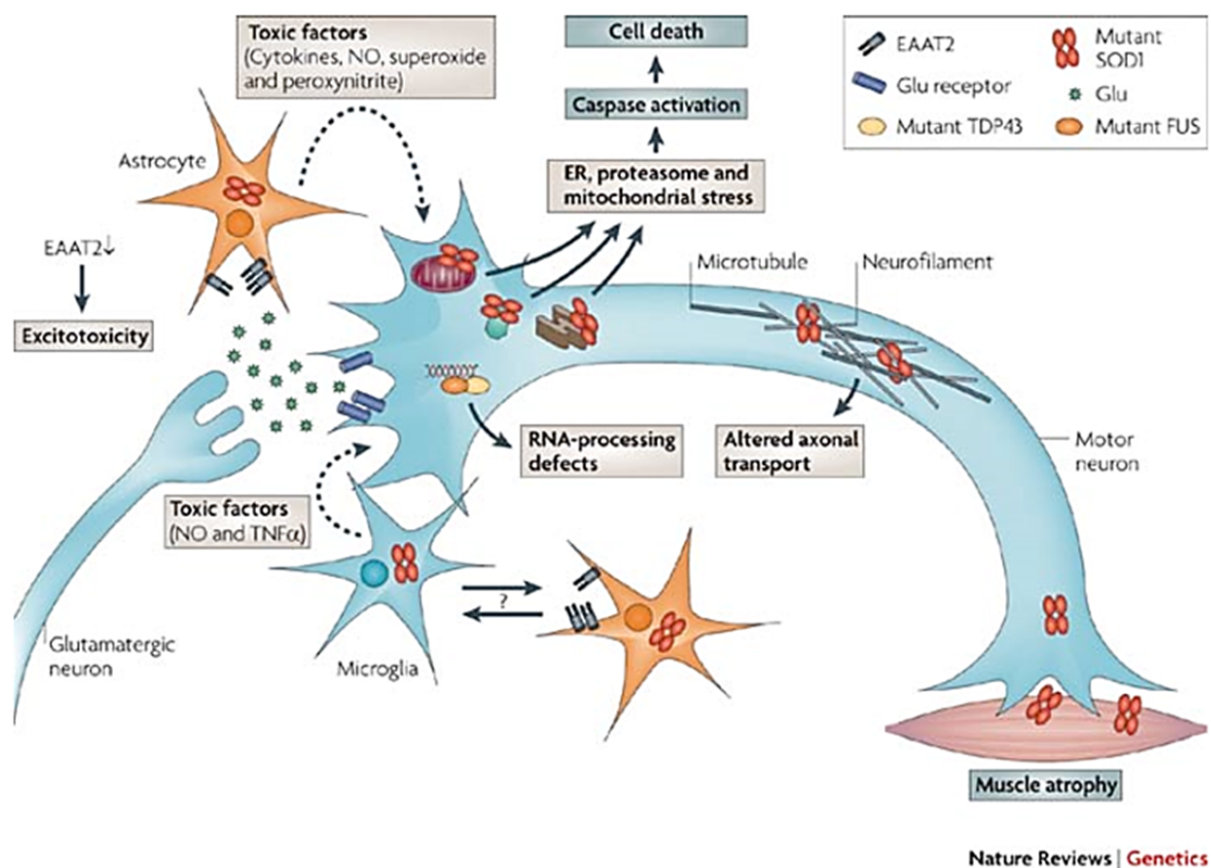


Figure 5 : mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA

V. Aspects périphériques de la SLA

1. La jonction neuro-musculaire

Comme il l'a été mentionné dans le chapitre précédent, la SLA apparaît désormais comme une pathologie multicellulaire. Ces dernières années, l'horizon s'est encore élargi avec l'hypothèse de l'origine périphérique de la pathologie et du rôle qu'occupe le muscle squelettique. Les études sur les modèles animaux mSOD1 se sont beaucoup concentrées sur la compréhension du décours temporel qui caractérise la pathologie. La mise en évidence du fait que le premier événement à survenir au cours de la maladie est la destruction de la jonction neuromusculaire (JNM), et donc la perte du contact motoneurone/muscle, a fait apparaître ce dernier comme étant un acteur clé dans la pathologie (Fischer et al., 2004). La mort motoneuronale avait, jusque-là, une place centrale dans la pathologie, mais des études ont montré que le fait d'empêcher la mort de ces motoneurones, en bloquant l'apoptose qui est le principal mécanisme mis en jeu, ne suffisait pas à empêcher la destruction de la JNM ni la progression de la maladie. Cela démontre bien que l'événement pathologique primaire qui détermine la survie des animaux n'est pas la mort neuronale elle-même mais la destruction des JNM, et que les motoneurones « sauvés » ne sont pas en mesure de recréer des JNM fonctionnelles (Gould, 2006; Rouaux et al., 2007).

Le rôle du muscle est probablement l'un des sujets les plus débattus dans la SLA. Deux grands points de vue s'affrontent. D'un côté le muscle est considéré comme n'ayant qu'un rôle passif, et d'un autre côté, le muscle est vu comme participant activement au processus pathologique. Il y a principalement deux études, basées sur la toxicité de la mSOD1, dont les résultats vont dans le sens d'un rôle passif du muscle dans la SLA. L'étude de Miller et collaborateurs visait à moduler l'expression de la SOD1^{G93A} dans le muscle et à évaluer les effets sur l'initiation et la progression de la maladie. Pour ce faire, un lentivirus et un adénovirus contenant un siRNA dirigé contre la SOD1 ont été injectés dans le muscle. Les souris qui ont reçu l'adénovirus, qui est capable d'être pris en charge par le transport axonal rétrograde, contrairement aux animaux injectés avec le lentivirus, qui n'agit que localement, présentent une amélioration de leur force musculaire et une survie plus grande. Cela laisse à penser que l'inhibition de l'expression de la SOD1 mutée dans le muscle n'a pas d'impact sur la maladie (Miller et al., 2006). Cela a été confirmé par la seconde étude qui visait également à réduire l'expression de la SOD1 spécifiquement dans le muscle à l'aide d'un shRNA injecté

par voie intraveineuse. Les résultats ont montré que l'expression de la SOD1 est bien réduite de 50% dans le muscle, mais que cette diminution de moitié n'a pas suffi à moduler la progression de la maladie (Towne et al., 2008). L'ensemble de ces résultats semblent indiquer que le muscle n'est pas un tissu qui exerce une influence sur l'apparition ou la progression de la maladie.

Le muscle semble également jouer un rôle perturbateur dans les interactions trophiques au niveau de l'axe neuromusculaire. La protéine Nogo-A, protéine inhibitrice de la croissance neuritique, est fortement exprimée dans les muscles squelettiques des souris mSOD1 comme dans ceux des patients (Dupuis et al., 2002). Il a été montré que le niveau d'expression de cette protéine est corrélé à l'état des patients (Jokic et al., 2005). De plus, il a été montré qu'une surexpression de cette protéine dans un muscle sain conduit à une dénervation, tandis que sa suppression chez les souris mSOD1 aboutit à une augmentation de leur survie (Jokic et al., 2006). De plus, de récentes études ont montré que l'augmentation de l'expression de la protéine MuSK, chez les animaux mSOD1, permet de maintenir l'intégrité des jonctions et ainsi de retarder la dénervation et d'améliorer la fonction musculaire (Hussain et al., 2013). Ces observations montrent que des modifications de l'expression de certains gènes musculaires peuvent moduler la pathologie.

2. Altérations métaboliques de la SLA

En parallèle de ces différentes observations définissant le rôle du muscle dans la SLA, de nombreuses altérations métaboliques, y compris au niveau musculaire, ont également été mises en avant. En 2003, l'étude de Dupuis et collaborateurs a mis en évidence une réduction de la production d'ATP dans les muscles de souris SOD1^{G86R} dès le stade présymptomatique (Dupuis et al., 2003). Plus tard, en 2009, Dupuis et collaborateurs ont démontré que lorsque l'on recrée un hypermétabolisme d'origine musculaire chez l'animal, comme il est observé chez les souris mSOD1, la JNM en souffre. En effet, des souris surexprimant la protéine découplante UCP1, au niveau du muscle, présentent une détérioration de la JNM corrélée à des signes de dénervation. Ces résultats indiquent donc que des altérations métaboliques peuvent participer à la déstabilisation de l'axe neuro-musculaire (Dupuis et al., 2009). De plus, il a également été observé, chez les souris SOD1^{G86R}, que le métabolisme musculaire est modifié dans le sens d'une stimulation du

métabolisme de type oxydatif. En effet, des marqueurs lipidiques caractéristiques du métabolisme oxydatif, tels que *Pdk4*, *Lpl* ou *Cd36*, ont une expression augmentée (Palamiuc et al., 2015). L'ensemble de ces observations suggère une relation forte entre la gestion du métabolisme des lipides et le devenir de la maladie. Cette notion est confortée par l'étude de Dupuis et collaborateurs dans laquelle il a été montré qu'une diète enrichie en graisses, administrée à des souris *SOD1^{G86R}*, permet d'augmenter de 20% la survie de ces animaux (Dupuis et al., 2004). Cela montre donc qu'une hyperlipidémie est bénéfique pour la souris.

L'idée générale selon laquelle le métabolisme lipidique jouerait un rôle dans la maladie est retrouvée et appuyée par des observations faites chez les patients atteints de SLA. En effet, de nombreuses études ont montré que ces patients, qu'ils soient atteints d'une forme sporadique ou familiale, se caractérisent pas un hypermétabolisme accru et stable tout au long de la maladie, une perte de poids importante ainsi qu'une hyperlipidémie (Desport et al., 2001; Dupuis et al., 2008; Funalot et al., 2009). Par la suite, de nombreuses observations ont indiqué que ces altérations métaboliques avaient un fort impact sur le pronostic de ces patients. Des études soulignent le fait que cette hyperlipidémie est un facteur pronostic primordial puisque les patients qui présentent un ratio LDL/HDL élevé vivent plus longtemps que les autres (Dupuis et al., 2008; Dorst et al., 2011). L'IMC apparaît ensuite comme étant un facteur pronostic de taille. Un IMC faible est associé à une survie plus faible et une vitesse de progression rapide et à l'inverse un IMC élevé corrèle avec une survie plus longue (Jawaid et al., 2010; Paganoni et al., 2011; Shimizu et al., 2012; Reich-Slotky et al., 2013). Par la suite, il a été montré que le taux de graisse sous-cutanée est positivement corrélé à la survie des patients (Lindauer et al., 2013) et que la malnutrition durant la maladie est un facteur pronostique négatif (Marin et al., 2011). Des études épidémiologiques ont montré que certains de ces paramètres métaboliques sont des facteurs de risque. Par exemple, une consommation élevée de carbohydrates au détriment de la consommation de lipides est associée à un risque plus important de développer la maladie (Okamoto et al., 2009) et une masse grasse corporelle plus importante réduit le risque de développer une SLA (Gallo et al., 2013).

VI. Les acides gras

1. Nomenclature et classification

1.1. Nomenclature

Les acides gras sont des molécules constituées typiquement d'une chaîne carbonée comprenant un groupement méthyle à une extrémité et un groupement carboxylique à l'autre. Ils peuvent être désignés selon différentes nomenclatures. Tout d'abord, il existe la nomenclature systématique ou standard de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), selon laquelle les acides gras sont désignés en fonction de l'hydrocarbure parent, et les doubles liaisons (s'il y en a) sont représentées par le symbole Δ , qui renseigne sur la position de la première double liaison par rapport au groupement carboxyle. La géométrie de ces acides pouvant changer en fonction de la position des atomes autour des doubles liaisons, les préfixes *cis* et *trans* sont utilisés. La configuration de la molécule est dite *cis* si tous les atomes d'hydrogène se trouvent du même côté du plan de la double liaison et *trans* s'ils sont de part et d'autre de ce plan.

Ensuite, il existe une nomenclature appelée oméga qui est très largement utilisée. Elle reprend le nombre d'atomes de carbone composant la chaîne, le nombre de doubles liaisons et la position de la première double liaison. Celle-ci est indiquée par le symbole ω et est comptée à partir du groupement méthyle cette fois-ci. Il arrive parfois que le symbole ω soit remplacé par la lettre *n*. Cette nomenclature est très empruntée du fait de sa simplicité et parce que, de cette façon, tous les principaux acides gras peuvent être nommés.

Enfin, il existe la nomenclature triviale ou commune. Au fil des années, des noms simplifiés sont apparus. La majorité de ces noms est issue des espèces végétales ou animales chez lesquelles les acides gras ont été découverts. En revanche, ces noms usuels ne s'appliquent que pour les espèces existantes à l'état naturel.

1.2. Classification et sources

1.2.1. Acides gras saturés

Les acides gras saturés (SFA) ne possèdent aucune double liaison au sein de leur chaîne carbonée. De ce fait, ils présentent un grand nombre de conformations possibles. Chaque liaison dans la chaîne étant simple, elle a tout pouvoir de rotation. La chaîne carbonée est donc très flexible (Cuvelier et al., 2004). En fonction de la longueur de cette chaîne, les acides gras saturés sont classés en trois catégories. De 2 à 4 atomes de carbone, on trouve les acides gras à chaîne courte, de 6 à 10 atomes de carbone, nous avons les acides gras à chaîne moyenne et enfin, à partir de 12 atomes de carbone se trouvent les acides gras à chaîne longue (Tvrzicka et al., 2011). Les plus courants sont ceux constitués de 12 à 22 atomes de carbone. Les différents acides gras saturés sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : acides gras saturés

Symbole	Structure chimique	Nom IUPAC (nomenclature systématique)	Nom trivial (nomenclature commune)
C1 :0	CHOOH	Méthanoïque	Formique
C2 :0	CH ₃ COOH	Ethanoïque	Acétique
C3 :0	CH ₃ CH ₂ COOH	Propanoïque	Propionique
C4 :0	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	Butanoïque	Butyrique
C5 :0	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	Pentanoïque	Valérique
C5 :0 iso	CH ₃ CHCH ₃ CH ₂ COOH	Méthyl-3 butanoïque	Isovalérique
C6 :0	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	Hexanoïque	Caproïque
C7 :0	CH ₃ (CH ₂) ₅ COOH	Heptanoïque	Enanthique
C8 :0	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	Octanoïque	Caprylique
C9 :0	CH ₃ (CH ₂) ₇ COOH	Nonanoïque	Pélagonique
C10 :0	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	Décanoïque	Caprique
C12 :0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	Dodécanoïque	Laurique
C14 :0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	Tétradécanoïque	Myristique
C16 :0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	Hexadécanoïque	Palmitique
C18 :0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	Octadécanoïque	Stéarique
C20 :0	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	Icosanoïque	Arachidique
C22 :0	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	Docosanoïque	Béhénique
C24 :0	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	Tétracosanoïque	Lognicérique
C26 :0	CH ₃ (CH ₂) ₂₄ COOH	Hexacosanoïque	Cérotique
C28 :0	CH ₃ (CH ₂) ₂₆ COOH	Octacosanoïque	Montanique
C30 :0	CH ₃ (CH ₂) ₂₈ COOH	Tricontanoïque	Mélistique

(Adapté de Cuvelier et al., 2004)

L'acide palmitique (16 :0) et l'acide stéarique (18 :0) sont retrouvés dans de nombreuses espèces végétales et animales, ils sont les plus abondants dans la nature. Ces espèces sont retrouvées dans les matières grasses telles que le beurre de cacao, par exemple. Les acides gras saturés plus longs, possédant de 20 à 24 atomes de carbone, sont présents de façon très ubiquitaire mais en très petites quantités. On les retrouve dans certaines huiles comme l'huile de soja, d'olive, de maïs, d'arachide ou encore de colza. Les acides gras ayant moins de 12 atomes de carbone au sein de leur chaîne sont essentiellement retrouvés dans le lait des mammifères alors que ceux qui possèdent plus de 24 atomes de carbone sont plutôt des composants de cires protectrices formées par des plantes, des bactéries ou des insectes (Cuvelier et al., 2004).

De nombreuses études ont montré qu'il existe un lien entre une augmentation des taux de SFA et celle du risque de maladies cardiovasculaires. Il a été montré que les SFA sont hypercholestérolémiants (Lamarche and Couture, 2014). En effet, les SFA augmenteraient les taux de LDL ainsi que le cholestérol total dans le plasma. De plus, il a été montré que remplacer les SFA par d'autres acides gras, notamment les acides gras poly-insaturés (PUFA), serait bénéfique et permettrait de diminuer les proportions de particules LDL et des triglycérides (Astrup et al., 2011; Lamarche and Couture, 2014). Les organisations de santé recommandent de réduire la consommation de SFA à moins de 10% de l'apport énergétique total.

1.2.2. Les acides gras mono-insaturés

Les acides gras mono-insaturés (MUFA) ne possèdent qu'une seule double liaison dans leur chaîne carbonée qui peut se trouver en diverses positions. Il existe plus d'une centaine de MUFA mais les principaux sont ceux possédant entre 16 et 22 atomes de carbone.

- Les acides gras mono-insaturés cis

La configuration *cis* se produit lorsque deux atomes d'hydrogène se trouvent du même côté du plan au niveau de la double liaison. Ces acides gras ont, de ce fait, une structure courbée. Les principales espèces sont les acides oléique (C18 :1n-9c), vaccénique (C18 :1n-7c) et palmitoléique (C16 :1n-7c). D'autres espèces sont beaucoup plus minoritaires telles que les acides myristoléique (C14 :1n-5) ou érucique (C22 :1n-9).

- Les acides gras mono-insaturés *trans*

Les acides gras en configuration *trans* ne possèdent aussi qu'une double liaison mais cette fois-ci, les atomes d'hydrogène sont de part et d'autre du plan de la molécule. Il en résulte une structure plane qui se rapproche beaucoup de celle des acides gras saturés. Les principales espèces sont les acides élaïdique (C18 :1n-9t) et *trans*-vaccénique (C18 :1n-7t). Les MUFA *trans* ont deux origines principales. Certains sont dits naturels car ils sont produits dans l'estomac des ruminants par les bactéries qui y résident et sont ensuite incorporés dans le lait. Les autres sont d'origine artificielle et sont synthétisés via un processus industriel appelé l'hydrogénation. C'est un processus très utilisé dans l'industrie alimentaire pour donner de la consistance aux huiles insaturées et en prolonger la conservation. Les principaux MUFA sont repris dans le tableau suivant 7.

Tableau 7 : acides gras mono-insaturés

Symbole (nomenclature normalisée)	Symbole (nomenclature oméga)	Structure chimique	Nom systématique	Nom commun
C12 :1(9)	C12 :1ω-3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> -9- dodécénoïque	Laurooléique
C14 :1(9)	C14 :1ω-5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> -9- tétradécénoïque	Myristoléique
C16 :1(9)	C16 :1ω-7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> -9- hexadécénoïque	Palmitoléique
C18 :1(6) <i>trans</i>	C18 :1ω-12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	<i>trans</i> -6- octadécénoïque	Pétrosélaïdique
C18 :1(9)	C18 :1ω-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> -9- octadécénoïque	Oléique
C18 :1(9) <i>trans</i>	C18 :1ω-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	<i>trans</i> -9- octadécénoïque	Elaidique
C18 :1(11)	C18 :1ω-7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	<i>cis</i> -11- octadécénoïque	Vaccénique
C18 :1(11) <i>trans</i>	C18 :1ω-7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	<i>trans</i> -11- octadécénoïque	<i>Trans</i> vaccénique
C20 :1(9)	C20 :1ω-11	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> -9-icosénoïque	Gadoléique
C22 :1(11)	C22 :1ω-11	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	<i>cis</i> -11- docosénoïque	Cétoléique
C22 :1(13)	C22 :1ω-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	<i>cis</i> -13- docosénoïque	Erucique
C24 :1(15)	C24 :1ω-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	<i>cis</i> -15- tétracosénoïque	Sélacholéique

(Adapté de Cuvelier et al., 2004)

Le plus représenté des MUFA est l'acide oléique (18:1n-9). Il compte pour approximativement 90% de tous les MUFA consommés. On retrouve ces MUFA dans de nombreux végétaux et graines (huile d'olive, huile de tournesol, huile de colza ou huile de palme) mais aussi dans les graisses animales (Degirolamo and Rudel, 2010). Les MUFA en configuration *-cis* semblent avoir des effets sur différents marqueurs associés aux maladies cardiovasculaires. Une étude réalisée sur 7000 patients à fort risques cardiovasculaires a montré que la consommation de MUFA est associée à un risque plus faible de troubles cardiovasculaires, et donc de décès (Guasch-Ferre et al., 2015). Cependant, ces corrélations ne sont correctes que pour des MUFA de type *-cis*. En effet, il est important de noter que les MUFA de type *-trans* sont associés à un fort risque de maladies cardiovasculaires.

1.2.3. Les acides gras poly-insaturés

Les acides gras poly-insaturés (PUFA) possèdent deux ou plus doubles liaisons dans leur chaîne carbonée. En fonction de la position de la première double liaison à partir du groupement méthyl, on distingue deux grandes familles de PUFA : les oméga-3 qui possèdent la première double liaison entre le 3^{ème} et le 4^{ème} carbone à partir du groupement méthyl et les oméga-6 qui possèdent leur première double liaison entre le 6^{ème} et le 7^{ème} carbone.

Chez les mammifères, la totalité des PUFA dérivent de deux acides gras dits essentiels : l'acide alpha-linolénique (C18 :3n-3) pour les oméga-3 et l'acide linoléique (C18 :2n-6) pour les oméga-6. Ces précurseurs essentiels ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères et doivent donc être absorbés par l'alimentation (Akoh and Min, 2008). Les différents oméga-3 et oméga-6 sont repris dans le tableau 8.

Tableau 8 : acides gras poly-insaturés

Symbole (nomenclature normalisée)	Symbole (nomenclature oméga)	Structure chimique	Nom systématique	Nom commun
C18 :2(9,12)	C18 :2ω-6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis,cis</i> -9,12- octadécadiénoïque	Linoléique
C18 :2(9,trans 11)	C18 :2ω-7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis,trans</i> -9,11- octadécadiénoïque	Ruménique
C18 :2(trans 11,12)	C18 :2ω-6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	<i>trans,cis</i> -10,12- octadécadiénoïque	Linoléique conjugué <i>trans</i> -10, <i>cis</i> - 12
C18 :3(6,9,12)	C18 :3ω-6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	<i>cis,cis,cis</i> -6,9,12- octadécatriénoïque	γ-linolénique
C18:3(9,12,15)	C18:3ω-3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15- octadécatriénoïque	α-linolénique
C18:3(9,trans 11,trans 13)	C18:3ω-5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis,trans,trans</i> - 9,11,13- octadécatriénoïque	α-éléostéarique
C20:4(5,8,11,14)	C20:4ω-6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	<i>cis,cis,cis</i> - 5,8,11,14- icosatétraénoïque	Arachidonique
C20:5(5,8,11,14,17)	C20:5ω-3	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	<i>cis,cis,cis,cis</i> - 5,8,11,14,17- icosapentaénoïque	
C22:5(4,8,12,15,19)	C22 :5ω-3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2)_3\text{COOH}$	<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> - 4,8,12,15,19- docosapentaénoïque	Cuplanodonique
C22:6(4,7,10,13,16,19)	C22 :6ω-3	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	<i>cis,cis,cis,cis,cis,cis</i> - 4,7,10,13,16,19- docosahexaénoïque	

(Adapté de Cuvelier et al., 2004)

Parmi tous les PUFA, les espèces les plus représentées sont les acides linoléique (18 :2n-6) et alpha-linolénique (18 :3n-3). L'acide linoléique est le plus distribué et également le plus abondant, on le retrouve dans les huiles végétales telles que l'huile de tournesol, de soja, de maïs ou de sésame. L'acide alpha-linolénique, quant à lui, est retrouvé dans les huiles végétales hautement insaturées. Les PUFA qui possèdent plus de carbone au sein de leur chaîne et qui possèdent plus de 4 doubles liaisons, sont uniquement présents dans les huiles de poisson (Cuvelier et al., 2004).

1.3. Effets biologiques et propriétés

1.3.1. Stockage et source d'énergie

Les acides gras sont des molécules pouvant être cassées et oxydées afin de fournir de l'énergie nécessaire pour la maintenance, la croissance et la reproduction des systèmes biologiques (**Turner et al., 2014**). Ils sont principalement stockés sous forme de triglycérides. Ces derniers constituent le stock d'acides gras le plus important de l'organisme localisé essentiellement dans le tissu adipeux mais aussi dans les muscles squelettiques et le plasma (Horowitz and Klein, 2000).

Les acides gras ont une valeur énergétique deux fois plus grande que les protéines ou le glucose. En effet, ils fournissent 9 kilocalories par grammes consommés contre 4 pour les glucides et les protéines. Par ailleurs, ils nécessitent moins d'eau pour leur stockage (Kremmyda et al., 2011).

Les acides gras sous forme de triglycérides sont les substrats énergétiques préférentiels du muscle qui est le plus gros consommateur, suivi du myocarde et du foie. L'énergie sous forme d'acides gras va être libérée dans des situations de jeûne, d'exercice physique, de stress ou encore d'exposition au froid à l'aide d'un processus appelé lipolyse. Elle correspond à l'hydrolyse des triglycérides stockés, c'est-à-dire à leur dégradation en trois acides gras libres et une molécule de glycérol. Les molécules ainsi libérées pourront être utilisées par les tissus périphériques comme source d'énergie (les acides gras) et comme précurseurs néoglucogéniques (le glycérol).

1.3.2. Composants des membranes cellulaires

Les acides gras, sous forme de phospholipides, sont les composants structuraux principaux des membranes plasmiques. Les phospholipides sont des molécules composées d'une tête hydrophile (choline, éthanolamine, sérine ou inositol) et d'une queue hydrophobe constituée d'un ou plusieurs acides gras. Cette configuration particulière permet alors la formation de la bicouche phospholipidique, caractéristique des membranes cellulaires, par un arrangement spécifique des queues hydrophobes dans la partie interne, et des têtes hydrophiles dans la partie externe de la membrane (Kremmyda et al., 2011).

Les propriétés de ces membranes peuvent largement être influencées en fonction de la présence ou non de cholestérol et protéines de différents types, mais surtout par la nature des acides gras qui composent les phospholipides. En effet, plus ces acides gras possèdent d'atomes de carbone et de doubles liaisons, plus la fluidité de la membrane est importante. A l'inverse, plus les phospholipides sont composés de SFA moins la membrane est fluide. Cela s'explique par le fait que les acides gras insaturés, et notamment ceux avec des doubles liaisons en configuration *cis*, ont une structure courbée qui occupe plus d'espace ce qui augmente la fluidité membranaire (Kremmyda et al., 2011).

1.3.3. Isolants thermiques

Il existe chez les nouveau-nés humains et chez de nombreuses espèces animales adultes un tissu adipeux particulier qu'on appelle tissu adipeux brun. Il diffère du tissu adipeux blanc, que l'on trouve chez les adultes, par la présence, de nombreuses gouttelettes de graisse et de mitochondries à l'intérieur des adipocytes. Ce tissu adipeux brun a pour fonction de produire de la chaleur pour maintenir la température du corps à 37°C (Ducimetière, 1997). Le mécanisme thermogénique s'explique par le découplage par la protéine UCP1, entraînant une dissociation et favorisant la production de chaleur au détriment de la production d'ATP (Ricquier, 2011).

1.3.4. Signalisation

Les acides gras sont connus pour être des ligands de certains récepteurs nucléaires, régulant ainsi l'activité cellulaire. Les acides gras insaturés et particulièrement les PUFA de type oméga-3 sont des ligands préférentiels des récepteurs PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). Ces récepteurs sont régulés par des acides gras pour contrôler le métabolisme de ces derniers. C'est pourquoi on appelle ces récepteurs PPAR des « senseurs lipidiques ». De façon résumée, PPAR α et PPAR β/δ sont responsables de la consommation énergétique tandis que PPAR γ est plutôt impliqué dans le stockage d'énergie par augmentation de l'adipogénèse (Grygiel-Górniak, 2014; Janani and Ranjitha Kumari, 2015; Palomer et al., 2015). Les PUFA peuvent également interagir avec les facteurs de

transcription LXR α et β (Liver X Receptor) et RXR (Retinoic X Receptor) afin de stimuler l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique (Yoshikawa et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que les PUFA sont capables de supprimer la lipogenèse *de novo* dans le foie en inhibant l'activité du récepteur SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) (Nakamura et al., 2014).

1.3.5. Précurseurs de médiateurs lipidiques

Certains PUFA comme l'AA (20:4n-6), l'EPA (20:5n-3) et le DHA (22:6n-3), sont les précurseurs d'un certain nombre de dérivés lipidiques jouant des rôles majeurs dans les processus d'inflammation. Ces dérivés sont appelés des eicosanoides. Il existe plusieurs catégories d'eicosanoides en fonction de la sous-famille d'acides gras dont ils sont issus et de leurs rôles.

Classiquement, on admet que les dérivés provenant des omega-3 ont des propriétés anti-inflammatoires, tandis que ceux provenant des omega-6 sont plutôt pro-inflammatoires. Parmi les dérivés provenant des omega-6, on trouve les prostaglandines, les leucotriènes et les thromboxanes de la série 2 ou encore des lipoxines. Concernant ceux qui sont issus des omega-3, on trouvera également des prostaglandines, des leucotriènes et des thromboxanes mais de la série 3 ainsi que des résolvines. Les prostaglandines issues de l'AA ont des propriétés pro-arythmiques alors que celles issues de l'EPA sont anti-arythmiques. Les prostaglandines provenant des omega-6 favorisent la production de cytokines inflammatoires telles que les IL-6. Les thromboxanes issues des omega-6 présentent un potentiel vasoconstricteur, et à l'inverse, ceux issues des omega-3 favorisent la vasodilatation. Concernant les leucotriènes, ceux issues des omega-6 augmentent la perméabilité vasculaire et entraînent la production de ROS et d'interleukines. Les résolvines issues de l'EPA, quant à elles, réduisent l'inflammation via la suppression de la synthèse de cytokines et chimiokines (Schmitz and Ecker, 2008).

2. Les acides gras comme témoins du statut métabolique

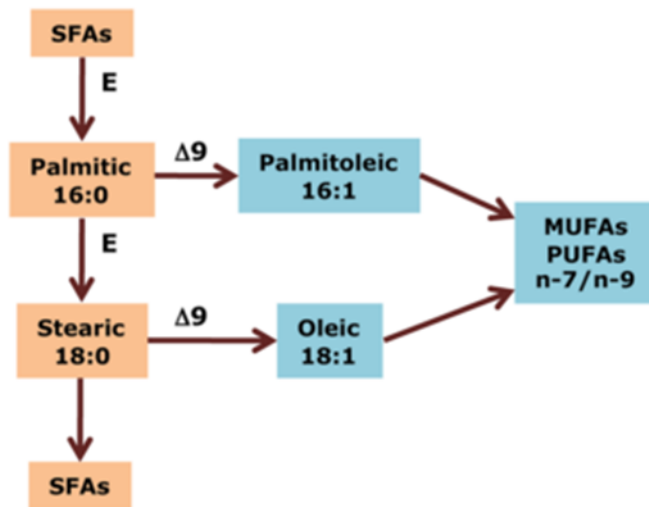
Les acides gras font partie de nombreux types de lipides comme les triglycérides, les phospholipides, les sphingolipides, les sphingomyélines ou encore les céramides. De ce fait, étudier la composition en acides gras d'un tissu ou d'un fluide biologique, comme le sang, revient à évaluer le métabolisme lipidique en général.

Parmi les différentes voies de synthèse des acides gras, la désaturation (ou introduction d'une double liaison dans la chaîne hydrocarbonée), en position $\Delta 9$, est prise en charge par l'enzyme Stearoyl-CoEnzyme A Desaturase (SCD). Ainsi, les SFA 16 :0 et 18 :0 sont convertis en MUFA 16 :1 et 18 :1, respectivement (Figure 6). Les index SCD, mesurés à l'aide des ratios produit/substrat 18 :1/18 :0 et 16 :1/16 :0, sont alors utilisés comme témoins d'une activité lipogénique. Il est admis qu'un index SCD élevé est associé à l'obésité et à des conditions pathologiques comme le diabète métaboliques (Vessby et al., 2013; Vinknes et al., 2013; Matthan et al., 2014).

Quant aux PUFA, les voies de synthèse des omega-3 et omega-6 sont deux voies bien distinctes qui ont toutefois des enzymes en commun comme les désaturases $\Delta 5$ (FADS1) et $\Delta 6$ (FADS2) et les élongases ELOVL2 et ELOVL5. Il est important de garder à l'esprit que, chez les mammifères, même si ces deux voies partagent les mêmes enzymes, il ne peut y avoir d'inter-conversion entre les deux familles de PUFA (Figure 3). Plusieurs index ou ratios, établis à partir des voies de synthèse des PUFA, reflètent aussi le statut métabolique de l'organisme. L'index omega-3, correspondant à la somme des taux d'EPA et de DHA, est couramment utilisé pour évaluer la composition des tissus en omega-3 de façon globale. Un index omega-3 élevé est associé à une diminution du risque cardiovasculaire (Harris, 2008). Le ratio $\omega 6/\omega 3$ permet d'évaluer la balance entre les deux familles de PUFA. Un ratio élevé, en faveur des $\omega 6$, est associé à une augmentation des processus inflammatoires ainsi qu'à une forte prédisposition pour l'obésité et le diabète (Simopoulos, 2010). Les rendements globaux des voies de synthèse des omega-6 et des omega-3 peuvent être estimés à l'aide des ratios AA/LA et EPA/ALA, respectivement. Enfin, les activités des différentes désaturases et élongases peuvent également être estimées à l'aide de ratios. Pour l'activité de la désaturase FADS1, le ratio AA/DGLA est utilisé. Quant à la désaturase FADS2, on utilise le ratio GLA/LA, et pour l'activité relative de l'élongase 5 (ELOVL5), c'est le ratio DGLA/GLA qui est utilisé (Pickens et al., 2016). La détermination de la composition en acides gras d'un

échantillon se fait grâce une technique spécifique : la chromatographie en phase gazeuse (CG). La CG est une technique de chimie analytique qui permet d'analyser les différentes molécules constituant des mélanges plus ou moins complexes. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage, sans décomposition. Les acides gras peuvent être extraits de tous types de tissus grâce à la méthode de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Cette méthode d'extraction se base sur l'utilisation d'un mélange de solvants apolaires, fait de méthanol et de chloroforme, permettant la séparation des protéines et des lipides totaux. Afin d'augmenter la volatilité des acides gras et, par conséquent, leur détection, une transestérification est réalisée. Cela consiste en une saponification suivie d'une méthylation (Figure 7). Les acides gras sont ensuite récupérés dans de l'heptane et ce mélange est injecté dans la colonne du chromatographe. Les différents acides gras vont ainsi migrer tout le long de la colonne grâce à un gaz vecteur (hélium) et en sortir à différents temps de rétention selon leur affinité pour la phase stationnaire de la colonne. Les acides gras sont détectés à la sortie de la colonne par un système à ionisation de flamme. Les pics obtenus sur les profils d'acides gras sont identifiés par comparaison à ceux obtenus pour un mélange standard connu (Figure 8). Le GC est donc un élément essentiel pour l'analyse de la composition en acides gras et, par conséquent, de l'estimation du bilan métabolique, voire énergétique, de l'organisme.

Synthesis of MUFAs



Synthesis of n-3 PUFAs



Synthesis of n-6 PUFAs



Figure 6 : voies de synthèse des acides gras chez les mammifères (Hussain et al., 2013)

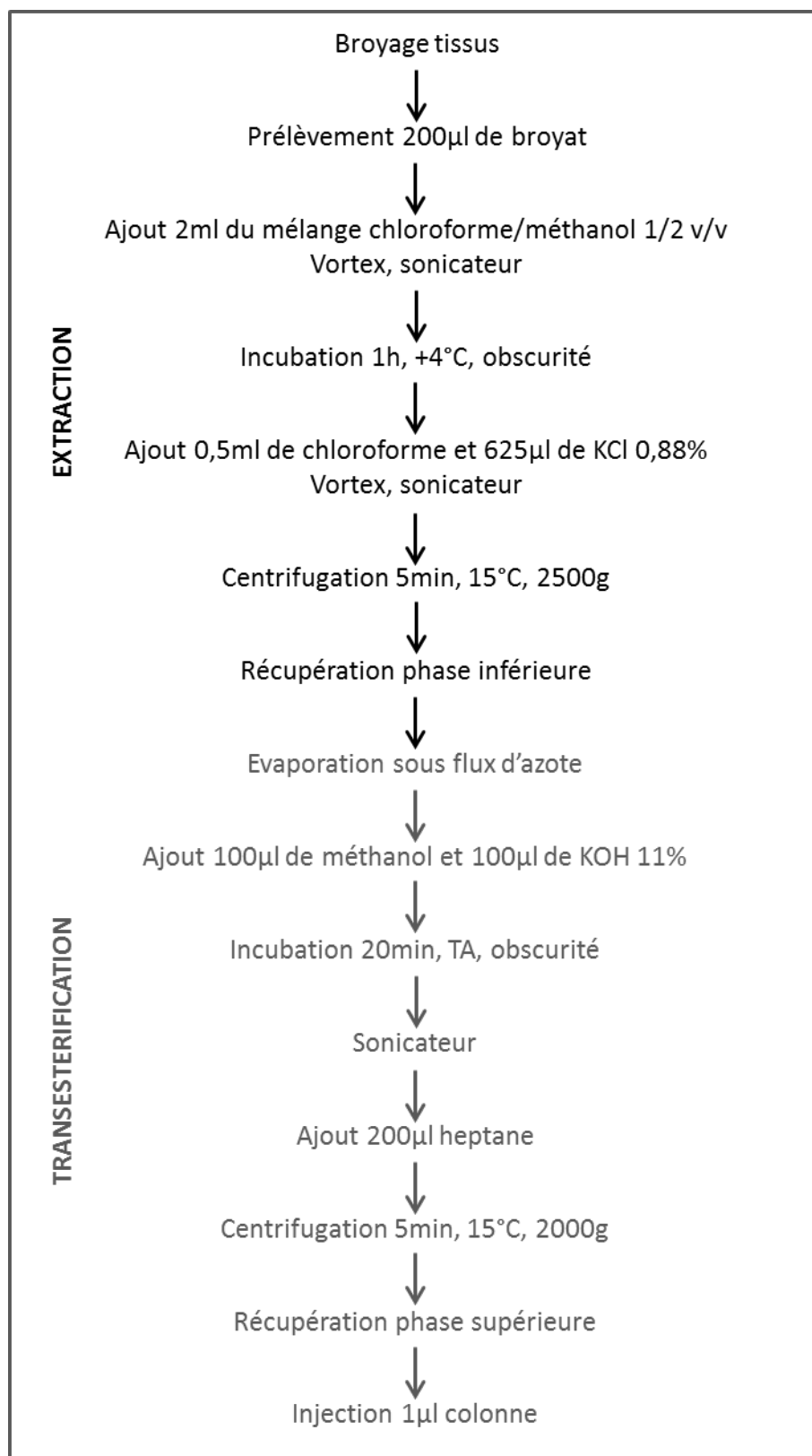


Figure 7 : protocole d'extraction des acides gras selon la méthode de Bligh and Dyer

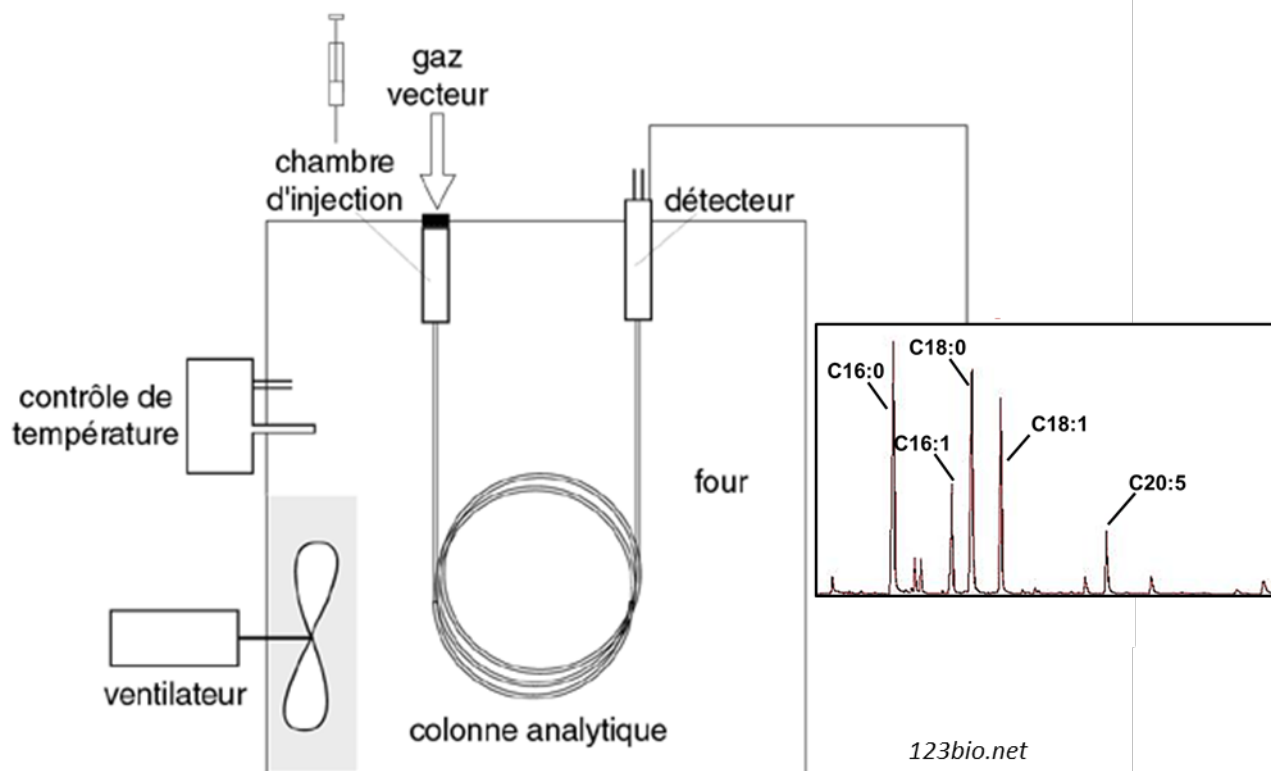


Figure 8 : schéma d'une chromatographie gazeuse et d'un chromatogramme

3. Les acides gras et le système nerveux

La plupart des études sur les rôles des acides gras dans le système nerveux se sont intéressées aux PUFA puisqu'ils constituent la majorité des acides gras présents dans le cerveau (Lauritzen et al., 2016). Les PUFA sont indispensables pour le système nerveux tout au long de la vie d'un individu. Tout commence lors du développement embryonnaire in-utero. A partir du 3^{ème} trimestre de grossesse, le développement du cerveau est maximal et les besoins en PUFA sont très importants. Ces PUFA, et plus précisément ces omega-3, vont être fournis par la mère via le placenta. Ensuite, c'est via le lait maternel que ces acides gras vont être apportés. Il apparaît alors évident que l'alimentation de la mère va jouer un rôle majeur dans la disponibilité et donc l'apport en omega-3. De nombreuses études se sont penchées sur les effets d'un apport en omega-3 et le développement des enfants mais les résultats obtenus restent relativement controversés. Certaines études ont montré que les enfants, dont les mères ont reçu une supplémentation en omega-3 durant la grossesse, présentent des QI plus élevés et une acuité visuelle ou des fonctions cognitives plus développées tandis que d'autres études n'ont pas montré de différences (Karr et al., 2011).

Les acides gras sont également très importants pour le développement et le maintien des fonctions cognitives chez l'adulte. Pour citer quelques exemples, l'étude de Fontani et collaborateurs a montré qu'une supplémentation en omega-3 est associée à une meilleure attention, une meilleure humeur et des temps de réaction amoindris pour certaines tâches cognitives (Fontani et al., 2005). De meilleures capacités de mémorisation semblent également être associées à la consommation d'omega-3. L'étude d'Eskelinen et collaborateurs a montré que des sujets ayant une alimentation riche en omega-3 présentent de meilleurs résultats pour des tests de mémoires épisodique ou sémantique (Eskelinen et al., 2008).

Enfin, les PUFA permettent de lutter contre le vieillissement naturel du cerveau, qui se caractérise, entre autres, par une diminution des taux de DHA (Janssen and Kiliaan, 2014). Ainsi, une alimentation enrichie en omega-3 est associée à une diminution du risque d'altération des fonctions cognitives chez les sujets âgés (Kalmijn et al., 2004).

