UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

U1118 Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence

THÈSE présentée par :

Cyril QUESSADA

soutenue le : **13 septembre 2021**

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

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

ANALYSE DE LA FLEXIBILITÉ MÉTABOLIQUE DANS LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE ET APPROCHES THÉRAPEUTIQUES

THÈSE dirigée par :

M. LOEFFLER Jean-Philippe	Directeur de recherches - Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. BLASCO Hélène	PU-PH - Université de Tours
M. ANDRES Christian	PU-PH - Université de Tours

AUTRE MEMBRE DU JURY

M. METZGER Daniel	Directeur de recherches - Université de Strasbourg

Pour toi, ma maman...

REMERCIEMENTS

Comme on dit « On garde le meilleur pour la fin » pour l'écriture d'un manuscrit, c'est-à-dire remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné de près ou de loin dans cette incroyable aventure qu'est le doctorat.

Premièrement, j'aimerai remercier très chaleureusement mon directeur de thèse, **Jean-Philippe Loeffler**. Je ne sais pas comment te remercier, juste merci infiniment de m'avoir donné la chance de faire cette thèse. Je n'étais pas le meilleur en master et pourtant tu m'as fait confiance. Ta disponibilité, ta générosité sans limite et ton immense expertise dans le domaine de la recherche m'ont été bénéfiques durant ces trois années. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir poussé dans ma réflexion scientifique et de m'avoir toujours soutenu dans les bons et les mauvais moments. Merci pour la liberté et l'autonomie que tu m'as laissé dans mon travail tout en étant 24h/24 et 7j/7 disponible si j'en avais besoin. Merci de m'avoir donné la chance de partir en Australie et de toujours m'impliquer dans toutes les réunions collaboratives. C'est d'ailleurs en Australie que j'ai mangé dans le meilleur restaurant indien de ma vie ! Enfin merci d'être toujours présent pour discuter de tout et pas uniquement de science.

Comment continuer mes remerciements, sans évoquer l'investissement sans faille de ma « deuxième directrice de thèse », **Frédérique René**. Officiellement, tu ne l'es pas mais officieusement c'est tout comme. Merci pour ton implication précieuse dans ma thèse. Toujours disponible, prête à aider sans limite dans le laboratoire, à prendre le temps de répondre à toutes mes interrogations mais surtout pour ta patience à toutes épreuves. Un énorme merci pour ton temps que tu m'as accordé sur les publications, les saisines, les présentations orales et écrites etc… bref merci pour ton aide scientifique et personnelle.

Je souhaiterai remercier les membres de mon jury de thèse **Hélène Blasco**, **Christian Andres** et **Daniel Metzger** qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

J'aimerai également remercier **Luc Dupuis**, directeur actuel du laboratoire, pour ses conseils scientifiques apportés lors des réunions du laboratoire. Je remercie également **José-Luiz Gonzalez De Aguilar**, **Caroline Rouaux**, **Marc de Tapia** et **Chantal Sellier** pour tous les échanges scientifiques qui m'ont été utiles lors de ma thèse.

Merci à **Michael Spedding** pour son implication sans relâche et son enthousiasme dans mon projet de thèse. Merci pour ses nombreuses discussions sur la SLA et sur l'industrie pharmaceutique. Merci également à nos collaborateurs italiens **Cristiana Valle** et **Alberto Ferri** et australiens **Ngo Shyuan Ngo** et **Frederik Steyn** pour leurs expertises sur les différents projets.

Je souhaiterai également remercier **Sylvie Dirrig-Grosch** et **Brigitte Kuenemann**. Merci **Sylvie** pour ton aide, ta bonne humeur mais aussi ta gentillesse. Ton savoir et ton expérience dans les différentes techniques de laboratoire sont de véritables atouts. Merci pour ta disponibilité tout au long de ma thèse. Merci **Brigitte** pour tout ce que tu as fait pour moi aux cours de ma thèse, toutes les démarches administratives contraignantes et parfois urgentes. Merci aussi pour ta disponibilité et ta réactivité. Merci aussi pour ces petits souvenirs que tu me ramenais de tes voyages, comme un magnifique masque que je n'aurai jamais imaginer porter avant cette satanée pandémie.

Je tiens également à remercier **Marie-Jo Ruivo** et **Annie Picchienna**. Merci **Marie-Jo** pour ta bonne humeur quotidienne et ta bienveillance. Merci **Annie** pour ton investissement dans l'élevage de toutes les souris nécessaires à mes travaux de thèse.

Merci aux post-docs du labo **Jelena**, **Salim**, **Matei**, **Raph** et **Johan** pour tous leurs conseils techniques et scientifiques durant mes trois années de thèse. Merci **Jelena** pour tous les conseils que tu as pu me donner. Merci à **Salim** pour ta disponibilité autour d'un café pour des conseils statistiques bien éclairés. De la moustache guidon à la queue de cheval en passant par des chaussettes improbables, **Matei**, tu n'as jamais cessé de te chercher… Merci pour ton aide et ta bonne humeur. **Raph**, merci pour ta bienveillance, ton « calme » de maître Shifu (enfin quand tu ne cours pas partout dans le labo) et d'être toujours à l'écoute. Merci pour tous les conseils que tu as pu me donner. Et bien sûr comment ne pas te remercier pour ton emménagement dans un immeuble sans ascenseur…mais je ne vais rien dire au risque de me faire attaquer par toutes tes armes de ninja ! **Johan**, alias « Jojo le rappeur de l'IGBMC », merci pour ton franc-parler, ta bonne humeur et ton aide technique précieuse pour les doctorantes ;). Merci pour la dynamique que tu as su apporter au labo et surtout ne t'inquiète pas, un jour tu trouveras un jeu pour la PS5 que tu as acheté avec l'intégralité de ta paie.