Le passage à une alimentation plus calorique, à la consommation d'aliments toujours plus transformés ainsi que la réduction de l'activité physique ont, de nos jours, un impact considérable sur la santé. De nombreuses études ont mis en avant un grand nombre de preuves quant à l'implication de la qualité de l'alimentation et donc au rôle des lipides dans l'apparition de troubles neurologiques. Les acides gras, et particulièrement les PUFA, sont des facteurs clé qui contribuent à un grand nombre de processus biologiques comme la neurotransmission, la neurogénèse, la survie cellulaire, la neuroinflammation ou encore dans le développement neuronal. Ce sont ces mêmes processus qui sont altérés dans les maladies neurologiques.

Des changements dans la composition en acides gras apparaissent étroitement liés à certains troubles neuropsychiatriques comme la dépression, la schizophrénie ou les troubles bipolaires. Ainsi, les proportions de différents acides gras, à la fois des SFA, des MUFA et des PUFA, sont altérées chez des patients atteints de dépression (Conklin et al., 2010; Lin et al., 2010; Hamazaki et al., 2012). Des modifications similaires ont été rapportées chez des sujets atteints de troubles bipolaires ou de schizophrénie. On observe, dans le sérum, une augmentation du ratio EPA/DHA ainsi qu'une diminution des niveaux d'EPA et d'omega-3 totaux. Ces mêmes observations sont faites dans les fractions cellulaires sanguines des patients (Chiu et al., 2003; Lin et al., 2010; Hamazaki et al., 2012; Bozzatello et al., 2016).

Par ailleurs, des altérations de la composition en acides gras sont également associées à des processus neurodégénératifs. Des analyses sur des tissus post-mortem de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont révélé une diminution des taux d'omega-3 dans l'hippocampe et le lobe frontal, qui sont les régions les plus affectées par la maladie (Yehuda et al., 2002). Une diminution des niveaux de DHA et d'acide oléique ont également été mises en avant chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Martín et al., 2010). La maladie de Parkinson se caractérise aussi par des altérations dans la composition en acides gras. L'étude de Fabelo et collaborateurs a décrit une réduction des niveaux de DHA et d'AA dans le cortex frontal de patients atteints de cette maladie (Fabelo et al., 2011). Quelques études se sont également intéressées à la composition en acides gras dans la SLA. Des différences significatives des proportions d'acides gras et des variations des index ont été décrites dans la moelle épinière et le cortex de patients atteints de SLA. En effet, des taux significativement réduits de DHA ont été observés parallèlement dans la moelle épinière (Ilieva et al., 2007).

Enfin, à la suite de ces observations et connaissant les propriétés neuroprotectrices des PUFA, des études se sont intéressées aux potentiels effets bénéfiques que pourrait avoir une supplémentation en acides gras sur ces maladies via des approches nutritionnelles. Plusieurs études réalisées sur des patients dépressifs ou atteints de troubles bipolaires ont montré qu'une supplémentation en omega-3 diminue leurs symptômes (Peet and Horrobin, 2002; Frangou et al., 2006). De même, il semblerait aussi que ces approches nutritionnelles aient un effet positif sur les maladies neurodégénératives. Des souris transgéniques surexprimant une forme humaine mutée de l'APP, précurseur responsable de la synthèse du peptide amyloïde β , ont été nourries avec une alimentation enrichie en DHA. Ces animaux présentent alors une diminution des taux de peptide A β ainsi qu'une réduction des plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Amtul et al., 2011a). Une supplémentation en acide oléique a également montré des effets bénéfiques en diminuant la production du peptide A β et des plaques (Amtul et al., 2011b).

Objectifs

Nous avons vu que la SLA est une maladie qui se caractérise par de nombreuses altérations de l'homéostasie énergétique, telles qu'un hypermétabolisme ou une dyslipidémie, et que ces perturbations métaboliques ont une influence sur la survie des patients. Nous savons également que les acides gras jouent un rôle fondamental dans le développement du cerveau, ainsi que dans le maintien de son bon fonctionnement tout au long de la vie. La composition en acides gras des lipides, altérée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives et désordres mentaux, est considérée aujourd'hui comme un bon témoin du statut métabolique et de ce fait, comme un biomarqueur potentiel à visée diagnostique et/ou pronostique.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était, dans un premier temps, d'identifier des changements dans la composition en acides gras dans le sang, des patients atteints de SLA. Dans un second temps, le but était de tester des approches pré-cliniques afin d'évaluer l'impact de la modulation des changements observés sur le fonctionnement du système moteur.

Mes travaux se sont articulés autour de deux grands axes : d'une part, les changements dans la composition en SFA et MUFA, et d'autre part, ceux dans la composition en PUFA. Le premier chapitre de cette thèse traitera de l'analyse des modifications de la composition en SFA et en MUFA dans le sang de patients atteints de SLA, et de leur utilité en tant que biomarqueur de la maladie. Le second chapitre sera destiné à l'étude des effets de la modulation de l'activité SCD, responsable de la conversion des SFA en MUFA, sur la progression de la maladie dans le modèle murin SOD1^{G86R}. Le troisième chapitre se rapportera à l'analyse de la composition en PUFA, dans le sang de patients atteints de SLA. Cette étude traitera plus particulièrement du caractère spécifique de ces changements et de leur capacité à prédire l'évolution de la maladie. Enfin, le dernier chapitre dissertera sur l'utilisation d'une approche nutritionnelle, via un enrichissement en omega-3, dans la modulation de la récupération fonctionnelle de l'axe neuromusculaire en réponse à une lésion nerveuse.

Résultats

CHAPITRE I

**Les acides gras saturés (SFA)
et mono-insaturés (MUFA) en
tant que biomarqueurs de la
SLA : étude préliminaire**

La réaction de désaturation des SFA en position $\Delta 9$ (ou SCD), responsable de la conversion du palmitate en palmitoléate et du stéarate en oléate, est associée à une activité lipogénique. Ainsi, de manière générale, les modifications des ratios 16:1/16:0 et 18:1/18:0, ont été utilisées comme témoins des altérations de l'homéostasie énergétique et du statut nutritionnel dans diverses conditions pathologiques telles que le cancer ou l'obésité (Vinknes et al., 2013; Matthan et al., 2014). Etant donné les manifestations d'ordre métabolique qui accompagnent la SLA, notre laboratoire s'est alors intéressé à évaluer le potentiel biomarqueur de cette activité de désaturation chez les patients atteints de la maladie. Au démarrage de mon projet de thèse, j'ai participé à une première étude qui visait à analyser la composition en SFA et MUFA des lipides dans le sang des patients.

Il est important de noter que le choix d'étudier l'activité SCD avait été également appuyé par des travaux sur l'analyse du transcriptôme musculaire, réalisés au sein du laboratoire. En effet, ces travaux avaient montré, aussi bien chez les souris mSOD1 que chez les patients atteints de SLA, une diminution de l'expression musculaire de la SCD1 (Gonzalez de Aguilar et al., 2008; Pradat et al., 2011). Cette altération de l'expression de SCD1 s'est révélée être relativement précoce puisqu'elle a été retrouvée dans un muscle dont la force était normale et sans signes de dénervation visibles à l'EMG. Par ailleurs, cette enzyme nous est apparue comme étant tout particulièrement intéressante du fait que des souris, dont le gène codant pour la SCD1 a été inactivé, présentent une dépense énergétique accrue et un poids réduit et donc un phénotype qui ressemble beaucoup à celui des souris mSOD1 (Ntambi et al., 2002; Dupuis et al., 2004).

A partir de l'ensemble de ces observations, nous avons posé l'hypothèse que l'activité SCD pouvait être un biomarqueur potentiel de la SLA. Pour cela, les profils d'acides gras obtenus à partir d'analyses chromatographiques du sérum et du culot sanguin de patients ont été analysés et comparés à ceux obtenus pour des sujets contrôles. De plus, ces changements dans la composition en acides gras ont été corrélés à différents paramètres biochimiques et cliniques de la maladie.

RESEARCH ARTICLE

Blood Cell Palmitoleate-Palmitate Ratio Is an Independent Prognostic Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis

Alexandre Henriques^{1,2}, Hélène Blasco^{3,4}, Marie-Céline Fleury⁵, Philippe Corcia^{3,6}, Andoni Echaniz-Laguna^{1,2,5}, Laura Robelin^{1,2}, Gabrielle Rudolf⁵, Thiebault Lequeu^{1,2}, Martine Bergaentzle^{7,8}, Christian Gachet⁹, Pierre-François Pradat¹⁰, Eric Marchioni^{7,8}, Christian R. Andres^{3,4}, Christine Tranchant⁵, Jose-Luis Gonzalez De Aguilar^{1,2†*}, Jean-Philippe Loeffler^{1,2†*}

1 INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Strasbourg, France, **2** Université de Strasbourg, UMR_S1118, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France, **3** INSERM, Université François-Rabelais, U930, Neurogénétique et Neurométabolisme, Tours, France, **4** CHRU de Tours, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Tours, France, **5** Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Neurologie, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France, **6** CHRU de Tours, Centre SLA, Tours, France, **7** Université de Strasbourg, IPHC, Equipe de Chimie Analytique des Molécules BioActives, Illkirch-Graffenstaden, France, **8** CNRS, UMR 7178, Strasbourg, France, **9** INSERM, Université de Strasbourg, UMR_S949, Etablissement Français du Sang - Alsace, Strasbourg, France, **10** Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Fédération des Maladies du Système Nerveux, Centre Référent Maladie Rare SLA, Paris, France

† JLGDA and JPL are joint senior authors on this work.

* gonzalez@unistra.fr (JLGDA); loeffler@unistra.fr (JPL)



OPEN ACCESS

Citation: Henriques A, Blasco H, Fleury M-C, Corcia P, Echaniz-Laguna A, Robelin L, et al. (2015) Blood Cell Palmitoleate-Palmitate Ratio Is an Independent Prognostic Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis. PLoS ONE 10(7): e0131512. doi:10.1371/journal.pone.0131512

Editor: Cedric Raoul, Inserm, FRANCE

Received: March 19, 2015

Accepted: June 3, 2015

Published: July 6, 2015

Copyright: © 2015 Henriques et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by funds from Thierry Latran Foundation, European Community's Health Seventh Framework Programme under grant agreement No. 259867 (Euro-MOTOR), "Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres Maladies du Motoneurone" (ARSLA), "André combat la SLA" and "Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives" (AREMANE). The funders had no role in study

Abstract

Growing evidence supports a link between fatty acid metabolism and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Here we determined the fatty acid composition of blood lipids to identify markers of disease progression and survival. We enrolled 117 patients from two clinical centers and 48 of these were age and gender matched with healthy volunteers. We extracted total lipids from serum and blood cells, and separated fatty acid methyl esters by gas chromatography. We measured circulating biochemical parameters indicative of the metabolic status. Association between fatty acid composition and clinical readouts was studied, including ALS functional rating scale-revised (ALSFRS-R), survival, disease duration, site of onset and body mass index. Palmitoleate (16:1) and oleate (18:1) levels, and stearoyl-CoA desaturase indices (16:1/16:0 and 18:1/18:0) significantly increased in blood cells from ALS patients compared to healthy controls. Palmitoleate levels and 16:1/16:0 ratio in blood cells, but not body mass index or leptin concentrations, negatively correlated with ALSFRS-R decline over a six-month period ($p < 0.05$). Multivariate Cox analysis, with age, body mass index, site of onset and ALSFRS-R as covariables, showed that blood cell 16:1/16:0 ratio was an independent prognostic factor for survival (hazard ratio=0.1 per unit of ratio, 95% confidence interval=0.01-0.57, $p=0.009$). In patients with high 16:1/16:0 ratio, survival at blood collection was extended by 10 months, as compared to patients with low ratio. The 16:1/16:0 index is an easy-to-handle parameter that predicts survival of ALS

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

patients independently of body mass index. It therefore deserves further validation in larger cohorts for being used to assess disease outcome and effects of disease-modifying drugs.

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a degenerative condition characterized by the loss of upper and lower motor neurons. Most patients initially present with muscular weakness and fasciculations in the limbs while others show dysphagia or dysarthria, indicating an onset in the bulbar area. Disease progresses to generalized paralysis and eventually death, usually occurring from respiratory failure within 1–5 years of diagnosis. Notably, 20% of patients live longer than 5 years, and 10% survive for more than 10 years. Symptoms develop typically between 40–70 years of age. Prevalence is slightly higher in men than in women but becomes comparable with increasing age. Patients with bulbar onset have more rapid progression and shorter life expectancy than patients with limb onset. Younger patients have longer disease duration than older ones [1–3].

According to the revised El Escorial and the Awaji criteria [4, 5], a progressive spread of symptoms involving upper and lower motor neurons is required for a definitive diagnosis of ALS. At onset, however, symptoms manifest partially, and the verification of such criteria often takes more than one year. Disease progression is mostly assessed by consensual clinical scores, the most used of which is the ALS functional rating scale-revised (ALSFRS-R) [5]. This scale is employed to evaluate the pace of disease progression, predict survival and assess the effects of disease-modifying drugs in therapeutic trials. However, it depends on the interpretation of questionnaires on the patients' quality of life and hence suffers from insufficient sensitivity. There is therefore an undeniable need for robust biological markers that help to diagnose ALS shortly, and prognosticate disease outcome accurately.

ALS is characterized by important alterations in energy homeostasis [6, 7]. Hypermetabolism, abnormal glucose tolerance and dyslipidemia have a high incidence in ALS patients and persist over time [8–13]. Since these modifications can be easily monitored with minimally invasive impact, new biomarkers were proposed based on metabolic readouts. The results were however conflicting. Using univariate analysis, high LDL/HDL cholesterol ratio or elevated content of total cholesterol and triglycerides, was associated with better prognosis in French, German, Dutch and North American cohorts [12–15] or with slower disease progression in an Italian cohort [16]. Based on multivariate analysis, BMI at diagnosis remains the only metabolic independent prognostic factor for survival in ALS [13, 14].

Overall energetic metabolism influences the degree of unsaturation and length of fatty acids present in lipids. The endogenous conversion of palmitate into palmitoleate and of stearate into oleate is catalyzed by $\Delta 9$ stearoyl-CoA desaturase (SCD), a lipogenic enzyme highly sensitive to global energetic homeostasis. Palmitoleate to palmitate (16:1/16:0) and stearate to oleate (18:1/18:0) ratios are used as proxies of nutritional status in conditions such as obesity and cancer [17, 18]. Here we hypothesized that the changes in the proportions of fatty acids from blood lipids are a source of novel, reliable markers to help monitoring disease severity in ALS patients. We analyzed chromatographic profiles of fatty acids derived from total lipids in serum and clotted blood cells. We compared fatty acid composition between patients and healthy controls. We also correlated changes in patients' fatty acid composition with clinical and biochemical parameters. We used multivariate Cox proportional hazards model analysis to assess whether the detected changes predict patients' life expectancy.

Material and Methods

Standard protocol approvals, registrations, and patient consents

Blood samples were collected during routine clinical evaluation for ALS patients and during blood donation for healthy controls. Patients have received appropriate information about the use of their blood samples in medical research and gave oral informed consent to clinicians (Tours) or gave written informed consent (Strasbourg). Signed or documented consent was not requested since study includes only blood collected during routine procedure. The ethical committees of the hospitals in Tours (Comité de protection des personnes "Ouest I") and Strasbourg (Comité de protection des personnes "Est-IV") approved the consent procedures and protocol (CPRB 09/40–n°AC-2008-438/n°DC-2009-1002).

Patients and control subjects

This is a case-control study performed with 117 ALS patients and 48 healthy controls enrolled between April 2011 and September 2014. Patients were recruited from two referral centers for ALS located in Strasbourg (Eastern France) and Tours (Western-Central France). Patients diagnosed as having probable or definite ALS, according to the revised El Escorial criteria, were included [5]. According to typical epidemiology, patients with a familial history of ALS represented about 10% [19]. Healthy volunteers were recruited from the Etablissement Français du Sang (Strasbourg, France), and were matched for gender and age. Blood samples were collected under non-fasting conditions, since the metabolic status of ALS patients in response to fasting may differ from that of controls [8]. Individuals taking medications for treatment of diabetes or related metabolic conditions were excluded [14]. Age, gender and body mass index (BMI, calculated as weight in kg divided by height in m²) were recorded at blood collection. The site of onset was defined as bulbar or spinal (*i.e.*, limb). Disease onset was designated as the time of initial motor deficit. Survival was the interval between the point of blood collection and death from confirmed ALS related complications. Disease duration was the interval between onset of symptoms and death. ALSFRS-R scores were recorded at blood collection. To determine the rate of ALSFRS-R decline, scores were also registered six months later, except for a minority of cases where scores were obtained six months before the collection time. The decline was calculated as the loss of points of ALSFRS-R over six months.

Blood sample preparation and gas chromatography

Blood samples were collected from venous puncture in red top tubes and allowed to clot for 30 minutes at room temperature. After centrifugation at 4000g for 10 minutes at 4°C, serum and clot were separately snap frozen on dry ice and kept at -80°C until processing. In addition to serum, we also analyzed clotted blood cells, since lipid turnover in this membrane-enriched fraction ranges from five to fifteen days, and hence fatty acid composition is hardly affected by food intake prior to collection [20–22]. Total lipids were extracted following a modified version of the Bligh and Dyer method, as previously described [23]. After separation from the parent lipid molecules, the obtained fatty acids were converted into fatty acid methyl ester derivatives and stored at -20°C until analysis. Gas chromatography was performed using a Varian 3400CX chromatograph fitted with a WCOT fused silica capillary column of 100 m x 0.25 mm x 0.20 µm, coated with polar highly substituted cyanopropyl CP-SIL 88 phase, as described in detail [24]. Results were expressed as relative percentages of the total fatty acids detected.

Quantification of biochemical parameters

Circulating levels of triglycerides, total cholesterol and free fatty acids were determined with TR210, CH200 and FA115 Randox kits, respectively, following standard protocols according to manufacturer's recommendations (Laboratoires Randox, Roissy, France). Leptin levels were determined using a commercial OKAA00022 ELISA kit, according to manufacturer's instructions (Aviva Systems Biology, San Diego, CA).

Statistical analysis

Prism version 6.0 (GraphPad, San Diego, CA) and JMP v11.0.0 (SAS, Grégy-sur-Yerres, France) were used for statistical analysis. Unless otherwise indicated, data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Normality was assessed by d'Agostino-Pearson omnibus test. Comparisons between fatty acid profiles were assessed by multiple unpaired two tailed *t*-test, with false discovery rate set to 10%. Differences in fatty acid ratios between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's least significant difference test, or by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. Receiver-operator characteristic (ROC) curves were used to study sensitivity and specificity of SCD indices when discriminating between ALS patients and controls. Non-parametric Mann-Whitney test was used to assess differences in circulating biochemical parameters. Significant correlation between two variables was determined by non-parametric Spearman test. Multivariate regression analysis was performed using Cox proportional hazard models. The results are reported as hazard ratios with 95% confidence intervals. Hazard ratios are per change in regressor over entire range for continuous variable. Kaplan-Meier curves were used to visualize survival rates after univariate analysis by Gehan-Breslow-Wilcoxon test. Significance level was set at $p < 0.05$. Experimenters were blinded until study endpoint.

Results

Palmitoleate and oleate levels and stearoyl-CoA desaturase indices are increased in ALS patients

In a first step to identify biomarkers that could reflect metabolic changes in ALS and help predict its outcome, we performed a case-control study on the fatty acid composition of blood lipids extracted from 48 ALS patients and age- and gender-matched healthy controls (Table 1).

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of ALS patients and control subjects. ALSFRS-R, ALS functional rating scale-revised; BMI, body mass index.

ITEMS	Control	ALS
Cohort size	48	48
Gender ratio (F/M)	18/30	18/30
Age at collection (years)	54.1 [31.7–66.6]	54.9 [34.9–68.7]
Duration (days)	N/A	809 $\pm$ 75.3
ALSFRS-R (score)	N/A	29.8 $\pm$ 1.3
Site at onset (bulbar/spinal)	N/A	14/35
BMI (kg/m ²)	N/A	23.6 $\pm$ 0.6
Triglycerides (g/L)	1.24 $\pm$ 0.1	1.44 $\pm$ 0.1
Total cholesterol (g/L)	2.60 $\pm$ 0.2	2.54 $\pm$ 0.2
Free fatty acid (mM)	0.12 $\pm$ 0.0	0.27 $\pm$ 0.1 *
Leptin (ng/mL)	9.66 $\pm$ 1.5	6.11 $\pm$ 0.9 *

* $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

doi:10.1371/journal.pone.0131512.t001

Table 2. Fatty acid composition of total lipids in serum and blood cells from ALS patients and control subjects. FA, fatty acid; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

% of FA	Serum		Blood pellet		
	Control (n = 48)	ALS (n = 48)	Control (n = 48)	ALS (n = 48)	
14:0	1.27 ± 0.1	1.22 ± 0.1	0.58 ± 0.0	0.80 ± 0.1	**
16:0	27.33 ± 0.3	26.27 ± 0.3	23.54 ± 0.2	24.60 ± 0.5	*
18:0	9.78 ± 0.2	9.46 ± 0.2	15.28 ± 0.2	13.77 ± 0.3	***
20:0	0.014 ± 0.007	0.013 ± 0.003	0.052 ± 0.006	0.061 ± 0.007	
22:0	0.18 ± 0.014	0.13 ± 0.010	0.05 ± 0.008	0.06 ± 0.008	
16:1n-7	1.82 ± 0.12	1.73 ± 0.11	0.93 ± 0.07	1.18 ± 0.08	*
18:1n-9	23.97 ± 0.4	26.79 ± 0.6	19.10 ± 0.3	22.59 ± 0.5	***
20:1n-9	0.15 ± 0.013	0.20 ± 0.033	0.24 ± 0.006	0.27 ± 0.010	**
22:1n-9	0.001 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.011 ± 0.002	0.016 ± 0.003	
18:2n-6	22.47 ± 0.5	21.21 ± 0.5	16.97 ± 0.3	17.64 ± 0.4	
18:3n-6	0.26 ± 0.014	0.29 ± 0.021	0.18 ± 0.014	0.24 ± 0.021	*
20:2n-6	0.24 ± 0.007	0.25 ± 0.008	0.24 ± 0.004	0.26 ± 0.008	*
20:3n-6	1.93 ± 0.1	1.78 ± 0.1	1.87 ± 0.1	1.71 ± 0.1	
20:4n-6	7.29 ± 0.2	6.96 ± 0.3	14.21 ± 0.2	11.16 ± 0.4	**
18:3n-3	0.44 ± 0.028	0.67 ± 0.120	0.24 ± 0.015	0.42 ± 0.061	**
20:3n-3	0.007 ± 0.002	0.016 ± 0.003	0.011 ± 0.002	0.015 ± 0.003	
20:5n-3	0.92 ± 0.07	0.80 ± 0.07	0.98 ± 0.05	0.84 ± 0.07	
22:5n-3	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.02	2.14 ± 0.07	1.31 ± 0.08	***
22:6n-3	1.71 ± 0.09	1.99 ± 0.09	3.37 ± 0.13	3.05 ± 0.15	
Σ SFA	38.57 ± 0.4	37.08 ± 0.4	39.51 ± 0.2	39.24 ± 0.6	**
Σ MUFA	25.95 ± 0.5	28.72 ± 0.6	20.28 ± 0.3	24.10 ± 0.5	***
Σ PUFA	35.48 ± 0.6	34.20 ± 0.6	40.22 ± 0.3	36.66 ± 0.8	***

* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$ (multiple unpaired two tailed t -test).

doi:10.1371/journal.pone.0131512.t002

Chromatographic profiles revealed up to 18 different fatty acids that were classified into saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, according to the number of carbon-carbon double bonds in the aliphatic chain. In general, proportions of several members from each class showed significant differences between ALS patients and healthy subjects, which were more marked in blood cell pellets than in serum (Table 2). Changes in polyunsaturated fatty acids may reflect altered susceptibility to lipid peroxidation and/or the presence of an inflammatory process. Lipid peroxidation susceptibility is commonly assessed by the peroxidability index (PI), which is based on the number of unsaturations present in the fatty acid chain [25]. Inflammatory processes can be estimated by the arachidonate (20:4n-6) to eicosapentaenoate (20:5n-3) ratio (ARA/EPA index) [26, 27]. In our study, PI was 16% lower in the blood cell fraction of ALS patients as compared to controls (S1 Fig), whereas ARA/EPA index was not significantly modified (S1 Fig).

Notably, the proportion of monounsaturated fatty acids was strongly increased in ALS patients. In particular, palmitoleate and oleate levels increased significantly in blood cells, and higher oleate levels were also observed in serum (Table 2). Palmitoleate and oleate are synthesized by SCD from palmitate and stearate, so that the respective product to substrate ratios are considered as an index of SCD activity [17, 18]. SCD indices 18:1/18:0 and 16:1/16:0 appeared

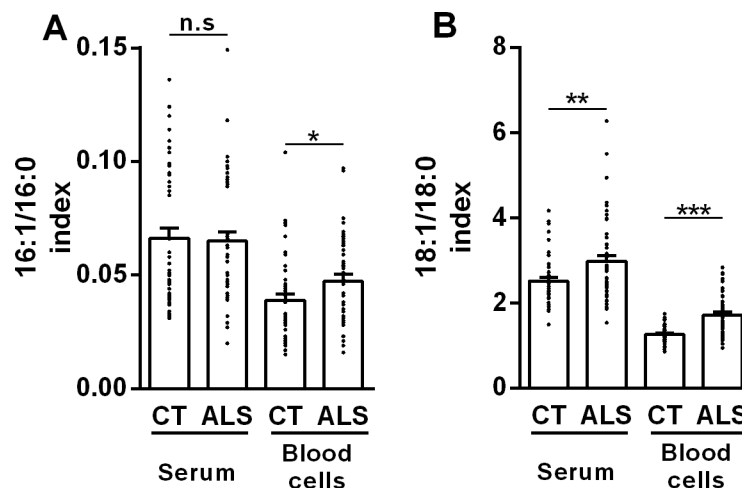


Fig 1. SCD indices are higher in ALS patients than in control subjects. (A) Palmitoleate to palmitate ratio (16:1/16:0) in serum and blood cells from ALS patients (ALS) and control subjects (CT). (B) Oleate to stearate ratio (18:1/18:0) in serum and blood cells from ALS patients (ALS) and control subjects (CT). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney test, $n = 48$).

doi:10.1371/journal.pone.0131512.g001

significantly higher in ALS blood cell pellets than in controls. Oleate to stearate ratio was also increased in patients' sera (Fig 1A and 1B).

To assess whether these changes had diagnostic value, we performed ROC analysis. Serum and blood cell pellet 18:1/18:0 ratio, as well as blood cell pellet 16:1/16:0 ratio, showed areas under the curves that were significant between ALS and control groups. Nevertheless, sensitivity and specificity scores based on these ratios were insufficient to distinguish between those individuals with the disease and those without the disease (S2 Fig).

High blood SCD index has been typically associated with conditions characterized by enhanced lipogenesis, such as obesity and insulin resistance [28]. Thus, we determined whether our ALS patients differed from healthy controls by a higher degree of dyslipidemia, as previously reported in other studies [12, 13]. Contents of triglycerides and total cholesterol in patients were comparable to those found in control subjects. Leptin levels, however, appeared significantly decreased, suggesting lower fat reserves [29]. Finally, circulating free fatty acids were more abundant in ALS patients, suggesting increased lipid breakdown by adipocytes [30] (Table 1). In all, this metabolic trait, indicative of lower adipose tissue stores, paradoxically coexisted with high SCD indices, which are rather characteristic of enhanced lipogenesis.

Blood cell 16:1/16:0 ratio and palmitoleate levels correlate with disease progression

In a second step to identify biomarkers that could help to prognosticate ALS evolution, we performed a cross-section study with 117 ALS patients, including the previous 48 ones (S1 Table). We focused on SCD indices in blood cell pellets, since differences in this lipid fraction between patients and controls were more robust. None of the SCD indices correlated with the duration of the disease from symptom onset to time of blood collection (Fig 2A and 2B), suggesting the absence of interferences due to the variability in the time of sampling. In contrast, 16:1/16:0 ratio showed a significant negative correlation with disease progression (Fig 2C and 2D), which was defined as the loss of ALSFRS-R score over a period of six months (unit loss/month) [31]. In fact, levels of palmitoleate itself were also significantly associated with the decline of

ALSFRS-R ($r = -0.1996$, $p < 0.05$). The relationship between SCD index and disease progression was also apparent when patients were divided into two subsets of low and high 16:1/16:0 ratio, based on the median of the population. ALSFRS-R declined more slowly in patients with high 16:1/16:0 ratio than in patients with low 16:1/16:0 ratio. Other measured indices, including 18:1/18:0 ratio, PI and ARA/EPA ratio, were not significantly associated with the rate of disease progression (Fig 2E and 2F, data not shown). However, both SCD indices in blood cells correlated negatively with PI, indicating that a higher proportion of monounsaturated fatty acids is associated with a lower susceptibility to lipid peroxidation (S1 Fig).

Blood cell 16:1/16:0 ratio and palmitoleate levels are independent prognostic factors for survival

The findings mentioned above prompted us to investigate whether blood cell pellet 16:1/16:0 ratio or palmitoleate could predict life expectancy. At the time of study completion (September 30th 2014), 57 out of 117 patients were alive or with unknown status, and were censored. Univariate analysis revealed that age, site of onset, BMI, disease duration and ALSFRS-R were significantly associated with survival, defined as the interval between the point of blood collection and the fatal event. Gender and ALS center did not reach significance (S2 Table). Then we performed multivariate Cox regression analysis adjusted for these covariates, except for gender and ALS center. We found that higher 16:1/16:0 ratios were significantly associated with better survival rates (HR = 0.09, 95%CI = 0.01–0.57, $p = 0.009$) (Table 3). Similar results were obtained when patients were classified as having low or high 16:1/16:0 ratio based on the median of the population (HR = 0.58, 95%CI = 0.34–0.99, $p = 0.0483$).

The association of 16:1/16:0 ratio with the survival of ALS patients ($n = 117$) was analyzed by adjusting for site of onset, age, BMI and ALSFRS-R. Survival was the interval between the point of blood collection and death. ALSFRS-R was categorized into four groups, according to Gordon et al. [32]. BMI, body mass index; ALSFRS-R, ALS functional rating scale-revised; SCD, $\Delta 9$ stearoyl-CoA desaturase.

Kaplan–Meier curves showed that patients with a high 16:1/16:0 ratio, based on the median of the population, had a prolonged life expectancy of almost 11 months (median survival of 23.6 months, $p = 0.019$), as compared to patients with low 16:1/16:0 ratio (median survival of 13.1 months) (Fig 2G). Higher levels of palmitoleate itself were also significantly associated with extended life span (HR = 0.11, 95%CI = 0.015–0.64, $p = 0.0141$). The 18:1/18:0 ratio was not associated with survival (Fig 2H, and data not shown). In all, our results suggest that 16:1/16:0 ratio is a new and robust prognostic factor, independent from BMI, for survival of ALS patients.

BMI and leptin levels are not independent prognostic factors for survival

High SCD index is often associated with metabolic conditions characterized by high BMI. Therefore, we asked whether other markers of global adiposity, such as BMI and leptin concentration [29], measured at the same time as the 16:1/16:0 ratio, could predict survival. Patients with a 16:1/16:0 ratio above the median of the ALS population had significantly higher leptin levels and BMI than patients with lower 16:1/16:0 ratios (Fig 3A and 3B). No differences in BMI or leptin concentrations were observed between patients when considering the 18:1/18:0 ratio (Fig 3C and 3D). Despite the relationship between 16:1/16:0 ratio and such fat tissue proxies, BMI or circulating leptin content did not correlate with ALSFRS-R decline, nor prognosticated survival based on multivariate analysis (Fig 3E–3H). Only when using univariate analysis, BMI was able to predict survival (HR = 0.12, 95%CI = 0.02–0.78, $p = 0.025$).

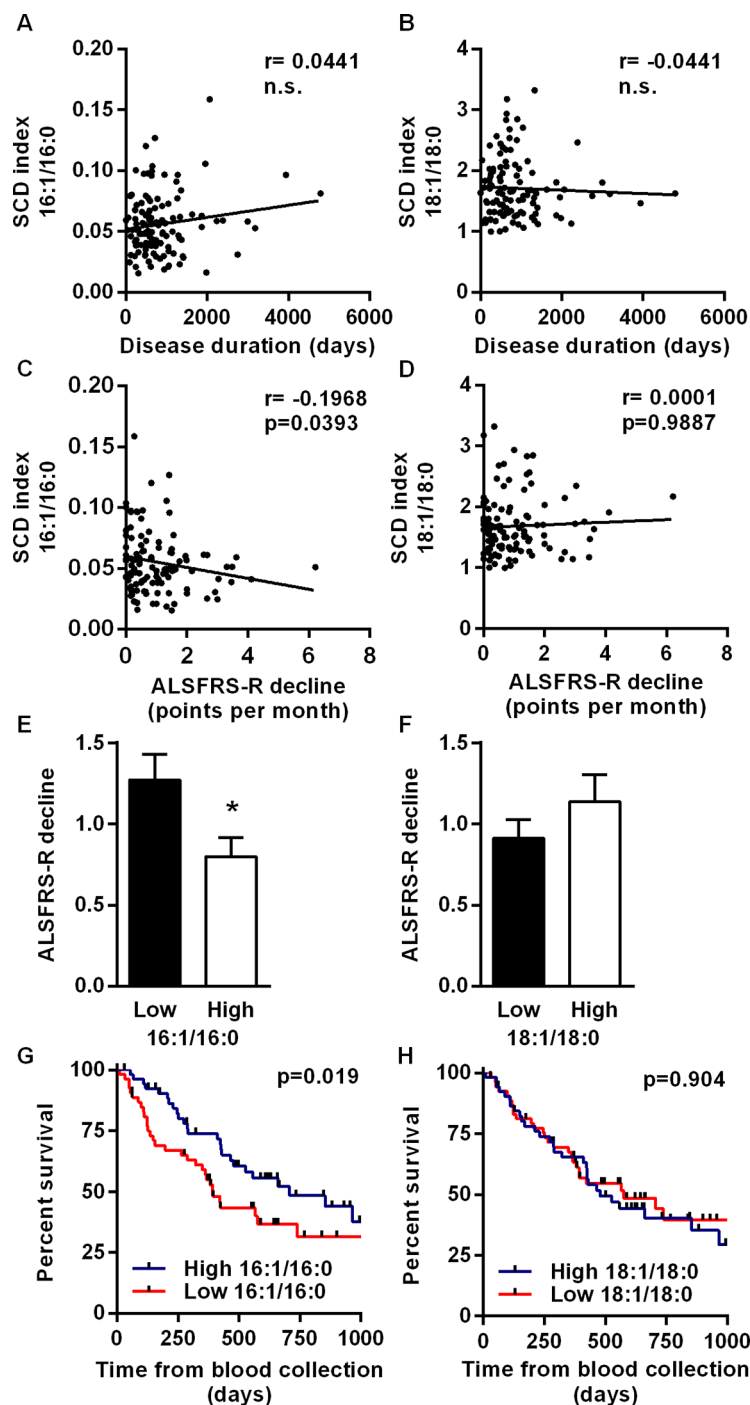


Fig 2. Blood cell 16:1/16:0 ratio correlates with disease progression and affects survival of ALS patients. Correlation between 16:1/16:0 and 18:0/18:1 ratios and disease duration (A, E) at blood collection or ALSFRS-R slope (B, F), determined as the decline of the score over a period of six months starting at the point of blood collection. Correlation coefficients (r) and p -values are indicated. n.s., non-significant p -value (Spearman test, $n = 111$). Based on the median ratio of the population, ALSFRS-R decline is shown in patients with low or high 16:1/16:0 ratio (C), and in patients with low or high 18:1/18:0 ratio (G). $*p < 0.05$ (Mann-Whitney test). (D, H) Kaplan-Meier curves of survival in the subgroups of patients as above. Survival was the interval between the point of blood collection and death. P -values are indicated (Gehan-Breslow-Wilcoxon test, $n = 117$).

doi:10.1371/journal.pone.0131512.g002

Table 3. Analysis of the survival of ALS patients using multivariate Cox proportional hazards model.

Variable	Items	Risk ratio	Lower 95%	Upper 95%	Prob>Chisq
Site of onset	Spinal	0.442	0.25	0.80	0.0076
	Bulbar	2.264	1.25	4.06	
Age	-	4.63	1.20	19.5	0.0257
Disease duration	-	0.28	0.03	1.93	0.2132
BMI	-	0.15	0.01	1.22	0.077
ALSFRS-R	0–35	1 (reference)	-	-	-
	36–39	0.529	0.26	0.99	0.0478
	40–42	0.240	0.04	0.83	0.0206
	>42	0.247	0.04	0.86	0.0257
SCD 16:1/16:0	-	0.09	0.01	0.57	0.0090

doi:10.1371/journal.pone.0131512.t003

Discussion

During the last decade, many efforts have been dedicated to the understanding of the remarkable alterations affecting lipid metabolism in ALS [6, 12]. Several systemic modifications, otherwise considered as important cardiovascular risk factors, such as high LDL/HDL cholesterol ratio [12, 15], or high levels of triglycerides and total cholesterol [13, 14], were shown to be associated with longer life span. Conversely, low LDL/HDL cholesterol ratio and malnutrition correlated with worsening of the respiratory function and shorter survival [16, 33, 34]. None of these metabolic readouts, however, reached statistical significance in multivariate analysis when BMI was included as a confounder variable. High BMI was indeed the only metabolic proxy that was associated with slower disease progression and longer life expectancy in multivariate models [13, 14, 33–35]. In this study, we report that blood lipids from ALS patients have a higher proportion of monounsaturated fatty acids and a lower proportion of polyunsaturated fatty acids. Most importantly, we show that the ratio of palmitoleate to palmitate (16:1/16:0) in the composition of lipids extracted from blood cells can predict life expectancy of ALS patients at the time of blood collection better than other previously proposed metabolic biomarkers, independently of age, site of onset, disease status and, most importantly, BMI. Patients with higher 16:1/16:0 ratio had lower lipid peroxidability and better survival rates, and their disease progressed slower, at least for a period of six months.

Several of the significant results we obtained with the 16:1/16:0 ratio were paralleled by palmitoleate in its own. However, neither 18:1/18:0 ratio nor oleate were able to prognosticate disease outcome. The abundance of oleate in modern diets [36] could interfere with the estimation of its endogenous synthesis and therefore lower the value of this fatty acid as a reliable predictor. In contrast, palmitoleate is a minor fatty acid present in the diet, and hence the 16:1/16:0 ratio is rather the reflect of its endogenous synthesis, which likely allowed a more accurate, independent follow-up of 16:1/16:0 ratio alterations in relation to the course of the disease.

In our multivariate model, the 16:1/16:0 ratio prognosticated life expectancy better than BMI. Notably, BMI failed to predict life span in this model. In line with these findings, the circulating levels of leptin, which represents a more direct measure of body adiposity [29], did not show any association with disease progression or survival. It is tempting to speculate that several uncontrolled parameters, such as inherited susceptibility, lifestyle and nutritional habits, would have shaped BMI, at least in our cohort of patients, long before disease in a way that biased its capacity to predict survival. In contrast to BMI, the 16:1/16:0 ratio reflects the

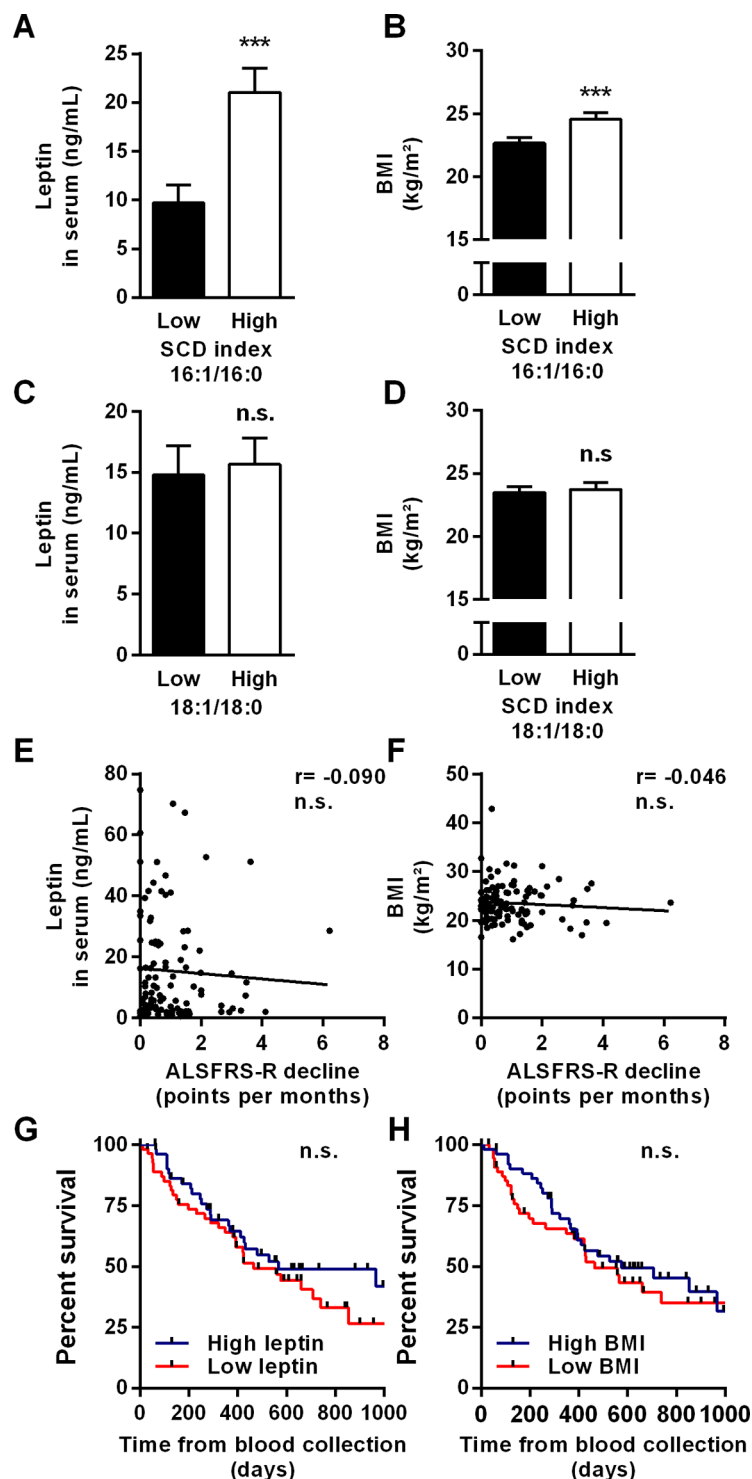


Fig 3. Blood cell 16:1/16:0 ratio is associated with leptin levels and BMI. Circulating amounts of leptin (A, C) and BMI (B, D) in patients with low or high 16:1/16:0 ratio, and in patients with low or high 18:1/18:0 ratio (Mann-Whitney test, $n = 117$). (E, F) Correlation between leptin levels (A) or BMI (C) and ALSFRS-R slope, determined as the decline of the score over a period of six months starting at the point of blood collection. Correlation coefficients (r) are indicated. n.s., non-significant p -value (Spearman test, $n = 111$). (G, H) Kaplan-Meier curves of survival in patients with low or high leptin levels, and in patients with low or high BMI, according to the median values of the population. Survival was the interval between the point of blood collection and death. n.s., non-significant p -value (Gehan-Breslow-Wilcoxon test, $n = 117$).

doi:10.1371/journal.pone.0131512.g003

relatively recent incorporation of these fatty acids into lipid species and therefore it may represent better the ongoing metabolism at the time of blood collection. In addition, the 16:1/16:0 ratio measured in blood cell lipids mainly reflects the fatty acid composition of structural membrane phospholipids, which is different from that of energetic triglycerides accumulated in fat pads and largely contributing to establish BMI. These specificities may have contributed to the robustness of the 16:1/16:0 ratio in predicting life expectancy.

High SCD indices have been usually associated with obesity and related metabolic disorders including diabetes [17]. However, our ALS patients were not obese, as deduced from their BMI scores and circulating leptin concentrations, according to commonly accepted criteria [14]. Aside from obesity, SCD activity has also been shown to be stimulated in conditions with atypical energetic requirements, such as anorexia and intense physical training [37–41]. These conditions are often accompanied by recurrent episodes of energy shortage. Such a situation can be experimentally reproduced in rats submitted to relatively long periods of food restriction and subsequent refeeding. SCD expression after refeeding was shown to be increased in the liver of these animals as a means to rapidly store highly energetic lipids for being used later [42]. ALS patients frequently present with hypermetabolism of unknown origin [8, 10]. Therefore, high SCD activity in these patients could be interpreted as a physiological response to the energetic demand imposed by the hypermetabolic trait [8–10]. In this scenario, high lipogenic SCD indices, as those observed in our cohort of patients, could coexist with elevated concentrations of circulating free fatty acids deployed to cope with the energetic requirements. In this respect, our previous studies demonstrated that feeding hypermetabolic mutant SOD1 mice, a well-known animal model for ALS, with a highly caloric fat-enriched diet not only restored lost fat pads but also preserved motor function, protected motor neurons and extended life expectancy [6, 43]. More recent studies performed on another related ALS transgenic mouse line also showed the neuroprotective benefit of a diet enriched in monounsaturated fatty acids, including palmitoleate and oleate [44]. The effects of diets with an enriched content in lipids or carbohydrates have also been evaluated in humans. These yet pilot studies reported benefit in terms of body mass stabilization and lower incidence of adverse events. Due to small cohorts of patients, no conclusions could be formally drawn about the potential survival effects of such highly caloric diets. Nevertheless, they provided proof-of-concept evidence that manipulating nutritional/energetic requirements can be beneficial to ALS patients [45, 46].