Merci à **Alizée**, **Haoyi**, **Simon** et **Mike** pour leur bonne humeur et leur gentillesse. **Alizée** l'incruste, merci pour ta spontanéité et ta cool attitude. Compagnon du week-end en perfusion. Dorénavant, je sais avec qui me mettre lors d'une partie de Pictionary ! **Haoyi**, merci d'avoir partagé avec nous ta culture, ton humour, la nourriture parfois insolite venu de Chine mais aussi délicieuse #raviolis ! Peut-être que tu préféreras le fromage au durian. **Simon**, tu resteras pour moi, l'américain qui goûte à TOUTES les pâtisseries françaises. Merci pour ta générosité, même si c'est toujours toi l'imposteur ! **Mike**, petit stagiaire qui est devenu grand stagiaire ou presque. Merci à toi, mon nouveau voisin de bureau. Bien que tu sois sympathique, je t'interdis de prendre ma chaise de bureau !

Sans eux, bien évidemment, un laboratoire de recherche n'existerait pas. Merci à **Stéphane**, **Marion**, **Florian**, **Geoffrey**, **Margaux**, **Marco**, **Claudia** et **Jérôme** pour leurs aides techniques indispensables. « **Stéphane** ?! » (aucune réaction…), « **Stéphinouuuu** ! » (« ouuuuiii !»). Merci à toi d'avoir été là du début à la fin, et ce pour les milliards de questions techniques que je te posais (parfois dans la même journée voire la même heure…) mais merci surtout pour ta patience, ta pédagogie et ta capacité à former efficacement le personnel du labo. Tu es le plus ancien des « jeunes » et ce n'est pas pour rien, tu es LA personne indispensable que tout labo rêve d'avoir dans ses rangs. Merci pour tout ! Tu m'as tellement bien formé à la qPCR que j'ai dépassé le Grand maître :-p ! **Marion**, ton arrivée a été déterminante pour la fin de ma thèse. Ton aide précieuse, surtout en fin de parcours m'a aidé énormément. Merci à toi pour ta simplicité, ta joie de vivre et surtout ton attitude « 0 prise de tête » #VictorHugo. **Florian**, j'aurai aimé que tu continues jusqu'à la fin de mon aventure, ta contribution à la vie du labo était cruciale. Merci pour tous ces bons moments au labo et aussi en dehors. Merci également pour ce magnifique shooting photo. **Geoffrey**, merci pour ta générosité et ta soif d'aider les autres. Tu apportes une belle dynamique à ce groupe, surtout par ta culture impressionnante, c'est toujours agréable de partager tes connaissances. **Margaux**, merci pour ta folie et à ton rire qu'on pourrait suivre à la trace. Tu as su égayer la vie du laboratoire par ta spontanéité. Merci pour ta gentillesse mais aussi pour ton soutien dans nos reprises musicales pendant les longues heures de vibratome. **Marco**, ton éternuement est l'une des choses qui me manque déjà. Merci pour ta disponibilité et ton envie inépuisable d'aider les autres. **Claudia**, merci pour ton expérience dans les expériences de comportement animal, ta bonne humeur et ta gentillesse. **Jérôme**, merci pour ton aide informatique qui a été précieuse lorsque les pc ou logiciels faisaient des caprices.

J'aimerai également remercier **Imma**, **Thibaut**, **Robin**, **Félicie**, **Marguerite**, **Aurore**, et **Gina** qui m'ont accompagné tout au long de ma thèse. **Imma**, même si je déteste le FC Barcelone, tu es la seule catalane que j'apprécie ;). Merci pour ta bonne humeur, j'ai aimé les moments passés en ta compagnie. Hala Madrid ! **Thibaut**, fervent de Doctoneuro, tu as toujours su (enfin essayé) de vendre au mieux tes cartes adhérents. Merci d'avoir été mon coéquipier de labo pour parler football, bon sauf quand tu me

parlais du PSG, organiser des soirées Doctoneuro *etc*. **Robin**, l'homme le plus charismatique du laboratoire (non je déconne), merci pour tous ces fous rires que tu déclenchais à tout moment dans la journée, ta fougue, ton talent pour la pâte à sel mais surtout pour la danse vont beaucoup me manquer. **Félicie** et **Marguerite**, les voisines du bureau des handicapés. **Félissoche**, je n'ai jamais vu une personne aussi organisée que toi, merci pour la bonne ambiance et l'énergie que tu apportes au quotidien. **Guerite**, ta personnalité décalée fait de toi une personne attachante (voilà, j'ai utilisé mon « bon à compliments ») malgré toutes les questions que tu poses ! **Aurore** et **Gina**, les pipelettes du laboratoire mais je vous aime quand même. **Awawawa**, camarade en master, collègue en thèse mais surtout une vraie amie. Merci à toi de nous avoir toujours reçu comme des rois pendant nos incalculables travaux en master. Merci pour tous ces moments passés en master et en thèse à discuter de tout et de rien en errant par exemple dans les rues de Bordeaux #TeamBichons. **Ginneuuhh**, comment faire simple quand on peut faire compliqué. Voilà, j'ai tout résumé non ? Merci à toi pour la folie, l'énergie, les rires, la générosité et la gentillesse que tu apportes au quotidien, qui font que les journées passent très très vite. Ah oui, bien sûr j'oubliais, merci à tes nombreuses histoires palpitantes qui ne contenaient qu'une once d'exagération (#ironie). Toujours prête à aider, tu as été la première personne qui m'a accueillie au laboratoire, donc difficile de ne pas bien m'y intégrer.