There are no well-established biological markers of prognostic value for ALS. Here we built on the *metabolic pathology* of the disease to propose the ratio of palmitoleate to palmitate in the composition of lipids as an independent factor to predict life expectancy. This parameter could be used in clinical practice and in the design of clinical trials.

Supporting Information

S1 Fig. Peroxidability index and ARA/EPA index.

(PPTX)

S2 Fig. Receiver-operator characteristic analysis of blood SCD indices.

(PPTX)

S1 Table. Demographic and clinical characteristics of ALS patients in the prognosis study.

(XLSX)

S2 Table. Analysis of the survival of ALS patients using univariate Cox proportional hazards model.

(XLSX)

Acknowledgments

We thank the patients and their families. We are also indebted to Dr. Françoise Bindler for her aid with gas chromatography.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AH PFP JLGDA JPL. Performed the experiments: TL MB LR. Analyzed the data: AH HB JLGDA. Contributed reagents/materials/analysis tools: MCF PC AEL GR MB CG PFP EM CRA CT JLGDA JPL. Wrote the paper: AH HB MCF PC AEL LR GR TL MB CG PFP EM CRA CT JLGDA JPL.

References

1. Manjaly ZR, Scott KM, Abhinav K, Wijesekera L, Ganesalingam J, Goldstein LH, et al. The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*. 2010; 11(5): 439–42. doi: [10.3109/17482961003610853](https://doi.org/10.3109/17482961003610853) PMID: [20225930](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20225930/).
2. Pupillo E, Messina P, Logroscino G, Beghi E, Group S. Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Annals of neurology*. 2014; 75(2):287–97. doi: [10.1002/ana.24096](https://doi.org/10.1002/ana.24096) PMID: [24382602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24382602/).
3. Turner MR, Barnwell J, Al-Chalabi A, Eisen A. Young-onset amyotrophic lateral sclerosis: historical and other observations. *Brain: a journal of neurology*. 2012; 135(Pt 9):2883–91. doi: [10.1093/brain/aws144](https://doi.org/10.1093/brain/aws144) PMID: [22661746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22661746/).
4. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. 2008; 119(3):497–503. doi: [10.1016/j.clinph.2007.09.143](https://doi.org/10.1016/j.clinph.2007.09.143) PMID: [18164242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18164242/).
5. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL, World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron D. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders: official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*. 2000; 1(5):293–9. PMID: [11464847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11464847/).
6. Schmitt F, Hussain G, Dupuis L, Loeffler JP, Henriques A. A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014; 8:25. doi: [10.3389/fncel.2014.00025](https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00025) PMID: [24600344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24600344/); PubMed Central PMCID: [PMC3929843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3929843/).
7. Dupuis L, Pradat PF, Ludolph AC, Loeffler JP. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2011; 10(1):75–82. doi: [10.1016/S1474-4422\(10\)70224-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70224-6) PMID: [21035400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21035400/).
8. Bouteloup C, Desport JC, Clavelou P, Guy N, Derumeaux-Burel H, Ferrier A, et al. Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *Journal of neurology*. 2009; 256(8):1236–42. doi: [10.1007/s00415-009-5100-z](https://doi.org/10.1007/s00415-009-5100-z) PMID: [19306035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19306035/).
9. Desport JC, Torrey F, Lacoste M, Preux PM, Couratier P. Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neuro-degenerative diseases*. 2005; 2(3–4):202–7. doi: [10.1159/000089626](https://doi.org/10.1159/000089626) PMID: [16909026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16909026/).
10. Desport JC, Preux PM, Magy L, Boirie Y, Vallat JM, Beaufre B, et al. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2001; 74(3):328–34. PMID: [11522556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11522556/).
11. Funalot B, Desport JC, Sturtz F, Camu W, Couratier P. High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*. 2009; 10(2):113–7. doi: [10.1080/17482960802295192](https://doi.org/10.1080/17482960802295192) PMID: [18792852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18792852/).
12. Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, et al. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008; 70(13):1004–9. doi: [10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27](https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27) PMID: [18199832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18199832/).
13. Dorst J, Kuhnlein P, Hendrich C, Kassubek J, Sperfeld AD, Ludolph AC. Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology*. 2011; 258(4):613–7. doi: [10.1007/s00415-010-5805-z](https://doi.org/10.1007/s00415-010-5805-z) PMID: [21128082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21128082/).
14. Paganoni S, Deng J, Jaffa M, Cudkowicz ME, Wills AM. Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2011; 44(1):20–4. doi: [10.1002/mus.22114](https://doi.org/10.1002/mus.22114) PMID: [21607987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21607987/).

15. Sutedja NA, van der Schouw YT, Fischer K, Sizoo EM, Huisman MH, Veldink JH, et al. Beneficial vascular risk profile is associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2011; 82(6):638–42. doi: [10.1136/jnnp.2010.236752](https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.236752) PMID: [21471184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21471184/).
16. Chio A, Calvo A, Ilardi A, Cavallo E, Moglia C, Mutani R, et al. Lower serum lipid levels are related to respiratory impairment in patients with ALS. *Neurology*. 2009; 73(20):1681–5. doi: [10.1212/WNL.0b013e3181c1df1e](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c1df1e) PMID: [19917991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19917991/).
17. Vinknes KJ, Elshorbagy AK, Nurk E, Dreven CA, Gjesdal CG, Tell GS, et al. Plasma stearoyl-CoA desaturase indices: association with lifestyle, diet, and body composition. *Obesity*. 2013; 21(3): E294–302. doi: [10.1002/oby.20011](https://doi.org/10.1002/oby.20011) PMID: [23404690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23404690/).
18. Matthan NR, Ooi EM, Van Horn L, Neuhauser ML, Woodman R, Lichtenstein AH. Plasma phospholipid fatty acid biomarkers of dietary fat quality and endogenous metabolism predict coronary heart disease risk: a nested case-control study within the Women's Health Initiative observational study. *Journal of the American Heart Association*. 2014; 3(4). doi: [10.1161/JAHA.113.000764](https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000764) PMID: [25122663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25122663/).
19. Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*. 2013; 79(3):416–38. doi: [10.1016/j.neuron.2013.07.033](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.033) PMID: [23931993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23931993/).
20. van den Boom MA, Wassink MG, Westerman J, de Fouw NJ, Roelofsens B, Op den Kamp JA, et al. In vivo turnover of phospholipids in rabbit erythrocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 1994; 1215(3): 314–20. PMID: [7811717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7811717/).
21. Al-Taani O, Stephenson JA, Spencer L, Pollard C, West AL, Calder PC, et al. Changes in plasma and erythrocyte omega-6 and omega-3 fatty acids in response to intravenous supply of omega-3 fatty acids in patients with hepatic colorectal metastases. *Lipids in health and disease*. 2013; 12:64. doi: [10.1186/1476-511X-12-64](https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-64) PMID: [23648075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23648075/); PubMed Central PMCID: [PMC3659039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3659039/).
22. Wood KE, Lau A, Mantzioris E, Gibson RA, Ramsden CE, Muhlhausler BS. A low omega-6 polyunsaturated fatty acid (n-6 PUFA) diet increases omega-3 (n-3) long chain PUFA status in plasma phospholipids in humans. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2014; 90(4):133–8. doi: [10.1016/j.plefa.2013.12.010](https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.12.010) PMID: [24456663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24456663/).
23. Hussain G, Schmitt F, Loeffler JP, de Aguilar JL. Fattening the brain: a brief of recent research. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7:144. doi: [10.3389/fncel.2013.00144](https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00144) PMID: [24058332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24058332/); PubMed Central PMCID: [PMC3766822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3766822/).
24. Hussain G, Schmitt F, Henriques A, Lequeu T, Rene F, Bindler F, et al. Systemic down-regulation of delta-9 desaturase promotes muscle oxidative metabolism and accelerates muscle function recovery following nerve injury. *PloS one*. 2013; 8(6):e64525. doi: [10.1371/journal.pone.0064525](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064525) PMID: [23785402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23785402/); PubMed Central PMCID: [PMC3681796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3681796/).
25. Yun JM, Surh J. Fatty Acid Composition as a Predictor for the Oxidation Stability of Korean Vegetable Oils with or without Induced Oxidative Stress. *Preventive nutrition and food science*. 2012; 17(2): 158–65. doi: [10.3746/pnf.2012.17.2.158](https://doi.org/10.3746/pnf.2012.17.2.158) PMID: [24471078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24471078/); PubMed Central PMCID: [PMC3866755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3866755/).
26. de Mello VD, Erkkila AT, Schwab US, Pulkkinen L, Kolehmainen M, Atalay M, et al. The effect of fatty or lean fish intake on inflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart disease. *European journal of nutrition*. 2009; 48(8):447–55. doi: [10.1007/s00394-009-0033-y](https://doi.org/10.1007/s00394-009-0033-y) PMID: [19506932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19506932/).
27. Friesen RW, Innis SM. Dietary arachidonic acid to EPA and DHA balance is increased among Canadian pregnant women with low fish intake. *The Journal of nutrition*. 2009; 139(12):2344–50. doi: [10.3945/jn.109.112565](https://doi.org/10.3945/jn.109.112565) PMID: [19864401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19864401/).
28. Sampath H, Ntambi JM. The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011; 1243:47–53. doi: [10.1111/j.1749-6632.2011.06303.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06303.x) PMID: [22211892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22211892/).
29. Falcao-Pires I, Castro-Chaves P, Miranda-Silva D, Lourenco AP, Leite-Moreira AF. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines. *Drug discovery today*. 2012; 17(15–16):880–9. doi: [10.1016/j.drudis.2012.04.007](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.04.007) PMID: [22561894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22561894/).
30. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual review of nutrition*. 2007; 27:79–101. doi: [10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734](https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734) PMID: [17313320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17313320/); PubMed Central PMCID: [PMC2885771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2885771/).
31. Lindauer E, Dupuis L, Muller HP, Neumann H, Ludolph AC, Kassubek J. Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PloS one*. 2013; 8(6):e67783. doi: [10.1371/journal.pone.0067783](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067783) PMID: [23826340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23826340/); PubMed Central PMCID: [PMC3694869](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3694869/).
32. Gordon PH, Salachas F, Lacomblez L, Le Forestier N, Pradat PF, Bruneteau G, et al. Predicting survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis at presentation: a 15-year experience. *Neuro-degenerative diseases*. 2013; 12(2):81–90. doi: [10.1159/000341316](https://doi.org/10.1159/000341316) PMID: [22922503](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22922503/).

33. Jawaid A, Murthy SB, Wilson AM, Qureshi SU, Amro MJ, Wheaton M, et al. A decrease in body mass index is associated with faster progression of motor symptoms and shorter survival in ALS. *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*. 2010; 11(6):542–8. doi: [10.3109/17482968.2010.482592](https://doi.org/10.3109/17482968.2010.482592) PMID: [20500116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20500116/).
34. Marin B, Desport JC, Kajeu P, Jesus P, Nicolaud B, Nicol M, et al. Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2011; 82(6):628–34. doi: [10.1136/jnnp.2010.211474](https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.211474) PMID: [21097551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21097551/).
35. Reich-Slotky R, Andrews J, Cheng B, Buchsbaum R, Levy D, Kaufmann P, et al. Body mass index (BMI) as predictor of ALSFRS-R score decline in ALS patients. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*. 2013; 14(3):212–6. doi: [10.3109/21678421.2013.770028](https://doi.org/10.3109/21678421.2013.770028) PMID: [23452274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23452274/).
36. Vannice G, Rasmussen H. Position of the academy of nutrition and dietetics: dietary fatty acids for healthy adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2014; 114(1):136–53. doi: [10.1016/j.jand.2013.11.001](https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.11.001) PMID: [24342605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24342605/).
37. Arsic A, Vucic V, Tepsic J, Mazic S, Djelic M, Glibetic M. Altered plasma and erythrocyte phospholipid fatty acid profile in elite female water polo and football players. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2012; 37(1):40–7. doi: [10.1139/h11-125](https://doi.org/10.1139/h11-125) PMID: [22165902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22165902/).
38. Tepsic J, Vucic V, Arsic A, Blazencic-Mladenovic V, Mazic S, Glibetic M. Plasma and erythrocyte phospholipid fatty acid profile in professional basketball and football players. *European journal of applied physiology*. 2009; 107(3):359–65. doi: [10.1007/s00421-009-1131-5](https://doi.org/10.1007/s00421-009-1131-5) PMID: [19633987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19633987/).
39. Zak A, Vecka M, Tvrcicka E, Hruby M, Novak F, Papezova H, et al. Composition of plasma fatty acids and non-cholesterol sterols in anorexia nervosa. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2005; 54(4):443–51. PMID: [15588144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15588144/).
40. Holman RT, Adams CE, Nelson RA, Grater SJ, Jaskiewicz JA, Johnson SB, et al. Patients with anorexia nervosa demonstrate deficiencies of selected essential fatty acids, compensatory changes in nonessential fatty acids and decreased fluidity of plasma lipids. *The Journal of nutrition*. 1995; 125(4):901–7. PMID: [7722693](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7722693/).
41. Dube JJ, Amati F, Toledo FG, Stefanovic-Racic M, Rossi A, Coen P, et al. Effects of weight loss and exercise on insulin resistance, and intramyocellular triacylglycerol, diacylglycerol and ceramide. *Diabetologia*. 2011; 54(5):1147–56. doi: [10.1007/s00125-011-2065-0](https://doi.org/10.1007/s00125-011-2065-0) PMID: [21327867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21327867/); PubMed Central PMCID: [PMC3804898](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3804898/).
42. Turyn J, Stojek M, Swierczynski J. Up-regulation of stearyl-CoA desaturase 1 and elongase 6 genes expression in rat lipogenic tissues by chronic food restriction and chronic food restriction/refeeding. *Molecular and cellular biochemistry*. 2010; 345(1–2):181–8. doi: [10.1007/s11010-010-0571-x](https://doi.org/10.1007/s11010-010-0571-x) PMID: [20721682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20721682/).
43. Dupuis L, Oudart H, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(30):11159–64. doi: [10.1073/pnas.0402026101](https://doi.org/10.1073/pnas.0402026101) PMID: [15263088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15263088/); PubMed Central PMCID: [PMC503756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC503756/).
44. Olivan S, Martinez-Beamonte R, Calvo AC, Surra JC, Manzano R, Arnal C, et al. Extra virgin olive oil intake delays the development of amyotrophic lateral sclerosis associated with reduced reticulum stress and autophagy in muscle of SOD1 G93A mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014; 25(8):885–92. doi: [10.1016/j.jnutbio.2014.04.005](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.04.005) PMID: [24917047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24917047/).
45. Wills AM, Hubbard J, Macklin EA, Glass J, Tandan R, Simpson EP, et al. Hypercaloric enteral nutrition in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet*. 2014; 383(9934):2065–72. doi: [10.1016/S0140-6736\(14\)60222-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60222-1) PMID: [24582471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24582471/).
46. Dorst J, Cypionka J, Ludolph AC. High-caloric food supplements in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: A prospective interventional study. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*. 2013; 14(7–8):533–6. doi: [10.3109/21678421.2013.823999](https://doi.org/10.3109/21678421.2013.823999) PMID: [23944684](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23944684/).

CHAPITRE II

Modulation de l'activité SCD : étude pré-clinique dans un modèle de SLA

I. Introduction

Les données présentées dans le chapitre précédent nous ont montré qu'il existe une corrélation positive entre les taux de MUFA et l'état des patients atteints de SLA. D'ailleurs, chez l'animal, nous savons que l'administration d'un régime riche en MUFA, ce qui revient à augmenter le produit de l'activité SCD, permet d'améliorer le phénotype des souris mSOD1 (données non publiées). Mais de façon paradoxale, il a également été montré, dans un modèle de dénervation d'origine lésionnelle, qu'une diminution de l'activité SCD est bénéfique et permet une stimulation de la récupération de l'activité motrice après lésion. En effet, chez des souris ayant subi une lésion transitoire du nerf sciatique et ayant reçu, par voie orale, un inhibiteur de l'activité enzymatique SCD, la récupération de la fonction motrice était meilleure. Les animaux traités à l'inhibiteur avaient récupéré une force musculaire plus rapidement et cela était accompagné d'une augmentation de l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif (Hussain et al., 2013).

Compte-tenu de l'ensemble de ces informations, nous pouvons nous demander si une modulation de l'activité SCD aurait un effet dans un modèle de SLA. D'un point de vue pharmacologique, il n'existe aucune drogue qui est capable de stimuler cette activité de manière spécifique. Ainsi, en accord avec les données obtenues à partir des travaux sur le modèle de dénervation, nous avons opté pour tester les effets d'un inhibiteur de l'activité SCD dans le modèle mSOD1^{G86R}.

II. Matériel et méthode

1. Animaux et traitement

Des souris FVB/N mâles sauvages et des souris FVB/N mâles surexprimant la SOD1 murine mutée en position G86R ont été maintenues dans notre animalerie à une température de 23°C et selon un cycle jour/nuit de 12h. Les animaux avaient accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Les croquettes A04 standards ont été utilisées. Les souris utilisées avaient environ 60 jours d'âge et les congénères sauvages issus des mêmes portées ont été utilisés comme contrôles.

Pour induire la déficience en activité SCD, les souris ont été nourries avec des croquettes A04 contenant du 3-(5-méthyl-[1,3,4]thiadiazol-2-yl)-6-[4-(2-trifluorométhyl-phénoxy)-piperidin-1-yl]-pyridazine, autrement appelé MF-438 (Prestwick Chemical, Illkirch, France), qui est un inhibiteur de l'activité SCD (Léger et al., 2010). Les croquettes ont été préparées de façon à délivrer une dose de MF-438 de 10mg/kg, 5mg/kg ou 1mg/kg (Safe, Augy, France). Ces valeurs ont été calculées sur la base d'une consommation journalière de 4g et d'un poids moyen de 25g par animal (comité d'éthique de l'Université de Strasbourg N° AL/01/20/09/12 et AL/15/44/12/12).

2. Suivi fonctionnel des animaux

Les animaux ont été suivis quotidiennement. Une mesure du poids a été réalisée et la force musculaire a été évaluée à l'aide du test du Grip Strength Test (Bioseb, Chaville, France). Trois essais successifs ont été réalisés pour chaque animal et la valeur retenue correspondaient à la moyenne des trois valeurs. La force a été normalisée par le poids de l'animal. Le réflexe d'extension des pattes postérieures a également été évalué en maintenant les souris brièvement par la queue. L'aspect physique global des animaux a aussi été surveillé jour après jour.

3. Collecte des échantillons

Après anesthésie profonde à l'aide de pentobarbital sodique, le sang a été collecté et les souris ont été perfusées par voie intracardiaque avec du PBS froid. Le foie, les muscles gastrocnémiens et la moelle épinière ont été rapidement prélevés puis congelés dans l'azote liquide. Les muscles tibialis ont été prélevés et congelés dans un bain d'isopentane refroidi à l'azote liquide, puis incorporés dans un milieu de cryoprotection (OCT, TissueTek) pour l'histologie. Le sang total a été centrifugé pendant 4min, à 4°C et 4000g, puis le sérum a été récupéré et congelé. Tous les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

4. Extraction des lipides totaux

Les lipides totaux ont été extraits selon la méthode de Bligh et Dyer. Brièvement, le foie, les muscles et la moelle épinière ont été broyés au TissueLyser pendant deux cycles de 3min à 30Hz à l'aide de billes métalliques dans des tubes contenant 1ml de tampon RIPA. Après une centrifugation de 10min, à 4°C et 20000g, un volume de surnageant contenant 2mg de protéines, selon un dosage protéique BCA, a été prélevé et transféré dans de nouveaux tubes et mélangés à 2ml de chloroforme/méthanol (v/v ; ½). Pour le sang, un volume de 250µl a été utilisé. Les échantillons ont été incubés 1h, à 4°C et à l'obscurité. Après ajout de chloroforme et KCl, les échantillons ont été centrifugés 5min à 2500g et 15°C. La phase inférieure contenant les lipides a été récupérée à l'aide de pipettes Pasteur en verre et transférée dans des tubes en verre. Ces lipides totaux ont ensuite été transméthylés à l'aide de méthanol et d'hydroxyde de potassium puis collectés dans de l'heptane. Les esters méthyliques d'acides gras (FAMES) ainsi formés ont été stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

5. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse a été réalisée à partir de 1µl de FAMES et à l'aide du chromatographe Varian 3400 CX composé d'une colonne capillaire siliciée de 100m x 0.25mm x 0.20µm. Le gradient de température du four variait de 80 à 220°C à une vitesse de 4°C/min. Le gaz vecteur utilisé était l'hélium. La température du détecteur à ionisation de flamme était de 270°C. Les pics ont été déterminés à l'aide de leur temps de rétention et identifiés par comparaison avec ceux obtenus pour un mélange standard de FAMES (Supelco PUFA-2, Sigma-Aldrich, France). Les données ont été exprimées en pourcentage relatif.

6. RT-qPCR

Les ARN totaux ont été préparés selon les protocoles standards. Rapidement, chaque échantillon congelé a été placé dans un tube contenant une bille métallique. Sur glace, 1ml de Trizol (Invitrogen, Groningen, Pays-Bas) a été ajouté et les tissus ont été broyés au

TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) pendant 2 cycles de 3min à 30Hz. Les ARN ont ensuite été extraits à l'aide des chloroforme, isopropanol et éthanol et stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Un µg d'ARN total a été utilisé pour la synthèse de l'ADN complémentaire à l'aide de la transcriptase inverse Iscript (BioRad, Marnes la Coquette, France). L'expression des gènes a été mesurée à l'aide du réactif SYBR Green (2x SYBR Green Supermix, BioRad) en suivant les instructions du fournisseur sur le thermocycleur. Les PCR ont été réalisées dans des conditions optimales : 95°C pendant 3min pour la dénaturation, suivie de 40 cycles de 10s à 95°C et 30s à 60°C. Les primers (Eurogentec, Seraing, Belgique) utilisés sont les suivants : Ribosomal RNA 18S (18S) : forward 5'-cgtctgccctatcaactttcg-3', reverse 5'-ttccttgatgtgtagccg-3' ; RNA Polymerase II (Pol II) forward 5'-aatccgcatcatgaacagt-3', reverse 5'-tcatccattttatccaccacc-3' ; TBP : forward 5'-ccaatgactcctatgacccta-3', reverse 5'-cagccaagattcacggtagat-3' ; Stearoyl-CoEnzyme A Desaturase 1 (SCD1) : forward 5'-cctacgacaagaacattcaatcc-3', reverse 5'-cgtctcaagttctttaatcct-3' ; Fatty Acid Translocase (FAT/CD36) : forward 5'-ttgtacctatactgtggctaaatgaga-3', reverse 5'-cttggttttgaacatttctgctt-3', Carnitine PalmitoylTransferase 1a (CPT1a) forward 5'-tctcctccttcatcagtg-3', reverse 5'-gctgtcaaagataccgtgagc-3', Carnitine PalmitoylTransferase 1 b (CPT1b) forward 5'-ggctccagggttcagaaagt-3', reverse 5'-tgctttacatcgtctcaa-3', Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ , Coactivator 1- α (PGC1 α) forward 5'-gtaaatcacacggcgctctt-3', reverse 5'-gaaagggccaaacagagaga-3', Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoenzyme 4 (PDK4) forward 5'-cttctgggctcttctcatgg-3', reverse 5'-gaacactccttcggtgcag-3'. La quantification relative a été effectuée en calculant le ratio entre le nombre de cycles dans la phase logarithmique du gène d'intérêt et celui des gènes de référence utilisés.

7. Histologie du muscle

Un marquage histochimique de la succinate déhydrogénase (SDH) a été réalisé pour distinguer les fibres oxydatives et glycolytiques. Des coupes transversales de 14µm d'épaisseur ont été obtenues à partir du muscle tibialis, grâce au cryostat, à -30°C (Leica, Nanterre, France). Les coupes ont été fixées à l'acétone pendant 15min puis séchées et incubées 30min à 37°C dans une solution contenant du succinate sodique, du nitrobleu tetrazolium et du methosulfate de phenazine. Après rinçage, les coupes ont été montées

dans un milieu aqueux (Polyaquamount, PolySciences Inc, USA). Des photographies ont été prises à l'aide d'un microscope au grossissement x20 (Nikon, Champigny sur Marne, France). Les comptages de fibres ont été réalisés à l'aide du logiciel ImageJ.

8. Analyse statistique

Les données sont exprimées par la moyenne $\pm$ sem. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA). Des t-test non appariés, des ANOVA à une voie ou des courbes Kaplan-Meier ont été utilisés. Une p-valeur inférieure à 0.05 a été considérée comme significative.

III. Résultats

1. Le MF-438 est biologiquement actif à toutes les doses

Avant de tester les effets d'une inhibition de l'activité SCD sur un modèle de SLA, nous avons déterminé la dose de notre inhibiteur à utiliser en traitant des souris sauvages avec différentes doses. Le traitement a été administré sur une période d'une trentaine de jours via des croquettes A04 contenant le MF-438 à 3 doses différentes : 1mg/kg, 5mg/kg et 10mg/kg. Afin de vérifier si la molécule était biologiquement active, nous avons mesuré deux paramètres qui témoignent du bon fonctionnement de cette molécule selon Léger et collaborateurs : l'alopecie et la sécheresse oculaire. Ces deux paramètres sont réversibles dès lors que le traitement est stoppé (Léger et al., 2010). Les résultats indiquent que ces deux paramètres sont apparus progressivement dans les trois groupes traités, après 10 jours de traitement (Figures 1A et 1B).

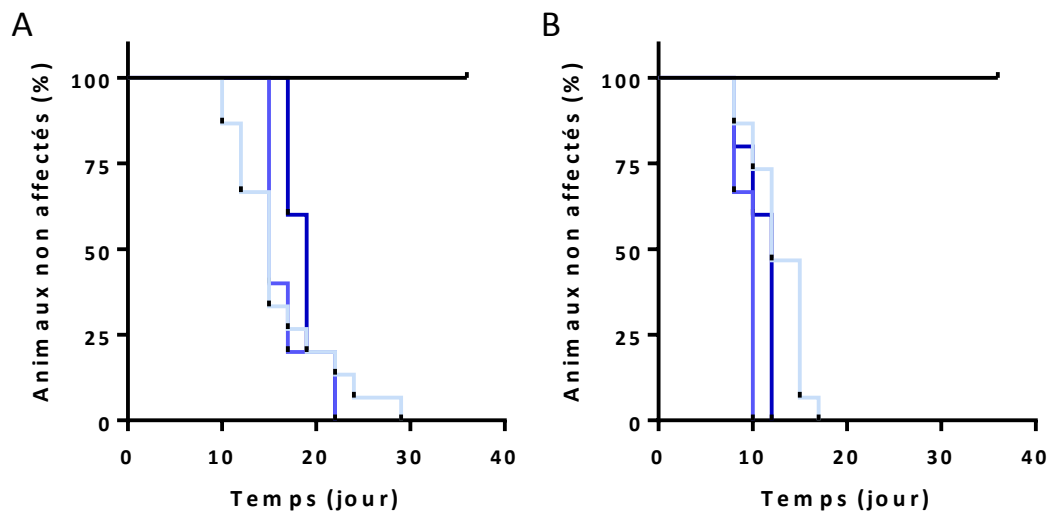


Figure 1. Effet biologique du traitement MF-438 sur le phénotype des souris WT Alopecie (A) et sécheresse oculaire (B) chez les animaux WT pour les 3 doses de MF-438 (noir : CT, bleu clair : 1mg/kg, bleu médian : 5mg/kg et bleu marine : 10mg/kg), n=5-15.

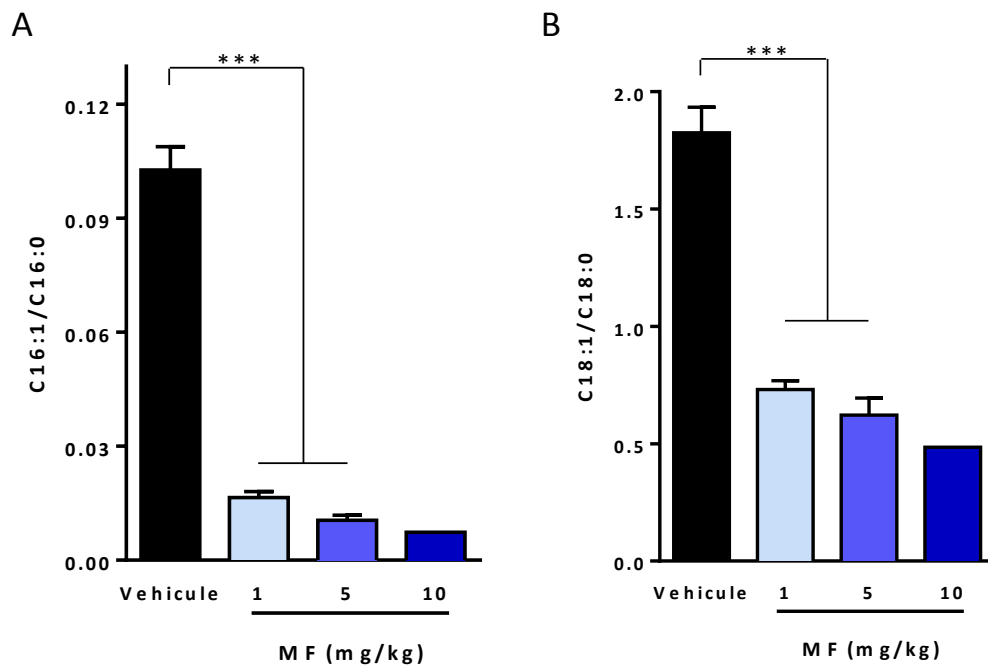


Figure 2. Effet du traitement sur l'activité SCD dans le sérum

Ratio C16:1/C16:0 (A) et C18:1/C18:0 (B) chez les animaux WT pour les 3 doses de MF-438 (noir : CT, bleu clair : 1mg/kg, bleu médian : 5mg/kg et bleu marine : 10mg/kg), n=5-15. ANOVA à une voie, * : $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,05$.

2. L'activité SCD est réduite aux niveaux systémique et tissulaire

En plus des effets visibles du MF-438 chez l'animal, nous avons mesuré, dans le sang et différents tissus, les ratios 16 :1/16 :0 et 18 :1/ 18 :0, témoins de l'activité SCD, par chromatographie gazeuse. Dans le sérum, ces deux ratios sont diminués pour les 3 doses (Figures 2A et 2B). Dans le muscle gastrocnémien, de façon similaire au sérum, les deux ratios sont réduits de façon significative pour les trois groupes traités (Figures 3A et 3B). Pour finir, nous avons regardé dans la moelle épinière, et là encore les deux ratios sont réduits dans tous les groupes traités. Néanmoins, la diminution est plus nuancée (Figures 4A et 4B). De manière générale, les espèces C16 sont plus affectées par le traitement et semblent être plus sensibles que les espèces C18.

3. Le MF-438 a un effet négatif sur le poids et la survie des animaux

L'augmentation de l'activité SCD a été associée à une tendance à l'obésité. Nous avons donc mesuré le poids des animaux quotidiennement en tant que témoin du statut métabolique général des animaux. Les valeurs de poids ont été normalisées par rapport au poids initial de chaque animal. Nous observons alors que les groupes traités avec les doses 1mg/kg et 5mg/kg ont un poids constant et qui se maintient à un niveau similaire à celui du groupe contrôle. En revanche, les animaux ayant reçu la dose 10mg/kg perdent du poids progressivement dès le 5^{ème} jour de traitement, jusqu'à atteindre une perte représentant en moyenne 20% du poids initial (Figure 5A). Cet effet amaigrissant semble être néfaste car les résultats nous montrent qu'un certain nombre d'animaux du groupe 10mg/kg (et même du groupe 5mg/kg) décèdent au cours du traitement. L'effet létal de la dose 10mg/kg se manifeste rapidement puisque les premiers animaux sont morts aux alentours du 8^{ème} jour de traitement (Figure 5B). Le MF-438, à forte dose, a donc un effet toxique sur nos souris.

4. Effet du MF-438 sur le phénotype des souris mSOD1

A partir des données obtenues sur nos souris sauvages, nous avons choisi la plus petite dose, 1mg/kg, étant donné qu'elle est déjà biologiquement active, pour traiter nos animaux transgéniques. Comme chez les souris sauvages, nous avons d'abord évalué l'activité

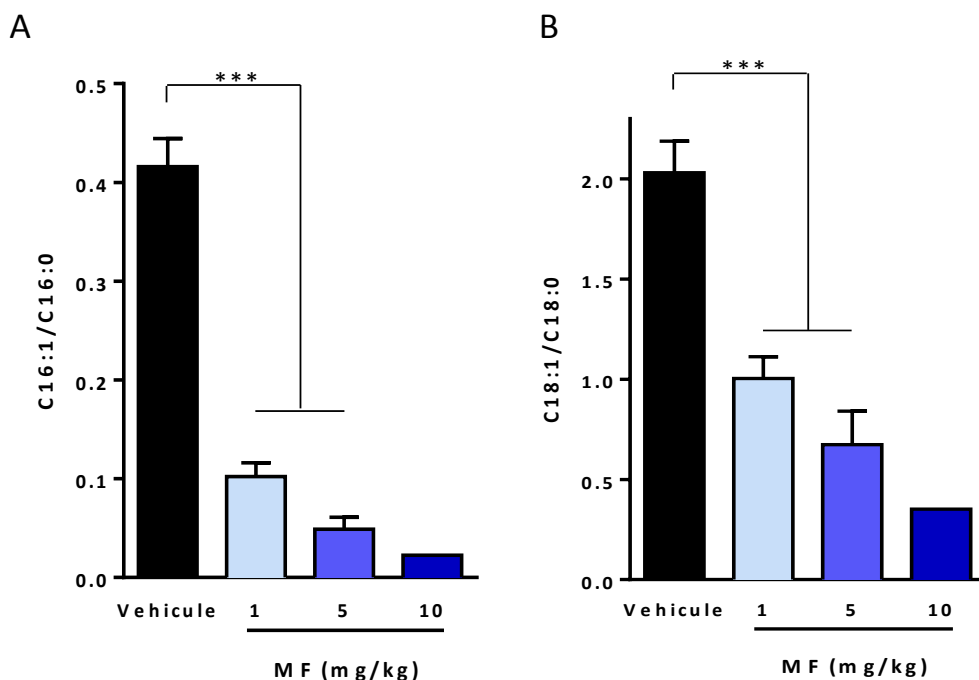


Figure 3. Effet du traitement sur l'activité SCD dans le muscle gastrocnémien

Ratio C16:1/C16:0 (A) et C18:1/C18:0 (B) chez les animaux WT pour les 3 doses de MF-438 (noir : CT, bleu clair : 1mg/kg, bleu médian : 5mg/kg et bleu marine : 10mg/kg), n=2-15. ANOVA à une voie, * : $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,05$.

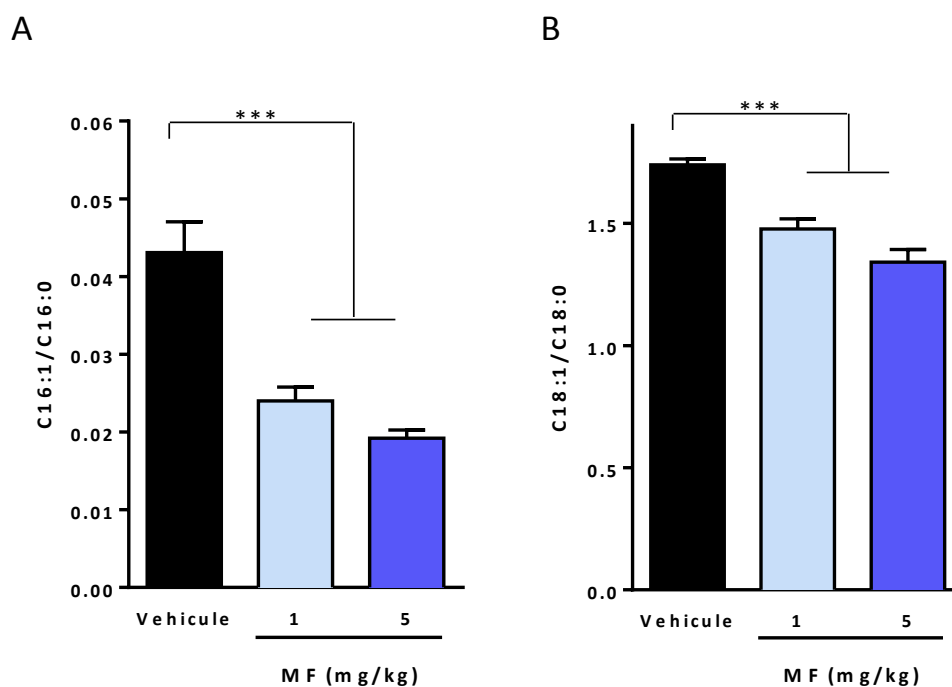


Figure 4. Effet du traitement sur l'activité SCD dans la moelle épinière

Ratio C16:1/C16:0 (A) et C18:1/C18:0 (B) chez les animaux WT pour 2 doses de MF-438 (noir : CT, bleu clair : 1mg/kg, bleu médian : 5mg/kg), n=2-15. ANOVA à une voie, * : $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,05$.

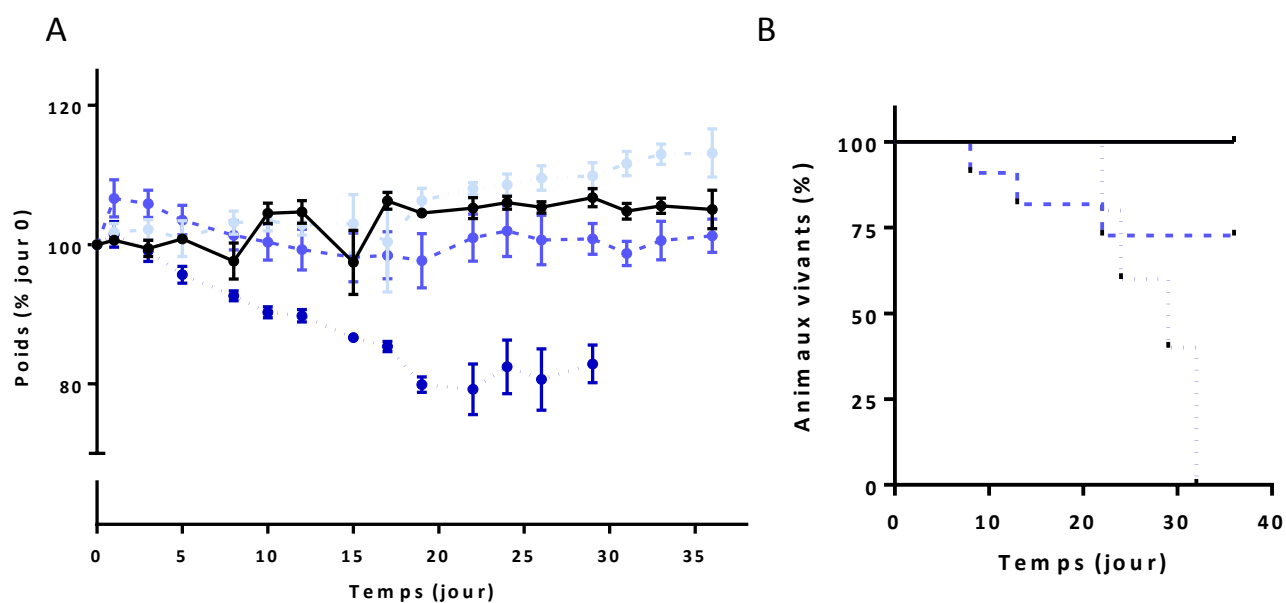


Figure 5. Effet du traitement MF-438 sur le poids et la survie des animaux

Poids et survie des animaux WT à toutes les doses (A), (B) (noir : CT, gris : 1mg/kg, bleu marine : 5mg/kg et bleu ciel : 10mg/kg), n=2-15

biologique générale de la molécule à l'aide des deux critères présentés précédemment. Les résultats nous montrent là encore que l'alopecie et la fermeture des yeux apparaissent progressivement chez les deux groupes traités dès approximativement 10 jours de traitement (Figures 6 A et 6B).

5. Le MF-438 inhibe l'activité SCD chez les souris mSOD1

Le niveau d'activité SCD, mesuré par les ratios 16 :1/16 :0 et 18 :1/18 :0, a d'abord été estimé au niveau périphérique dans le sérum. Les résultats nous indiquent que le traitement MF-438 permet bien une diminution significative de ces ratios (Figures 7A et 7B). De plus, ces deux ratios sont diminués significativement chez les animaux mSOD1 par comparaison aux animaux sauvages. De manière similaire, le MF-438 a induit l'inhibition de l'activité SCD au niveau tissulaire, aussi bien dans la périphérie (muscle (Figures 8A et 8B) et foie (Figures 9A et 9B)) que dans la moelle épinière (Figures 10 A et 10B). Là encore, l'effet est moins important dans le système nerveux central que dans les tissus périphériques. De plus, les espèces C16 sont plus touchées que les espèces C18.

6. Le MF-438 a un impact sur le poids et la survie des animaux mSOD1

Les mesures quotidiennes du poids des animaux ont révélé que les groupes sauvage véhicule et traités et mSOD1 véhicule ne voient pas leurs poids particulièrement affectés par le traitement. Par contre, les animaux du groupe mSOD1 traités perdent du poids (environ 12%) significativement dès le 19^{ème} jour de traitement (Figure 11A). La survie, quant à elle, n'est pas significativement altérée, puisqu'un seul animal est décédé au cours du traitement, de manière « anecdotique » (Figure 11B).

7. Le MF-438 n'a pas d'effet sur l'état de dénervation

Nous avons vu que le traitement au MF-438 exerce bien son action d'inhibiteur de l'activité SCD mais qu'il entraîne également une perte de poids importante chez les souris mSOD1. Nous avons voulu savoir si ce traitement avait un impact sur l'axe neuromusculaire et, par conséquent, une influence sur la pathologie. Pour cela, le réflexe d'extension des pattes

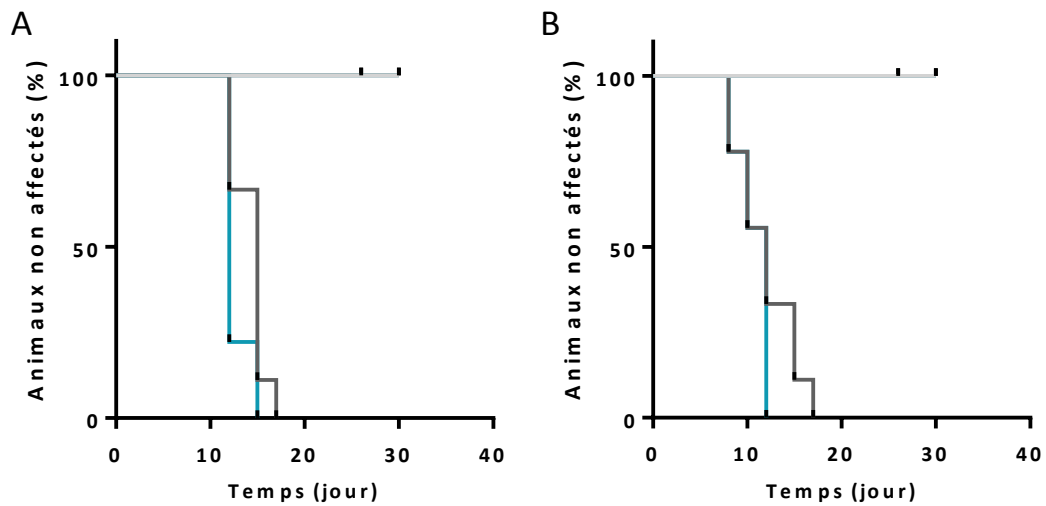


Figure 6. Effet biologique du traitement MF-438 sur le phénotype des souris mSOD1
Alopécie (A) et sécheresse oculaire (B) chez les animaux WT et mSOD1 pour la dose 1mg/kg de MF-438, n=7-9.

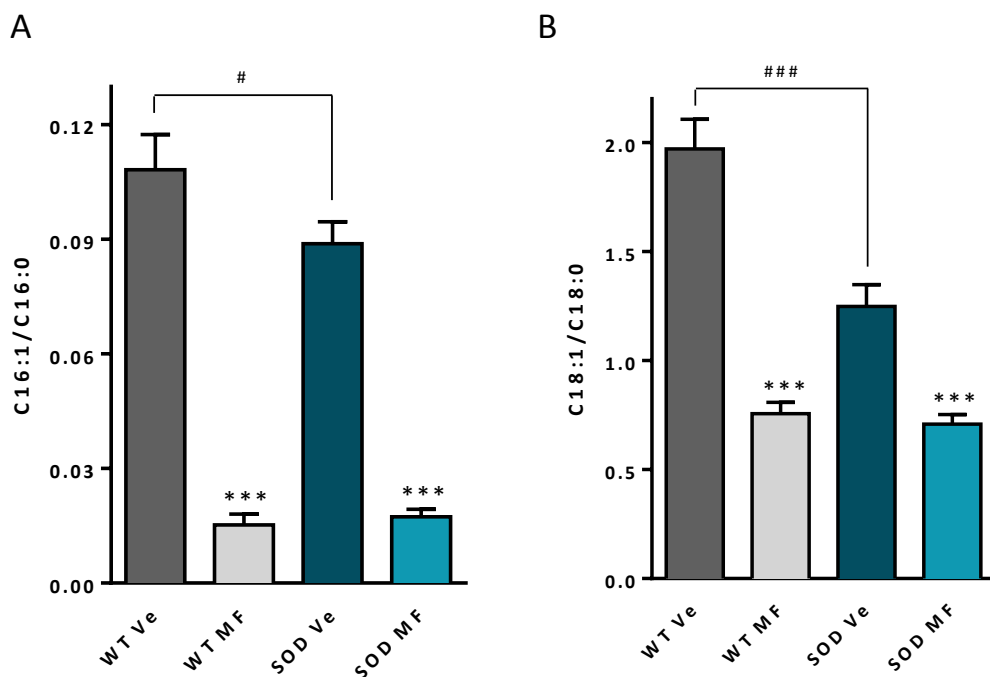


Figure 7. Effet du traitement MF-438 sur l'activité SCD dans le sérum
Ratio C16:1/16:0 (A) et C18:1/18:0 (B) chez des animaux WT et mSOD1 à la dose de 1mg/kg, n=7-9. ANOVA à une voie, * : $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

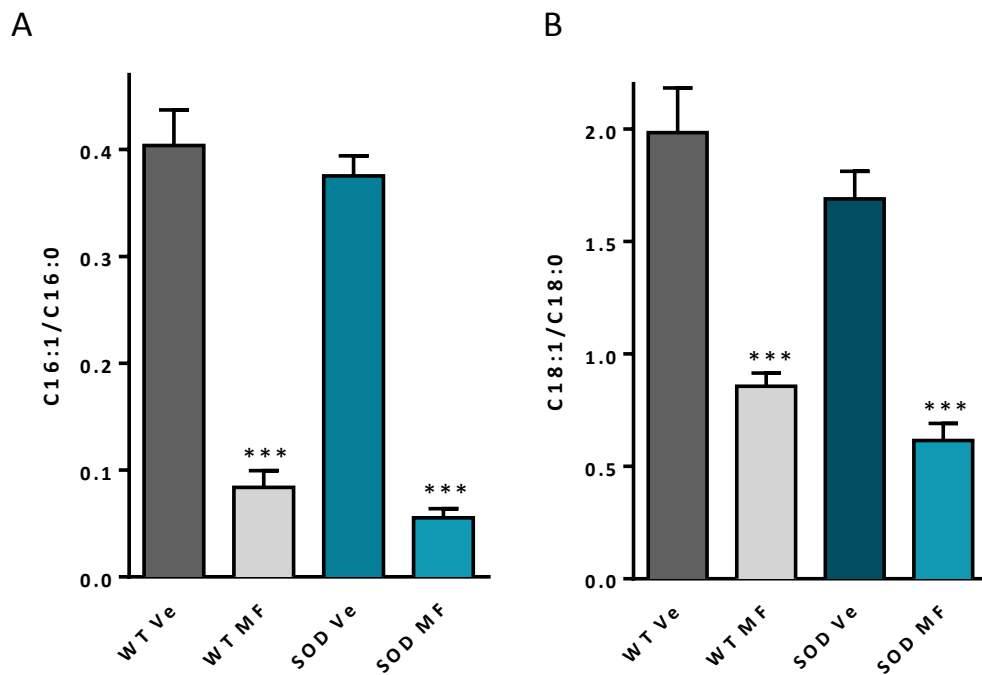


Figure 8. Effet du traitement sur l'activité SCD dans le muscle gastrocnémien

Ratio C16:1/16:0 (A) et C18:1/18:0 (B) chez des animaux WT et mSOD1 à la dose de 1mg/kg, n=7-9. ANOVA à une voie, * : p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,05.

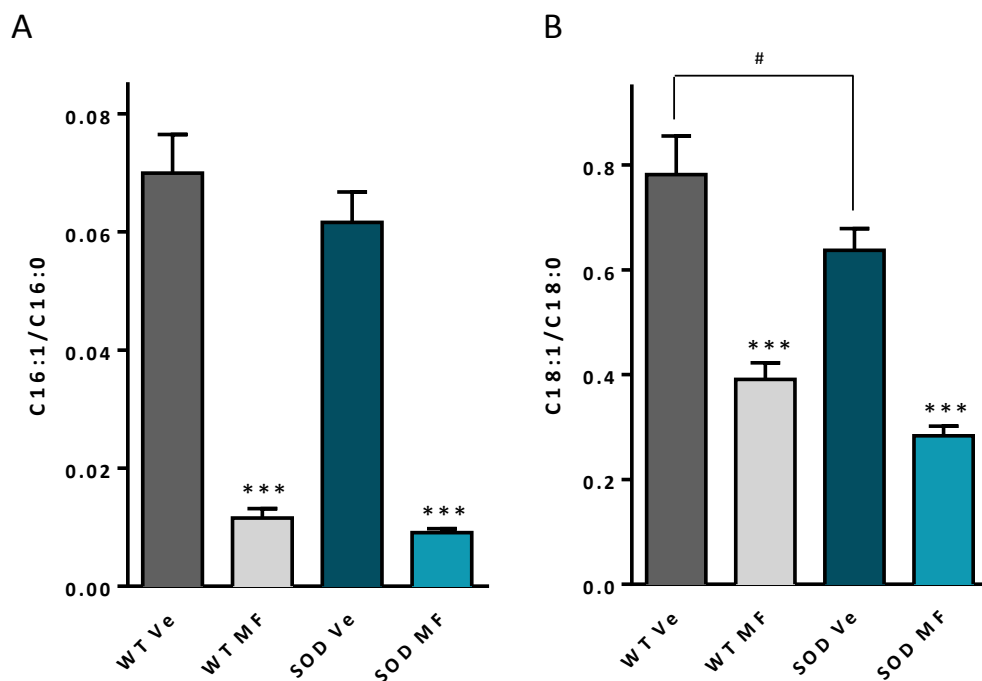


Figure 9. Effet du traitement sur l'activité SCD dans le foie

Ratio C16:1/16:0 (A) et C18:1/18:0 (B) chez des animaux WT et mSOD1 à la dose de 1mg/kg, n=7-9. ANOVA à une voie, * : p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,05.

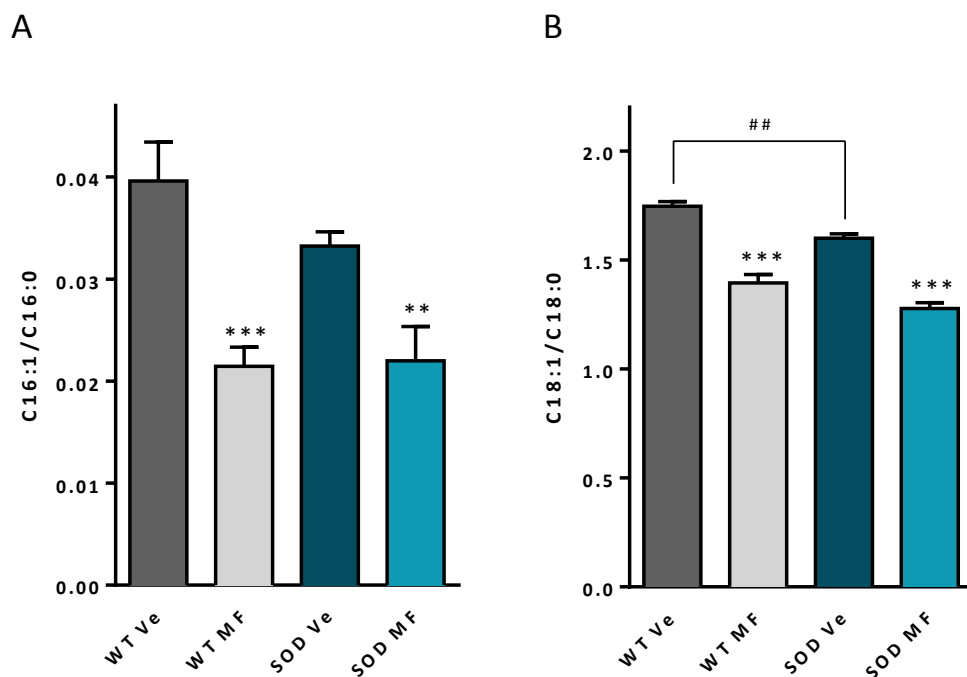


Figure 10. Effet du traitement sur l'activité SCD dans la moelle épinière

Ratio C16:1/16:0 (A) et C18:1/18:0 (B) chez des animaux WT et mSOD1 à la dose de 1mg/kg, n=7-9. ANOVA à une voie, * : p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001.

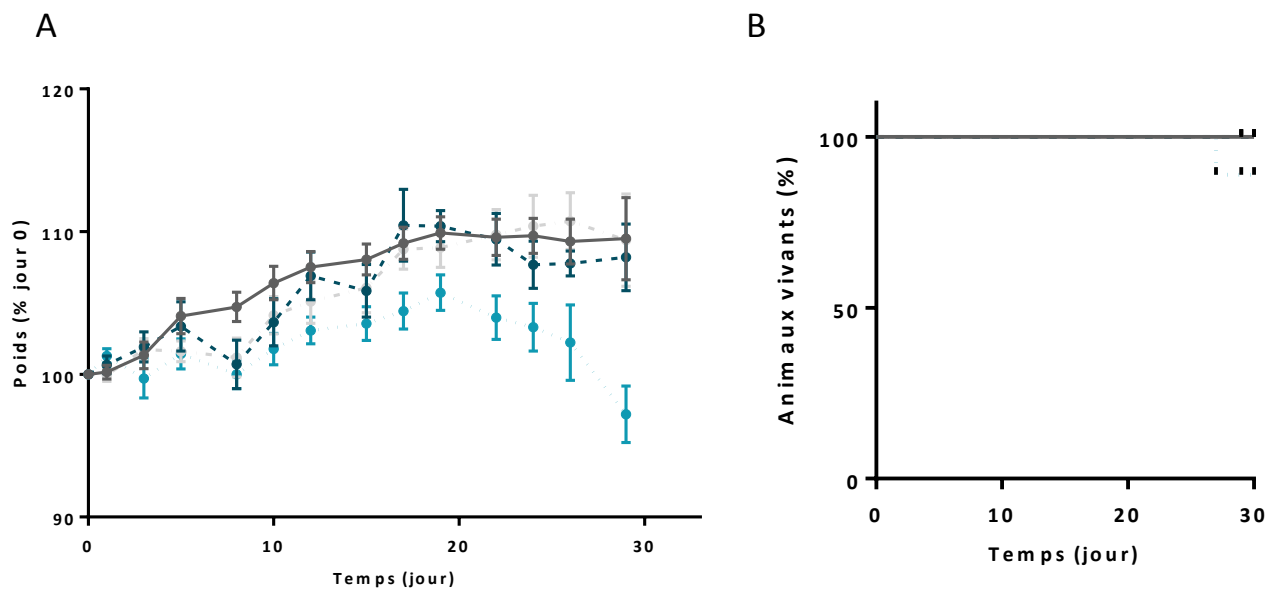


Figure 11. Effet du traitement MF-438 sur le poids et la survie des animaux

Poids et survie des animaux WT et mSOD1 à la dose 1mg/kg (gris foncé : WT Veh, gris clair : WT MF-438, vert foncé : mSOD1 Veh et vert clair : mSOD1 MF-438), n=2-15

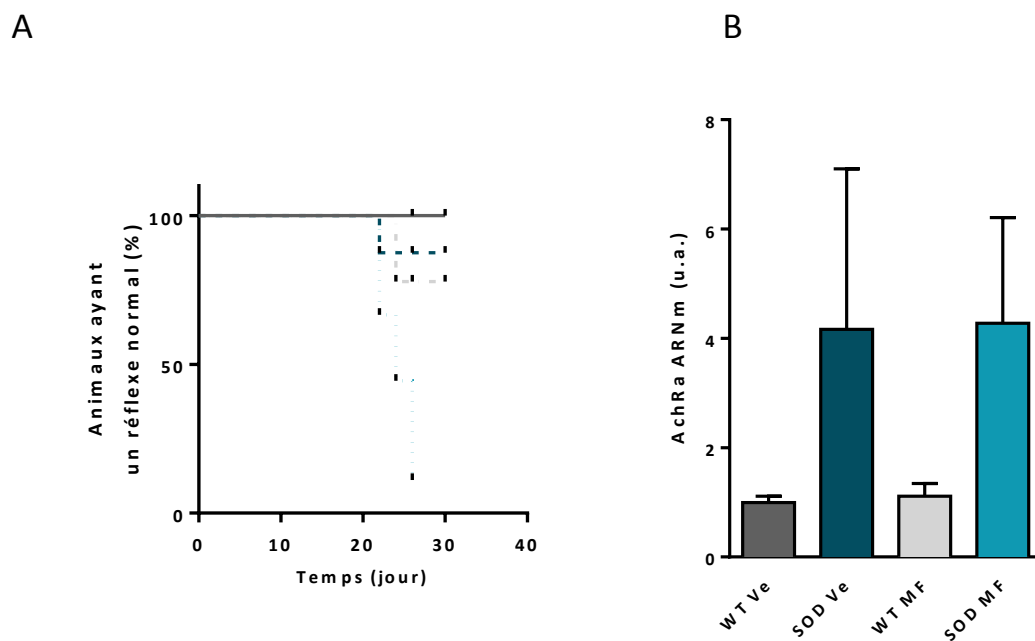


Figure 12. Effet du traitement MF-438 sur le réflexe d'extension des pattes et état de dénervation chez les animaux mSOD1

Réflexe d'extension des pattes postérieurs (A) et expression de l'ARNm de AchRα (B) chez les souris WT et mSOD1 traitées avec la dose 1mg/kg, (gris foncé : WT Veh, gris clair : WT MF-438, vert foncé : mSOD1 Veh et vert clair : mSOD1 MF-438), n=7-9.

postérieures, témoin d'une dénervation musculaire sous-jacente, a été évalué dans chaque groupe. Pour ce faire, les animaux sont maintenus par la queue pendant un temps bref. Un animal sain a le réflexe d'étendre ses pattes postérieures immédiatement alors qu'un animal qui dénerve va présenter une extension amoindrie voire pas d'extension du tout, selon l'état de dénervation. Nos résultats nous ont indiqué que les animaux ayant un réflexe d'extension altéré sont plus nombreux dans le groupe mSOD1 traité avec le MF-438 par comparaison avec les animaux transgéniques non traités (Figure 12A). Le traitement semble donc affecter le réflexe d'extension des pattes. En parallèle, nous avons mesuré le niveau d'expression du gène de la sous-unité α , typiquement surexprimé en cas de dénervation, dans le muscle gastrocnémien de ces animaux. Les niveaux d'expression sont plus élevés dans les deux groupes mSOD1, ce qui est caractéristique de la pathologie, par comparaison aux groupes WT. En revanche, il n'y a aucune différence d'expression entre les deux groupes mSOD1 eux-mêmes (Figure 12B). Ceci indique que le MF-438 n'a pas réduit l'intensité de cet indicateur de dénervation.

8. Le MF-438, à faible dose, n'a pas d'effet sur le phénotype métabolique

Pour tenter de comprendre pourquoi le traitement MF-438 n'a pas d'effet « protecteur » sur l'axe neuromusculaire, sachant que notre hypothèse de départ reposait sur le fait qu'un métabolisme oxydatif serait plutôt favorable à l'axe neuromusculaire, nous avons étudié le typage de fibres musculaires sur des souris sauvages ayant reçu le traitement au MF-438 aux trois doses. Pour cela, un marquage à la succinate déhydrogénase (SDH) a été fait sur des coupes transversales de muscle tibialis de 14 μ m d'épaisseur obtenues au cryostat (Figure 13C). Deux paramètres ont été évalués : l'aire des fibres et leur intensité de marquage. De manière générale, les fibres de petite taille et qui sont SDH-positives sont des fibres plutôt oxydatives, tandis que celles qui sont de grande taille et SDH-négatives sont plutôt glycolytiques.

Le marquage SDH nous a révélé que les animaux non traités ont environ 60% de fibres d'une aire inférieure à 1560 μ m, c'est-à-dire de petite taille, et environ 35% de fibres de grande taille (aire comprise entre 1560 et 3120 μ m). Les animaux ayant reçu les doses 5 et 10mg/kg présentent un taux plus élevé de fibres de petite taille (84%) au détriment des fibres de grande taille dont la proportion diminue (15%) (Figure 13A). Néanmoins, cet effet n'est pas

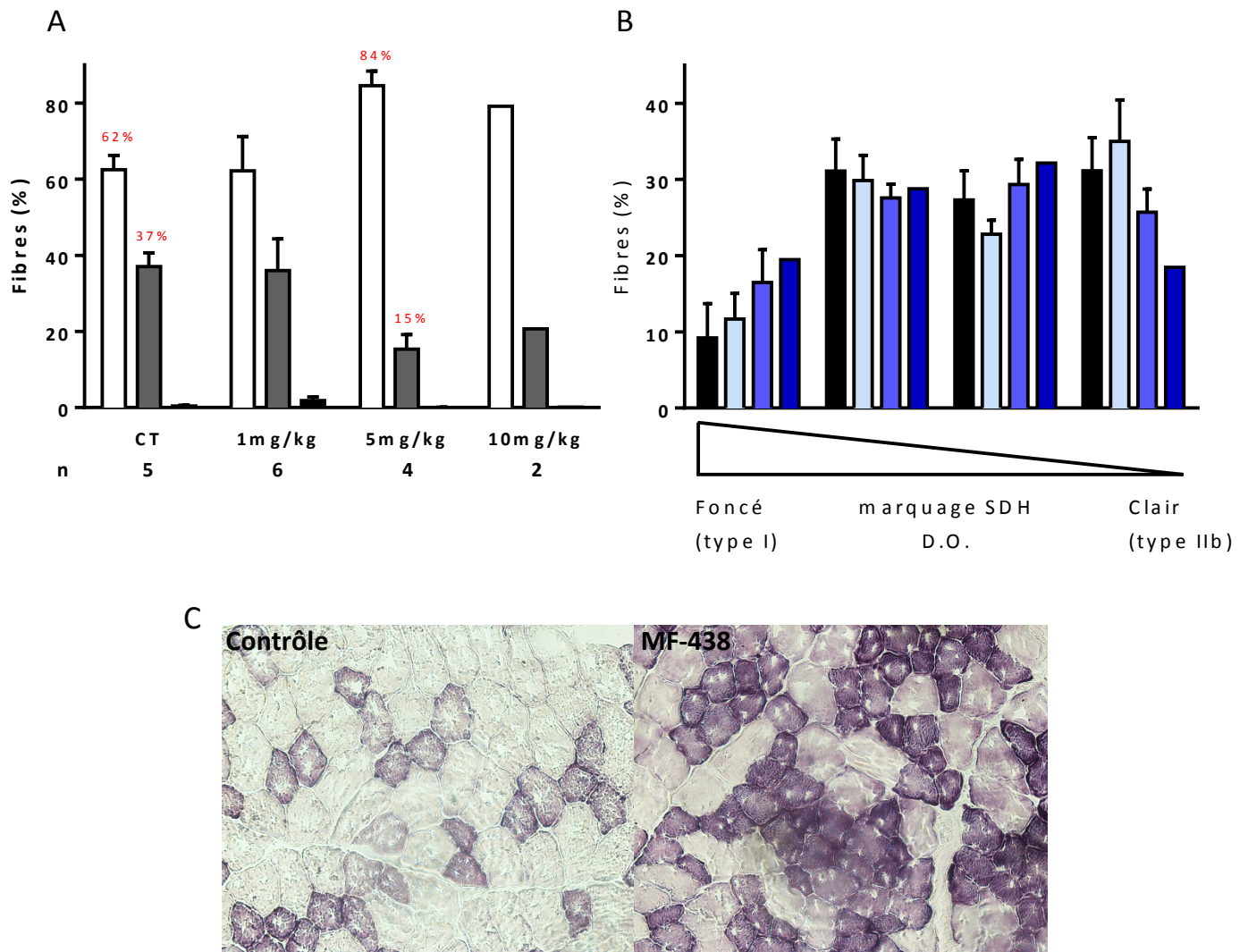


Figure 13. Typage des fibres musculaires chez les animaux WT

Aire des fibres musculaires chez les animaux WT à toutes les doses (A) (blanc : $A < 1560\mu\text{m}$, gris $1560 < A < 3120\mu\text{m}$ et noir $> 3120\mu\text{m}$. Couleur des fibres musculaires du plus foncé au plus clair (noir : CT, bleu ciel : 1mg/kg, bleu médian : 5mg/kg et bleu marine : 10mg/kg), $2 < n < 6$ (B). Illustration marquage SDH pour un animal contrôle et un animal traité (C).

observé à la dose 1mg/kg. Ces résultats sont renforcés par les observations faites concernant l'intensité de marquage. En effet, on s'est aperçu que plus la dose de MF-438 administrée est importante, plus la proportion de fibres SDH-positives augmente et celle de fibres SDH-négatives diminue (Figure 13B). Cela signifie que le traitement, à forte dose, permet un « switch » des fibres glycolytiques vers des fibres oxydatives et que la dose 1mg/kg n'induit pas un tel phénomène.

9. Le MF-438 n'a pas d'influence sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif

Pour aller plus loin, nous avons voulu vérifier si le traitement au MF-438 avait une influence sur l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif. Pour cela, nous avons étudié, par RT-qPCR, des gènes dont l'expression est impliquée dans la régulation du métabolisme oxydatif. De manière générale, nous n'observons aucune augmentation ou diminution significative, aussi bien pour le traitement aux trois doses de MF-438 (Figure 14), que pour le traitement des souris mSOD1 (Figure 15). Le MF-438 ne semble pas avoir d'effet sur l'activité transcriptionnelle de ces gènes.

IV. Conclusion

A partir de cette approche expérimentale basée sur l'inhibition spécifique de l'activité SCD, nous pouvons faire ressortir plusieurs points essentiels. Tout d'abord, la molécule est bien active d'un point de vue pharmacologique. L'inhibition de l'activité SCD est bien observée à la fois au niveau systémique et au niveau tissulaire, que ce soit en périphérie ou dans le système nerveux central. Ensuite, d'après les résultats obtenus, il apparaît clairement que la molécule a des effets secondaires toxiques importants qui sont retrouvés aussi bien chez les souris sauvages que chez les souris mSOD1, plus fragiles. Le poids est affecté par la molécule, ce qui se répercute par la suite sur la survie des animaux. Ces effets délétères nous ont conduit à utiliser l'unique dose qui ne présentait, à priori, pas d'effets néfastes. Contrairement à ce qui était attendu, cette dose n'a pas eu d'effets positifs sur l'axe neuromusculaire puisque la dénervation n'a pas été réduite après traitement. D'un point de vue moléculaire, le MF-438, à la dose de 1mg/kg, n'a pas suffi à promouvoir un métabolisme

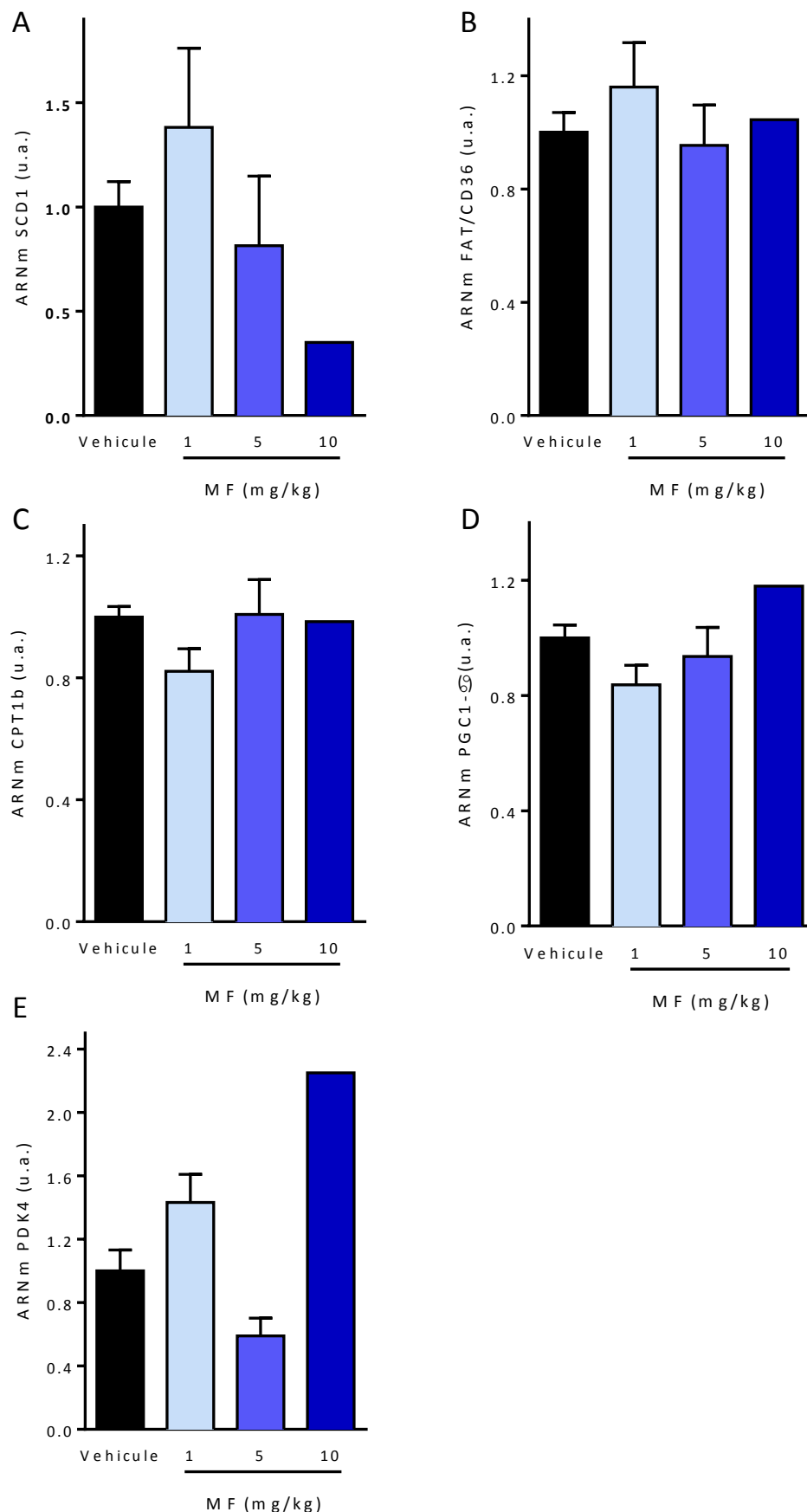


Figure 14. Effet du traitement MF-438 sur l'expression des gènes dans le muscle des animaux WT

Expression de l'ARNm de SCD (A), FAT/CD36 (B), CPT1b (C), PGC1- α (D) et PDK4 (E) chez les animaux WT pour toutes les doses de MF-438 (noir : CT, bleu clair : 1mg/kg, bleu médian : 5mg/kg et bleu marine : 10mg/kg), n=2-15.

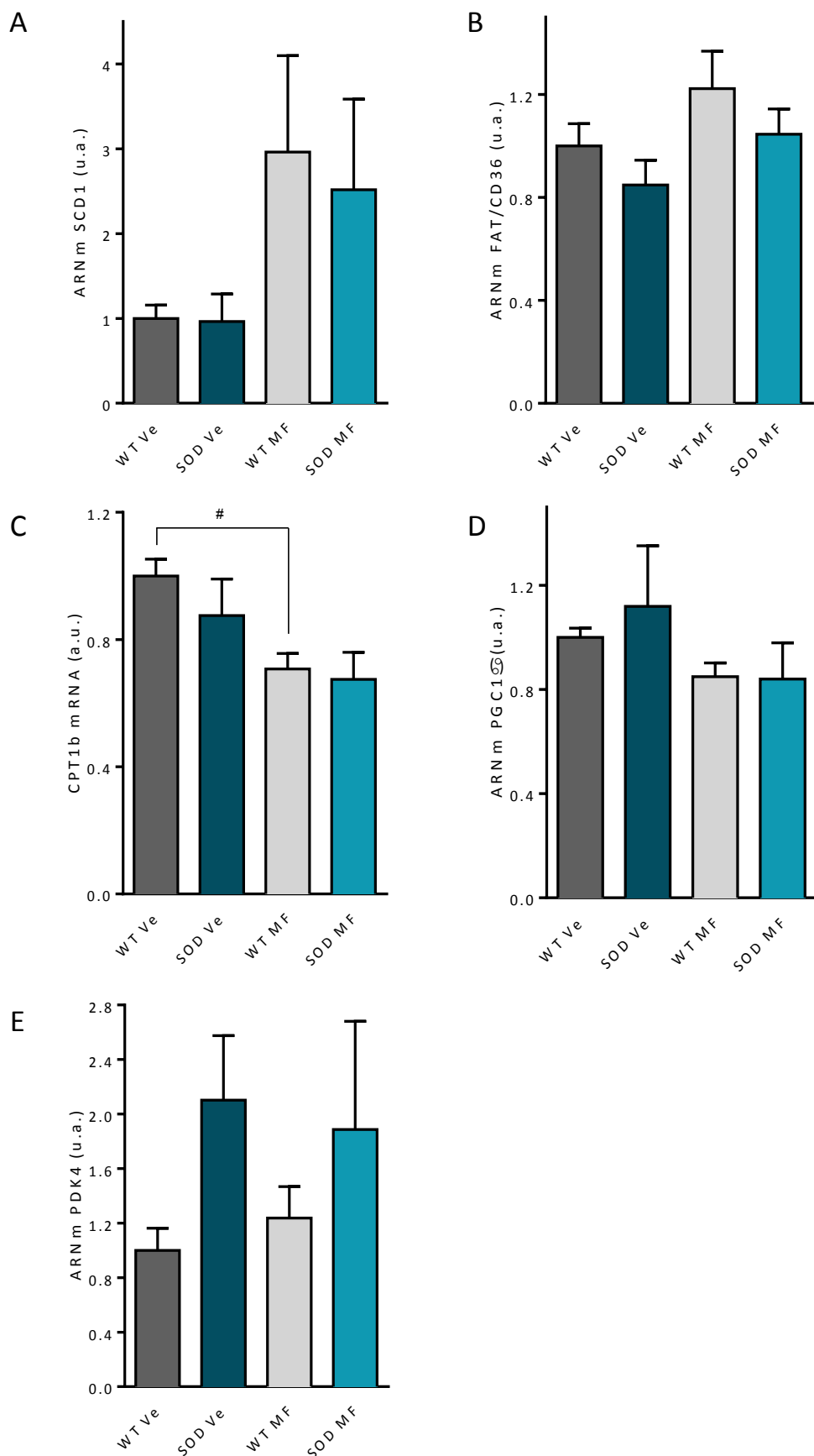


Figure 15. Effet du traitement MF-438 sur l'expression des gènes dans le muscle des animaux mSOD1

Expression de l'ARNm de SCD (A), FAT/CD36 (B), CPT1b (C), PGC1-α (D) et PDK4 (E) chez les animaux WT et mSOD1 à la dose 1mg/kg, n=7-9.

oxydatif. En effet, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif n'est pas augmentée, et les fibres musculaires n'ont pas bénéficié d'un « switch » du phénotype métabolique.

Il apparaît alors évident que cette approche, bénéfique dans un contexte de dénervation expérimentale, n'est pas une stratégie adaptée dans notre contexte de SLA. Le MF-438 ne permet pas de moduler positivement certains paramètres de la maladie mais il semble, au contraire, les aggraver. La fenêtre d'action de la molécule est très mince et la dose administrée ne suffit pas à améliorer la condition pathologique.

CHAPITRE III

Les acides gras poly-insaturés (PUFA) en tant que biomarqueurs de la SLA

Dans les chapitres précédents, nous avons évalué, dans un premier temps, le potentiel biomarqueur de deux grandes familles d'acides gras, les SFA et les MUFA. Dans un second temps, nous avons étudié les conséquences d'une modulation de l'activité SCD dans un modèle animal de SLA.

Dans cette nouvelle partie, nous allons maintenant analyser l'importance d'une autre famille d'acides gras : les PUFA. D'un point de vue pathologique, ces dernières années, beaucoup d'études ont mis l'accent sur l'implication de ces acides gras dans des problèmes de santé publique comme le diabète, l'obésité ou les maladies inflammatoires (Feskens, 2001; Schaefer, 2002). Concernant le système nerveux, il existe également toute une littérature qui met en lien la composition en PUFA et le bon, ou le mauvais, fonctionnement des neurones. En effet, les PUFA ont été impliqués dans différents troubles neurologiques comme la dépression, la schizophrénie ou les troubles bipolaires, mais aussi dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Yehuda et al., 2002; Chiu et al., 2003; Conklin et al., 2010; Lin et al., 2010; Fabelo et al., 2011; Bozzatello et al., 2016). Les courants de pensées actuels suggèrent que les omega-3 pourraient être bénéfiques pour le maintien des performances cognitives chez l'adulte. La composition en acides gras des membranes cellulaires des neurones est le reflet de la consommation de ces acides gras. Il a ainsi été suggéré que des régimes riches en omega-3 pouvaient représenter des moyens de prévenir et/ou de retarder le déclin cognitif dû à l'âge (D'Ascoli et al., 2016).

Concernant la SLA, il n'existe, à ce jour, aucune étude sur la composition des lipides en PUFA, ni sur le potentiel biomarqueur de cette composition. Pour cela, nous avons analysé la composition en PUFA, dans le sérum et le culot sanguin, de patients atteints de SLA, mais également de patients atteints de SBMA, qui est une autre maladie neurodégénérative qui n'affecte que les motoneurones, sans toucher les neurones moteurs, contrairement à ce qui est observé dans la SLA.

Blood polyunsaturated fatty acid composition is a biomarker for amyotrophic lateral sclerosis

Laura Robelin^{1,2}, Alexandre Heriques^{1,2}, François Salachas³, Hélène Blasco^{4,5,6}, Gabrielle Rudolf⁷, Martine Bergaentzle^{8,9}, Marie-Céline Fleury⁷, Christian Andres^{4,5}, Philippe Corcia^{4,10}, Eric Marchioni^{8,9}, Jean-Philippe Loeffler^{1,2}, Pierre-François Pradat³, Jose-Luis Gonzalez De Aguilar^{1,2}

¹ Université de Strasbourg, UMR_S1118, Strasbourg, France.

² INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Strasbourg, France.

³ Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Fédération des Maladies du Système Nerveux, Centre Référent Maladie Rare SLA, Paris, France

⁴ INSERM, U930, Neurogénétique et Neurométabolomique, Tours, France.

⁵ Université François-Rabelais, UMR_S930, Tours, France.

⁶ CHRU Tours, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Tours, France.

⁷ Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Neurologie, Strasbourg, France.

⁸ Université de Strasbourg, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Département Sciences Analytiques, Strasbourg, France.

⁹ CNRS, UMR7178, Chimie Analytique des Molécules BioActives, Illkirch-Graffenstaden, France.

¹⁰ Centre Hospitalier Universitaire Bretonneau, Centre SLA, Tours, France.

Correspondence to: Jose-Luis Gonzalez De Aguilar, INSERM U1118, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France, +33.368.85.30.91, gonzalez@unistra.fr

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, biomarker, blood, polyunsaturated fatty acid, spinal and bulbar muscular atrophy

ABSTRACT

Objective Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease associated with important disarrangements of energy homeostasis and lipid metabolism. Here we determined the polyunsaturated fatty acid (PUFA) composition of lipids in blood samples to establish metabolic biomarkers of the disease.

Methods We recruited 134 patients with ALS, 48 age and gender matched healthy volunteers, and 12 patients with spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). We analysed PUFAs extracted from total lipids in serum and clotted blood cells by gas chromatography. We performed analysis of ROC curves to assess diagnostic potential, and applied univariate and multivariate models to estimate effects on survival.

Results We observed a significant decrease in PUFA composition of blood cell lipids in ALS patients relative to control subjects, particularly affecting levels of docosapentaenoic acid (DPA 22:5n-3) and arachidonic acid (AA 20:4n-6). Relative indices of ω 3 and ω 6 PUFA biosynthesis (EPA/ALA and AA/LA, respectively) also diminished significantly. Similar differences were found when ALS patients were compared to patients with SBMA, which is an ALS mimic condition. The observed modifications satisfied high standards for diagnostic purposes (95.8% specificity, 66.7% sensibility, $LR(+)=15.9$ and $LR(-)=0.35$ for DPA in ALS *versus* healthy subjects; and 92.9% specificity, 75.0% sensibility, $LR(+)=10.6$ and $LR(-)=0.27$ for AA/LA ratio in ALS *versus* SBMA patients). Moreover, variations in the serum of ALS women, but not men, of levels of total ω 3 PUFAs, ω 3/ ω 6 ratio and ω 3 index $DHA\ 22:6n-3 + EPA\ 20:5n-3$ were independent prognostic factors for survival. Patients with low rates of these parameters had a prolonged survival of more than 10 months compared to patients with high rates.

Conclusion Detailed analysis of PUFA composition of blood lipids revealed important metabolic biomarkers for ALS that could be used both in clinical practice and in clinical trials.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal condition primarily characterized by the selective loss of upper and lower motor neurons. Clinical hallmarks include progressive muscle wasting, fasciculations, dysarthria, dysphagia, altered reflexes, and spasticity. The disease typically appears between 40 and 70 years of age, and affects about two per 100,000 of people (Gordon, 2013). About 90% of cases are considered as sporadic. The remaining 10% are inherited mainly in an autosomal dominant manner. Both forms are clinically and pathologically undistinguishable, so that it is assumed that they share common pathogenic mechanisms (Zufiria et al., 2016). Death usually occurs from respiratory failure within one to five years of diagnosis, although 20% of patients live longer than 5 years, and 10% survive for more than 10 years. It is also known that patients with bulbar onset have shorter life expectancy than patients with limb onset, and older patients have more rapid progression than younger ones (Pupillo et al., 2014). The diagnosis of ALS is based on clinical examination, electrophysiological findings, medical history, and exclusion of confounding disorders that mimic the disease. This is a laborious process that typically takes more than one year (Cellura et al., 2012). Moreover, a correct diagnosis may be difficult to determine at early stages, particularly in patients with predominant lower motor neuron involvement (Pradat and Bruneteau, 2006). There is therefore an unmet need for finding reliable molecular markers to facilitate the diagnosis of ALS and to monitor the course of the disease more accurately (Turner et al., 2009).

ALS is associated with alterations of energy homeostasis and lipid metabolism (Desport et al., 2005; Dupuis et al., 2011; Henriques et al., 2015a). Therefore, several indices of dyslipidemia have been proposed as surrogate biomarkers for ALS. In particular, high body mass index (BMI), increased LDL/HDL cholesterol ratio, and elevated contents of total cholesterol and triglycerides were shown to correlate with better prognosis.

However, except for BMI, these parameters failed to predict survival in combination with a panel of confounding factors (Dupuis et al., 2008; Dorst et al., 2011; Marin et al., 2011; Paganoni et al., 2011; Sutedja et al., 2011). Our previous work analyzed the saturated and monounsaturated fatty acid composition of blood lipids, as a source of biomarkers of the general metabolic status. It has been shown that adiposity is associated with an increase in the desaturation activity that converts palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0) into palmitoleic acid (16:1n-7) and oleic acid (18:1n-9), respectively (Warensjö et al., 2006; Vinknes et al., 2013). We observed that desaturation indices in the blood cell fraction (*i.e.*, 16:1n-7/16:0 and 18:1n-9/18:0) were higher in ALS patients than in healthy subjects. In addition, 16:1n-7/16:0 ratio was an independent prognostic factor for survival (Henriques et al., 2015b).

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs), including ω 6 (or n-6) and ω 3 (or n-3) PUFAs, are a category of long chain fatty acids involved in maintaining cell membrane fluidity, production of inflammatory mediators and regulation of gene transcription (Stubbs and Smith, 1984; Calder and Grimble, 2002; Lapillonne et al., 2004). Altered PUFA metabolism has been implicated in neurological and neurodegenerative diseases (Hussain et al., 2013a). It has been also shown that systemic variations of PUFA levels may represent convenient indices of a neuropathological process (Conquer et al., 2000; Evans et al., 2014). However, the potential of PUFAs as biomarkers for ALS has not been investigated so far. In this study, we performed gas chromatography to determine the PUFA composition of lipids derived from serum and blood cells. We compared PUFA levels of ALS patients with those of healthy subjects and patients with spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), which is a mimic condition considered as a part of the regular process of differential diagnosis of ALS. We also correlated changes in PUFA composition with ALS survival.

METHODS

Patients and control subjects

We performed a retrospective study with 134 patients with ALS, 11 patients with SBMA and 48 healthy individuals recruited between April 2011 and June 2015. Patients came from three French referral centers for ALS (Strasbourg, Tours and Paris). Patients diagnosed as having probable or definite ALS were included, according to the revised El Escorial criteria (Brooks et al., 2000). Patients taking medications for treating diabetes, dyslipidemia or related conditions were excluded. Age, gender and body mass index (BMI, kg/m²) were recorded at blood collection. Disease onset was designated as the time of initial motor deficit. Disease duration was the interval between onset of symptoms and the point of blood collection. Clinical status was evaluated at blood collection using the revised version of the ALS functional rating scale (ALSFRS-R). Healthy volunteers came from *Etablissement Français du Sang* (Strasbourg) and were matched for gender and age. All individuals gave informed consent, and the study was approved by the ethical committees *CPP Est IV* (Strasbourg), *CPP Ouest I* (Tours) and *CPP Ile-de-France* (Paris) under agreement CPPRB 09/40, No. AC-2008-438, No. DC-2009-1002.

Blood samples and lipid extraction

Blood samples were collected in red-top tubes under non-fasting conditions, and allowed to clot for 30 minutes at room temperature. Additional samples were taken in lavender-top tubes under fasting conditions for routine biochemical measurements. After centrifugation at 4000g for 10 minutes at 4°C, serum, plasma and cell pellets were separately snap frozen on dry ice and kept at -80°C until processing. Total lipids were extracted following a modified version of the Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer, 1959). After separation from the parent lipid molecules, the obtained fatty acids were converted into fatty acid methyl ester derivatives. This method yields derivatization

efficacies for glycerophospholipids and glycerolipids of about 90% but do not derivatize free fatty acids (FFAs) and cholesterol esters (Ostermann et al., 2014). Samples were stored at -20°C until analysis.

Gas chromatography

Gas chromatography was performed using a Varian 3400 CX chromatograph fitted with a WCOT fused silica capillary column of 100 m x 0.25 mm x 0.20 µm. The column was coated with a polar highly substituted cyanopropyl CP-SIL 88 phase. PUFAs were separated using conditions as previously described (Hussain et al., 2013b). Briefly, 1 µL of sample was injected. The split ratio was set at 1:1, and the temperature gradient in the oven ranged from 80 to 220°C at a rate of 4°C/min. Helium was the gas carrier. The temperature of the flame ionization detector was set at 270°C. Peaks were identified by retention time and compared to a standard mix of fatty acid methyl esters (Supelco 37 and Supelco PUFA-2 Animal Source, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Results were expressed as relative percentages of total fatty acids.

Statistical analysis

Prism version 7.0b (GraphPad, San Diego, CA) and JMP version 11.0.0 (SAS, Grégy-sur-Yerres, France) were used for statistical analysis. Unless otherwise indicated, data are expressed as the mean±SEM. Comparisons between fatty acid profiles were assessed by multiple unpaired two tailed *t*-test. Receiver-operator characteristic (ROC) curves were used to study sensitivity, specificity and likelihood ratios. Mann-Whitney test was used to assess differences between ALS and SBMA patients. Significant correlation between two variables was determined by Spearman test. Kaplan-Meier curves were used to visualize survival rates after univariate analysis by Gehan-Breslow-Wilcoxon test. Multivariate regression analysis was performed using Cox proportional hazard models. Hazard ratios for continuous variables represent the risk change over one unit of the regressor.