Je tiens également à remercier **Caro**, **Guillaume**, **Florian**, **Zélie**, **Julia**, **Lucas**. Merci à **Caro**, mon amie d'enfance de 27 ans. Toujours à mes côtés dans les bons et les mauvais moments. Merci d'avoir toujours été présente même quand on ne se voyait pas souvent. **Guillaume**, avec qui j'ai fait quasiment toute ma scolarité et qui a toujours été à mes côtés. **Florian** et **Zélie**, les Gabelia, mes compagnons de master, mais surtout mes amis. Toujours prêt à chanter du Céline ou « le temps des cathédrales » à en faire trembler les vitres. **Flo**, toujours là à n'importe quelle heure et n'importe quand, bon quand tu réponds tout de suite hein ;). Merci pour ton soutien, tu as été l'un des plus présents depuis le master et pendant ma thèse. A quand une autre virée pour chasser le loup ? **Zezette vapeur**, ou gallinette cendrée de son vrai nom, merci pour tous ces moments partagés en ta compagnie, même quand tu n'arrives pas à passer une commande de tarte flambée au munster. **Julia** et **Lucas**, autres membres de la TeamBichons, merci à vous pour tous ces moments de fous rires durant le master. Merci également à ma **belle-famille** qui m'a tout de suite mis à l'aise et soutenu dans les bons et les mauvais moments.

Merci à toi **Alex**, ma conjointe. Par où commencer ? Trop de choses me viennent en tête que je ne pourrai pas tout écrire en quelques lignes. Ma force, mon appui, ma motivation de tous les jours. Merci d'avoir été présente depuis le début, chaque jour un peu plus, chaque fois toujours plus. Je te remercie pour tous les moments passés à tes côtés, même quand ça n'allait pas. Tu as toujours su trouver les bons mots pour me réconforter, me motiver, m'apaiser. Tant de complicité, de spontanéité et d'attention entre nous que je mesure la chance d'être près de toi au quotidien. Merci pour tous tes encouragements, pour tout ce que tu fais pour moi sans compter même si tu ne t'en rends pas compte. Merci infiniment d'être la personne que tu es, et pour tout ce que tu m'apportes dans ma vie. #chef !

Enfin, comment pourrai-je terminer ces remerciements sans adresser un énorme merci aux personnes sans qui je n'aurai jamais vécu cette incroyable aventure de thèse. Merci à ma sœur, ma zdam **Pauline**, toujours à faire la folle avec moi et à rigoler sans cesse. Mon frère, mon zgaz **Loïc**, toujours présent, à prendre soin de nous dans tous les moments. Merci à ma belle-sœur, **Anne**, pour ton soutien et ta bonne humeur accompagnés de mes trois neveux, **Anaël**, **Gabin** et **Maxence** (dont je suis fier d'être le parrain), merci à eux pour leur folie incommensurable. Merci **mamie** et **papy**, pour votre soutien inestimable depuis toutes ces années. Merci à mes parents, **maman** et **Laurent**, qui ont toujours cru en moi durant ces longues études, m'ont toujours soutenu dans mes choix et surtout m'ont tout donné pour que je réussisse. Voilà j'y suis, tu n'y es pas, mais je sais que tu veilles sur moi, j'espère que tu es fière de moi, **maman** <3