RESULTS

PUFA composition is altered in ALS blood cells

We performed a retrospective case-control analysis of fatty acid composition in serum and blood cells obtained from 48 ALS patients and 48 age and gender-matched healthy subjects (Table 1, group 1). In general, proportions of PUFAs were significantly decreased in the blood cell fraction of ALS men and women. This difference remained significant in men when $\omega 6$ and $\omega 3$ PUFAs were considered separately. They tended to decrease in women. Monounsaturated fatty acids were significantly increased in men and women while saturated fatty acids were decreased only in women (Table 2). The overall decay of blood cell PUFAs in ALS patients was mainly due to the significant decrease of two species, arachidonic acid (AA 20:4n-6, -20%) and docosapentaenoic acid (DPA 22:5n-3, -38%). Notably, the proportion of α -linolenic acid (ALA 18:3n-3), which is the essential precursor of $\omega 3$ PUFAs, was significantly increased in blood cells of ALS women, and tended to increase in men (Table 3). Biosynthesis of PUFAs from essential precursors requires the combined action of desaturases (FADS1 and FADS2) and elongases (ELOVL2 and ELOVL5). The relative activity of these enzymes is estimated based on ratios between products and substrates. In our hands, there were no marked differences in the relative activities of desaturases and elongases individually considered. In contrast, the global ratios of $\omega 6$ and $\omega 3$ PUFA biosynthesis were significantly decreased in the blood cell fraction in ALS men and women (-22% for AA/LA and -38% for EPA/ALA, respectively) (Table 4).

Reduced PUFA composition in blood cells is characteristic of ALS

To evaluate the biomarker potential of the changes detected in PUFA composition, we performed ROC curve analysis, which is typically used to determine the effectiveness for discriminating between individuals with disease and those without disease (Akobeng, 2007a). The areas under the curves (AUCs) for DPA (22:5n-3), AA (20:4n-6), AA/LA and

EPA/ALA significantly approached 1 (the nearer to 1, the better the test is). We also calculated optimal cut-off points, based on the Youden index, at which specificity and sensitivity scores are maximized (Akobeng, 2007a). Specificity was higher than 90% for DPA (22:5n-3) and AA (20:4n-6), and almost reached 90% for AA/LA and EPA/ALA. Sensibility ranged between 54% and 67%. Finally, we computed likelihood ratios, which are a measure of diagnostic accuracy that estimates how many times more (or less) likely a particular test result is in subjects with the disease than in those without disease (Akobeng, 2007b). Likelihood ratios for a positive test result (LR+) ranged from 5 to almost 16 (the higher LR+, the more indicative of disease the test is), whereas likelihood ratios for a negative test result (LR-) were less than 0.5 (the lower the LR-, the more indicative of absence of disease the test is) (Table 5).

At early stages, distinguishing ALS from other conditions with similar symptoms is a common clinical problem (Traynor et al., 2000; Pradat 2014). To further assess the specificity of the changes detected in PUFA composition, we performed gas chromatography on blood cell samples obtained from patients with SBMA (Table 1, group 2). This is an X-linked motor neuron disease caused by a CAG repeat expansion in the androgen receptor gene, and primarily characterized by progressive muscle weakness and atrophy (Rhodes et al., 2009). Our PUFA parameters, including DPA (22:5n-3), AA (20:4n-6), AA/LA and EPA/ALA, were significantly decreased in ALS compared to SBMA (Figure 1A-D). Moreover, analysis of ROC curves revealed significant AUCs, high rates of specificity and sensibility, and good likelihood ratios (Table 6). Our previous work showed that the desaturation indices 16:1n-7/16:0 and 18:1n-9/18:0 in the blood cell fraction were higher in patients than in healthy subjects (Henriques et al., 2015b). Here we found that they correlated negatively with all selected PUFA parameters in ALS patients (Table 7), and were significantly increased in ALS compared to SBMA (Figure 1E, F), which reinforces the specific nature of the observed differences.

Low ω 3 PUFA composition in serum of ALS women is associated with better prognosis

In general, PUFA composition in serum was not significantly affected in ALS patients compared to healthy subjects (Table 2 and Table 3). Only EPA/ALA ratio appeared significantly reduced in ALS women (Table 4). Despite the lack of clear-cut differences between patients and controls, PUFA composition did change between men and women in both groups. Keeping this difference in mind, we wished to evaluate the potential of PUFA composition to predict survival. To this aim, we took advantage of an extended group of ALS patients (Table 1, group 3), and performed univariate analysis to select variations in the levels of PUFAs that could discriminate between short and long-survivors among ALS men or women. Based on median values, Kaplan-Meier curves revealed that women with low serum rates of total ω 3 PUFAs, ω 3/ ω 6 ratio and ω 3 index DHA (22:6n-3)+EPA (20:5n-3) showed a prolonged survival of more than 10 months compared to women with high serum rates (Figure 2). No effects were detected in serum of men, nor in clot of both genders (data not shown). We had previously shown that several demographic and clinical factors, including age, BMI, site of symptom onset, disease duration and clinical status (as measured by the ALSFRS-R score), affect life expectancy of ALS patients (Henriques et al., 2015b). Thus, we performed multivariate Cox regression analysis adjusted for these covariates to evaluate the robustness of the selected serum PUFA parameters. Decreased rates of total ω 3 PUFAs (HR=1.17, P =0.0119), ω 3/ ω 6 ratio (HR=71.02, P =0.0133) and ω 3 index DHA (22:6n-3)+EPA (20:5n-3) (HR=1.17, P =0.0233) were associated with better prognosis (Table 8).

DISCUSSION

This study represents the first comprehensive analysis of PUFA composition as a biomarker for ALS. We show that decreased rates of DPA (22:5n-3), AA (20:4n-6), AA/LA and EPA/ALA in the blood cell fraction allow to distinguish between ALS patients and SBMA and healthy subjects. We also show that low levels of total ω 3 PUFAs, ω 3/ ω 6 ratio and ω 3 index DHA (22:6n-3)+EPA (20:5n-3) in the serum of ALS women are associated with better prognosis.

Classically, perturbations of the fatty acid composition of blood lipids have been shown to correlate with a number of conditions collectively grouped under the umbrella of the metabolic syndrome, including obesity, type 2 diabetes and cardiovascular disease (Albert et al., 2002; Wang et al., 2003; Warensjo et al., 2009). Neurological and neurodegenerative diseases have also been associated with alterations in fatty acid composition (Hussain et al., 2013a; Janssen and Kiliaan, 2014), and some of these modifications have been shown to occur in the periphery. Decreased levels of total PUFAs in erythrocyte membranes accompanied the degree of demyelination in brain white matter in young patients with schizophrenia (Peters et al., 2009). Also, decreased levels of plasma DHA (22:6n-3) were found to correlate with cognitive impairment in demented individuals (Conquer et al., 2000). Taken together, these studies argue in favor of using systemic variations of PUFA levels as appropriate biomarkers of disease.

At early stages, ALS manifests incompletely and progresses heterogeneously from one individual to another. As a consequence, diagnosis often takes more than one year, and even up to two years in some cases (Iwasaki et al., 2001). Under these circumstances, discriminating ALS from mimic disorders still represents a common problem in clinical practice. Indeed, the rates of false positives and false negatives at initial diagnosis have been estimated as being 10% and 40%, respectively (Brooks, 1999; Radunovic et al.,

2007). Although SBMA is considered as a rare motor neuron disease, both ALS and SBMA share confounding early symptoms (Pugdahl et al., 2008; Pradat, 2014). Thus, it has been reported that SBMA may represent more than 10% of mistaken ALS cases (Traynor et al., 2000). In this study, we showed decreased levels of DPA (22:5n-3), AA (20:4n-6), AA/LA and EPA/ALA in the blood cell fraction of ALS patients compared to healthy subjects and, more importantly, SBMA patients. According to commonly accepted standards (Akobeng, 2007b; Akobeng, 2007c), DPA (22:5n-3) showed 95.8% specificity when compared to healthy people, which would be very useful for ruling in ALS in a person with a positive test. Sensitivity reached 66.7%, which would be only relatively useful for ruling out ALS in a person with a negative test. Moreover, a positive likelihood ratio of more than 10 has been shown to increase the probability of disease very significantly. In the case of DPA (22:5n-3), we observed that a person with ALS is about 16 times more likely to have a positive test than a person without ALS. When compared to SBMA, the selected PUFA parameters, in particular AA/LA ratio, also satisfied high standards despite smaller numbers of individuals (92.9% specificity and LR(+) score of 10.6). The whole of these findings highlights the potential of blood cell PUFA composition as a diagnostic biomarker for ALS.

In contrast to the differences observed in PUFAs in the blood cell fraction between ALS patients and healthy or SBMA subjects, we did not find any significant changes in the PUFA composition of ALS serum that could distinguish patients from controls. However, changes between men and women did occur in both groups. This observation is not without precedent, so that it has been suggested that gender should be considered when analyzing fatty acid composition (Decsi and Kennedy, 2011; Lohner et al., 2013). In our hands, univariate analysis of the effects on survival of ALS patients of several parameters indicative of the status of ω 3 PUFA metabolism, including total ω 3 PUFAs, ω 3/ ω 6 ratio and ω 3 index DHA (22:6n-3)+EPA (20:5n-3), indicated that these parameters were able to discriminate between short and long-survivors only in women. We have no explanation

for this differential behavior. Likely, uncontrolled factors may trigger higher variability in men that preclude clear-cut differences in survival. Multivariate analysis showed that lower rates of the selected ω 3 PUFA parameters were associated with better prognosis, taking into account the influence of a number of confounding factors, including the interaction of PUFA levels with gender. This is *a priori* a contradictory finding, since it is generally postulated that maintaining optimal levels of these ω 3 PUFA indices, mainly through dietary sources, can be beneficial for preventing from aging and neurodegenerative diseases (Janssen and Kiliaan, 2014). However, there exists controversy about the effects of dietary PUFAs on the risk of having ALS. Early studies reported that a higher intake of PUFAs increased the risk of developing the disease (Nelson et al., 2000). In contrast, follow-up studies showed that a higher PUFA intake decreased that risk (Veldink et al., 2007). Although it is difficult to compare between those studies and ours, the present findings would rather support the notion of a negative impact, and strengthen the potential of serum ω 3 PUFA composition as a prognostic biomarker for ALS.

The assessment of ALS and its progression likely need the implementation of multipanel biomarkers, combining neurophysiological and neuroimaging criteria with molecular parameters. To date, proposed molecular markers from tissues and biological fluids have not reached routine clinical application. On the basis of the process of motor neuron degeneration, recent studies have pointed to neurofilament proteins found in cerebrospinal fluid and blood as powerful biomarkers of ALS for both diagnostic and prognostic purposes (Lu et al., 2015; Steinacker et al., 2016). Beyond the manifestations directly ascribed to suffering motor neurons, ALS is associated with weight loss, hypermetabolism, and dyslipidemia (Dupuis et al., 2011). Here we propose novel lipid biomarkers as proxys of altered metabolism, which could be used in combination with others to improve the clinical practice and the design of clinical trials.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the patients and their families. We are indebted to Dr. Françoise Bindler for her aid with gas chromatography measurements. We also acknowledge Dr. Christian Gachet for providing control samples. This work was supported by funds from European Community's Health Seventh Framework Programme under grant agreement No. 259867 (Euro-MOTOR) and *Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres Maladies du Motoneurone* (ARSLA). L.R. is a PhD student granted by *Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives* (AREMANE), *Association André combat la SLA* and ARSLA.

REFERENCES

- Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatr* 2007c;96:338-341.
- Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 2: likelihood ratios, pre- and post-test probabilities and their use in clinical practice. *Acta Paediatr* 2007b;96:487-491.
- Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatr* 2007a;96:644-647.
- Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC, Ma J. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N Engl J Med* 2002;346:1113-1118.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL; World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the

- diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1:293-299.
- Brooks BR. Earlier is better: the benefits of early diagnosis. *Neurology* 1999;53:S53-S54; discussion S55-S57.
- Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:S14-S19.
- Cellura E, Spataro R, Taiello AC, La Bella V. Factors affecting the diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2012;114:550-554.
- Conquer JA, Tierney MC, Zecevic J, Bettger WJ, Fisher RH. Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids* 2000;35:1305-1312.
- Decsi T, Kennedy K. Sex-specific differences in essential fatty acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 2011;94:1914S-1919S.
- Desport JC, Torny F, Lacoste M, Preux PM, Couratier P. Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegener Dis* 2005;2:202-207.
- Dorst J, Kuhnlein P, Hendrich C, Kassubek J, Sperfeld AD, Ludolph AC. Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2011;258:613-617.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Seilhean D, Hauw JJ, Lacomblez L, Loeffler JP, Meininger V. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2008;70:1004-1009.
- Dupuis L, Pradat PF, Ludolph AC, Loeffler JP. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2011;10:75-82.
- Evans SJ, Ringrose RN, Harrington GJ, Mancuso P, Burant CF, McInnis MG. Dietary intake and plasma metabolomic analysis of polyunsaturated fatty acids in bipolar subjects reveal dysregulation of linoleic acid metabolism. *J Psychiatr Res* 2014;57:58-64.

Gordon PH. Amyotrophic lateral sclerosis: an update for 2013 clinical features, pathophysiology, management and therapeutic trials. *Aging Dis* 2013;4:295–310.

Gordon PH, Salachas F, Lacomblez L, Le Forestier N, Pradat PF, Bruneteau G, et al. Predicting survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis at presentation: a 15-year experience. *Neurodegener Dis* 2013;12:81–90.

Henriques A, Blasco H, Fleury MC, Corcia P, Echaniz-Laguna A, Robelin L, Rudolf G, Lequeu T, Bergaentzle M, Gachet C, Pradat PF, Marchioni E, Andres CR, Tranchant C, Gonzalez De Aguilar JL, Loeffler JP. Blood cell palmitoleate-palmitate ratio is an independent prognostic factor for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 2015b;10:e0131512.

Henriques A, Croixmarie V, Priestman DA, Rosenbohm A, Dirrig-Grosch S, D'Ambra E, Huebecker M, Hussain G, Boursier-Neyret C, Echaniz-Laguna A, Ludolph AC, Platt FM, Walther B, Spedding M, Loeffler JP, Gonzalez De Aguilar JL. Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. *Hum Mol Genet.* 2015a;24:7390-7405.

Hussain G, Schmitt F, Henriques A, Lequeu T, Rene F, Bindler F, Dirrig-Grosch S, Oudart H, Palamiuc L, Metz-Boutigue MH, Dupuis L, Marchioni E, Gonzalez De Aguilar JL, Loeffler JP. Systemic down-regulation of delta-9 desaturase promotes muscle oxidative metabolism and accelerates muscle function recovery following nerve injury. *PLoS One* 2013b;8:e64525.

Hussain G, Schmitt F, Loeffler JP, Gonzalez De Aguilar JL. Fattening the brain: a brief of recent research. *Front Cell Neurosci* 2013a;7:144.

Iwasaki Y, Ikeda K, Kinoshita M. The diagnostic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2001;2:123-126.

Janssen CI, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog Lipid Res* 2014;53:1-17.

- Lapillonne A, Clarke SD, Heird WC. Polyunsaturated fatty acids and gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:151-156.
- Lohner S, Fekete K, Marosvölgyi T, Decsi T. Gender differences in the long-chain polyunsaturated fatty acid status: systematic review of 51 publications. *Ann Nutr Metab* 2013;62:98-112.
- Lu CH, Petzold A, Topping J, Allen K, Macdonald-Wallis C, Clarke J, Pearce N, Kuhle J, Giovannoni G, Fratta P, Sidle K, Fish M, Orrell R, Howard R, Greensmith L, Malaspina A. Plasma neurofilament heavy chain levels and disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: insights from a longitudinal study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015;86:565-573.
- Marin B, Desport JC, Kajeu P, Jesus P, Nicolaud B, Nicol M, Preux PM, Couratier P. Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82:628-634.
- Nelson LM, Matkin C, Longstreth WT Jr, McGuire V. Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. II. Diet. *Am J Epidemiol* 2000;151:164-173.
- Ostermann AI, Müller M, Willenberg I, Schebb NH. Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography – a comparison of different derivatization and extraction procedures. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2014;91:235-241.
- Paganoni S, Deng J, Jaffa M, Cudkowicz ME, Wills AM. Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2011;44:20-24.
- Peters BD, Duran M, Vlieger EJ, Majoie CB, den Heeten GJ, Linszen DH, de Haan L. Polyunsaturated fatty acids and brain white matter anisotropy in recent-onset schizophrenia: a preliminary study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009;81:61-63.

- Pradat PF, Bruneteau G. [Differential diagnosis and atypical subsets of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 2006;162:4S81-4S90.
- Pradat PF. [SBMA: a rare disease but a classic ALS mimic syndrome]. *Presse Med* 2014;43:580-586.
- Pugdahl K, Fuglsang-Frederiksen A, Johnsen B, de Carvalho M, Fawcett PR, Labarre-Vila A, Liguori R, Nix WA, Schofield IS. A prospective multicentre study on sural nerve action potentials in ALS. *Clin Neurophysiol* 2008;119:1106-1110.
- Pupillo E, Messina P, Logroscino G, Beghi E; the SLALOM Group. Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Ann Neurol* 2014;75:287-297.
- Radunovic A, Mitsumoto H, Leigh PN. Clinical care of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2007;6:913-925.
- Rhodes LE, Freeman BK, Auh S, Kokkinis AD, La Pean A, Chen C, Lehky TJ, Shrader JA, Levy EW, Harris-Love M, Di Prospero NA, Fischbeck KH. Clinical features of spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain* 2009;132:3242-3251.
- Steinacker P, Feneberg E, Weishaupt J, Brettschneider J, Tumani H, Andersen PM, von Arnim CA, Böhm S, Kassubek J, Kubisch C, Lulé D, Müller HP, Muche R, Pinkhardt E, Oeckl P, Rosenbohm A, Anderl-Straub S, Volk AE, Weydt P, Ludolph AC, Otto M. Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: a prospective study on 455 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;87:12-20.
- Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta* 1984;779:89-137.
- Sutedja NA, van der Schouw YT, Fischer K, Sizoo EM, Huisman MH, Veldink JH, Van den Berg LH. Beneficial vascular risk profile is associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82:638-642.
- Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: a population-based study. *Arch Neurol* 2000;57:109-131.

- Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2009;8:94–109.
- Veldink JH, Kalmijn S, Groeneveld GJ, Wunderink W, Koster A, de Vries JH, van der Luyt J, Wokke JH, Van den Berg LH. Intake of polyunsaturated fatty acids and vitamin E reduces the risk of developing amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:367-371.
- Vinknes KJ, Elshorbagy AK, Nurk E, Drevon CA, Gjesdal CG, Tell GS, Nygård O, Vollset SE, Refsum H. Plasma stearoyl-CoA desaturase indices: association with lifestyle, diet, and body composition. *Obesity* 2013;21:E294-E302.
- Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, Pankow JS, Eckfeldt JH; ARIC Study Investigators. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* 2003;78:91-98.
- Warensjö E, Ohrvall M, Vessby B. Fatty acid composition and estimated desaturase activities are associated with obesity and lifestyle variables in men and women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:128-136.
- Warensjö E, Rosell M, Hellenius ML, Vessby B, De Faire U, Risérus U. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids Health Dis* 2009;8:37.
- Zufiría M, Gil-Bea FJ, Fernández-Torrón R, Poza JJ, Muñoz-Blanco JL, Rojas-García R, Riancho J, de Munain AL. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Prog Neurobiol* 2016;142:104-129.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the groups of individuals.

	Group 1				Group 2		Group 3	
	Healthy (48)		ALS (48)		ALS (18)	SBMA (12)	ALS (117)	
	Men (29)	Women (19)	Men (25)	Women (16)	Men (14)	Men (12)	Men (58)	Women (59)
Age (years)	55 (31-66)	55.9 (35-65)	53.6 (34.9-68.7)	55.7 (37.6-75.6)	65 (35-74)	59.5 (42-71)	64.1 (33.3-84.1)	67.5 (37.6-89.9)
BMI (kg/m ²)	N/A	N/A	23.5 (18.6-28.1)	23.4 (16.1-42.9)	22.3 (18.1-28.7)	22.5 (19.7-34.8)	23.3 (18.3-31.7)	23.4 (16.1-42.9)
Bulbar onset (%)	N/A	N/A	22.2	35.3	14.3	-	20.7	40.7
Duration at collection (days)	N/A	N/A	682 (159-2752)	623 (40-1631)	730 (30-1460)	4928 (1095-12775)	682 (123-3938)	595 (2-4788)
ALSFRS-R	N/A	N/A	34 (9-43)	34 (8-44)	40 (32-45)	40 (35-44)	34 (9-46)	34 (8-48)

Numbers of individuals are indicated in brackets. Data are expressed as median and range.

Table 2. Total fatty acid composition of blood lipids.

Men				
	Serum		Blood cells	
	Healthy (29)	ALS (25)	Healthy (29)	ALS (25)
Σ SFA	38.10±0.49	37.58±0.49	39.48±0.29	39.82±0.89
Σ MUFA	26.61±0.73	28.95±0.78 ^a	20.43±0.36	24.23±0.75 ^c
Σ PUFA	35.28±0.93	33.47±0.83	40.09±0.44	35.95±1.20 ^b
Σ ω6 PUFA	31.96±0.90	30.15±0.77	33.18±0.46	30.38±0.91 ^b
Σ ω3 PUFA	3.33±0.19	3.33±0.24	6.91±0.21	5.57±0.36 ^b
Women				
	Serum		Blood cells	
	Healthy (19)	ALS (16)	Healthy (19)	ALS (16)
Σ SFA	39.28±0.50	36.58±0.81 ^c	39.55±0.28	37.67±0.55 ^b
Σ MUFA	24.94±0.67	29.06±1.47 ^a	20.04±0.46	24.15±0.89 ^c
Σ PUFA	35.78±0.89	34.36±1.06	40.41±0.40	38.18±1.04 ^a
Σ ω6 PUFA	32.53±0.80	30.36±0.94	33.93±0.34	32.42±0.90
Σ ω3 PUFA	3.25±0.22	4.00±0.41	6.48±0.30	5.77±0.41

^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001.

Table 3. PUFA composition of blood lipids.

Men				
	Serum		Blood cells	
	Healthy (29)	ALS (25)	Healthy (29)	ALS (25)
18:2n-6 LA	22.52±0.76	21.35±0.74	16.73±0.46	17.15±0.64
18:3n-6 GLA	0.27±0.02	0.27±0.03	0.17±0.02	0.22±0.03
20:2n-6	0.25±0.009	0.23±0.009	0.24±0.006	0.26±0.01
20:3n-6 DGLA	1.82±0.07	1.66±0.11	1.81±0.07	1.63±0.1
20:4n-6 AA	7.09±0.27	6.63±0.36	14.22±0.31	11.12±0.67 ^c
18:3n-3 ALA	0.50±0.04	0.51±0.07	0.25±0.02	0.32±0.03
20:3n-3	0.009±0.002	0.010±0.002	0.008±0.003	0.01±0.004
20:5n-3 EPA	0.96±0.09	0.74±0.10	1.02±0.07	0.81±0.10
22:5n-3 DPA	0.21±0.10	0.19±0.01	2.26±0.1	1.38±0.13 ^c
22:6n-3 DHA	1.66±0.10	1.87±0.15	3.38±0.14	3.06±0.24
Women				
	Serum		Blood cells	
	Healthy (19)	ALS (16)	Healthy (19)	ALS (16)
18:2n-6 LA	22.37±0.75	20.72±0.76	17.34±0.43	18.53±0.84
18:3n-6 GLA	0.24±0.02	0.30±0.03	0.19±0.02	0.27±0.03
20:2n-6	0.23±0.01	0.24±0.012	0.24±0.006	0.27±0.01 ^a
20:3n-6 DGLA	2.09±0.11	1.96±0.18	1.97±0.07	1.89±0.12
20:4n-6 AA	7.58±0.33	7.14±0.43	14.19±0.32	11.46±0.61 ^c
18:3n-3 ALA	0.36±0.03	0.88±0.34	0.23±0.02	0.56±0.17 ^a
20:3n-3	0.005±0.002	0.01±0.005	0.02±0.003	0.01±0.004
20:5n-3 EPA	0.88±0.1	0.90±0.14	0.91±0.07	0.91±0.13
22:5n-3 DPA	0.21±0.01	0.18±0.02	1.97±0.1	1.24±0.13 ^c
22:6n-3 DHA	1.81±0.15	2.03±0.11	3.35±0.26	3.05±0.20

^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001.

Table 4. Relative activity of PUFA metabolism.

Men				
	Serum		Blood cells	
	Healthy (29)	ALS (25)	Healthy (19)	ALS (16)
FADS1 20:4n-6/20:3n-6	4.04±0.19	4.28±0.32	8.19±0.37	7.15±0.50
FADS2 18:3n-6/18:2n-6	0.01±0.001	0.01±0.002	0.01±0.001	0.01±0.002
ELOVL2 22:5n-3/20:5n-3	0.30±0.04	0.35±0.05	2.62±0.25	2.39±0.40
ELOVL5 20:3n-6/18:3n-6	7.59±0.63	7.85±0.93	12.48±0.99	11.23±1.40
AA/LA	0.32±0.01	0.32±0.02	0.87±0.03	0.67±0.05 ^c
EPA/ALA	2.22±0.26	2.00±0.40	4.83±0.59	3.05±0.41 ^a
Women				
	Serum		Blood cells	
	Healthy (29)	ALS (25)	Healthy (19)	ALS (16)
FADS1 20:4n-6/20:3n-6	3.73±0.21	3.92±0.34	7.38±0.31	6.44±0.58
FADS2 18:3n-6/18:2n-6	0.01±0.001	0.01±0.002	0.01±0.002	0.02±0.002
ELOVL2 22:5n-3/20:5n-3	0.28±0.03	0.30±0.06	2.43±0.24	1.77±0.30
ELOVL5 20:3n-6/18:3n-6	9.51±0.85	7.71±0.91	13.01±1.32	10.14±2.27
AA/LA	0.35±0.02	0.35±0.02	0.83±0.04	0.65±0.06 ^c
EPA/ALA	2.65±0.30	1.63±0.25 ^a	4.24±0.37	2.54±0.46 ^b

^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001.

Table 5. ROC analysis of blood cell PUFA parameters in ALS and healthy subjects.

	AUC	<i>P</i> -value	J	Cut-off	Sp	Sn	LR+	LR-
DPA 22:5n-3	0.86	<0.0001	0.63	1.45	95.8	66.7	15.9	0.35
AA 20:4n-6	0.81	<0.0001	0.54	12.38	91.7	62.5	7.5	0.41
AA/LA	0.76	<0.0001	0.52	0.68	89.6	62.5	6.0	0.42
EPA/ALA	0.76	<0.0001	0.44	2.39	89.6	54.2	5.2	0.51

AUC, area under the curve; J, Youden index, Sp, specificity; Sn, sensibility.

Table 6. ROC analysis of blood cell PUFA parameters in ALS and SBMA subjects.

	AUC	<i>P</i> -value	J	Cut-off	Sp	Sn	LR+	LR-
DPA 22:5n-3	0.87	0.0012	0.69	1.87	85.7	83.3	5.8	0.19
AA 20:4n-6	0.81	0.0075	0.54	13.53	78.6	75.0	3.5	0.32
AA/LA	0.89	0.00083	0.68	0.89	92.9	75.0	10.6	0.27
EPA/ALA	0.78	0.0157	0.5	4.91	100	50.0	-	0.50

AUC, area under the curve; J, Youden index, Sp, specificity; Sn, sensibility.

Table 7. Correlation between desaturation indices and blood cell PUFA parameters.

	DPA 22:5n-3	AA 20:4n-6	AA/LA	EPA/ALA
16:1n-7/16:0	-0.466 ^c	-0.431 ^b	-0.407 ^b	-0.431 ^b
18:1n-9/18:0	-0.716 ^d	-0.596 ^d	-0.535 ^d	-0.346 ^a

^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001, ^dp<0.0001.

Table 8. Cox proportional hazard models for serum ω 3 PUFA parameters

Total ω 3 PUFAs				
Variate	Item	HR	95% CI	P-value
Age (years)	-	1.034	1.0084 to 1.060	0.0071
BMI (kg/m ²)	-	0.922	1.0000 to 1.084	0.0404
Site of onset	Spinal	0.393	0.211 to 0.736	0.0037
	Bulbar	2.542	1.359 to 4.733	0.0037
Duration (days)	-	1.000	0.999 to 1.0000	0.0589
ALSFRS-R group	[0-35]	1 (ref)	-	-
	[36-39]	0.435	0.210 to 0.839	0.0121
	[40-42]	0.357	0.056 to 1.248	0.1167
	[>42]	0.232	0.037 to 0.809	0.0186
Total ω 3 PUFAs * Gdr	-	1.172	1.022 to 1.343	0.0119
ω 3/ ω 6 ratio				
Variate	Item	HR	95% CI	P-value
Age (years)	-	1.032	1.007 to 1.058	0.0097
BMI (kg/m ²)	-	0.924	0.849 to 0.998	0.0441
Site of onset	Spinal	0.406	0.220 to 0.754	0.0046
	Bulbar	2.461	1.326 to 4.537	0.0046
Duration (days)	-	1.000	1.000 to 1.0000	0.0551
ALSFRS-R group	[0-35]	1 (ref)	-	-
	[36-39]	0.445	0.215 to 0.855	0.0142
	[40-42]	0.343	0.054 to 1,196	0.1007
	[>42]	0.231	0.037 to 0.801	0.0175
ω 3/ ω 6 ratio * Gender	-	71,024	1.522 to 3313.982	0.0133
ω 3 index DHA (22:6n-3)+EPA (20:5n-3)				
Variate	Item	HR	95% CI	P-value
Age (years)	-	1.030	1.0056 to 1.055	0.0149
BMI (kg/m ²)	-	0.920	0.845 to 0.994	0.0345
Site of onset	Spinal	0.385	0.207 to 0.720	0.0030
	Bulbar	2.596	1.388 to 4.831	0.0030
Duration (days)	-	1.000	0.999 to 1.0000	0.675
ALSFRS-R group	[0-35]	1 (ref)	-	-
	[36-39]	0.451	0.218 to 0.865	0.0157
	[40-42]	0.340	0.054 to 1.183	0.0970
	[>42]	0.229	0.036 to 0.802	0.0179
DHA+EPA * Gender	-	1.169	1.003 to 1.363	0.0233

ALSFRS-R was categorized into four groups (Gordon et al., 2013). Gdr, Gender.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. PUFA and MUFA indices in ALS and SBMA patients. Levels of DPA (22:5n-3) (A) and AA (20:4n-6) (B), as well as EPA/ALA (C), AA/LA (D), 16:1n-7/16:0 (E) and 18:1n-9/18:0 (F) ratio in SBMA (grey columns) and ALS (black columns) patients.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 2. Survival analysis of $\omega 3$ PUFAs. Kaplan-Meier curves of survival in the subgroups of ALS women as determined by median values of total $\omega 3$ PUFAs (A), $\omega 3/\omega 6$ ratio (B) and $\omega 3$ index DHA+EPA (C). Survival was the interval between the point of blood collection and death.

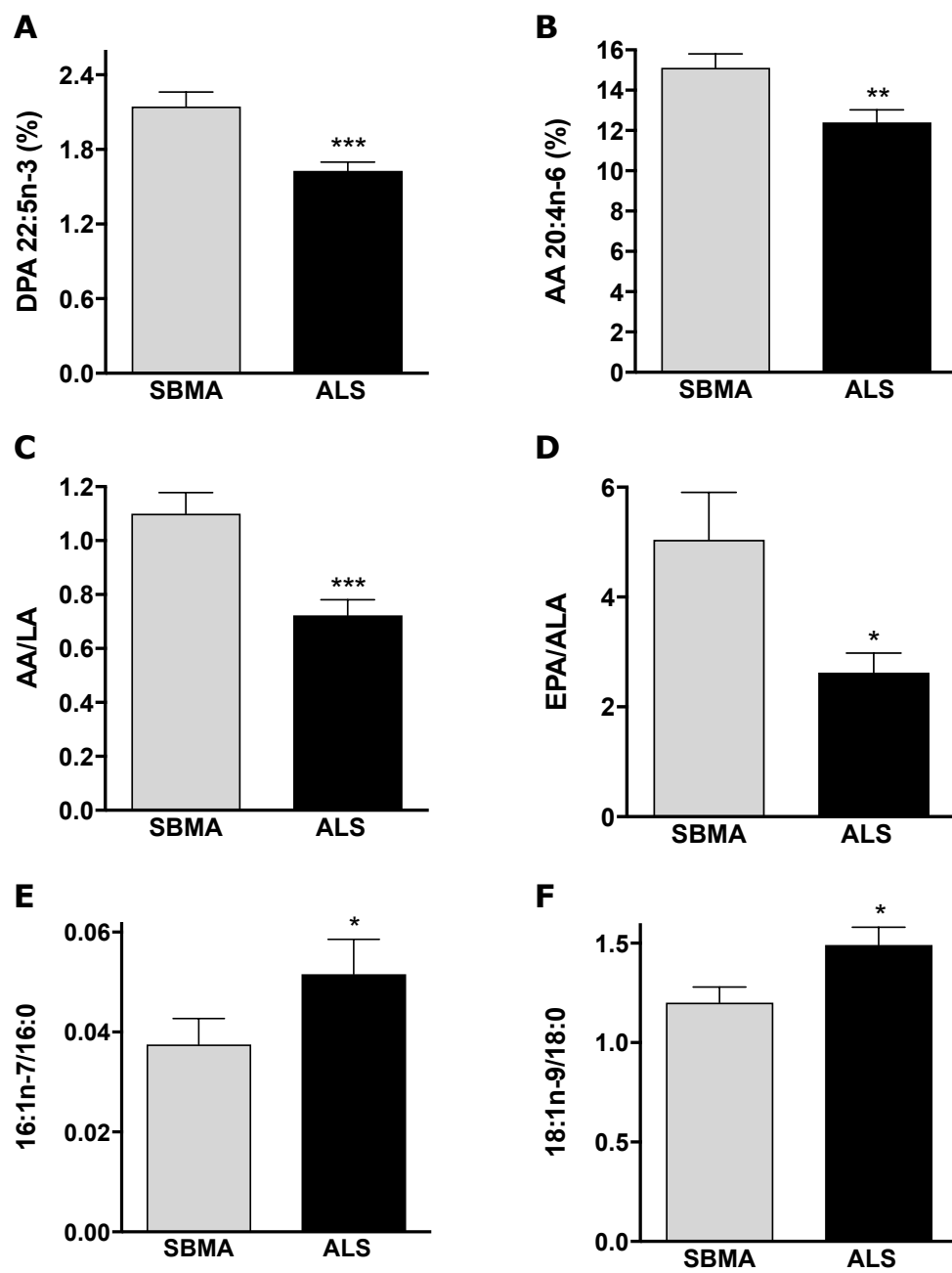


Figure 1

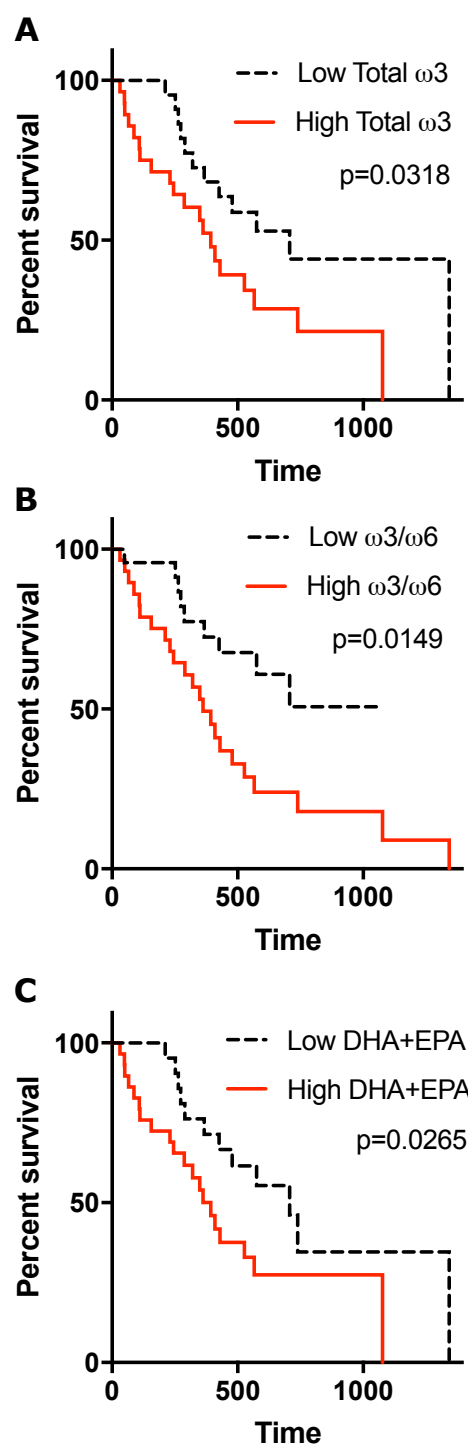


Figure 2

CHAPITRE IV

Modulation de la composition en PUFA : étude pré-clinique sur un modèle de dénervation

I. Introduction

Les données présentées dans le chapitre précédent nous ont indiqué qu'il existe des altérations dans la composition en omega-3 des lipides chez les patients atteints de SLA. A ce jour, peu d'études se sont intéressées aux rôles qu'occupent ces acides gras au niveau de la jonction neuromusculaire, qui est un acteur clé du processus pathologique de la SLA. L'étude de Lewis et collaborateurs a montré, chez des sujets sportifs, qu'une supplémentation en omega-3 permettait une augmentation des performances via une amélioration de la transmission neuromusculaire (Lewis et al., 2015). Par ailleurs, l'étude d'Aïd et collaborateurs a montré qu'un régime dépourvu d'omega-3 entraînait, au niveau hippocampique, des modifications de la libération d'acétylcholine, qui est le neurotransmetteur également retrouvé au niveau de la jonction (Aïd et al., 2003). Ces observations nous ont amenés à nous poser la question suivante : *Les PUFA participent-ils au phénomène de dénervation si caractéristique de la maladie ?*

Notre étude sur des patients atteints de SLA a révélé une diminution significative des proportions de DPA dans le sang par comparaison à des sujets contrôles. Et nous savons également, d'après la littérature, que le DPA est un omega-3 qui a de nombreuses propriétés bénéfiques (Kaur et al., 2011). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse qu'une supplémentation en DPA serait bénéfique à l'axe neuromusculaire et plus précisément sur sa récupération fonctionnelle après lésion. Pour cela, nous avons mis en place un protocole de supplémentation en DPA par gavage sur des animaux ayant subi une lésion du nerf sciatique, constituant ainsi un modèle de dénervation expérimentale. Nous avons opté pour le gavage comme moyen d'administration de l'acide gras car il permet, d'une part, une assimilation naturelle via la digestion et d'autre part, il permet de contrôler précisément la dose administrée aux animaux.

II. Matériels et méthodes

1. Animaux et traitement

Des souris adultes mâles de souche FVB/N âgées d'environ 90 jours, provenant des laboratoires Janvier (Le Genest-Saint-Ile, France), ont été maintenues dans notre animalerie

à une température de 23°C et selon un cycle jour/nuit de 12h. Les animaux avaient accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Les croquettes A04 standards ont été utilisées. Les animaux ont reçu une dose quotidienne de DPA par gavage. La dose administrée était de 50mg/kg de DPA dilué dans du polyéthylène glycol 5%. Les souris contrôles ont reçu une dose équivalente de polyéthylène glycol (Figure 1) (comité d'éthique de l'Université de Strasbourg N° AL/01/20/09/12 et AL/15/44/12/12).

2. Lésion nerveuse

La lésion axonale réalisée sur les animaux consistait en une compression *in situ* du nerf sciatique, à mi-hauteur de la cuisse, à l'aide d'une pince plate pendant 20 secondes. Les animaux avaient été préalablement anesthésiés à l'aide d'un mélange kétamine 5% et xylazine 3.3%, injecté en intra-péritonéal. Les souris ont été placées, après chirurgie, sous une lampe chauffante et surveillées jusqu'à leur réveil. Un antalgique (Advil) a été administré aux souris, via l'eau de boisson, durant le reste de l'expérience.

3. Suivi des animaux

Le suivi des animaux a consisté, dans un premier temps, à mesurer le poids et évaluer visuellement le réflexe d'extension des pattes postérieures et des doigts. Ces deux réflexes sont obtenus en soulevant l'animal par la queue et apparaissent comme étant particulièrement altéré en cas de lésion nerveuse (Gobrecht et al., 2014). Ces réflexes ont été cotés de 0 à 2, 0 correspondant à l'absence totale de réflexe et 2 correspondant à un réflexe normal. Un test d'agrippement a également été réalisé sur les membres postérieurs des animaux.

Dans un second temps, un suivi plus détaillé a été réalisé à l'aide du système Catwalk (Noldus Information Technology, Wageningen, Pays-Bas). Ce système permet l'évaluation de nombreux paramètres moteurs de la souris. Le test a consisté à réaliser 3 passages, par souris, dans un tunnel de 1.5m de long en respectant certains paramètres que le logiciel considère comme corrects. Les animaux ont été placés, chacun leur tour, à une extrémité du tunnel et ont dû réaliser leurs 3 passages en moins de 10 secondes chacun pour qu'ils soient validés. Ensuite, une analyse sur logiciel a été réalisée.

4. Collecte des échantillons

La procédure suivie pour la collecte des échantillons a été la même que celle qui a été présentée dans le chapitre II section 3.

5. Extraction des lipides totaux et chromatographie gazeuse

La technique d'extraction des lipides totaux ainsi que le protocole de chromatographie gazeuse ont été présentées en détail dans le chapitre II sections 4 et 5.

6. Histologie du nerf sciatique

Les nerfs sciatiques ont été prélevés et fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 2 heures puis rincés et conservés dans une solution de PBS. Les tissus ont ensuite été placés dans une solution de cryoprotection composée de PBS supplémenté en sucrose à 25%, sur une durée de 48h et gardés à +4°C. Par la suite, les échantillons ont été placés dans le milieu OCT Tissue Tek (Sakura, Alphen aan den Rijn, Pays-Bas) afin d'être coupés au cryostat (Leica, Nanterre, France). Des coupes longitudinales d'une épaisseur de 12µm ont été réalisées à une température de -32°C. Une coloration au bleu de Toluidine a ensuite été effectuée. Les échantillons ont été placés pendant 45 secondes dans la solution de coloration puis rincés délicatement à l'eau. Les coupes ont ensuite été séchées pendant 20 minutes à 40°C et placées dans une solution d'histoclear (National Diagnostics, Atlanta, GE). Les lames ont été montées avec le milieu Roti-Histo-Kitt (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) et les images ont été faites à l'aide du microscope Nikon Eclipse E800 (Tokyo, Japon).

7. Marquage des jonctions neuro-musculaires

Les muscles Extenseur Digital Long (EDL) des pattes contralatérale et ipsilatérale à la lésion ont été prélevés et fixés dans une solution de PFA à 4% pendant 2 heures. Après rinçage au PBS, les fibres de ces muscles ont été séparées délicatement sous une lentille binoculaire et

conservées dans une solution de PBS à +4°C jusqu'à l'étape de marquage. Pour cette étape, les fibres ont été incubées 30 minutes dans une solution de PBS contenant de la BSA à 3% et du triton à 0.5%. Ensuite, les anticorps primaires ont été ajoutés et l'ensemble a été mis à incuber toute la nuit sur agitateur à température ambiante. Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps anti-synaptophysine (Lapin, Eurogentec, Liège, Belgique) et l'anticorps anti-neurofilament (Lapin, Eurogentec), dilués au 1/50. Après 3 lavages successifs de 10 minutes chacun, avec une solution de PBS-Triton 0.1%, l'anticorps secondaire d'âne anti-lapin Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) ainsi que la bungarotoxine couplée à la rhodamine (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés, dilués au 1/400. L'ensemble a été mis en incubation pendant 1h30 sur agitateur, à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter. Trois rinçages successifs de 10 minutes ont de nouveau été réalisés au PBS-Triton 0.1% puis les échantillons ont été montés sur lame à l'aide de l'aquapolymer (PolySciences Inc., Warrington, PA) comme milieu de montage. Les images ont été réalisées à l'aide du microscope à fluorescence Nikon Eclipse E800 (Tokyo, Japon).

8. RT-qPCR

Cette technique a été présentée dans la section Matériels et Méthodes du chapitre II.

9. Analyse statistique

Des t-tests ont été réalisés pour les comparaisons entre deux groupes. Pour évaluer l'effet du traitement, des ANOVA à deux voies ont été réalisées. Les données sont exprimées par la moyenne $\pm$ sem. Le logiciel Prism 6.0 a été utilisé (GraphPad, San Diego, CA) pour les analyses statistiques.

III. Résultats

1. Mise au point du traitement au DPA par gavage sur des souris sauvages

La première partie de cette étude a été dédiée à la mise au point de la supplémentation en DPA par gavage sur des animaux sauvages. Pour établir un protocole correct et pour évaluer

les effets d'un apport en DPA, nous avons testé différentes doses de cet acide gras sur des souris WT : 50mg/kg, 150mg/kg et 300mg/kg, sur une période de 10 jours. Le déroulement de ce protocole est présenté en Figure 1.

A la suite de la période de gavage, nous avons testé un certain nombre de paramètres afin d'évaluer l'effet de la supplémentation en DPA. Dans un premier temps, nous avons évalué les modifications, dans la composition en acides gras au niveau circulant et tissulaire, à l'aide de chromatographies gazeuses. La dose 50mg/kg est la seule qui a eu les effets attendus, à savoir l'augmentation du DPA ou de ses produits, c'est pourquoi seuls les résultats correspondant à cette dose-ci seront présentés (Figures Supplémentaires 1-4). Dans le culot sanguin, parmi les trois grandes familles d'acides gras, les proportions de SFA ont diminué significativement après traitement. Les proportions de MUFA sont restées inchangées et celles de PUFA présentent une tendance à l'augmentation (Figures 2 A-C). Au sein des PUFA, nous avons noté une augmentation significative des proportions d'omega-3 chez les animaux traités (Figure 2D), et il est intéressant de préciser qu'après la supplémentation en DPA, ce n'est pas les proportions en DPA lui-même qui sont augmentées, mais celles de son produit, le DHA (Figures 2E et 2F). Au niveau tissulaire, les modifications dans les profils d'acides gras sont très similaires. Nous retrouvons la tendance à l'augmentation des proportions de PUFA ainsi que les augmentations significatives des taux d'omega-3 et de DHA (Figures 3A-F). La supplémentation en DPA, à la dose de 50mg/kg, suffit à modifier significativement les profils d'acides gras à la fois au niveau systémique et tissulaire.

L'augmentation des proportions en omega-3 ayant comme effet majeur la stimulation de la consommation des graisses par accroissement du métabolisme oxydatif (Sampath and Ntambi, 2005), nous avons voulu étudier l'effet de notre supplémentation en DPA sur l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif, dans le muscle gastrocnémien. Les résultats indiquent une augmentation significative de l'expression des gènes FAT/CD36, PDK4 et PGC1 α (Figures 4A-C). Par ailleurs, il est important de noter que cette augmentation de l'expression des gènes du métabolisme oxydatif s'accompagne d'une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le traitement des radicaux libres responsables du stress oxydant, tels que SOD1 et GPX (Figures 4D et 4E).

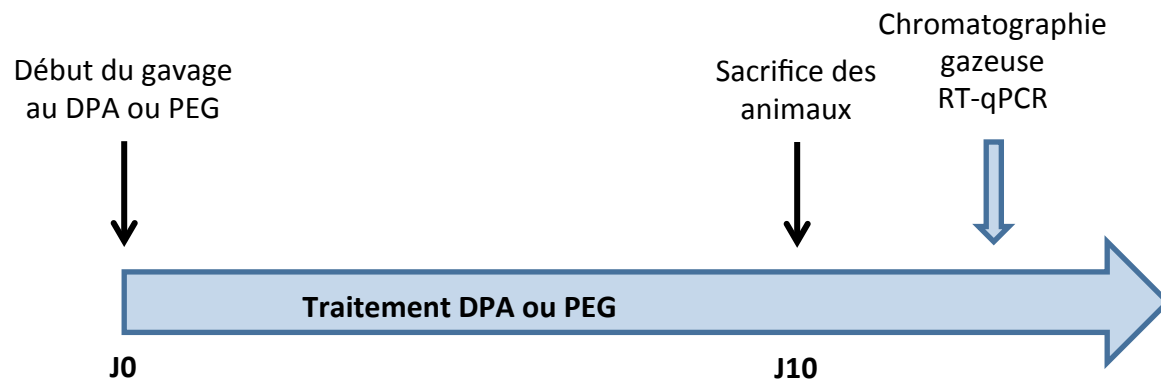


Figure 1. Déroulement de l'expérience

Déroulement de l'expérience de gavage au DPA à la dose de 50mg/kg chez des souris WT ayant subi une lésion partielle du nerf sciatique, n=6-7.

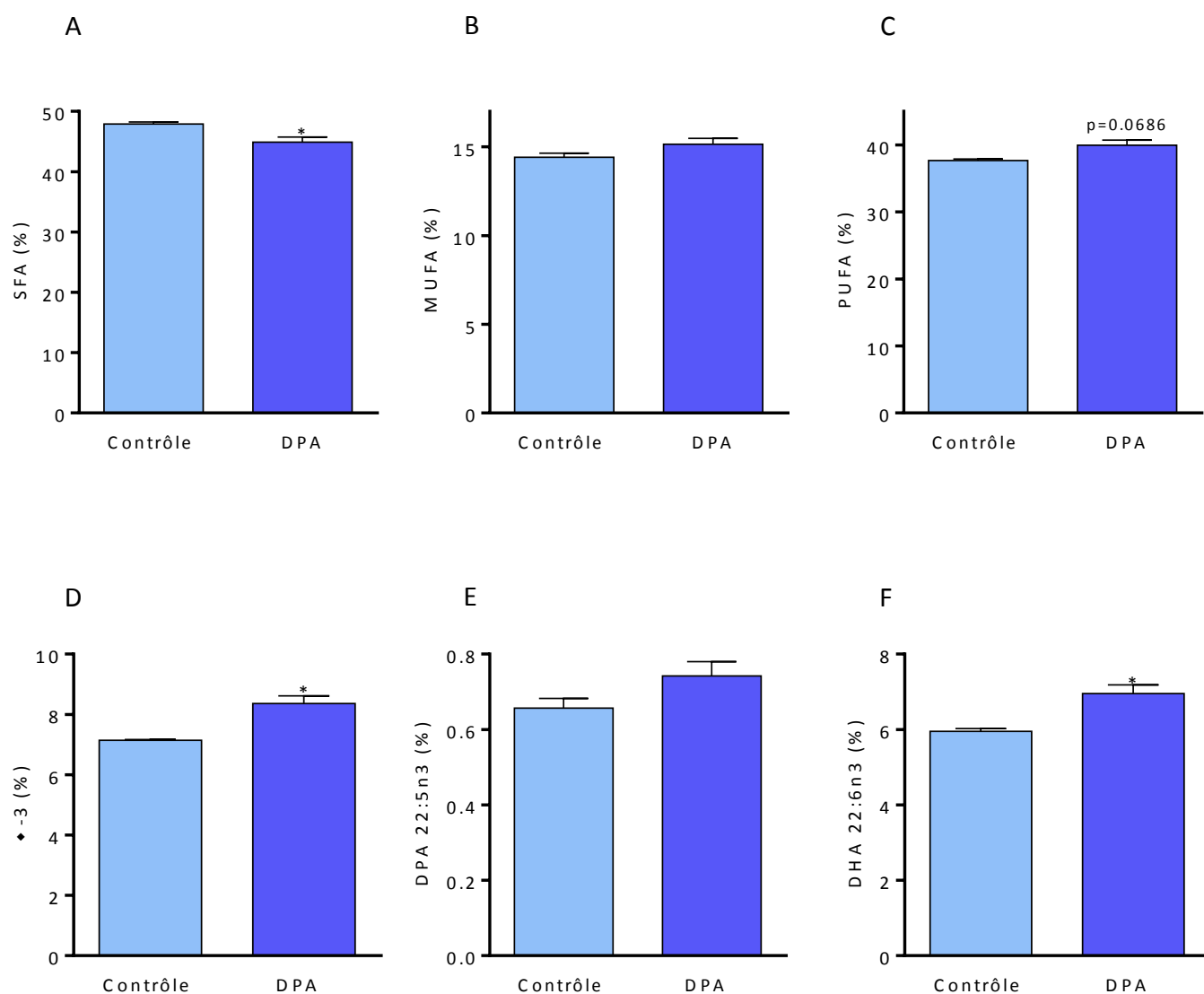


Figure 2. Proportions des acides gras dans le culot sanguin après traitement au DPA

Proportions en SFA totaux (A), MUFA totaux (B), PUFA totaux (C), omega-3 totaux (D), DPA (E) et DHA (F) chez des animaux contrôles et des animaux ayant reçu le traitement au DPA à la dose 50mg/kg, n=3-5, t-test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

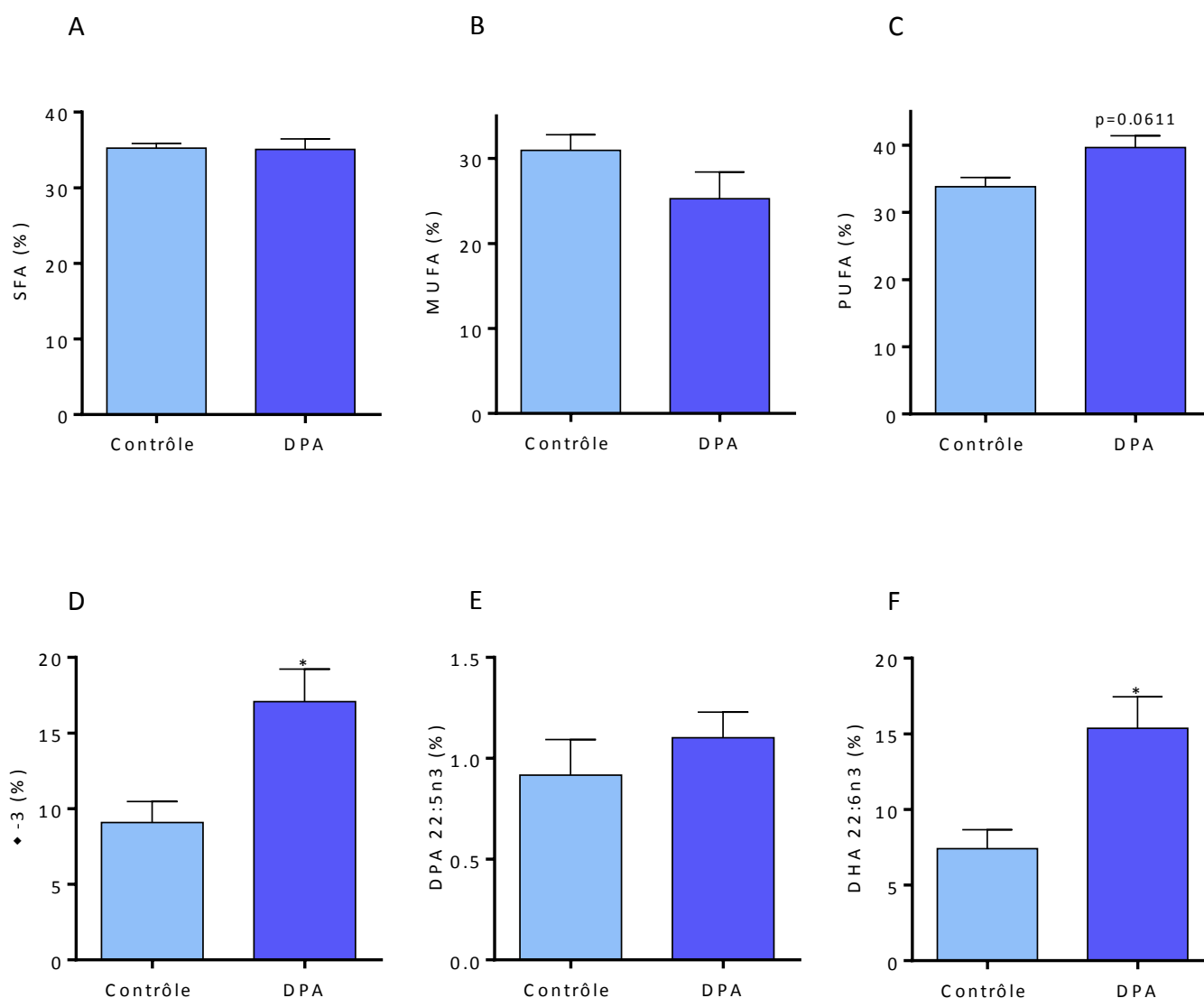


Figure 3. Proportions des acides gras dans le muscle gastrocnémien après traitement au DPA

Proportions en SFA totaux (A), MUFA totaux (B), PUFA totaux (C), omega-3 totaux (D), DPA (E) et DHA (F) chez des animaux contrôles et des animaux ayant reçu le traitement au DPA, n=3-5, t-test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

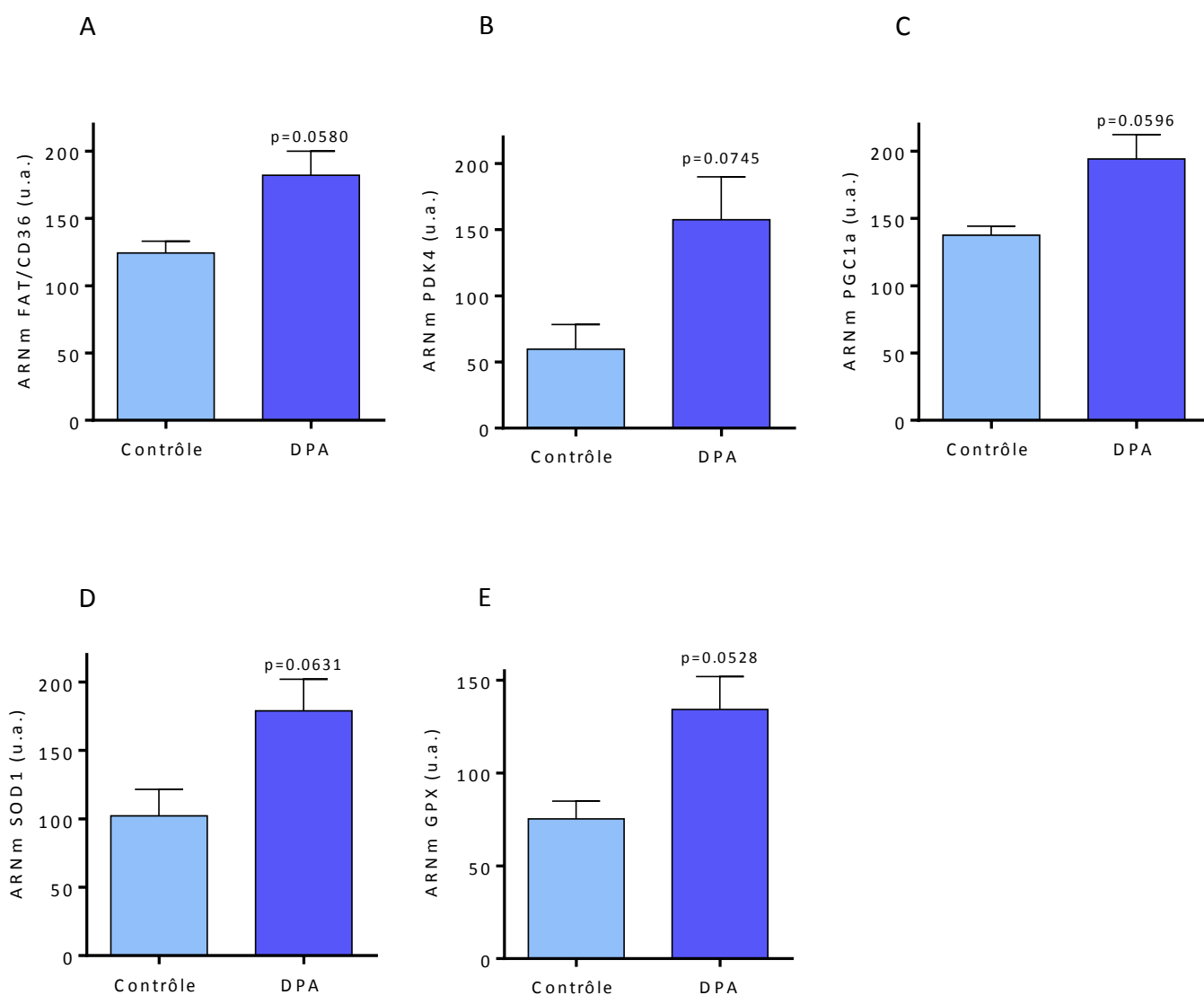


Figure 4. Expression des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif et le stress oxydant dans le muscle gastrocnémien après traitement au DPA

Expression des ARNm des gènes FAT/CD36 (A), PDK4 (B), PGC1a (C), SOD1 (D) et GPX (E), n=3-5, t-test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

2. Effet du traitement au DPA sur la récupération fonctionnelle après lésion nerveuse

Dans une seconde partie, nous avons voulu évaluer l'effet de la supplémentation en DPA sur la récupération de l'activité nerveuse après une lésion nerveuse. Le protocole suivi pour cette section est présenté en Figure 5.

2.1. Suivi fonctionnel

En premier lieu, nous avons évalué l'effet du traitement sur le poids des animaux. Aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes au cours du traitement (Figure 6A). L'évaluation de la force musculaire, sur la patte lésée, révèle une diminution significative chez les animaux des deux groupes après lésion. De plus, les résultats révèlent que la force musculaire pour la groupe contrôle commence de nouveau à augmenter significativement à partir du 5^{ème} jour tandis que pour le groupe traité, la force musculaire reste à la valeur observée après lésion (Figure 6B).

L'évaluation du réflexe d'extension des doigts révèle qu'après lésion, tous les animaux présentent un réflexe altéré et que les animaux du groupe contrôle récupèrent un réflexe normal plus rapidement que les animaux du groupe traité (Figure 7A). De façon analogue, pour le réflexe d'extension des membres postérieurs, les animaux contrôles récupèrent plus vite que ceux qui ont reçu le traitement. La récupération est de l'ordre de 50% environ au 5^{ème} jour pour le groupe contrôle contre environ 10% pour le groupe traité (Figure 7B).

D'autres paramètres de la démarche des animaux ont été évalués à l'aide du système Catwalk. Tout d'abord, trois paramètres statiques qui sont la longueur, la largeur ainsi que l'aire de l'empreinte des pattes ont été mesurés (Figures 8A-C). Ces 3 paramètres sont significativement diminués après la lésion du nerf sciatique et la récupération est plus faible pour le groupe traité par comparaison au groupe contrôle. L'intensité moyenne des pas a également été mesurée (Figure 8D). On observe aussi une diminution de ce paramètre après la lésion ainsi qu'une meilleure récupération pour le groupe contrôle, bien que la différence ne soit pas significative entre les deux groupes. Le « step cycle », correspondant au temps entre deux appuis consécutifs de la même patte, est diminué après la lésion mais on observe une récupération progressive au cours de l'expérience, identique entre les deux groupes

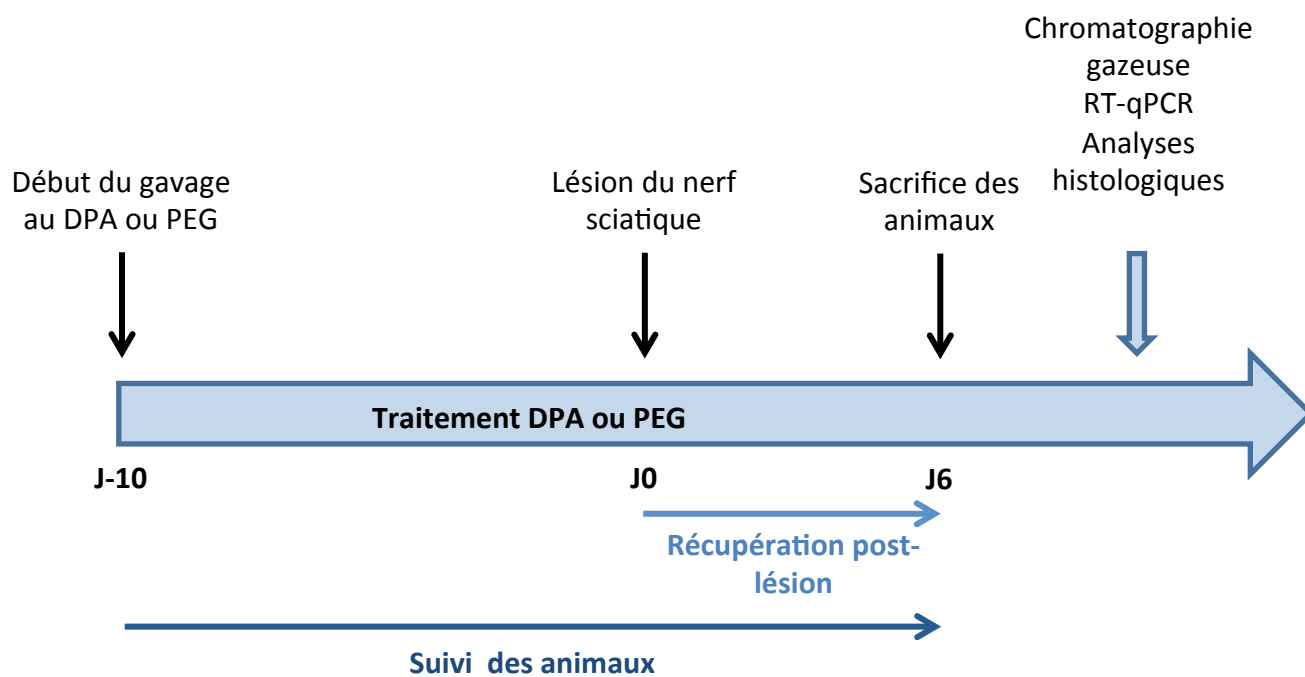


Figure 5. Déroulement de l'expérience

Déroulement de l'expérience de gavage au DPA à la dose de 50mg/kg chez des souris WT ayant subi une lésion du nerf sciatique, n=6-7.

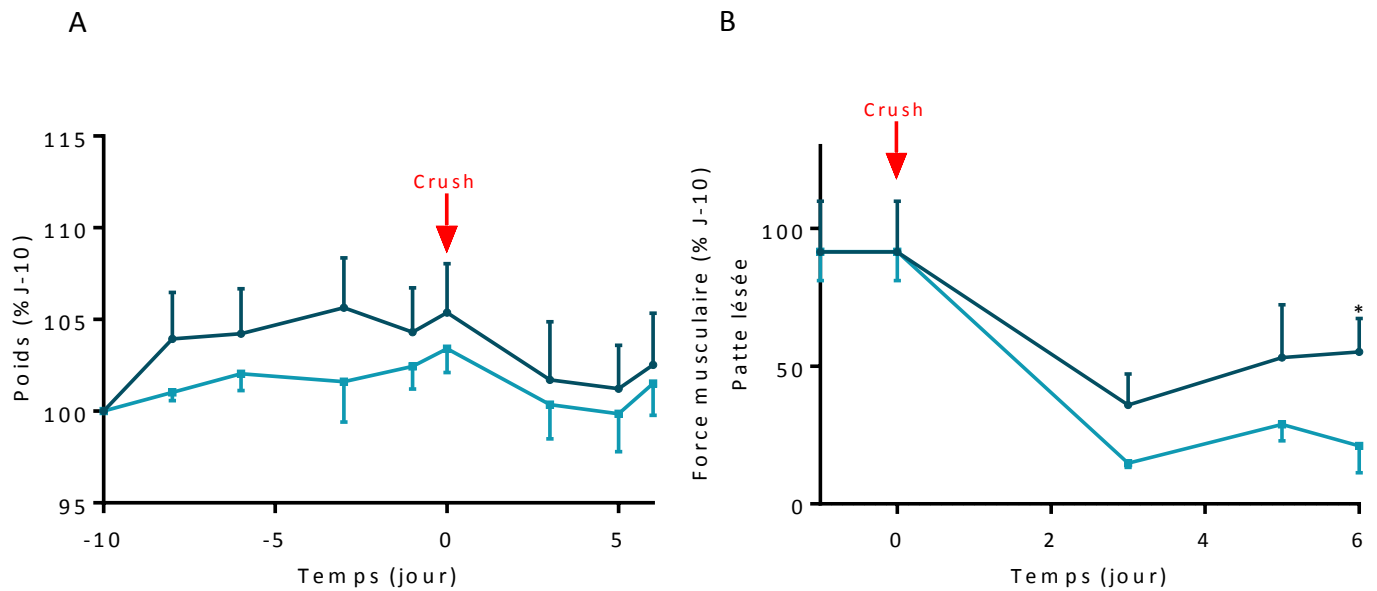


Figure 6. Effet du traitement au DPA sur le poids et la force musculaire

Effet du traitement au DPA sur le poids (A) et la force musculaire (B) des souris WT ayant subi une lésion du nerf sciatique, vert foncé : souris contrôles, vert clair : souris traitées au DPA, n=6-7, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

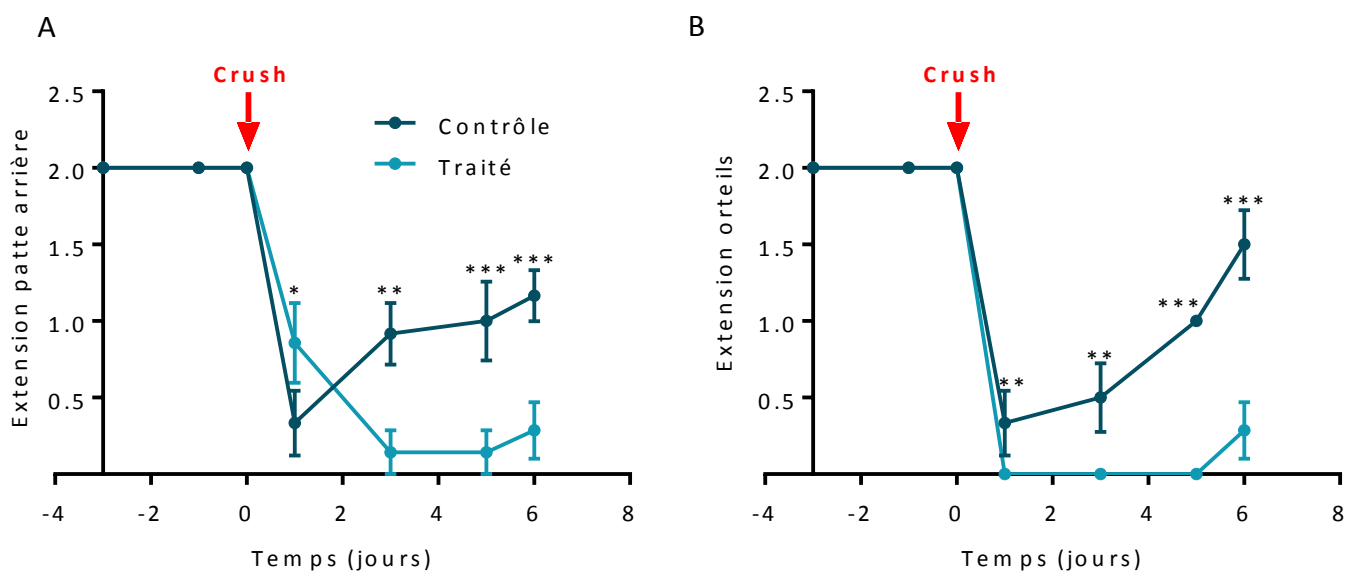


Figure 7. Effet du traitement au DPA sur le réflexe d'extension des doigts et des membres postérieurs

Effet du traitement au DPA sur le réflexe d'extension des pattes postérieures (A) et sur le réflexe d'extension des doigts (B) des souris WT ayant subi une lésion du nerf sciatique, vert foncé : souris contrôles, vert clair : souris traitées au DPA, n=6-7.

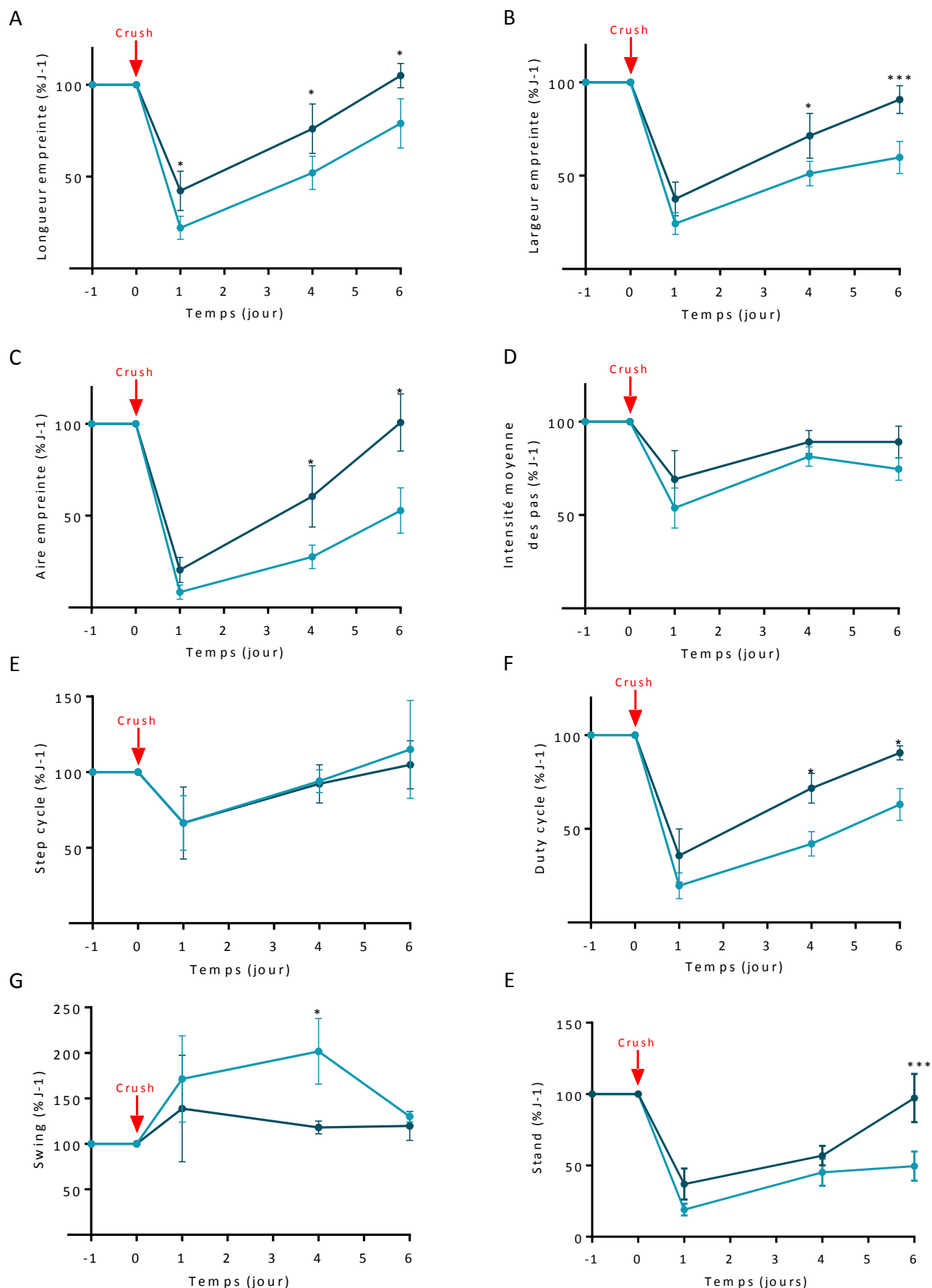


Figure 8. Evaluation des paramètres moteurs des souris à l'aide du système du Catwalk
 Effet du traitement au DPA sur la longueur de l'empreinte (A), la largeur de l'empreinte (B), l'aire de l'empreinte (C), l'intensité moyenne des pas (D), le cycle de pas (E), le cycle d'utilisation (F) et le balancement (G), vert foncé : souris contrôles, vert clair : souris traitées au DPA, n=6-7, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

(Figure 8E). Le « duty cycle » correspond au ratio [appui/appui + balancement], et il est très diminué après la lésion chez les deux groupes (Figure 8F). De manière similaire aux autres paramètres, la récupération est progressive chez les deux groupes mais plus importante et plus rapide pour le groupe contrôle. Enfin, nous avons évalué le « swing » qui correspond à la durée sans contact de la patte avec le sol est augmenté dans le groupe traité par comparaison au groupe contrôle lors de la phase de récupération (Figure 8G). Et à l'inverse, le « stand », qui correspond à la durée de contact de la patte avec le sol, est significativement diminué chez le groupe traité par rapport au groupe contrôle (Figure 8H).

2.2. Les altérations motrices sont associées à une dénervation de l'unité motrice

Des marquages fluorescents des jonctions neuro-musculaires ont été réalisés afin d'évaluer l'état d'innervation des unités motrices. L'observation au microscope a permis de constater la présence de jonctions neuro-musculaires sous 3 états distincts : innervées (Figure 9A), partiellement dénervées et totalement dénervée au niveau du muscle EDL (Figure 9B). Le comptage d'un total de 180 jonctions a permis de faire une classification des différents états et d'évaluer les proportions de chacun. Les résultats nous indiquent 43% de jonctions totalement dénervées et 23% de jonctions partiellement dénervées dans le groupe contrôle alors que pour le groupe traité, 100% des jonctions sont totalement dénervées (Figure 9C). Pour aller plus loin, nous avons également étudié la dénervation en mesurant l'expression de deux gènes musculaires impliqués dans ce processus : les gènes codant pour la sous-unité alpha et epsilon (Figures 9D et 9E). Au cours d'un processus de dénervation, ces gènes sont respectivement augmenté et diminué. La quantification de l'expression de ces deux gènes dans le muscle gastrocnémien de nos deux groupes d'animaux nous révèle bien une augmentation de l'expression de la sous-unité alpha et une diminution de l'expression de la sous-unité epsilon au niveau de la patte lésée par rapport à la patte contralatérale. Par ailleurs, on observe une différence d'expression de la sous-unité cholinergique α dans le groupe traité par rapport au groupe contrôle, ce qui témoigne d'une dénervation plus importante.

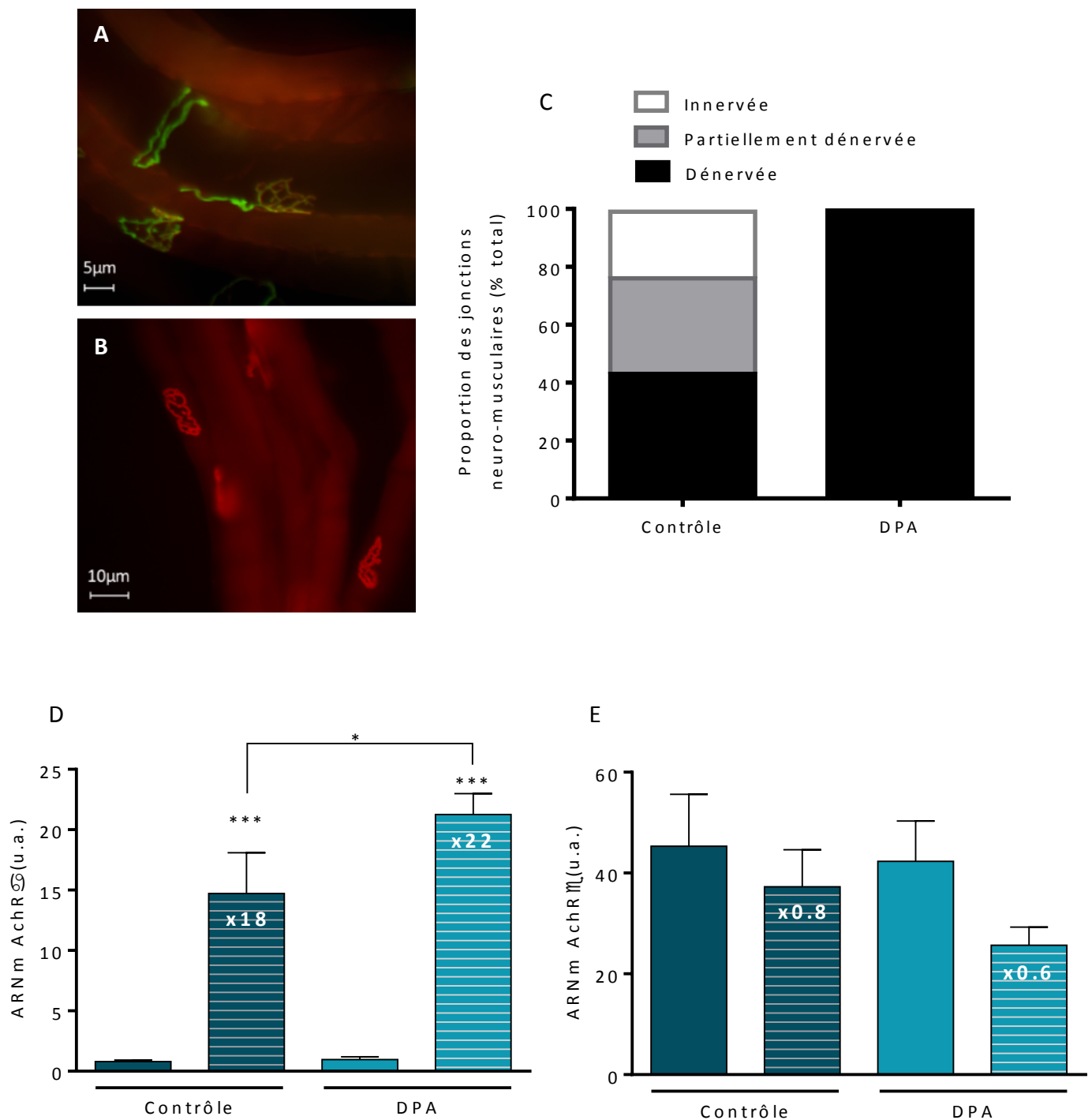


Figure 9. Etat des jonctions neuro-musculaires et état de dénervation après traitement au DPA

Marquages fluorescents présynaptiques (vert) et postsynaptiques (rouge) de jonctions neuro-musculaires partiellement innervée (A) et totalement dénervée (B). Proportions des 3 états de fibres selon chaque condition (contrôle versus DPA) (C) dans le muscle EDL. Expression de l'ARNm des récepteurs cholinergiques α et ϵ selon chaque condition (D et E) dans le muscle gastrocnémien. n=4-6, ANOVA, barres unies : patte contralatérale, barres rayées : patte ipsilatérale, ANOVA, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

2.3. Etat du nerf sciatique

Dans le but d'évaluer l'état du nerf sciatique après lésion dans les deux groupes d'animaux, une coloration au bleu de toluidine a été réalisée. Cette coloration révèle la présence de zones légèrement hypertrophiées, avec une accumulation de nombreuses cellules, et associées avec des vacuolisations au niveau de la patte lésée, correspondant à la zone de compression du nerf lors de la lésion (Figure 10B). Cet aspect n'est pas observé au niveau de la patte contrôle (Figure 10A). Malgré un aspect général plus désorganisé des fibres des nerfs sciatiques dans le groupe traité au DPA, aucun paramètre n'a pu être avancé pour objectiver cette différence (Figures 10 C et D).

IV. Conclusion

Les résultats obtenus par chromatographie gazeuse nous permettent, dans un premier temps, de confirmer que le DPA, administré par gavage, a été correctement assimilé par les animaux et principalement converti en DHA mais cela uniquement pour la dose 50mg/kg, ce qui témoigne d'une fenêtre d'action très mince de l'acide gras en question. De plus, cela nous permet également de dire que la durée de traitement est suffisante puisqu'elle induit bien des changements dans la composition en acides gras.

Par ailleurs, l'observation de changements dans l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif nous permet de prouver que l'assimilation du DPA est suffisante pour entraîner une modulation du métabolisme oxydatif au niveau musculaire. Cependant, il est intéressant de noter qu'elle entraîne aussi une modulation de l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydant, ce qui laisse supposer une augmentation du stress oxydant.

Sur les animaux ayant subi la lésion du nerf sciatique, l'évaluation des réflexes d'extension des doigts et des membres postérieurs révèle des différences très marquées sur la récupération fonctionnelle entre les deux groupes, avec un effet visiblement négatif du DPA sur l'axe neuromusculaire, dans ce contexte. Les paramètres observés via le système Catwalk nous indiquent également une récupération motrice plus lente et plus faible chez les animaux traités par comparaison avec les animaux contrôles.

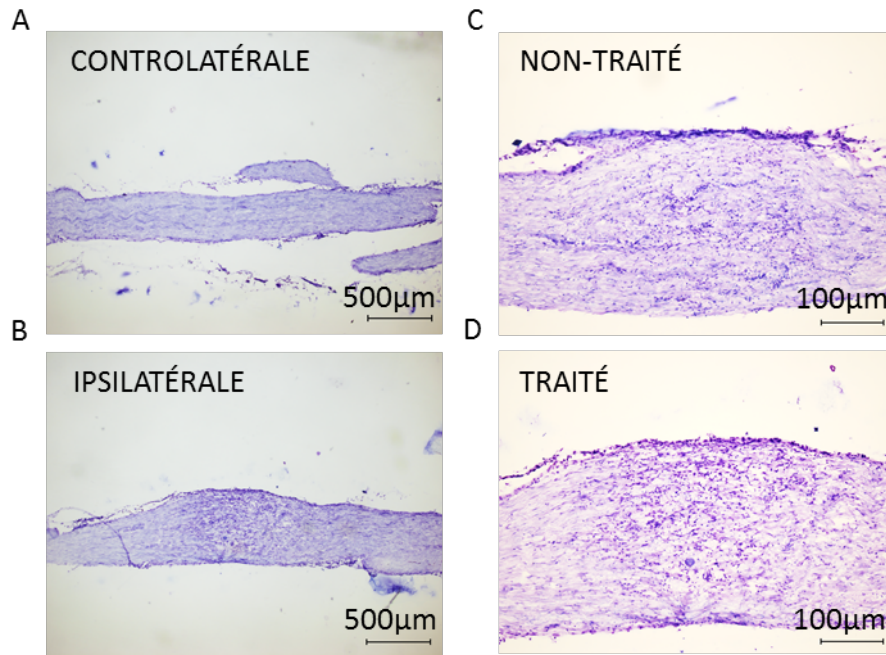


Figure 10. Etat des nerfs sciatiques après lésion et traitement au DPA

Nerfs sciatiques colorés au bleu de Toluidine d'une patte controlatérale (A) et ipsilatérale (B). Images à un plus fort grossissement d'un nerf provenant d'un animal non-traité (C) et traité (D).

Les résultats obtenus à partir de l'étude des jonctions neuromusculaires mettent en évidence un effet négatif du traitement au DPA puisque dans le groupe traité, 100% des jonctions sont totalement dénervées alors que dans le groupe contrôle, on observe une certaine proportion de jonctions intactes ou partiellement dénervées. Pour les études histologiques du nerf sciatique, les résultats obtenus ne sont pas suffisants pour être informatifs sur l'effet du traitement au DPA sur le nerf.

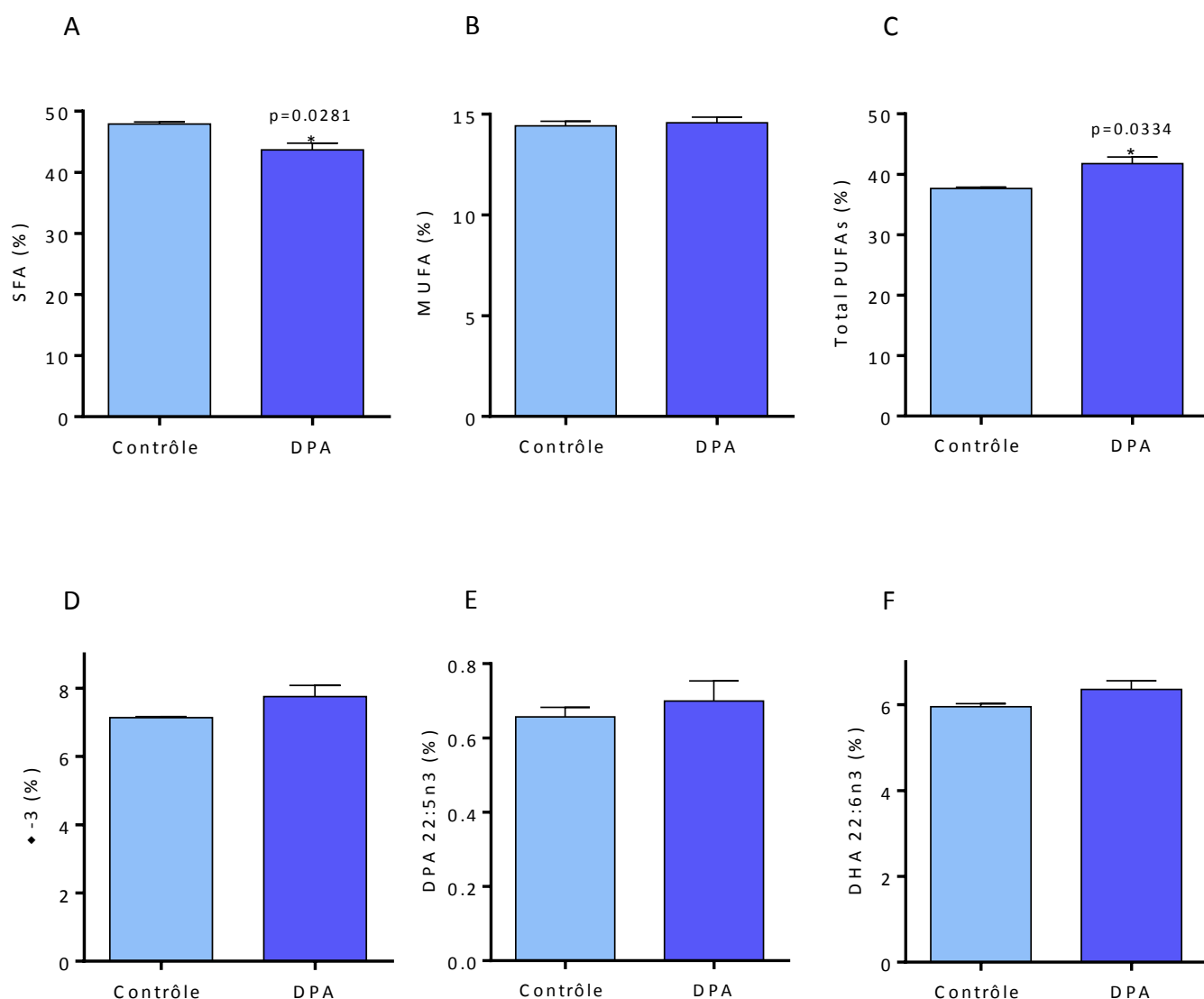


Figure Supplémentaire 1. Proportions des acides gras dans le culot sanguin après traitement au DPA pour la dose 150mg/kg

Proportions en SFA totaux (A), MUFA totaux (B), PUFA totaux (C), omega-3 totaux (D), DPA (E) et DHA (F) chez des animaux contrôles et des animaux ayant reçu le traitement au DPA à la dose 150mg/kg, n=3-5, t-test, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,005$.