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS ---- 10

ABREVIATIONS ---- 11

AVANT-PROPOS ---- 12

INTRODUCTION ---- 15

PARTIE 1 : La Sclérose Latérale Amyotrophique ---- 15

A. Présentation des aspects cliniques ---- 15

1. Historique et définitions ---- 15

2. Données épidémiologiques ---- 15

2.1 Susceptibilité génétique de la SLA ---- 16

2.2 Influence potentielle de l'environnement et des facteurs de risques associés ---- 17

3. Le tableau clinique ---- 18

3.1 Déclaration et progression de la SLA ---- 18

3.2 Différents sites d'initiation de la SLA ---- 19

3.3. Les signes cliniques ---- 20

4. Etablissement d'un diagnostic différentiel de la SLA ---- 21

4.1 les critères de diagnostic d' « El Escorial » ---- 21

4.2 Les méthodes d'évaluation ---- 22

4.2.1 Analyse du tissu musculaire par mesures électrophysiologiques et biopsies musculaires ---- 22

4.2.2 La neuroimagerie ---- 23

4.2.3 Les biomarqueurs ---- 23

4.3 Evaluation et progression des symptômes de la SLA ---- 24

5. Du traitement symptomatique au traitement curatif ? ---- 26

5.1 Les traitements symptomatiques non médicamenteux ---- 26

5.1.1 Prise en charge médicale ---- 26

5.1.2 Exercice physique ---- 26

5.1.3 Nutrition ---- 27

5.1.4 La ventilation assistée ---- 28

5.2 Les traitements symptomatiques médicamenteux ---- 28

5.3 Les traitements médicamenteux autorisés ---- 28

5.3.1 Le riluzole ---- 29

5.3.2 L'Edaravone ---- 29

6. Les causes du décès ---- 30

B. Modélisation animale ---- 31

1. Identification du 1er gène associé à la SLA ---- 31

2. Les modèles murins *SOD1* de la SLA ---- 32
2.1 Le modèle $SOD1^{G93A}$ ---- 32
2.2 Le modèle $Sod1^{G86R}$ ---- 33
C. Les mécanismes physiopathologiques décrits dans la SLA ---- 35
1. Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydant ---- 35
2. L'homéostasie protéique ---- 37
3. Excitotoxicité glutamatergique ---- 38
D. Pathogénicité pluricellulaire ---- 39
1. Les neurones moteurs ---- 39
2. Les cellules gliales ---- 40
3. Implication de la JNM et du muscle ---- 42
PARTIE 2 : La composante métabolique : cause ou conséquence de la SLA ? ---- 43
A. Physiologie du métabolisme énergétique à l'échelle de l'organisme ---- 43
1. La flexibilité métabolique au service de l'homéostasie énergétique ---- 43
2. Voies biochimiques principales ---- 44
2.1 Le métabolisme glucidique ---- 44
2.1.1 Transport du glucose et régulation ---- 44
2.1.2 Devenir, utilisation du glucose et régulation ---- 46
2.2 Le métabolisme lipidique ---- 47
2.2.1 Transport des acides gras et régulation ---- 47
2.2.2 Devenir, utilisation des AG et régulation ---- 48
2.3 Le chaine respiratoire et la phosphorylation oxydative ---- 49
3. Cycle de Randle : le régulateur énergétique à l'échelle de l'organisme. ---- 51
B. Altérations du métabolisme énergétique dans la SLA ---- 55
1. Hypermétabolisme systémique ---- 55
2. Hypermétabolisme cérébrale ---- 56
2.1 Couplage métabolique astrocyte-motoneurone ---- 56
2.2 Altération centrale du métabolisme énergétique dans la SLA ---- 58
3. Contribution du muscle strié squelettique ---- 59
3.1 Structure et diversité des fibres musculaires ---- 59
3.2 Sarcomère et contraction musculaire ---- 63
3.3 Dénervation sélective et progressive des muscles dans la SLA ---- 65
3.4 Acteurs moléculaires et désordres du métabolisme musculaire impliqués dans la SLA ---- 69
PROBLÉMATIQUE DE THÈSE ---- 93
RÉSULTATS ---- 97
A. Publication en préparation ---- 97

1. INTRODUCTION ---- 98

2. MATERIELS ET METHODES ---- 99

2.1 Déclaration éthique ---- 99

2.2 Animaux et conditions expérimentales d'élevage ---- 99

2.3 Evaluation de la force musculaire ---- 100

2.4 Electromyographie ---- 100

2.5 Compression du nerf sciatique ---- 101

2.6 Préparation des tissus ---- 101

2.7 Culture d'explants de moelle épinière ---- 103

2.7.1 Culture primaire de motoneurones spinaux ---- 103

2.7.2 Traitement au TMZ et induction du stress glutamatergique ---- 104

2.7.3 Méthodes d'évaluation ---- 104

2.8 Statistiques ---- 104

3. RÉSULTATS ---- 105

3.1 La TMZ ralentit la progression de la maladie, préserve l'axe moteur de la dégénérescence sans affecter la survie des souris $Sod1^{G86R}$ ---- 105

3.2 La TMZ module le métabolisme énergétique des fibres musculaires des souris $Sod1^{G86R}$ 107

3.3 La TMZ facilite la récupération motrice d'un modèle de compression du nerf sciatique et favorise la pousse axonale in vitro ---- 108

4. DISCUSSION ---- 109

5. CONCLUSION ---- 112

6. RÉFÉRENCES ---- 112

7. FIGURES & LÉGENDES ---- 118

DISCUSSION ---- 126

A. Des modulateurs métaboliques cardiaques préservent l'intégrité de l'axe moteur de deux modèles murins de SLA ---- 126

B. Correction de la balance énergétique musculaire comme élément clef pour freiner le développement de la SLA ? ---- 130

C. Stimulation du système de réparation au site de lésion favorisée par le spectre d'action élargie de la RAN et du TMZ ---- 136

D. Sensibilité différente des modèles murins de SLA vis-à-vis des traitements : vers une thérapie personnalisée ? ---- 139

E. Intérêt de cibler les atteintes métaboliques par ce type de traitement ---- 142

CONCLUSION ---- 145

ANNEXES ---- 146

A. Données préliminaires de l'étude comparative des deux composés dans le modèle *$Sod1^{G86R}$* 147

B. Publication 1: Repurposing of Trimetazidine for Amyotrophic Lateral Sclerosis: a study in *SOD1^{G93A}* mice. ---------- 150

C. Publication 2: Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-*SOD1^{G93A}* Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target ---------- 179

D. Publication 3: Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Functions and Extends Survival in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis ---------- 218

E. Publication 4: Drug repositioning in neurodegeneration: An overview of the use of ambroxol in neurodegenerative diseases ---------- 228

F. Publication 5: Sphingolipids metabolism alteration in the central nervous system: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and other neurodegenerative diseases ---------- 233

BIBLIOGRAPHIE ---------- 245

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Répartition génétique dans la SLA. 17
Figure 2: Sites d'initiation de la SLA et symptômes associés. 20
Figure 3 : Dégénérescence des populations neuronales associée aux signes cliniques de la SLA. 21
Figure 4 : Critères d'évaluation de la progression de la SLA selon l'échelle ALSFRS-R. 25
Figure 5 : Accompagnement médical multidisciplinaire du patient SLA. 27
Figure 6 : Caractéristiques principales observées dans deux modèles murins de SLA. 34
Figure 7 : Voies métaboliques du glucose et régulation de son transport. 45
Figure 8 : Voies métaboliques des AG et régulation de son transport. 48
Figure 9 : Couplage de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative. 50
Figure 10 : Mobilisation des substrats énergétiques en période post-prandiale. 52
Figure 11 : Mobilisation des substrats énergétiques en période de jeûne. 53
Figure 12 : Le cycle de Randle, régulateur du métabolisme énergétique. 54
Figure 13 : Représentation schématique du couplage métabolique astrocyte-neurone. 57
Figure 14 : Représentation structurale du muscle strié squelettique. 60
Figure 15 : Illustration représentative des trois types de fibres musculaires et tableau récapitulant leurs principales caractéristiques structurales et fonctionnelles. 61
Figure 16 : Représentation schématique de la proportion du types de fibres musculaires retrouvée dans les muscles à prédominance oxydative et glycolytique. 62
Figure 17 : Caractéristiques d'innervation des différents types d'unité motrice. 62
Figure 18 : Représentation schématique de l'ultrastructure d'une myofibrille. 63
Figure 19 : Représentation schématique du couplage neuromusculaire. 65
Figure 20 : Caractéristiques morpho-fonctionnelles des motoneurones α et leurs unités motrices. 67
Figure 21 : Dénervation séquentielle des motoneurones α concomitante à la progression de la maladie des souris $SOD1^{G93A}$. 68
Figure 22 : Effets pharmacologiques observés de la ranolazine et de la trimétazidine dans deux modèles murins de SLA. 135

ABREVIATIONS

Ach	Acétylcholine
AchR	Récepteur nicotinique de l'Ach
AG	Acide Gras
ALSFRS	"ALS Functional Rating Scale"
ALSFRS-R	"ALS Functional Rating Scale – Revised"
AMPK	"AMP-activated protein kinase"
C9ORF72	"Chromosome 9 Open Reading Frame 72"
CPT1	"Carnitine Palmitoyl Transferase"
DCA	Dichloroacétate
EAAT	"Excitatory amino acid transporters"
EMA	"European Medicines Agency"
EMG	Électromyographie
FADH	Flavine adénine dinucléotide
fALS	SLA familiale
FAT/CD36	"Fatty Acid Translocase/ Cluster of Differentiation 36"
FDA	"Food Drug Administration"
FUS	"Fused in Sarcoma"
GLUT	Récepteur au glucose
IMC	Indice de Masse Corporelle
IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
JNM	Jonction Neuromusculaire
LCR	Liquide Céphalorachidien
MCT	"Monocarboxylase receptors"
MN	Motoneurone
MND	"Motor Neuron Disease"
mSOD1	SOD1 mutée

MyHC	Myosine à chaîne lourde
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NMC	Neurone Moteur Cortical
nTg	Non transgénique
PDH	Pyruvate Déshydrogénase
PDK4	Pyruvate Déshydrogénase Kinase 4
PFK1	Phosphofructokinase 1
PPAR	"Peroxisome proliferator-activated receptors"
QR	Quotient Respiratoire
RAN	Ranolazine
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	"Reactive oxygen species"
sALS	SLA sporadique
SDH	Succinate déshydrogénase
SERCA	"Sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase"
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SOD1	Superoxyde dismutase 1
TARDBP	"TAR DNA binding protein"
TEP	Tomographie par émission de positons
Tg	Transgénique
TG	Triglycérides
TMZ	Trimétazidine
UCP	"UnCoupling Protein"
UM	Unité Motrice
VDAC	"Voltage-dependent anion channel"

AVANT-PROPOS

Au cours de l'été 2014, l'américain Pete Frates lance sur les réseaux sociaux un défi totalement glacé, le « *Ice Bucket Challenge* » qui a pour but de médiatiser la lutte contre la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), plus connue sous le nom de « maladie de Charcot ». Vite devenu viral à travers le monde, notamment dans notre laboratoire, ce défi a permis de lever des fonds considérables pour combattre cette maladie. 3ème maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer et celle de Parkinson, fatale et incurable, la SLA est caractérisée par la mort sélective et progressive des neurones corticaux et des motoneurones contrôlant les muscles impliqués dans la motricité volontaire. Cette dégénérescence provoque l'atrophie des muscles striés squelettiques, une paralysie graduée aboutissant inévitablement au décès du patient généralement 3 à 5 ans après le diagnostic établit. L'origine ainsi que les mécanismes physiopathologiques associés sont toujours incompris.

Très longtemps considérée comme une maladie intrinsèque au motoneurone, les données de la littérature dont les nôtres permettent d'affirmer qu'une protection du motoneurone n'est pas suffisante pour contrer la SLA. L'autre caractéristique majeure de la SLA est le démantèlement de la jonction neuromusculaire qui est intimement lié au déficit énergétique chronique retrouvé dans l'ensemble de l'organisme. En effet, depuis le début du 21ème siècle, plusieurs études recensent des altérations métaboliques (hypermétabolisme et dyslipidémie) et mitochondriales importantes chez les patients et les souris modèles de SLA. Ces événements sont associés à la progression de la pathologie puisqu'ils sont détectés précocement, avant tout symptôme moteur détectable et précédant même la mort des motoneurones. De ce fait, ces modifications métaboliques participent incontestablement au développement de la SLA et imposent une nouvelle définition de la SLA qui n'est plus considérée comme une maladie stricte du motoneurone. Par ailleurs, l'hypermétabolisme et la dyslipidémie sont des facteurs négativement corrélés au pronostic vital des patients atteints de SLA.