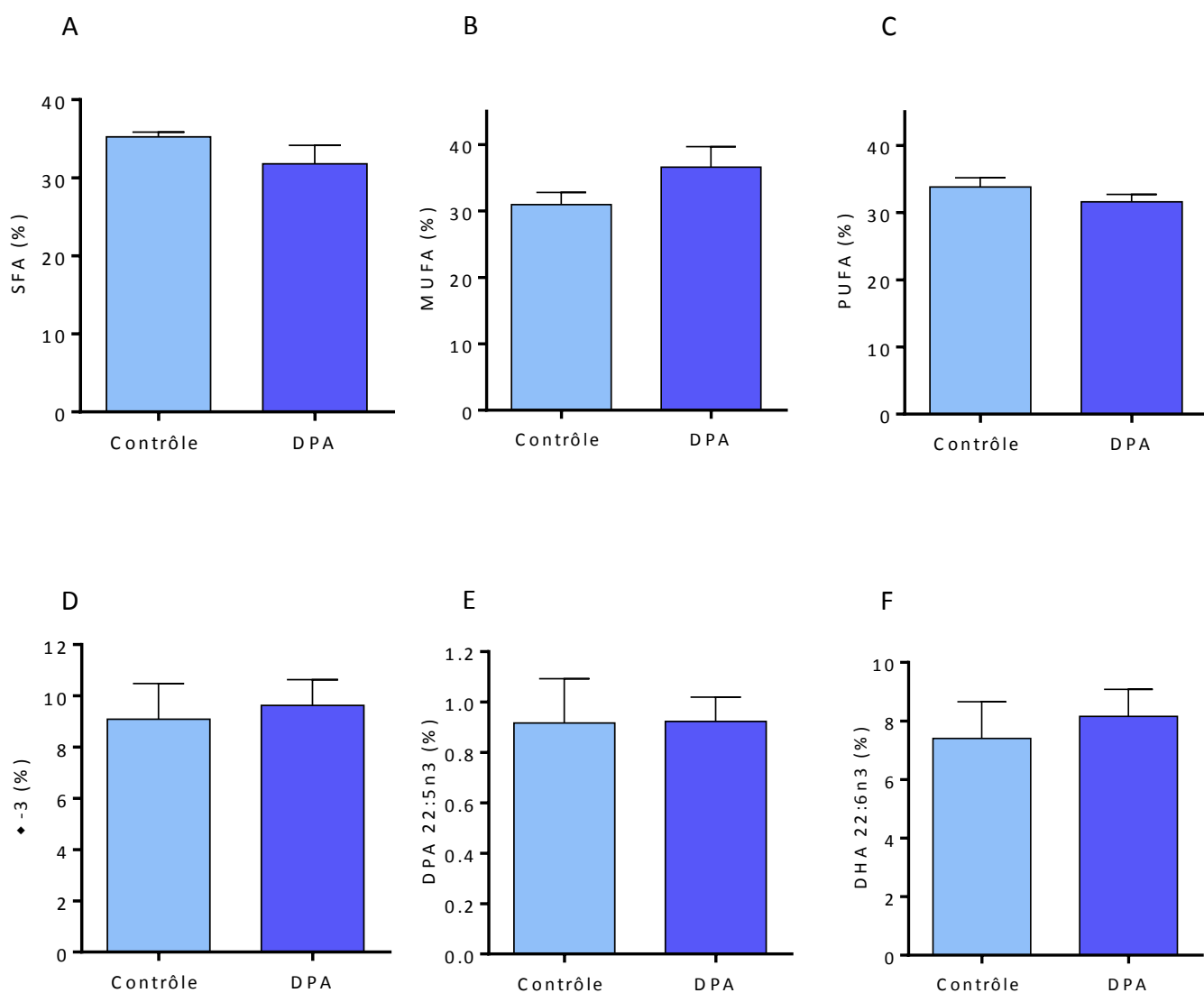


Figure Supplémentaire 2. Proportions des acides gras dans le muscle gastrocnémien après traitement au DPA pour la dose 150mg/kg

Proportions en SFA totaux (A), MUFA totaux (B), PUFA totaux (C), omega-3 totaux (D), DPA (E) et DHA (F) chez des animaux contrôles et des animaux ayant reçu le traitement au DPA à la dose 150mg/kg, n=3-5, t-test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

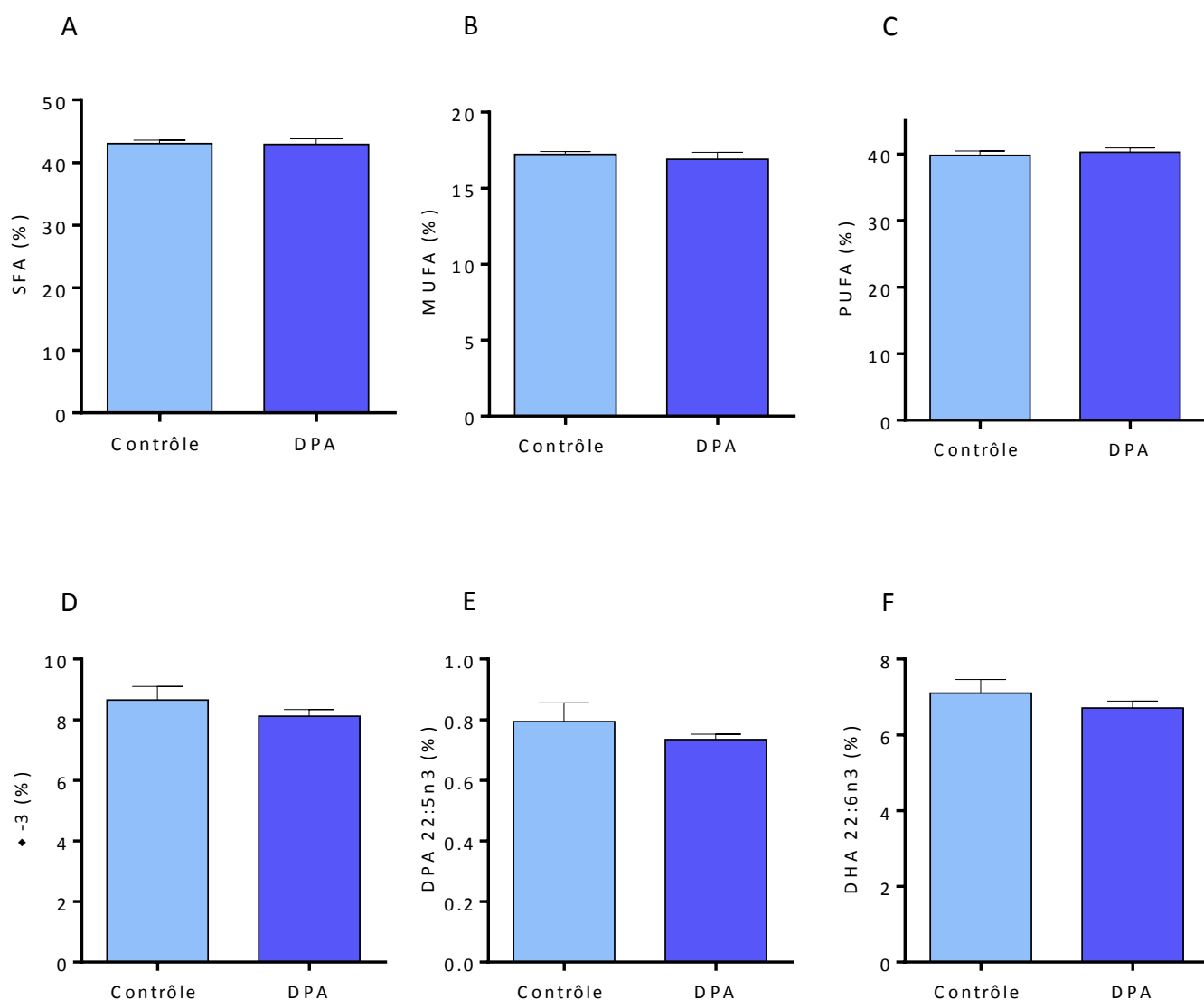


Figure Supplémentaire 3. Proportions des acides gras dans le culot sanguin après traitement au DPA pour la dose 300mg/kg

Proportions en SFA totaux (A), MUFA totaux (B), PUFA totaux (C), omega-3 totaux (D), DPA (E) et DHA (F) chez des animaux contrôles et des animaux ayant reçu le traitement au DPA à la dose 300mg/kg, n=3-5, t-test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

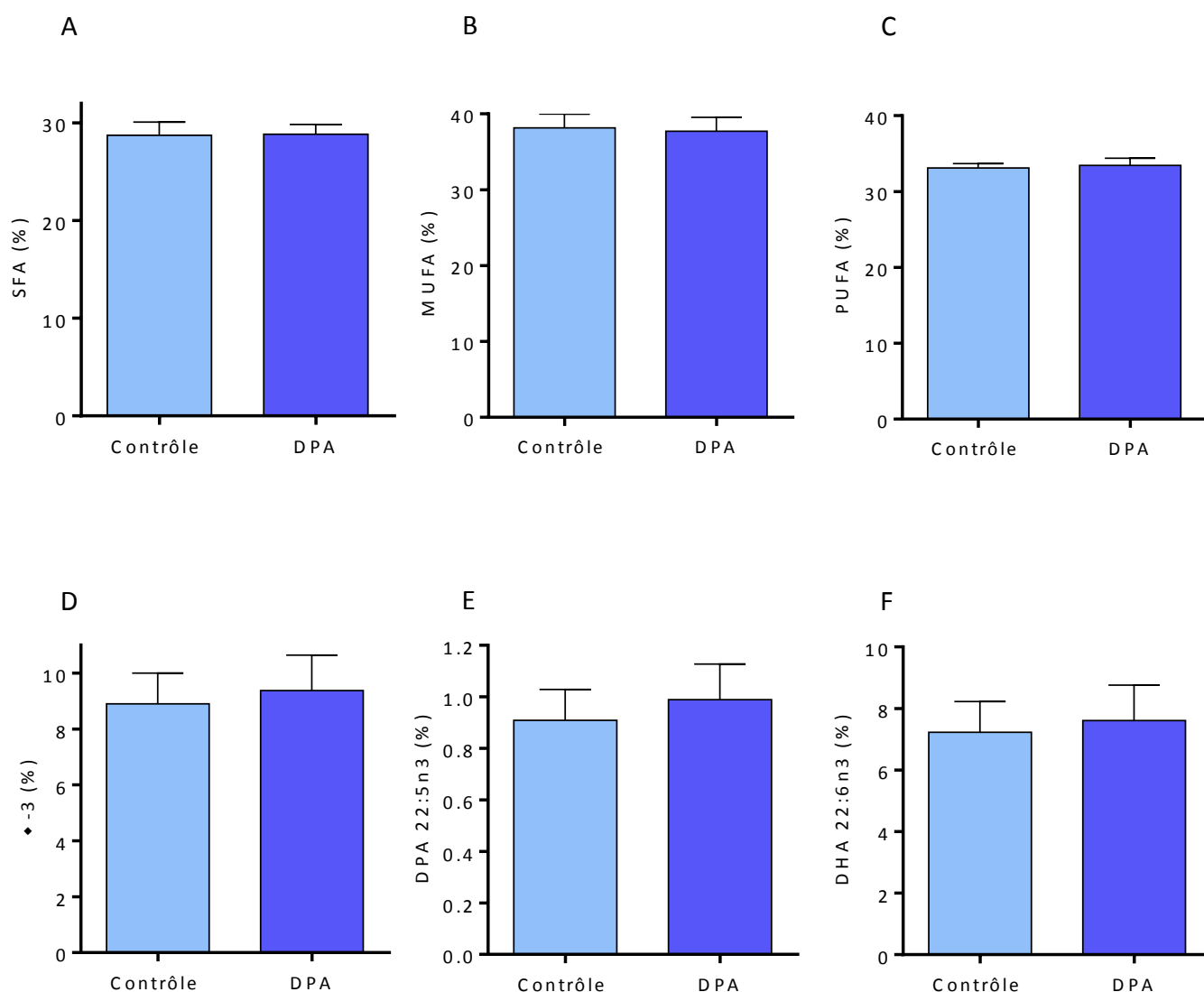


Figure Supplémentaire 4. Proportions des acides gras dans le muscle gastrocnémien après traitement au DPA pour la dose 300mg/kg

Proportions en SFA totaux (A), MUFA totaux (B), PUFA totaux (C), omega-3 totaux (D), DPA (E) et DHA (F) chez des animaux contrôles et des animaux ayant reçu le traitement au DPA à la dose 300mg/kg, n=3-5, t-test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

Discussion

Les recherches menées dans le cadre de cette thèse ont été construites à partir d'observations faites chez l'Homme. En transposant au modèle animal, par des approches pré-cliniques, nous avons cherché à apprendre de ces observations afin de mieux comprendre la composante métabolique de la pathologie. Cette dernière partie du manuscrit est dédiée à la discussion des travaux. Dans un premier temps, nous aborderons l'importance de rechercher de nouveaux biomarqueurs et de la pertinence du sang comme fluide d'intérêt pour la recherche de biomarqueurs. Ensuite, nous nous pencherons sur la valeur diagnostique et pronostique des biomarqueurs identifiés. Enfin, dans une troisième partie, nous nous concentrerons sur les approches pré-cliniques testées en comparaison avec ce qui est décrit dans la littérature.

I. Nécessité de trouver des biomarqueurs

Ces dernières années, la recherche de nouveaux biomarqueurs de la SLA a été considérable mais, à l'heure actuelle, nous ne disposons toujours pas de biomarqueurs robustes utilisables en clinique (Robelin and Gonzalez De Aguilar, 2014). Ceci s'explique en partie par le fait que, aux prémices de la maladie, les symptômes sont incomplets et surviennent de façon progressive et très hétérogène d'un individu à l'autre. De ce fait, les délais de consultation sont souvent longs et, par conséquent, le diagnostic est souvent établi plus d'un an, voire parfois deux après l'apparition des premiers signes. L'étude d'Iwasaki, en 2001, démontre que les délais entre l'apparition des premiers symptômes et la première consultation, ou la première visite chez un neurologue, ou encore la confirmation du diagnostic sont en moyenne de 5.7, 9.7 et 11.6 mois, respectivement (Iwasaki et al., 2001).

Par ailleurs, poser un diagnostic de SLA peut s'avérer difficile, de façon précoce, du fait que de nombreux signes qui la caractérisent sont communs à d'autres troubles neurologiques. Ghasemi et collaborateurs décrivent plus d'une vingtaine de maladies pouvant ressembler, de prime abord, à la SLA (Ghasemi, 2016). L'amyotrophie musculaire spinale et bulbaire (SBMA), aussi appelée maladie de Kennedy, est une maladie du motoneurone dont les signes premiers sont très semblables à ceux de la SLA. Elle représente l'une des maladies les plus souvent confondues avec la SLA, après la neuropathie motrice multifocale. La SBMA représente à elle-seule au moins 10% des mauvais diagnostics de SLA (Traynor et al., 2000). Ces pathologies représentent alors des obstacles, d'un point de vue clinique, et peuvent

ainsi retarder davantage le diagnostic, ou même conduire à de mauvais diagnostics. On dénombre approximativement 10% de faux-positifs et 40% de faux-négatifs au stade initial de la maladie (Magistris, 2006; Cellura et al., 2012). Compte-tenu de ces informations, il apparaît alors clairement qu'il est indispensable de découvrir de nouveaux biomarqueurs spécifiques de la SLA afin d'aider au diagnostic. Il existe également un manque indéniable de biomarqueurs robustes permettant d'évaluer la progression de la maladie, d'un point de vue clinique, mais aussi dans un contexte d'essai de nouveaux traitements.

II. Le sang : une source pertinente de biomarqueurs moléculaires

Comme il l'a été dit précédemment, ces dernières années se sont caractérisées par une course acharnée après des biomarqueurs moléculaires spécifiques de la SLA. S'agissant d'une maladie neurologique, le liquide céphalo-rachidien représente la première source de biomarqueurs à laquelle on pense. Ce fluide, qui communique directement avec le système nerveux central, est un lieu de passage pour beaucoup de protéines et de métabolites provenant du système nerveux, et peut s'avérer être un témoin privilégié d'un processus neurodégénératif (Tarasiuk et al., 2012). Une étude récente, réalisée sur 455 patients atteints de SLA, a montré que les taux de neurofilaments, à chaîne lourde et à chaîne légère, sont significativement élevés chez ces patients en comparaison à des sujets sains et ce, avec une spécificité et une sensibilité très fortes (Steinacker et al., 2015). Il ne faut pas oublier cependant, qu'une ponction lombaire reste un acte lourd et invasif, et qui n'est pas sans risque pour le patient.

Du point de vue de la périphérie, le muscle apparaît comme un tissu de choix, de par son atteinte importante dans la maladie. Des études ont montré que des modifications, dans ce tissu, à un niveau moléculaire, pouvait nous renseigner sur la progression de la maladie. C'est le cas de la protéine Nogo-A, qui est surexprimée dans le muscle des patients atteints de SLA, de manière à corrélérer avec l'état de dénervation musculaire et le degré de sévérité des symptômes musculaire (Jokic et al., 2005; Pradat et al., 2007; Bruneteau et al., 2015).

Aussi, l'analyse du transcriptome musculaire a mis en évidence des groupes de gènes dont l'expression permet de distinguer des patients à un stade précoce de patients à un stade plus avancé (Pradat et al., 2012). Cependant, le muscle n'est pas le tissu le plus commode

pour la recherche de biomarqueurs. La principale limitation de ce tissu repose sur le fait qu'une biopsie musculaire est un acte douloureux et invasif pour le patient. De ce fait, ce n'est pas une pratique qui est faite de façon routinière par les neurologues.

Notre intérêt s'est porté sur un autre fluide biologique. Le sang apparaît, d'un point de vue pratique, comme une source de biomarqueurs particulièrement commode, du fait de sa facilité d'accès et de son étude à moindre coût (Turner et al., 2009; Robelin and Gonzalez De Aguilar, 2014). Le sang se prête également au suivi longitudinal puisqu'il peut être prélevé à des intervalles de temps réguliers. De cette façon, il permet d'étudier les variations de différents biomarqueurs au cours de la maladie.

Plusieurs arguments appuient la pertinence de chercher des biomarqueurs dans le sang dans un contexte de SLA. Tout d'abord, la composition du sang peut être un bon reflet des changements qui ont lieu au niveau central (moelle épinière et cerveau), mais également au niveau périphérique (muscle), en particulier lors d'un processus dégénératif de l'axe neuromusculaire, comme c'est le cas dans la SLA. Il est important de remarquer que, dans d'autres contextes pathologiques, le sang a été montré comme une bonne source de biomarqueurs. Dans la maladie d'Alzheimer, Chiu et collaborateurs ont montré une augmentation significative du taux de protéine Tau dans le plasma de patients, par comparaison avec des sujets contrôles. Ce niveau de protéine Tau est négativement corrélé avec les volumes totaux de certaines régions cérébrales, telles que l'hippocampe et l'amygdale, touchées par la maladie. Le niveau plasmatique de protéine Tau apparaît alors comme un témoin de la perte neuronale caractéristique de la maladie d'Alzheimer (Chiu et al., 2014).

Dans la SLA, beaucoup de biomarqueurs ont été identifiés, au niveau sanguin, selon le processus physiopathologique qu'ils reflètent. On trouve ainsi des biomarqueurs sanguins spécifiques du stress oxydant, de l'excitotoxicité ou encore de l'inflammation (Robelin and Gonzalez De Aguilar, 2014). Sur le plan métabolique, d'autres biomarqueurs ont été mis en évidence comme c'est le cas pour l'apolipoprotéine E, la créatine kinase ou la transglutaminase. Cependant, aucune étude ne s'est penchée sur le potentiel biomarqueur des acides gras qui sont, par ailleurs, témoins du métabolisme lipidique, qui lui, est fortement altéré dans la SLA.

III. Valeur diagnostique et pronostique de la composition en acides gras en tant que biomarqueurs sanguins de la SLA

L'analyse de la composition en acides gras des lipides chez des patients atteints de SLA a fait ressortir un trait singulier de la maladie : alors que certains indices, témoignant de la synthèse des MUFA, sont augmentés, ceux qui reflètent la synthèse des PUFA sont diminués. En effet, les ratios 16 :1/16 :0 et 18 :1/ 18 :0 sont élevés chez les patients, et les ratios AA/LA et EPA/ALA, quant à eux, sont diminués. Cela laisse suggérer que ces deux grandes familles d'acides gras se comportent de façon opposée dans la SLA. Cet antagonisme laisse penser qu'une activité lipogénique accrue, suggérée par des ratios 16 :1/16 :0 et 18 :1/ 18 :0 élevés, et qui serait bénéfique dans un contexte de SLA, pourrait avoir lieu aux dépens des PUFA, qui sont diminués (Dupuis et al., 2004). Ces données sont cohérentes avec celles trouvées dans la littérature qui décrivent que les PUFA sont des inhibiteurs de la synthèse des MUFA, et que lorsque les proportions de l'une des familles augmentent, celles de l'autre diminuent (Sampath and Ntambi, 2005). Dans notre contexte de SLA, on peut ainsi supposer qu'un mécanisme global se met en place, visant à augmenter les MUFA et diminuer les PUFA. De plus, cela serait aussi cohérent avec le fait que les patients atteints de SLA, qui ont des taux plus importants de triglycérides et de cholestérol sanguins, survivent plus longtemps (Dorst et al., 2011).

D'ailleurs, il a été décrit que les omega-3 inhibent la production de ces espèces lipidiques (Sampath and Ntambi, 2005). Les proportions d'omega-3 seraient alors modulées à la baisse, de façon à favoriser la synthèse des triglycérides et du cholestérol.

Cette dichotomie MUFA/PUFA semble présenter un fort potentiel diagnostique. En particulier, nos données nous indiquent que le taux de DPA (22 :5n-3) est significativement diminué dans le culot des patients atteints de SLA par comparaison à des sujets sains. De plus, les analyses des courbes ROC, qui renseignent sur la performance diagnostique d'un facteur, nous indiquent que le DPA est spécifique à 96%. Cela signifie que dans 95 cas sur 100, le taux de DPA permettrait bien d'identifier une personne ayant un test positif comme étant atteinte de SLA. Dans la pratique clinique, plus un test diagnostique est spécifique, moins il occasionnera de faux-positifs, et il est admis qu'une spécificité minimale de 95% doit

être observée pour qu'un test puisse être utile. De plus, les taux de DPA se sont avérés être significativement différents entre des patients atteints de SLA et des patients atteints de SBMA avec une spécificité de 86%. Les modifications du taux de DPA permettraient donc d'affiner le diagnostic et d'éliminer la SBMA qui peut se présenter comme l'une des maladies les plus confondantes lors du diagnostic (Traynor et al., 2000).

Un certain nombre de biomarqueurs moléculaires métaboliques ont été mis en évidence à dans le sang de patients atteints de SLA. Rappelons-nous, les patients se caractérisent par une augmentation significative des taux plasmatiques de triglycérides ou du ratio LDL/HDL (Dupuis et al., 2008; Dorst et al., 2011; Paganoni et al., 2011; Sutedja et al., 2011). Ces marqueurs mettent en avant l'existence d'une composante métabolique qui accompagne la SLA et l'évolution du processus neurodégénératif. Tous ces marqueurs sont apparus comme ayant un potentiel pronostique puisqu'ils corrèlent avec la survie. Pour citer quelques exemples, les patients qui ont un ratio LDL/HDL élevé présentent une médiane de survie augmentée de près de 13 mois, par comparaison avec des patients ayant un faible ratio (Dupuis et al., 2008). De manière similaire, les patients qui ont un taux élevé de triglycérides voient leur espérance de vie augmentée de 14 mois, par comparaison à ceux qui ont un taux de triglycérides bas (Dorst et al., 2011). Cependant, aucun de ces biomarqueurs n'est apparu comme étant robuste car ils n'ont pas permis de prédire l'espérance de vie de façon indépendante d'autres facteurs confondants.

Les résultats de nos travaux nous indiquent que le taux de palmitoléate (16 :1) et le ratio 16 :1/16 :0, significativement augmentés chez les patients, sont positivement corrélés à la survie. En effet, les patients qui ont un ratio élevé survivent en moyenne 11 mois de plus que ceux qui ont un ratio faible, et ce, de façon indépendante des autres covariables connues, à savoir l'âge, le site de début des symptômes, la durée de la maladie et surtout l'IMC. Ces résultats indiquent donc que les patients qui ont une activité lipogénique importante (*i.e.* activité SCD augmentée) ont un meilleur pronostic. Cela suggère qu'un apport en graisses serait alors bénéfique pour les patients. Des études pilotes, dans le sens de cette hypothèse, ont été mises en place ces dernières années. En 2013, l'étude de Ludolph et collaborateurs, a eu pour but d'évaluer les effets d'une diète hypercalorique sur l'état général des patients SLA. Une diète enrichie en carbohydrates et une enrichie en

graisses ont été testées. Les résultats ont montré que les deux diètes permettaient une prise de poids significative chez les patients. Une augmentation plus importante a été observée chez les patients recevant le régime riche en graisses même si cette différence n'était pas significative. Par ailleurs, les diètes ont permis une réduction de la diminution de l'IMC et une augmentation de la masse grasseuse (Dorst et al., 2013). Une seconde étude visant à évaluer les effets de tels régimes a été réalisée. Des régimes hypercaloriques enrichis en carbohydrates ou en graisses ont été comparés à un régime standard. De façon similaire, les diètes hypercaloriques ont montré des effets bénéfiques sur la survie des patients (Wills et al., 2014). Cependant, les résultats de ces études sont à prendre avec précautions. Tout d'abord, le nombre de participants à ces études reste relativement faible. Il est donc difficile de généraliser les effets de tels régimes. De plus, les participants à ces études étaient des patients qui se trouvaient déjà à un stade avancé de la maladie et qui présentaient un état de dénutrition important, il est donc difficile de conclure avec exactitude des effets de ces régimes.

En parallèle, nos résultats indiquent également que les PUFA corrélaient avec la survie de façon négative et indépendante des autres covariables testées. Les patients qui ont un taux faible d'omega-3 survivent en moyenne 10 mois de plus que ceux qui ont un taux d'omega-3 élevé. Ce même effet est observé avec l'index DHA+EPA, considéré comme un reflet de la composition globale en omega-3. Ces résultats viendraient appuyer la dichotomie entre les MUFA et les PUFA dont nous avons discuté auparavant. Mais cette capacité à prédire l'espérance de vie est valable uniquement chez les femmes. Plusieurs études ont mis en avant des différences significatives dans la composition en PUFA des lipides sanguins. Il a été montré que les omega-3, et particulièrement le DHA, sont significativement plus représentés dans les esters de cholestérol et les phospholipides sériques et plasmatiques, ainsi que dans les membranes érythrocytaires, chez les femmes en comparaison avec les hommes (Decsi and Kennedy, 2011). Cependant, nous n'avons pas d'explications plausibles pour expliquer cette différence entre les hommes et les femmes.

IV. Approches pré-cliniques

Nos travaux ont mis en avant diverses altérations au niveau du profil des acides gras chez les patients atteints de SLA. Nous avons voulu savoir, par des approches pré-cliniques, s'il était possible de moduler ces paramètres pour en tirer des bénéfices. Les approches que nous avons testées ont fait intervenir aussi bien les MUFA que les PUFA.

Une étude menée au laboratoire avait montré que, dans un contexte de dénervation expérimentale, l'inhibition de l'activité SCD permettait une meilleure récupération fonctionnelle chez les animaux présentant une lésion nerveuse. En même temps, il avait été observé que, au niveau musculaire, le métabolisme avait été modifié en faveur d'un métabolisme de type oxydatif (Hussain et al., 2013). Dans la SLA, les fibres oxydatives, qui utilisent les acides gras comme source énergétique, semblent être moins sensibles à la dénervation que les fibres de type glycolytique (Pun et al., 2006; Hegedus et al., 2007). Ce passage vers un métabolisme oxydatif semble donc être protecteur. Par ailleurs, il a été montré que des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif sont surexprimés dans les modèles murins mSOD1^{G93A} et mSOD1^{G86R} (Palamiuc et al., 2015). A partir de ces informations, nous avons voulu savoir quels seraient les effets d'une inhibition de l'activité SCD dans notre contexte de SLA. Nous avons ainsi mis en place une approche visant à inhiber l'activité SCD chez les souris mSOD1^{G86R}. Les résultats obtenus à partir de notre approche n'ont pas montré d'effets bénéfiques. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce manque d'effet. Premièrement, l'inhibition de l'activité SCD que nous avons provoquée est généralisée à l'ensemble de l'organisme, et non restreinte au niveau du muscle, qui reste le tissu cible. Or, nous savons que les souris mSOD1 se caractérisent par un hypermétabolisme important, au même titre que beaucoup de patients atteints de SLA, et présentent une perte importante des réserves adipeuses (Dupuis et al., 2004). Ces souris sont déjà fragilisées et on peut donc supposer que l'inhibition ubiquitaire de SCD a pu accentuer ce phénomène et réduire des réserves adipeuses déjà affaiblies. Il est, de ce fait, possible que notre approche ne fonctionne pas chez les animaux mSOD1 car le système est défectueux à la base et le muscle ne dispose plus d'assez de réserves adipeuses. Cette hypothèse est appuyée par des observations faites dans le muscle de rats entraînés pour être plus endurants. Chez ces animaux, pour lesquels le métabolisme oxydatif est augmenté, l'expression de l'ARNm de SCD1 ainsi que la protéine SCD1, sont augmentées dans le muscle

soléaire. Le ratio 18 :1/18 :0 est également augmenté dans ce muscle, indiquant une activité SCD accrue. Tout cela est couplé à une augmentation des taux d'acides gras libres, de diacylglycérol et de triglycérides. Cela laisse suggérer que le muscle, lorsqu'il est sous l'influence d'un métabolisme oxydatif, requiert une activité SCD locale (intramusculaire) accrue pour synthétiser les triglycérides dont il a besoin (Dobrzyn et al., 2010).

Par ailleurs, il a été montré récemment que le changement de métabolisme glycolytique vers oxydatif n'était pas sans risque au moins dans un contexte de SLA. EN effet, une utilisation prolongée des lipides comme source d'énergie provoquerait un défaut d'utilisation du glucose et, par la suite, conduirait à la production de dérivés lipotoxiques et de radicaux libres (Magnan, 2006; Palamiuc et al., 2015a). De ce point de vue, on peut alors penser que favoriser un métabolisme oxydatif alimente des phénomènes néfastes, déjà retrouvés chez les souris mSOD1, et contribue à maintenir un cercle vicieux.

Dans un second temps, nous avons voulu évaluer les effets de la modulation de la composition en PUFA, et plus précisément en DPA, dans un modèle de dénervation expérimentale. Le DPA nous est apparu comme une cible de choix puisque c'est un acide gras qui est modifié significativement chez les patients atteints de SLA par comparaison à des sujets sains, mais également par comparaison avec des personnes atteintes de SBMA. Par ailleurs, malgré le peu d'études qui se portent sur le DPA, cet acide gras possède des effets bénéfiques décrits dans la littérature et il occupe une place stratégique dans la voie de biosynthèse des omega-3. En effet, le DPA a la capacité d'être converti en DHA mais il peut aussi être rétro-converti en EPA (Kaur et al., 2011; Byelashov et al., 2015). Avec notre approche, même si la dose de DPA administrée a permis de modifier la composition en acides gras de nos animaux, les effets observés interrogent. Nos résultats sont cohérents avec ceux d'une autre équipe qui s'est intéressée aux effets d'une supplémentation en EPA dans un modèle murin de SLA, les souris mSOD1^{G93A}. Cette supplémentation en EPA, débutée à un stade pré-symptomatique, a entraîné une diminution de la survie des animaux, bien que la mort neuronale n'ait pas été modifiée (Yip et al., 2013). L'hypothèse avancée repose sur une des caractéristiques des PUFA. Tous les PUFA à longue chaîne sont particulièrement sensibles à la peroxydation (Ayala et al., 2014) et sont susceptibles d'être dégradés en dérivés toxiques comme c'est le cas du 4-HNE. On peut alors, nous aussi,

supposer qu'au moins une partie de notre DPA administré ait été dégradée en 4-HNE. De ce fait, le DPA pourrait ainsi exercer des effets néfastes par le biais de ces métabolites.

D'un autre côté, nos résultats s'opposent à ceux d'autres études qui ont montré des effets bénéfiques d'un régime riche en omega-3, dans un contexte de SLA. Il a été montré, dans un modèle murin ayant subi une lésion nerveuse, qu'un taux élevé d'omega-3 permet une meilleure récupération motrice. Dans cette étude, Gladman et collaborateurs ont introduit, chez des souris, le gène *Fat-1*, qui est un gène trouvé chez *C. elegans* et qui permet la conversion endogène des omega-6 en omega-3. A la suite de l'augmentation endogène des taux d'omega-3 chez ces animaux lésés, ils ont montré une meilleure récupération mais également une diminution de la mort des cellules neuronales (Gladman et al., 2012). Par ailleurs, dans la littérature, d'autres études appuient les effets presque « miraculeux » des omega-3. Dans la maladie d'Alzheimer, par exemple, il a été montré qu'un régime riche en oméga-3, et plus particulièrement en DHA, entraîne chez des souris atteintes de la maladie une réduction des taux de peptides amyloïdes β ainsi qu'une diminution des plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie (Amtul et al., 2011a). D'autres études, par contre, sont contradictoires. Dans maladie de Parkinson, par exemple, certains auteurs ont montré des effets bénéfiques d'un traitement riche en omega-3, via une diminution des voies apoptotiques ou de l'inflammation (Bousquet et al., 2008, 2009). D'autres ont avancé des résultats négatifs d'un enrichissement en omega-3. Ces effets néfastes seraient médiés par différents mécanismes tels qu'une augmentation de l'atteinte des neurites et une augmentation de l'astrocytose ou de l'agrégation protéique (Yakunin et al., 2012). Pour finir, d'autres études n'ont montré aucun effet (Delattre et al., 2010).

Conclusion et Perspectives

En conclusion, nous pouvons dire que les résultats majeurs issus de mes travaux de thèse ont permis, dans un premier temps, l'identification de biomarqueurs moléculaires spécifiques et robustes, dans le domaine lipidique, chez les patients atteints de SLA. Cependant, compte-tenu des résultats hétérogènes quant aux effets d'un régime riche en omega-3 sur différents modèles de SLA, il paraît indispensable d'envisager de nouvelles approches nutritionnelles. La mise en place d'études longitudinales, sur des patients, permettrait, d'une part, de confirmer les changements des profils d'acides gras, mais cela permettrait également d'étudier la dynamique de ces altérations au cours du temps. Par ailleurs, il paraît indispensable de mettre en place des suivis alimentaires chez les patients participants à ce genre d'études, car on peut imaginer que les patients, au cours de la maladie, peuvent présenter des modifications des préférences alimentaires, ce qui pourrait également avoir un impact. *Est-ce que ces phénomènes finissent par être compensés ? Est-ce qu'ils s'aggravent au cours de la maladie ?* Les réponses à ces questions nous en apprendraient davantage sur les rôles qu'occupent les acides gras dans la SLA.

Le potentiel « préventif » des acides gras est également à étudier. Il serait intéressant d'initier des études sur des familles touchées par la SLA, comme par exemple chez les individus sains porteurs de mutations C9ORF72, afin de voir si des profils d'acides gras particuliers sont retrouvés chez ces individus. *Est-ce que la composition en acides gras présente une « signature » particulière dans ces populations ? Est-ce que cette signature pourrait être annonciatrice de la maladie ?* De telles études pourraient conduire à la découverte de marqueurs précoces de la maladie qui pourraient être utilisés en clinique.

La SLA est une maladie très complexe, qui présente de nombreuses facettes. De ce fait, on ne peut pas se contenter de regarder qu'un seul biomarqueur, aussi spécifique soit-il, pour établir le diagnostic et évaluer le pronostic. Il faut définir un ensemble de biomarqueurs qui tienne compte des multiples aspects de la maladie. Il faudrait des biomarqueurs traduisant le processus neurodégénératif, comme c'est le cas des neurofilaments (Menke et al., 2015; Oeckl et al., 2016), mais aussi des biomarqueurs qui reflètent la pathologie métabolique qui caractérise la SLA. C'est dans ce cadre que nos travaux s'inscrivent.

Dans le futur, on devrait pouvoir combiner des approches d'imagerie et ces différentes classes de biomarqueurs pour permettre aux cliniciens de réaliser un diagnostic plus précoce.

Le second point majeur qui ressort de nos travaux est que si l'on considère à la fois la nature des biomarqueurs moléculaires identifiés et les conséquences de leur modulation, la SLA semble occuper une place toute particulière au sein des maladies neurodégénératives, d'un point de vue métabolique. Les résultats négatifs obtenus à partir des approches pré-cliniques indiquent que la SLA se comporte différemment des autres troubles neurodégénératifs. En effet, quand, pour ces troubles, une augmentation des proportions des PUFA, et plus particulièrement des omega-3, semble être bénéfique, la SLA apparaît comme étant à l'opposé.

Par exemple, une restriction calorique semble bénéfique pour contrecarrer les effets de la maladie d'Alzheimer. En 2009, l'étude de Witte et collaborateurs, réalisée sur 50 personnes, démontre qu'une restriction calorique est associée à une meilleure performance mémorielle (Witte et al., 2009). L'étude de Luchsinger et collaborateurs démontre également qu'une réduction calorique modérée prévient la maladie d'Alzheimer (Luchsinger et al., 2002). Il a, de plus, été montré qu'une restriction calorique améliorait les pathologies Tau et amyloïde β , et augmentait les performances cognitives chez les souris modèles de maladie d'Alzheimer (Wang et al., 2005; Maruszak et al., 2014). A l'inverse, une réduction de l'apport calorique aggrave la SLA. En effet, il a été montré qu'une restriction calorique, chez des souris $mSOD1^{G93A}$, provoque l'augmentation de la peroxydation des lipides, du stress oxydant, des marqueurs d'inflammation et d'apoptose, conduisant à une réduction de l'espérance de vie de ces animaux (Patel et al., 2010).

Enfin, nos travaux, font apparaitre de nombreuses mises en garde quant à la modulation des taux d'acides gras dans le cadre d'approches à visée thérapeutique. De futures études sont nécessaires pour confirmer ce potentiel thérapeutique et établir les doses et les associations les plus bénéfiques pour lutter contre le processus pathologique de la SLA.

Bibliographie

- Afifi A, Aleu P, Goodgold J, MacKay B (1966) Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 16:475–481.
- Aïd S, Vancassel S, Poumès-Ballihaut C, Chalon S, Guesnet P, Lavalie M (2003) Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J Lipid Res* 44:1545–1551.
- Akoh CC, Min DB (2008) Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology. Third edition. CRC Press.
- Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, Russ C, Shaw CE, Powell JF, Leigh PN (1999) Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 8:157–164.
- Al-Chalabi A, Hardiman O (2013) The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* 9:617–628.
- Almer G, Guégan C, Teismann P, Naini a, Rosoklija G, Hays a P, Chen C, Przedborski S (2001) Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 49:176–185.
- Amtul Z, Uhrig M, Rozmahel RF, Beyreuther K (2011a) Structural insight into the differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on the production of A β peptides and amyloid plaques. *J Biol Chem* 286:6100–6107.
- Amtul Z, Westaway D, Cechetto DF, Rozmahel RF (2011b) Oleic acid ameliorates amyloidosis in cellular and mouse models of alzheimer's disease. *Brain Pathol* 21:321–329.
- Andersen PM, Al-Chalabi A (2011) Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 7:603–615.
- Andersen PM, Sims KB, Xin WW, Kiely R, O'Neill G, Ravits J, Piro E, Harati Y, Brower RD, Levine JS, Heinicke HU, Seltzer W, Boss M, Brown RH (2003) Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4:62–73.
- Andreadou E, Kapaki E, Kokotis P, Paraskevas GP, Katsaros N, Libitaki G, Petropoulou O, Zis V, Sfagos C, Vassilopoulos D (2008) Plasma glutamate and glycine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *In Vivo* 22:137–141.
- Appel V, Stewart SS, Smith G, Appel SH (1987) A rating scale for amyotrophic lateral sclerosis: description and preliminary experience. *Ann Neurol* 22:328–333.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351:602–611.
- Araki T, Nagano S, Tateno M, Kaido M, Ogata K, Arima K (2012) Misfolded SOD1 forms high-density molecular complexes with synaptic molecules in mutant SOD1-linked familial

- amyotrophic lateral sclerosis cases. *J Neurol Sci* 314:92–96.
- Astrup A, Dyerberg J, Elwood P, Hermansen K, Hu FB, Jakobsen MU, Kok FJ, Krauss RM, Lecerf JM, LeGrand P, Nestel P, Risør U, Sanders T, Sinclair A, Stender S, Tholstrup T, Willett WC (2011) The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: Where does the evidence stand in 2010? *Am J Clin Nutr* 93:684–688.
- Ayala A, Munoz MF, Arguelles S (2014) Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014:360438.
- Babu GN, Kumar A, Chandra R, Puri SK, Kalita J, Misra UK (2008) Elevated inflammatory markers in a group of amyotrophic lateral sclerosis patients from northern India. *Neurochem Res* 33:1145–1149.
- Battistini S et al. (2005) SOD1 mutations in amyotrophic lateral sclerosis: Results from a multicenter Italian study. *J Neurol* 252:782–788.
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364:584.
- Beghi E, Logroscino G, Chio A, Hardiman O, Mitchell D, Swingle R, Traynor BJ (2006) The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1762:1150–1157.
- Beghi E, Millul A, Logroscino G, Vitelli E, Micheli A (2008) Outcome measures and prognostic indicators in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 9:163–167.
- Bensimon G, Lacomblez L, Delumeau JC, Bejuit R, Truffinet P, Meininger V (2002) A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 249:609–615.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V (1994) A controlled trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 330:585–591.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911–917.
- Blokhuis AM, Groen EJN, Koppers M, Van Den Berg LH, Pasterkamp RJ (2013) Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 125:777–794.
- Bousquet M, Gibrat C, Saint-Pierre M, Julien C, Calon F, Cicchetti F (2009) Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 33:1401–1408.
- Bousquet M, Saint-Pierre M, Julien C, Salem N, Cicchetti F, Calon F (2008) Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* 22:1213–1225.