Les travaux de notre laboratoire ont permis de montrer avant même l'apparition des symptômes moteurs, une perte de la flexibilité métabolique se traduisant par l'incapacité d'utiliser le glucose (glycolyse) comme source d'énergie au détriment d'une augmentation concomitante des acide gras (β-oxydation) dans le modèle murin *Sod1*^{G86R}. Par ailleurs, il a également été identifié un acteur moléculaire important, la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4), qui semble être à l'origine de ce déséquilibre énergétique. Ainsi, ce déséquilibre énergétique contribuerait activement au développement de la maladie.

Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressé à deux pans de la SLA : le métabolisme bioénergétique principalement qui fait l'objet de ce manuscrit et le métabolisme des sphingolipides secondairement dont ma contribution sera uniquement présentée en annexe.

Durant ces 3 années, je me suis focalisé sur cette perte de flexibilité métabolique dans le développement de la SLA, dont l'objectif de mon travail était d'évaluer l'impact d'une correction de ce déséquilibre à l'aide d'agents pharmacologiques. Tout d'abord, j'introduirai ce manuscrit par une présentation de la SLA suivie de la contribution du métabolisme énergétique dans le muscle strié squelettique dans le développement de la maladie. Puis, je présenterai la partie résultats sous la forme d'un article scientifique en cours de préparation qui expose les effets bénéfiques de la trimétazidine (Vastarel®) sur le métabolisme énergétique et le développement de la SLA dans le modèle murin *Sod1*^{G86R}.

L'ensemble de mes travaux de thèse démontre le rôle crucial du métabolisme énergétique dans le développement de la SLA ainsi que l'intérêt de la trimétazidine dans cette pathologie. Mes travaux permettent d'envisager un repositionnement médicamenteux de la trimétazidine comme potentiel traitement de la SLA.

En annexe de ce manuscrit, sont présentées deux publications auxquelles j'ai pu contribuer : une étude récemment soumise qui présente les effets bénéfiques de la trimétazidine sur le métabolisme énergétique et le développement de la SLA dans un autre modèle de SLA, le modèle murin *SOD1*^{G93A} et une autre étude publiée en 2020 qui décrit les effets d'une reprogrammation métabolique musculaire dans le modèle murin *SOD1*^{G93A} à l'aide d'un autre agent pharmacologique, la ranolazine (Ranexa®).

INTRODUCTION

INTRODUCTION

PARTIE 1 : La Sclérose Latérale Amyotrophique

A. Présentation des aspects cliniques

1. Historique et définitions

En 1869, le médecin neurologue français Jean-Martin Charcot établit pour la première fois une description complète de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Cette maladie neurodégénérative est caractérisée par la perte sélective et progressive des neurones moteurs corticaux (situés dans le cortex moteur) et des motoneurones (MN) bulbaires et spinaux (respectivement localisés dans le bulbe rachidien et dans la moelle épinière) (Brooks and Fischbeck, 1995; Bruijn et al., 2004; Cleveland and Rothstein, 2001). Classée parmi les maladies rares, elle reste la maladie du MN la plus fréquente chez l'adulte (Worms, 2001). Une perte de poids, une atrophie musculaire et une paralysie progressive généralisée s'installent chez les patients provoquant une mort par insuffisance respiratoire généralement 3 à 5 ans après l'établissement de leur diagnostic. Cette maladie qui a une évolution très rapide, affecte en moyenne des individus âgés de 55 ans (van Es et al., 2017). Aujourd'hui, aucun traitement curatif n'est disponible pour la SLA. Depuis 1995, seul le riluzole (Rilutek®) est autorisé en Europe pour le traitement de la SLA permettant d'augmenter de quelques mois l'espérance de vie de certains patients atteints de SLA (Bensimon et al., 2002; van Es et al., 2017; Miller et al., 1996, 2012; Turner et al., 2001; Zoccolella et al., 2007). Récemment, la Food and Drug Administration (FDA) a autorisé aux USA et au Japon, l'Edaravone comme autre molécule pour le traitement de la SLA. Cependant, son efficacité est remise en cause (Abe et al., 2017; Al-Chalabi et al., 2016; Dorst et al., 2018).

2. Données épidémiologiques

En Europe, la SLA a une incidence de 1,75 à 3 pour 100 000 habitants par an et touche 60 000 personnes chaque année (Chiò et al., 2013; van Es et al., 2017; Logroscino et al., 2010; Masrori and Van Damme, 2020; Petrov et al., 2017). En France, les études dénombrent 6000 personnes diagnostiquées comme ayant une SLA et 3 à 4 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants (Couratier et al., 2016; Marin et al., 2014). Cependant, la répartition géographique mondiale de la SLA est encore mal établie en raison du nombre insuffisant de données récoltées (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Couratier et al., 2016). Toutefois, des études tendent à montrer qu'il existerait des différences significatives d'incidence et de prévalence à travers le monde (Chiò et al., 2013; Logroscino et al., 2018; Marin et al., 2016; Masrori and Van Damme, 2020). Par ailleurs, la SLA est considérée comme une maladie orpheline. Cela provient de la faible espérance de vie des patients atteints de SLA. Enfin, les

hommes auraient plus de risques de développer la SLA que les femmes avec un ratio global d'incidence de 1,2-1,5/1 (Johnston et al., 2006; Manjaly et al., 2010; Masrori and Van Damme, 2020; Ryan et al., 2019). Comme la plupart des maladies neurodégénératives, la SLA peut être d'origine sporadique (90% des cas) ou familiale (10% des cas) (Renton et al., 2014; Chia et al., 2018). Dans le cas des SLA sporadiques (sALS), les patients ne présentent aucun antécédent familial connu et l'origine du déclenchement de la pathologie est souvent indéterminée malgré divers facteurs de risques qui peuvent être liés (Dupuis et al., 2011). A l'inverse, dans le cas des SLA familiales (fALS), l'origine génétique est connue avec une mutation généralement transmise de manière autosomique dominante. En revanche, il n'est pas possible de distinguer cliniquement les sALS des fALS (Couratier et al., 2016; Turner et al., 2017). Ainsi, les données actuelles ne peuvent pas nous renseigner sur une étiologie stricte de la SLA malgré les connaissances établies sur les facteurs génétiques et environnementaux (Al-Chalabi et al., 2016).

2.1 Susceptibilité génétique de la SLA

Aujourd'hui, plus d'une vingtaine de gènes ont été identifiés comme étant associés à la SLA, tant dans les formes familiales (10%) que dans les formes sporadiques (90%) (Renton et al., 2014; Chia et al., 2018). La découverte de ces gènes de susceptibilité a permis de mettre en évidence des mutations génétiques qui provoquent ou prédisposent au développement de la SLA (Andersen and Al-Chalabi, 2011; Millecamps et al., 2012; Nguyen et al., 2018). De manière générale, le modèle de transmission de mutation se fait de façon autosomique dominante avec une pénétrance élevée dans les fALS. Dans de rares cas, la transmission génétique se fait de manière autosomique récessive (Couratier et al., 2016; Millecamps et al., 2010). Dans la fALS, parmi les principaux gènes associés à la SLA, les mutations dans le gène *C9ORF72* (chromosome 9 open reading frame 72) sont majoritaires à 46% dans les fALS et sont impliquées dans 8% des sALS où des expansions hexanucléotidiques sont retrouvées dans une région non codante du gène. Puis, les mutations dans les gènes *SOD1* (codant la superoxyde dismutase 1), *FUS* (codant la protéine nucléaire « fused in sarcoma ») et *TARDBP* (codant la « Transcriptase Response DNA Binding Protein TDP-43) représentent respectivement 12% des fALS et 3% des sALS ; 5% des fALS et 1% des sALS ; et 5% des fALS et 1% des sALS (Couratier et al., 2016; Millecamps et al., 2010; Renton et al., 2014) **(figure 1)**. En association avec ces découvertes, les études révèlent que ces mutations ont pour conséquence des agrégats protéiques dans les tissus de patients atteints de SLA. Par exemple, il a été montré que la protéine TDP43 est le constituant majeur des agrégats protéiques retrouvé dans les MN des patients SLA (Neumann et al., 2006; Renton et al., 2014). Du fait de la complexité à établir une causalité stricte à la SLA, ces données ont permis la création de modèles animaux transgéniques dans le seul et unique but de mieux comprendre l'impact de ces mutations et

les mécanismes physiopathologiques associés. La modélisation animale de la SLA sera présentée dans la partie 1-B.

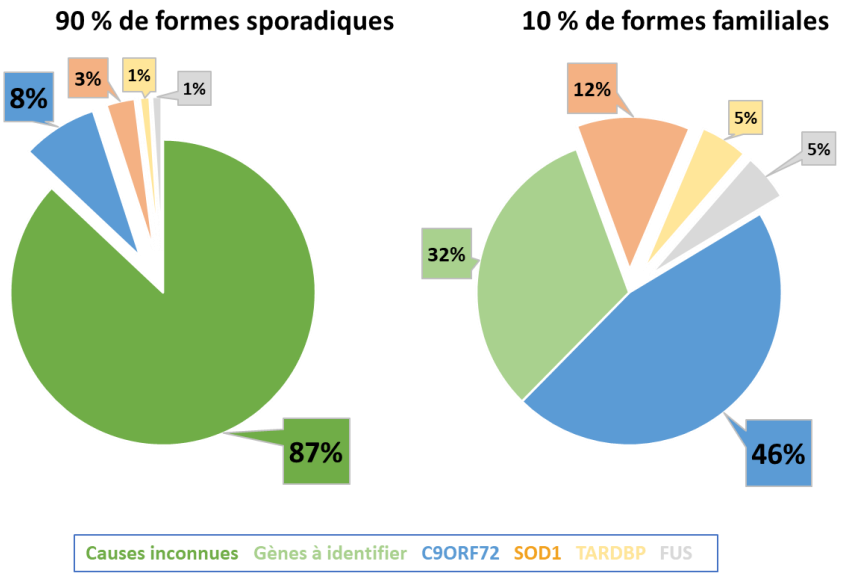


Figure 1 : Répartition génétique dans la SLA.
Plus d'une vingtaine de gènes de susceptibilité ont été identifiés dans les formes sporadiques et familiales de la SLA. Sur ce graphique, l'implication des 4 gènes majeurs est représentée. (Figure adaptée de (Couratier et al., 2016; Millecamps et al., 2010; Renton et al., 2014).