- Bouteloup C, Desport JC, Clavelou P, Guy N, Derumeaux-Burel H, Ferrier A, Couratier P (2009) Hypermetabolism in ALS patients: An early and persistent phenomenon. *J Neurol* 256:1236–1242.
- Bowerman M, Vincent T, Scamps F, Perrin FE, Camu W, Raoul C (2013) Neuroimmunity dynamics and the development of therapeutic strategies for amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* 7:214.
- Bozzatello P, Brignolo E, De Grandi E, Bellino S (2016) Supplementation with Omega-3 Fatty Acids in Psychiatric Disorders: A Review of Literature Data. *J Clin Med* 5:1–26.
- Brooks BR, Shodis KA, Lewis DH, Rawling JD, Sanjak M, Belden DS, Hakim H, DeTan Y, Gaffney JM (1995) Natural history of amyotrophic lateral sclerosis. Quantification of symptoms, signs, strength, and function. *Adv Neurol* 68:163–184.
- Brooks BR, Antel J, Bradley W, Cardy P, Carpenter S, Chou S, Conradi S, Daube J, Denys EH, Festoff B, Hirano a., Hormigo a., Karpatai G, Kasarskis E, Kuther G, Larumbe R, Leigh N, Martinez-Lage JM, Meininger V (1994) El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 124:96–107.
- Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327–338.
- Bruneteau G, Bauché S, Gonzalez de Aguilar JL, Brochier G, Mandjee N, Tanguy ML, Hussain G, Behin A, Khiami F, Soriali E, Hell-Remy C, Salachas F, Pradat PF, Lacomblez L, Nicole S, Fontaine B, Fardeau M, Loeffler JP, Meininger V, Fournier E, Koenig J, Hantaï D (2015) Endplate denervation correlates with Nogo-A muscle expression in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Clin Transl Neurol* 2:362–372.
- Bryson H, Fulton B, Benfield P (1996) Riluzole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs* 52:549–563.
- Byelashov OA, Sinclair AJ, Kaur G (2015) Dietary sources, current intakes, and nutritional role of omega-3 docosapentaenoic acid. *Lipid Technol* 27:79–82.
- Camu W, Khoris J, Moulard B, Salachas F, Briolotti V, Rouleau GA, Meininger V (1999) Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. *J Neurol Sci* 165:21–26.
- Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, Nakanishi A (1999) The ALSFRS-R: A revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *J Neurol Sci* 169:13–21.
- Cellura E, Spataro R, Taiello AC, La Bella V (2012) Factors affecting the diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 114:550–554.
- Chenevert T, Brunberg J, Pipe J (1990) Anisotropic diffusion in human white matter: demonstration with MR techniques in vivo. *Radiology* 177:401–405.

- Chiang P, Ling J, Ha Y, Price DL, Aja SM, Wong PC, Jeong YH, Price DL, Aja SM, Wong PC (2010) Deletion of TDP-43 down-regulates Tbc1d1, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16320–16324.
- Chiò a, Mora G, Leone M, Mazzini L, Cocito D, Giordana MT, Bottacchi E, Mutani R (2002) Early symptom progression rate is related to ALS outcome: a prospective population-based study. *Neurology* 59:99–103.
- Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swigler R, Mitchell D, Beghi E, Traynor BG (2012) Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler* 10:310–323.
- Chiu CC, Huang SY, Su KP, Lu ML, Huang MC, Chen CC, Shen WW (2003) Polyunsaturated fatty acid deficit in patients with bipolar mania. *Eur Neuropsychopharmacol* 13:99–103.
- Chiu MJ, Chen YF, Chen TF, Yang SY, Yang FPG, Tseng TW, Chieh JJ, Chen JCR, Tzen KY, Hua MS, Horng HE (2014) Plasma tau as a window to the brain-negative associations with brain volume and memory function in mild cognitive impairment and early alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp* 35:3132–3142.
- Christensen P, Hojer-Pedersen E, Jensen N (1990) Survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis in 2 Danish counties. *Neurology* 40:600–604.
- Clement AM (2003) Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science* 302:113–117.
- Conklin S, Runyan C, Leonard S (2010) Age-related changes of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in the anterior cingulate cortex of individuals with major depressive disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 82:111–119.
- Corbo M, Hays AP (1992) Peripherin and neurofilament protein coexist in spinal spheroids of motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51:531–537.
- Corcia P, Pradat P-F, Salachas F, Bruneteau G, Forestier N Le, Seilhean D, Hauw J-J, Meininger V (2008) Causes of death in a post-mortem series of ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler* 9:59–62.
- Corcia P, Valdmanis P, Millecamps S, Lionnet C, Blasco H, Mouzat K, Daoud H, Belzil V, Morales R (2012) Phenotype and genotype analysis in amyotrophic lateral sclerosis with TARDBP gene mutations. *Neurology* 78:1519–1526.
- Corrado L, Carlomagno Y, Falasco L, Mellone S, Godi M, Cova E, Cereda C, Testa L, Mazzini L, D'Alfonso S (2011) A novel peripherin gene (PRPH) mutation identified in one sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient. *Neurobiol Aging* 32:552.e1-6.
- Couratier P, Corcia P, Lautrette G, Nicol M, Preux PM, Marin B (2015) Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Rev Neurol (Paris)* 172:37–45.
- Couratier P, Marin B, Lautrette G, Nicol M, Preux PM (2014) Épidémiologie, spectre clinique de la SLA et diagnostics différentiels. *Press Medicale* 43:538–548.
- Couratier P, Torny F, Lacoste M (2016) [Functional rating scales for amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 162:502–507.

- Crain JM, Nikodemova M, Watters JJ (2013) Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. *J Neurosci Res* 91:1143–1151.
- Cudkowicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE, Chin W, Geller B, Hayden DL, Schoenfeld DA, Hosler BA, Horvitz HR, Brown RH (1997) Epidemiology of Mutations in Superoxide Dismutase in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* 41:210–221.
- Cuvelier C, Cabaraux JF, Dufrasne I, Hornick JL, Istasse L (2004) Acides gras: Nomenclature et sources alimentaires. *Ann Med Vet* 148:133–140.
- Czaplinski A, Yen AA, Appel SH (2006) Forced vital capacity (FVC) as an indicator of survival and disease progression in an ALS clinic population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:390–392.
- D’Ascoli TA, Mursu J, Voutilainen S, Kauhanen J, Tuomainen T-P, Virtanen JK (2016) Association between serum long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognitive performance in elderly men and women: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Eur J Clin Nutr* 70:970–975.
- Decsi T, Kennedy K (2011) Sex-specific differences in essential fatty acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 94:1914–1919.
- Degrolamo C, Rudel L (2010) Dietary monounsaturated fatty acids appear not to provide cardioprotection. *Curr Atheroscler Rep* 12:391–396.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72:245–256.
- del Aguila MA, Longstreth WT, McGuire V, Koepsell TD, van Belle G (2003) Prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: A population-based study. *Neurology* 60:813–819.
- Delattre AM, Kiss Á, Szawka RE, Anselmo-Franci JA, Bagatini PB, Xavier LL, Rigon P, Achaval M, Iagher F, de David C, Marroni NAP, Ferraz AC (2010) Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson’s disease. *Neurosci Res* 66:256–264.
- Delzor A et al. (2014) Searching for a link between the L-BMAA neurotoxin and amyotrophic lateral sclerosis: a study protocol of the French BMAALS programme. *BMJ Open* 4:e005528.
- Demestre M, Parkin-Smith G, Petzold A, Pullen AH (2005) The pro and the active form of matrix metalloproteinase-9 is increased in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol* 159:146–154.
- Deng H, Gao K, Jankovic J (2014) The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol* 10:337–348.

- Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261:1047–1051.
- Desnuelle C, Dib M, Garrel C, Favier A (2001) A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2:9–18.
- Desport JC, Preux PM, Magy L, Boirie Y, Vallat JM, Beaufrere B, Couratier P (2001) Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr* 74:328–334.
- Dobrzyn P, Pyrkowska A, Jazurek M, Szymanski K, Langfort J, Dobrzyn A (2010) Endurance training-induced accumulation of muscle triglycerides is coupled to upregulation of stearoyl-CoA desaturase. *J Appl Physiol* 109:1653–1661.
- Doi H, Koyano S, Suzuki Y, Nukina N, Kuroiwa Y (2010) The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases. *Neurosci Res* 66:131–133.
- Dorst J, Cypionka J, Ludolph AC (2013) High-caloric food supplements in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: a prospective interventional study. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14:533–536.
- Dorst J, Kühnlein P, Hendrich C, Kassubek J, Sperfeld AD, Ludolph AC (2011) Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 258:613–617.
- Ducimetière P (1997) *Physiologie du tissu adipeux brun*. Chapitre 12:211–217.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani a, Gonzalez De Aguilar J-L, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Seilhean D, Hauw J-J, Lacomblez L, Loeffler J-P, Meininger V (2008) Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70:1004–1009.
- Dupuis L, de Tapia M, René F, Lutz-Bucher B, Gordon JW, Mercken L, Pradier L, Loeffler J-P (2000) Differential Screening of Mutated SOD1 Transgenic Mice Reveals Early Up-Regulation of a Fast Axonal Transport Component in Spinal Cord Motor Neurons. *Neurobiol Dis* 7:274–285.
- Dupuis L, Di Scala F, Rene F, De Tapia M, Oudart H, Pradat P-F, Meininger V, Loeffler J-P (2003b) Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J* 17:2091–2093.
- Dupuis L, Gonzalez De Aguilar J-L, Di Scala F, Rene F, De Tapia M, Pradat P-F, Lacomblez L, Seihlan D, Prinjha R, Walsh FS, Meininger V, Loeffler J-P (2002) Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 10:358–365.
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar J-L, Echaniz-Laguna A, Eschbach J, Rene F, Oudart H, Halter B, Huze C, Schaeffer L, Bouillaud F, Loeffler J-P (2009) Muscle mitochondrial uncoupling

- dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One* 4:e5390.
- Dupuis L, Oudart H, René F, Gonzalez De Aguilar J-L, Loeffler J-P (2004) Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11159–11164.
- Dupuis L, Pradat P-F, Ludolph AC, Loeffler J-P (2011) Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 10:75–82.
- Echaniz-Laguna A, Zoll J, Ponsot E, N'Guessan B, Tranchant C, Loeffler JP, Lampert E (2006) Muscular mitochondrial function in amyotrophic lateral sclerosis is progressively altered as the disease develops: A temporal study in man. *Exp Neurol* 198:25–30.
- El Oussini H, Bayer H, Scekcic-Zahirovic J, Vercruysse P, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, Dieterlé S, Echaniz-Laguna A, Larmet Y, Müller K, Weishaupt JH, Thal DR, van Rheenen W, van Eijk K, Lawson R, Monassier L, Maroteaux L, Roumier A, Wong PC, van den Berg LH, Ludolph AC, Veldink JH, Witting A, Dupuis L (2016) Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 131:465–480.
- Eskelinen M, Ngandu T, Helkala E, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H, Kivipelto M (2008) Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. *Int J Geriatr Psychiatry* 23:741–747.
- Fabelo N, Martín V, Santpere G, Marín R, Torrent L, Ferrer I, Díaz M (2011) Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol Med* 17:1107–1118.
- Fang L, Teuchert M, Huber-Abel F, Schattauer D, Hendrich C, Dorst J, Zettlmeissel H, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K, Kapfer T, Tuman H, Ludolph AC, Brettschneider J (2010) MMP-2 and MMP-9 are elevated in spinal cord and skin in a mouse model of ALS. *J Neurol Sci* 294:51–56.
- Felgoise SH, Chakraborty BH, Bond E, Rodriguez J, Bremer B a, Walsh SM, Lai EC, McCluskey L, Simmons Z (2010) Psychological morbidity in ALS: the importance of psychological assessment beyond depression alone. *Amyotroph Lateral Scler* 11:351–358.
- Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ (2011) Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 7:616–630.
- Ferrarese C, Sala G, Riva R, Begni B, Zoia C, Tremolizzo L, Galimberti G, Millul A, Bastone A, Mennini T, Balzarini C, Frattola L, Beghi E, Italian ALS Study Group (2001) Decreased platelet glutamate uptake in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 56:270–272.
- Feskens EJ (2001) Can diabetes be prevented by vegetable fat? *Diabetes Care* 24:1517–1518.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: Evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185:232–240.

- Fontani G, Corradeschi F, Felici a, Alfatti F, Migliorini S, Lodi L (2005) Cognitive and physiological effects of Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in healthy subjects. *Eur J Clin Invest* 35:691–699.
- Forbes RB, Colville S, Parratt J, Swingler RJ (2007) The incidence of motor neuron disease in Scotland. *J Neurol* 254:866–869.
- Frangou S, Lewis M, McCrone P (2006) Efficacy of ethyl-eicosapentaenoic acid in bipolar depression: randomized double-blind placebo-controlled study. *Br J Psychiatry* 188:46–50.
- Funalot B, Desport J-C, Sturtz F, Camu W, Couratier P (2009) High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 10:113–117.
- Gallo V, Wark PA, Jenab M, Pearce N, Brayne C, Vermeulen R, Andersen PM, Hallmans G, Kyrozi A, Vanacore N, Vahdaninia M, Grote V, Kaaks R, Mattiello A, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Travis RC, Petersson J, Hansson O, Arriola L, Jimenez-Martin JM, Tjønneland A, Halkjær J, Agnoli C, Sacerdote C, Bonet C, Trichopoulou A, Gavrila D, Overvad K, Weiderpass E, Palli D, Quirós JR, Tumino R, Khaw KT, Wareham N, Barricante-Gurra A, Fedirko V, Ferrari P, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Boeing H, Vigl M, Middleton L, Riboli E, Vineis P (2013) Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis: The EPIC cohort. *Neurology* 80:829–838.
- Ganesalingam J, An J, Shaw CE, Shaw G, Lacomis D, Bowser R (2011) Combination of neurofilament heavy chain and complement C3 as CSF biomarkers for ALS. *J Neurochem* 117:528–537.
- Ghasemi M (2016) Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes. *Iran J Neurol* 15:85–91.
- Gil J, Funalot B, Verschueren A, Danel-Brunaud V, Camu W, Vandenberghe N, Desnuelle C, Guy N, Camdessanche JP, Cintas P, Carluer L, Pittion S, Nicolas G, Corcia P, Fleury MC, Maugras C, Besson G, Le Masson G, Couratier P (2008) Causes of death amongst French patients with amyotrophic lateral sclerosis: A prospective study. *Eur J Neurol* 15:1245–1251.
- Giordana MT, Ferrero P, Grifoni S, Pellerino A, Naldi A, Montuschi A (2011) Dementia and cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: A review. *Neurol Sci* 32:9–16.
- Gladman SJ, Huang W, Lim S-N, Dyll SC, Boddy S, Kang JX, Knight MM, Priestley J V, Michael-Titus AT (2012) Improved outcome after peripheral nerve injury in mice with increased levels of endogenous ω -3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci* 32:563–571.
- Gobrecht P, Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D (2014) Sustained GSK3 activity markedly facilitates nerve regeneration. *Nat Commun* 5:4561.
- Gonzalez de Aguilar J-L, Niederhauser-wiederkehr C, Halter B, De Tapia M, Di Scala F, Demougin P, Dupuis L, Primig M, Meininger V, Loeffler J-P (2008) Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiol Genomics* 32:207–218.
- Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW

- (2006) Complete Dissociation of Motor Neuron Death from Motor Dysfunction by Bax Deletion in a Mouse Model of ALS. *J Neurosci* 26:8774–8786.
- Graf M, Ecker D, Horowski R, Kramer B, Riederer P, Gerlach M, Hager C, Ludolph AC (2005) High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: Results of a placebo-controlled double-blind study. *J Neural Transm* 112:649–660.
- Grygiel-Górniak B (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutr J* 13:1–10.
- Guasch-Ferre M, Babio N, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Ros E, Martin-Pelaez S, Estruch R, Aros F, Gomez-Gracia E, Fiol M, Santos-Lozano JM, Serra-Majem L, Bullo M, Toledo E, Barragan R, Fito M, Gea A, Salas-Salvado J (2015) Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 102:1563–1573.
- Gurney M, Cutting F, Zhai P, Doble A, Taylor C, Andrus P, Hall E (1996) Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39:147–157.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772–1775.
- Halter B, Gonzalez de Aguilar J-L, Rene F, Petri S, Fricker B, Echaniz-Laguna A, Dupuis L, Larmet Y, Loeffler J-P (2010) Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 48:915–923.
- Hamazaki K, Hamazaki T, Inadera H (2012) Fatty acid composition in the postmortem amygdala of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *J Psychiatr Res* 46:1024–1028.
- Harris WS (2008) The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 87:1997S – 2002S.
- Haverkamp LJ, Appel V, Appel SH (1995) Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population; Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 118:707–719.
- Hayward LJ, Rodriguez JA, Kim JW, Tiwari A, Goto JJ, Cabelli DE, Valentine JS, Brown RH (2002) Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 277:15923–15931.
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T (2007) Time course of preferential motor unit loss in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 28:154–164.
- Hideo Tohgi TA, Kinya Y, Takahiko M, Eri I, Chiaki I (1999) Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 46:129–131.

- Hillel A, Miller R, Yorkston K, McDonald E, Norris F, Konikow N (1989) Amyotrophic lateral sclerosis severity scale. *Neuroepidemiology* 8:142–150.
- Horowitz JF, Klein S (2000) Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr* 72:558S–563S.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1604–1609.
- Hu S, Joseph A, Wong D (2006) Human body fluid proteome analysis. *Proteomics* 6:6326–6353.
- Hussain G, Schmitt F, Henriques A, Lequeu T, Rene F, Bindler F, Dirrig-Grosch S, Oudart H, Palamiuc L, Metz-Boutigue MH, Dupuis L, Marchioni E, Gonzalez De Aguilar JL, Loeffler JP (2013) Systemic Down-Regulation of Delta-9 Desaturase Promotes Muscle Oxidative Metabolism and Accelerates Muscle Function Recovery following Nerve Injury. *PLoS One* 8:e64525.
- Ilieva E V, Ayala V, Jové M, Dalfó E, Cacabelos D, Povedano M, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otín M (2007) Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 130:3111–3123.
- Inghilleri M, Iacovelli E (2011) Clinical neurophysiology in ALS. *Arch Ital Biol* 149:57–63.
- Iwasaki Y, Ikeda K, Ichikawa Y, Igarashi O, Kinoshita M (2001) The diagnostic interval in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 104:87–89.
- Janani C, Ranjitha Kumari BD (2015) PPAR gamma gene - A review. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* 9:46–50.
- Janssen CIF, Kiliaan AJ (2014) Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog Lipid Res* 53:1–17.
- Jawaid A, Murthy SB, Wilson AM, Qureshi SU, Amro MJ, Wheaton M, Simpson E, Harati Y, Strutt AM, York MK, Schulz PE (2010) A decrease in body mass index is associated with faster progression of motor symptoms and shorter survival in ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 11:542–548.
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar J-L, Dimou L, Lin S, Fergani A, Ruegg M a, Schwab ME, Dupuis L, Loeffler J-P (2006) The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* 7:1162–1167.
- Jokic N, Gonzalez De Aguilar JL, Pradat PF, Dupuis L, Echaniz-Laguna A, Muller A, Dubourg O, Seilhean D, Hauw JJ, Loeffler JP, Meininger V (2005) Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* 57:553–556.
- Joyce NC, Carter GT (2013) Electrodiagnosis in persons with amyotrophic lateral sclerosis. *PM R* 5:S89–S95.

- Juneja T, Pericak-Vance M, Laing H, Dave S, Siddique T (1997) Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu,Zn superoxide dismutase. *Neurology* 48:55–57.
- Kalmijn S, van Boxtel M, Ocké M, Verschuren W, Kromhout D, Launer L (2004) Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology* 62:275–280.
- Karr JE, Alexander JE, Winningham RG (2011) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognition throughout the lifespan: A review. *Nutr Neurosci* 14:216–225.
- Kaur G, Cameron-Smith D, Garg M, Sinclair AJ (2011) Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. *Prog Lipid Res* 50:28–34.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140:691–707.
- Kinsley L, Siddique T (2001) Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993-2016.
- Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng HJ, Terpstra ML, Zundel CAC, Vieira De Sá R, Schellevis RD, Waite AJ, Blake DJ, Veldink JH, Van Den Berg LH, Pasterkamp RJ (2015) C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann Neurol* 78:426–438.
- Kremmyda L-S, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A (2011) Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap* 155:195–218.
- Kurian KM, Forbes RB, Colville S, Swingler RJ (2009) Cause of death and clinical grading criteria in a cohort of amyotrophic lateral sclerosis cases undergoing autopsy from the Scottish Motor Neurone Disease Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:84–87.
- Kurland LT (1988) Amyotrophic lateral sclerosis and parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin. *Trends Neurosci* 11:51–54.
- Kushner PD, Stephenson DT, Wright S (1991) Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of Amyotrophic Lateral Sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:263–267.
- Kwiatkowski TJ, Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C (2009) Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 323:892–896.
- Lamarche B, Couture P (2014) It is time to revisit current dietary recommendations for saturated fat. *Appl Physiol Nutr Metab* 3:1–3.
- Landers JE et al. (2009) Reduced expression of the Kinesin-Associated Protein 3 (KIFAP3) gene increases survival in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*

A 106:9004–9009.

- Lattante S, Rouleau GA, Kabashi E (2013) TARDBP and FUS Mutations Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Summary and Update. *Hum Mutat* 34:812–826.
- Lauritzen L, Brambilla P, Mazzocchi A, Harsløf LBS, Ciappolino V, Agostoni C (2016) DHA effects in brain development and function. *Nutrients* 8:1–17.
- Lee JRJ, Annegers JF, Appel SH (1995) Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis and the effect of referral selection. *J Neurol Sci* 132:207–215.
- Lee M, Hyun DH, Halliwell B, Jenner P (2001) Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative stress and cell death induced by hydrogen peroxide, 4-hydroxynonenal or serum deprivation: Potentiation of injury by ALS-related mutant superoxide dismutases and pro. *J Neurochem* 78:209–220.
- Léger S, Black WC, Deschenes D, Dolman S, Falgueyret JP, Gagnon M, Guiral S, Huang Z, Guay J, Leblanc Y, Li CS, Massé F, Oballa R, Zhang L (2010) Synthesis and biological activity of a potent and orally bioavailable SCD inhibitor (MF-438). *Bioorganic Med Chem Lett* 20:499–502.
- Lewis E, Radonic P, Wolever T, Wells G (2015) 21 Days of Mammalian Omega-3 Fatty Acid Supplementation Improves Aspects of Neuromuscular Function and Performance in Male Athletes Compared To Olive Oil Placebo. *J Int Soc Sports Nutr* 12:28.
- Lin P-Y, Huang S-Y, Su K-P (2010) A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. *Biol Psychiatry* 68:140–147.
- Lindauer E, Dupuis L, Müller H-P, Neumann H, Ludolph AC, Kassubek J (2013) Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* 8:e67783.
- Liu J, Gao L, Zang D (2015) Elevated levels of IFN- γ in CSF and serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 10:1–11.
- Lloyd CM, Richardson MP, Brooks DJ, Al-Chalabi A, Leigh PN (2000) Extramotor involvement in ALS: PET studies with the GABA(A) ligand [(11)C]flumazenil. *Brain* 123:2289–2296.
- Louwerse ES, Visser CE, Bossuyt PM, Weverling GJ (1997) Amyotrophic lateral sclerosis: mortality risk during the course of the disease and prognostic factors. The Netherlands ALS Consortium. *J Neurol Sci* 152:S10–S17.
- Lowe J, Lennox G, Jefferson D, Morrell K, McQuire D, Gray T, Landon M, Doherty FJ, Mayer RJ (1988) A filamentous inclusion body within anterior horn neurones in motor neurone disease defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *Neurosci Lett* 94:203–210.
- Luchsinger J a, Tang M-X, Shea S, Mayeux R (2002) Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:1258–1263.
- Ludolph A, Elger C, Bottger I, Kuttig A, Lottes G, Brune G (1989) N-isopropyl-p-123I-amphetamine single photon emission computer tomography in motor neuron disease. *Eur Neurol* 29:255–260.

- Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretzschmar HA, Monoranu CM, Highley JR, Kirby J, Siddique T, Shaw PJ, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 61:427–434.
- Magistris MR (2006) [Amyotrophic lateral sclerosis: differential diagnosis and frontier forms]. *Rev Neurol (Paris)* 162:4S67-4S80.
- Magnan C (2006) Lipotoxicité et insulino-résistance. *Nutr Clin Métabolisme* 20:108–113.
- Magnus T, Beck M, Giess R, Puls I, Naumann M, Toyka K V (2002) Disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: predictors of survival. *Muscle Nerve* 25:709–714.
- Maihöfner C, Probst-Cousin S, Bergmann M, Neuhuber W, Neundörfer B, Heuss D (2003) Expression and localization of cyclooxygenase-1 and -2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 18:1527–1534.
- Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, Chiò A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pamphlett R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD, Morrison KE, Pall H, Talbot K, Ansorge O; Chromosome 9-ALS/FTD Consortium.; French research network on FTLD/FTLD/ALS.; ITALSGEN Consortium., Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M, Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, Laaksovirta H, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu CS, Yeh TH, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ (2012) Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: A cross-sectional study. *Lancet Neurol* 11:323–330.
- Manjaly ZR, Scott KM, Abhinav K, Wijesekera L, Ganesalingam J, Goldstein LH, Janssen A, Dougherty A, Willey E, Stanton BR, Turner MR, Ampong M-A, Sakel M, Orrell RW, Howard R, Shaw CE, Leigh PN, Al-Chalabi A (2010) The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Amyotroph Lateral Scler* 11:439–442.
- Marin B, Desport JC, Kajeu P, Jesus P, Nicolaud B, Nicol M, Preux PM, Couratier P (2011) Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82:628–634.
- Martín V, Fabelo N, Santpere G, Puig B, Marín R, Ferrer I, Díaz M (2010) Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J Alzheimer's Dis* 19:489–502.
- Maruszak A, Pilarski A, Murphy T, Branch N, Thuret S (2014) Hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease: Is there a role for dietary modulation? *J Alzheimer's Dis* 38:11–38.
- Matthan NR, Ooi EM, Horn L Van, Neuhaus ML, Woodman R, Lichtenstein AH (2014) Plasma phospholipid fatty acid biomarkers of dietary fat quality and endogenous metabolism predict coronary heart disease risk: A nested case-control study within the women's health initiative observational study. *J Am Heart Assoc* 3:14–16.

- Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Flint Beal M, Manfredi G (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277:29626–29633.
- McCombe PA, Henderson RD (2010) Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend Med* 7:557–570.
- Menke R a L, Gray E, Lu C-H, Kuhle J, Talbot K, Malaspina A, Turner MR (2015) CSF neurofilament light chain reflects corticospinal tract degeneration in ALS. *Ann Clin Transl Neurol* 2:748–755.
- Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umapathi P, Arnson H, Rizo L, Mendell JR, Gage FH, Cleveland DW, Kaspar BK (2006) Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19546–19551.
- Mitchell JD (2000) Guidelines in motor neurone disease (MND)/amyotrophic lateral sclerosis (ALS)--from diagnosis to patient care. *J Neurol* 247:7–12.
- Mitchell RM, Freeman WM, Randazzo WT, Stephens HE, Beard JL, Simmons Z, Connor JR (2009) A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 72:14–19.
- Moura MC, Novaes MRCG, Eduardo EJ, Zago YSSP, Del Negro Barroso Freitas R, Casulari LA (2015) Prognostic factors in amyotrophic lateral sclerosis: A population-based study. *PLoS One* 10:1–11.
- Museth AK, Brorsson AC, Lundqvist M, Tibell LAE, Jonsson BH (2009) The ALS-associated mutation G93A in human copper-zinc superoxide dismutase selectively destabilizes the remote metal binding region. *Biochemistry* 48:8817–8829.
- Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ (2014) Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 53:124–144.
- Neumann M, Rademakers R, Roeber S, Baker M, Kretschmar HA, MacKenzie IRA (2009) A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* 132:2922–2931.
- Niebroj-Dobosz I, Janik P, Sokołowska B, Kwiecinski H (2010) Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 17:226–231.
- Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H (2008) ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* 22:1451–1464.
- Norris F, Calanchini P, Fallat R, Panchari S, Jewett B (1974) The administration of guanidine in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 24:721–728.
- Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzierski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD (2002) Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice

- against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11482–11486.
- Oeckl P et al. (2016) Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarkers for ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 17:404–413.
- Okamoto K, Kihira T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M (2009) Fruit and vegetable intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Neuroepidemiology* 32:251–256.
- Orsini M, Oliveira AB, Nascimento OJM, Reis CHM, Leite MAA, de Souza JA, Pupe C, de Souza OG, Bastos VH, de Freitas MRG, Teixeira S, Bruno C, Davidovich E, Smidt B (2015) Amyotrophic lateral sclerosis: New perspectives and update. *Neurol Int* 7:39–47.
- Oyanagi K, Yamazaki M, Takahashi H, Watabe K, Wada M, Komori T, Morita T, Mizutani T (2008) Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:650–658.
- Paganoni S, Deng J, Jaffa M, Cudkowicz M, Wills A (2011) Body Mass Index, Not Dyslipidemia, Is An Independent Predictor of Survival in Amyotrophic Lateral. 44:20–24.
- Palamiuc L, Schlagowski A, Ngo ST, Vernay A, Dirrig-Grosch S, Henriques A, Boutillier A-L, Zoll J, Echaniz-Laguna A, Loeffler J-P, René F (2015) A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol Med* 7:526–546.
- Palomer X, Barroso E, Zarei M, Botteri G, Vázquez-Carrera M (2015) PPAR β/δ and lipid metabolism in the heart. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1860:1569–1578.
- Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ (2010) Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PLoS One* 5:e9386.
- Peet M, Horrobin DF (2002) A Dose-Ranging Study of the Effects of Ethyl-Eicosapentaenoate in Patients With Ongoing Depression Despite Apparently Adequate Treatment With Standard Drugs. *Arch Gen Psychiatry* 59:913–919.
- Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, Estévez AG, Barbeito L (2004) Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89:464–473.
- Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010) The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1804:245–262.
- Pickens CA, Matsuo KH, Fenton JI (2016) Relationship between Body Mass Index, C-Peptide, and Delta-5-Desaturase Enzyme Activity Estimates in Adult Males. *PLoS One* 11:1–13.
- Plaitakis A, Constantakakis E (1993) Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartylglutamate in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* 30:381–386.
- Pradat, P. F. Bruneteau G (2006) Differential diagnosis and atypical subsets of amyotrophic

- lateral sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 162:4S81–4S90.
- Pradat PF, Bruneteau G, Gonzalez De Aguilar JL, Dupuis L, Jokic N, Salachas F, Le Forestier N, Echaniz-Laguna A, Dubourg O, Hauw JJ, Tranchant C, Loeffler JP, Meininger V (2007) Muscle Nogo-A expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. *Ann Neurol* 62:15–20.
- Pradat PF, Dubourg O, De Tapia M, Di Scala F, Dupuis L, Lenglet T, Bruneteau G, Salachas F, Lacomblez L, Corvol JC, Demougin P, Primig M, Meininger V, Loeffler JP, Gonzalez De Aguilar JL (2012) Muscle gene expression is a marker of amyotrophic lateral sclerosis severity. *Neurodegener Dis* 9:38–52.
- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur ELF, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SJ, Brown RH, Ludlow CL, Fischbeck KH (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 33:455–456.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P (2006) Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9:408–419.
- Radunovic A, Mitsumoto H, Leigh PN (2007) Clinical Care of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Lancet Neurol* 6:913–925.
- Reich-Slotky R, Andrews J, Cheng B, Buchsbaum R, Levy D, Kaufmann P, Thompson JLP (2013) Body mass index (BMI) as predictor of ALSFRS-R score decline in ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14:212–216.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Rytten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviiita VM, Kaivorinne AL, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M; ITALSGEN Consortium., Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ, Traynor BJ (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72:257–268.
- Ricquier D (2011) Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: A historical perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2:1–7.
- Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:689–693.
- Robberecht W, Aguirre T, Van den Bosch L, Tilkin P, Cassiman J, Matthijs G (1996) D90A heterozygosity in the SOD1 gene is associated with familial and apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47:1336–1339.

- Robelin L, Gonzalez De Aguilar JL (2014) Blood biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: Myth or reality? *Biomed Res Int* 2014:525097.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59–62.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 326:1464-1468.
- Rouaux C, Panteleeva I, Rene F, Gonzalez de Aguilar J-L, Echaniz-Laguna A, Dupuis L, Menger Y, Boutillier A-L, Loeffler J-P (2007) Sodium Valproate Exerts Neuroprotective Effects In Vivo through CREB-Binding Protein-Dependent Mechanisms But Does Not Improve Survival in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *J Neurosci* 27:5535–5545.
- Rutkove SB, Caress JB, Cartwright MS, Burns TM, Warder J, David WS, Goyal N, Maragakis NJ, Clawson L, Benatar M, Usher S, Sharma KR, Gautam S, Narayanaswami P, Raynor EM, Watson ML, Shefner JM (2012) Electrical impedance myography as a biomarker to assess ALS progression. *Amyotroph Lateral Scler* 13:439–445.
- Sampath H, Ntambi JM (2005) Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Genes of Lipid Metabolism. *Annu Rev Nutr* 25:317–340.
- Scekic-Zahirovic J, Sendscheid O, El Oussini H, Jambeau M, Sun Y, Mersmann S, Wagner M, Dieterlé S, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, Drenner K, Birling MC, Qiu J, Zhou Y, Li H, Fu XD, Rouaux C, Shelkownikova T, Witting A, Ludolph AC, Kiefer F, Storkebaum E, Lagier-Tourenne C, Dupuis L (2016) Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J* 35:1077–1097.
- Schaefer EJ (2002) Lipoproteins, Nutrition, and Heart Disease. *Am J Clin Nutr* 75:191–212.
- Schiffer D, Cordera S, Cavalla P, Migheli A (1996) Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 139:27–33.
- Schmitz G, Ecker J (2008) The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 47:147–155.
- Schroder M, Kaufman R (2005) the Mammalian Unfolded Protein Response. *Annu Rev Biochem* 74:739–789.
- Sharp PS, Dick JRT, Greensmith L (2005) The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 130:897–910.
- Shimizu T et al. (2012) Reduction rate of body mass index predicts prognosis for survival in amyotrophic lateral sclerosis: A multicenter study in Japan. *Amyotroph Lateral Scler* 13:363–366.
- Simopoulos AP (2010) The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: Health implications. *OCL - Oil Corps Gras Lipides* 17:267–275.
- Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH (2004) Increased lipid peroxidation in

- sera of ALS patients A potential biomarker of disease burden. *Neurology* 62:1758–1765.
- Soriani MH, Desnuelle C (2009) Epidemiologie de la SLA. *Rev Neurol (Paris)* 165:627–640.
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph a C, Ross SM, Roy DN, Robertson RC (1987) Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237:517–522.
- Steinacker P et al. (2015) Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: a prospective study on 455 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87:12–20.
- Süssmuth SD, Tumani H, Ecker D, Ludolph AC (2003) Amyotrophic lateral sclerosis: Disease stage related changes of tau protein and S100 beta in cerebrospinal fluid and creatine kinase in serum. *Neurosci Lett* 353:57–60.
- Sutedja NA, van der Schouw YT, Fischer K, Sizoo EM, Huisman MHB, Veldink JH, Van den Berg LH (2011) Beneficial vascular risk profile is associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82:638–642.
- Takahashi H, Snow B, Bhatt M, Peppard R, Eisen A, Calne D (1993) Evidence for a dopaminergic deficit in sporadic amyotrophic lateral sclerosis on positron emission scanning. *Lancet* 342:1016–1018.
- Talbot PR, Goulding PJ, Lloyd JJ, Snowden JS, Neary D, Testa HJ (1995) Inter-relation between “classic” motor neuron disease and frontotemporal dementia: neuropsychological and single photon emission computed tomography study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58:541–547.
- Tan C, Eguchi H, Tagawa A, Onodera O, Iwasaki T, Tsujino A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2007) TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol* 113:535–542.
- Tanaka M, Kikuchi H, Ishizu T, Minohara M, Osoegawa M, Motomura K, Tateishi T, Ohyagi Y, Kira J (2006) Intrathecal upregulation of granulocyte colony stimulating factor and its neuroprotective actions on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:816–825.
- Tarasiuk J, Kułakowska A, Drozdowski W, Kornhuber J, Lewczuk P (2012) CSF markers in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm* 119:747–757.
- Tomonaga M, Saito M, Yoshimura M, Shimada H, Tohgi H (1978) Ultrastructure of the Bunina bodies in anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 42:81–86.
- Towne C, Raoul C, Schneider BL, Aebischer P (2008) Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Mol Ther* 16:1018–1025.
- Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O (2000) Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes. *Arch Neurol* 57:109–113.

- Turner BJ, Talbot K (2008) Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 85:94–134.
- Turner MR, Bowser R, Bruijn L, Dupuis L, Ludolph A, McGrath M, Manfredi G, Maragakis N, Miller RG, Pullman SL, Rutkove SB, Shaw PJ, Shefner J, Fischbeck KH (2013) Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14:19–32.
- Turner MR, Grosskreutz J, Kassubek J, Abrahams S, Agosta F, Benatar M, Filippi M, Goldstein LH, van den Heuvel M, Kalra S, Lulé D, Mohammadi B (2011) Towards a neuroimaging biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 10:400–403.
- Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K (2009) Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 8:94–109.
- Turner MR, Rabiner EA, Hammers A, Al-Chalabi A, Grasby PM, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN (2005) [11C]-WAY100635 PET demonstrates marked 5-HT_{1A} receptor changes in sporadic ALS. *Brain* 128:896–905.
- Tvrzicka E, Kremmyda L-S, Stankova B, Zak A (2011) Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap* 155:117–130.
- Tysnes OB, Vollset SE, Aarli JA (1991) Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Hordaland county, western Norway. *Acta Neurol Scand* 83:280–285.
- Van Den Bosch L, Vandenberghe W, Klaassen H, Houtte E Van, Robberecht W (2000) Ca²⁺-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci* 180:29–34.
- Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE (2009) Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science* 323:1208–1211.
- Vessby B, Gustafsson I-BB, Tengblad S, Berglund L (2013) Indices of fatty acid desaturase activity in healthy human subjects: effects of different types of dietary fat. *Br J Nutr* 110:1–9.
- Vinknes KJ, Elshorbagy AK, Nurk E, Drevon CA, Gjesdal CG, Tell GS, Nygård O, Vollset SE, Refsum H (2013) Plasma stearoyl-CoA desaturase indices: Association with lifestyle, diet, and body composition. *Obesity* 21:294–302.
- Vucic S, Ziemann U, Eisen A, Hallett M, Kiernan MC (2013) Transcranial magnetic stimulation and amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiological insights. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:1161–1170.
- Wang FC, Gérard P, Bouquiaux O (2004) [Advantages and limitations of the motor unit number estimation techniques]. *Rev Med Liege* 59:38-48.

- Wang J, Ho L, Qin W, Rocher AB, Seror I, Humala N, Maniar K, Dolios G, Wang R, Hof PR, Pasinetti GM (2005) Caloric restriction attenuates beta-amyloid neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 19:659–661.
- Wang L, Gutmann DH, Roos RP (2011) Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Hum Mol Genet* 20:286–293.
- Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH (2009) TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18809–18814.
- Wijesekera LC, Leigh PN (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 4:3.
- Wills A-M et al. (2014) Hypercaloric enteral nutrition in Amyotrophic Lateral Sclerosis: *Lancet* 383:2065–2072.
- Witte A V., Fobker M, Gellner R, Knecht S, Flöel A (2009) Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1255–1260.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14:1105–1116.
- Wood MD, Kemp SWP, Weber C, Borschel GH, Gordon T (2011) Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Ann Anat* 193:321–333.
- Wu CH, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, Piotrowska K, Lowe P, Koppers M, McKenna-Yasek D, Baron DM, Kost JE, Gonzalez-Perez P, Fox AD, Adams J, Taroni F, Tiloca C, Leclerc AL, Chafe SC, Mangroo D, Moore MJ, Zitzewitz JA, Xu ZS, van den Berg LH, Glass JD, Siciliano G, Cirulli ET, Goldstein DB, Salachas F, Meininger V, Rossoll W, Ratti A, Gellera C, Bosco DA, Bassell GJ, Silani V, Drory VE, Brown RH Jr, Landers JE (2012) Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 488:499-503.
- Xiao S, McLean J, Robertson J (2006) Neuronal intermediate filaments and ALS: A new look at an old question. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1762:1001–1012.
- Yakunin E, Loeb V, Kisos H, Biala Y, Yehuda S, Yaari Y, Selkoe D, Sharon R (2012) α -Synuclein neuropathology is controlled by nuclear hormone receptors and enhanced by docosahexanoic acid in a mouse model for Parkinson's disease. *Brain Pathol* 22:280–294.
- Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, Mostofsky DI (2002) The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging* 23:843–853.
- Yip PK, Pizzasegola C, Gladman S, Biggio ML, Marino M, Jayasinghe M, Ullah F, Dyll SC, Malaspina A, Bendotti C, Michael-Titus A (2013) The omega-3 Fatty Acid eicosapentaenoic Acid accelerates disease progression in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 8:e61626.

ANNEXE

Liste des publications et présentations

Publications

- ***Blood biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: myth or reality?*** Robelin L, Gonzalez De Aguilar JL. Biomed Res Int. 2014;2014:525097.
- ***Blood Cell Palmitoleate-Palmitate Ratio Is an Independent Prognostic Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis.*** Henriques A, Blasco H, Fleury MC, Corcia P, Echaniz-Laguna A, Robelin L, Rudolf G, Lequeu T, Bergaentzle M, Gachet C, Pradat PF, Marchioni E, Andres CR, Tranchant C, Gonzalez De Aguilar JL, Loeffler JP. PLoS One. 2015 Jul 6;10(7):e0131512.
- ***The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions.*** Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC. J Neurosci. 2013 May 15;33(20):8772-83.

Présentations orales et congrès

- ***Sécrétion de vésicules musculaires toxiques : rôles dans la pathogénèse de la SLA.*** Le Gall L, Duddy W, Roquevière S, Martinat C, Madjihounoum B, Blasco H, Mariot V, Lainé J, Joubert R, Dumonceaux J, Ouandaogo G, Robelin L, Ratti F, Mejat A, Mouly V, Butler Browne G, Loeffler JP, Gonzalez De Aguilar JL, Pradat PF, Duguez S. 2èmes journées de la recherche sur la SLA et les maladies du neurone moteur, Paris, 18 et 19 octobre 2016
- ***Utilisation des lipides comme biomarqueurs de la SLA.*** Robelin L. Conférence grand public « André combat la SLA », Nantes, Avril 2016
- ***Polyunsaturated fatty acid composition of blood lipids as a potentiel biomarker for ALS patients.*** Robelin L, Henriques H, Blasco H, Fleury MC, Corcia P, Echaniz-Laguna A, Lequeu T, Rudolf G, Bergaentzle M, Andrès C, Tranchant C, Loeffler JP, Marchioni E, Gonzalez De Aguilar JL. Congrès ENCALS, Dublin, Mai 2015
- ***Systemic alteration of polyunsaturated fatty acid composition of lipids in a mouse model of ALS.*** Robelin L, Henriques A, Fleury MC, Bergaentzle M, Loeffler JP, Gonzalez De Aguilar JL. Journées de l'Ecole Doctorale, Strasbourg, Avril 2015

Laura ROBELIN
***Analyse de la composition en acides gras
des lipides dans la sclérose latérale
amyotrophique : implications dans le
processus pathologique***

La SLA est une maladie neurodégénérative grave touchant l'adulte qui se caractérise principalement par la perte sélective des neurones moteurs cortico-spinaux et des motoneurons bulbaires et spinaux. La SLA se caractérise également par des altérations de l'homéostasie énergétique et du métabolisme des lipides. L'objectif de ce travail de thèse était, dans un premier temps, d'identifier des changements dans la composition en acides gras, dans le sang, comme potentiels biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de la SLA. Dans un second temps, le but était de moduler ces changements, par des approches nutritionnelles, afin de mieux comprendre l'implication d'un métabolisme lipidique altéré dans le processus pathologique de la SLA. Ces travaux ont montré que des taux élevés d'acides gras mono-insaturés (MUFA), ainsi que des taux diminués d'acides gras poly-insaturés (PUFA), sont associés à un meilleur pronostic. L'analyse des effets de la modification de la composition en acides gras, dans des modèles de dénervation pathologique et lésionnelle, a confirmé l'implication de l'antagonisme MUFA/PUFA dans le processus neurodégénératif. Ces travaux font apparaître des mises en garde quant à l'utilisation des acides gras dans des approches à visée thérapeutique pour la SLA.

Mots-clé : sclérose latérale amyotrophique, métabolisme, acide gras, biomarqueur

ALS is a fatal neurodegenerative condition characterized by the selective loss of upper and lower motor neurons. The disease is also characterized by alterations of energy homeostasis and lipid metabolism. The objective of this PhD work was, first, to identify changes in fatty acid composition of lipids in blood of ALS patients, as potential diagnosis and prognosis biomarkers of the disease. The second goal was to modulate these changes, by nutritional approaches, in order to better understand the involvement of an altered lipid metabolism in the pathological process. Our results showed that high levels of monounsaturated fatty acid (MUFA), as well as low levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA), are associated with a better prognosis. The analysis of the effects of a modified fatty acid composition in both pathological and lesion models of denervation, has confirmed implication of the antagonistic relationship between MUFA and PUFA in the neurodegenerative process. This work suggests a cautious usage of fatty acids in therapeutic approaches targeting ALS.

Key words : amyotrophic lateral sclerosis, metabolism, fatty acid, biomarker