2.2 Influence potentielle de l'environnement et des facteurs de risques associés

Bien que des dizaines de mutations aient été mises en cause dans le déclenchement de la SLA, 87% des causes sont encore inconnues dans les formes sporadiques. Ainsi, de nombreuses hypothèses émergent et tendent à expliquer ce pourcentage important (Fang et al., 2015). Les études s'adonnent à catégoriser ces inconnus en facteurs de risques endogènes et exogènes. Hormis, les mutations génétiques présentées ci-dessus, les facteurs endogènes impliqueraient le sexe et les antécédents médicaux qui sont à prendre en considération. En effet, le rapport des sexes de la SLA en défaveur des hommes (1,5/1) soulève une question non négligeable d'un potentiel facteur endogène en relation avec le sexe masculin (Couratier et al., 2016; Johnston et al., 2006; Manjaly et al., 2010; Masrori and Van Damme, 2020; Ryan et al., 2019). Par ailleurs, certaines affections comme des maladies auto-immunes (ex : diabète de type 1) (Mariosa et al., 2015; Turner et al., 2003) ou des maladies inflammatoires (ex : sclérose en plaques) (Ismail et al., 2013) pourraient prédisposer tout individu à développer une SLA. En plus de ces facteurs endogènes, l'impact des facteurs exogènes liés à l'environnement direct ou indirect à un individu semblerait également non négligeable dans la SLA. Une des plus vielles hypothèses est celle mettant en cause la toxine L-b-Methylaminoalanine présente dans les sols, l'eau et l'alimentation des habitants des îles du Pacifique notamment celle de Guam (Cox and Sacks, 2002; Cox et al., 2005; Kurland, 1988; Murch et al., 2004; Spencer et al., 1987). En effet, un

certain nombre des personnes issues de la population Chamorro a présenté une forme de SLA atypique couplée à un syndrome parkinsonien et une démence (Arnold, 1953; Figlewicz et al., 1994; Garruto et al., 1981; Koerner, 1952; Kurland, 1988). Toutefois, aucune étude à ce jour ne peut établir concrètement un lien de cause à effet (Bradley and Mash, 2009). Depuis, d'autres hypothèses émergent et dénoncent certains facteurs exogènes comme les métaux lourds, les pesticides (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Gresham et al., 1986; Malek et al., 2012; Vinceti et al., 2010) ou encore le mode de vie. Sans compter les comportements inhérents à l'Homme tels que le type de nutrition, le tabagisme ou encore l'activité physique qui seraient considérés comme des facteurs de risques (Armon, 2009; Chio, 2005; Fang et al., 2015; Huisman et al., 2013; Longstreth et al., 1998; Nelson et al., 2000; Pupillo et al., 2014a; Scarmeas et al., 2002; Turner et al., 2013; Valenti et al., 2005). Néanmoins, ces facteurs de risques restent très controversés et ne constituent aucunement un lien de causalité.

3. Le tableau clinique

3.1 Déclaration et progression de la SLA

En moyenne, la SLA survient chez des personnes âgées de 55 ans et conduit à leur mort 3 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes moteurs, généralement par insuffisance respiratoire. Malgré son issue fatale, il est répertorié des SLA de types juvéniles et de type tardifs qui se différencieront par les mutations de gènes retrouvées, l'évolution et la sévérité de la maladie (Pupillo et al., 2014a; Wolf et al., 2014). Hormis les mutations dans le gène *FUS*, qui peuvent être liées à des SLA juvéniles souvent agressives et rapides (Ravits et al., 2013), les mutations dans certains gènes comme *ALS2*, *SETX* sont associées à des SLA juvéniles à progression lente dont les symptômes apparaissent avant 25 ans (Cai, 2005; Chance et al., 1998; Chen et al., 2004; Gros-Louis et al., 2008; Orban et al., 2007; Pupillo et al., 2014b; Sabatelli et al., 2008). Quant aux formes tardives qui se déclarent après 75 ans, l'évolution de la maladie est très rapide (Chio et al., 2009; Eisen et al., 1993; Pupillo et al., 2014b) et le type de mutations va déterminer la durée de la phase symptomatique (Millecamps et al., 2010). En effet, des patients porteurs de mutations *FUS* développeront la SLA aux alentours de 43 ans en moyenne contre 51, 52 et 58 ans pour des individus porteurs de mutations *SOD1*, *TARDBP* ou encore *C9ORF72* (Millecamps et al., 2012). De manière exceptionnelle, la SLA peut présenter une évolution très lente. Stephen Hawking en est l'exception puisqu'il a vécu avec une forme « atypique » de SLA pendant plus de 50 ans (Dobson, 2002; Westeneng et al., 2018). Ainsi, il est clair qu'une corrélation existe entre l'âge, le site d'apparition de la maladie, la sévérité ainsi que la durée de la maladie des patients (Eisen et al., 1993; Pupillo et al., 2014b; Swinnen and Robberecht, 2014).

3.2 Différents sites d'initiation de la SLA

Dans la caractérisation de la SLA, trois sites d'initiation ont été classifiés : spinal, bulbaire et respiratoire (**figure 2**). La description de ces trois formes repose sur l'identification des symptômes moteurs. La forme spinale (75% des cas) est caractérisée par une atteinte asymétrique des membres supérieurs ou inférieurs, s'effectuant majoritairement du côté distal (Chio et al., 2011; Rowland and Shneider, 2001; Wijesekera and Leigh, 2009). Elle se traduit par une faiblesse et une atrophie musculaire, des fasciculations (contractions fibrillaires) qui peuvent être accompagnées de crampes, une hyporéflexie ainsi qu'une spasticité notifiée par une absence du signe de Babinski (Rowland and Shneider, 2001; Swinnen and Robberecht, 2014). Sous cette forme, la progression est tout de même moins sévère que les autres. Avec un pronostic vital plus délétère, la forme bulbaire (20% des cas) est quant à elle caractérisée par des signes de faiblesse musculaire de la zone oro-pharyngée (**figure 2**). En clair, une faiblesse musculaire et une atrophie progressive des muscles faciaux, du pharynx et du larynx qui provoquent une dysphagie (troubles de déglutition), une dysarthrie (troubles de l'élocution) ainsi que des fasciculations de la langue (Turner 2010b). Enfin, la forme respiratoire est présente dans 5% des cas et connue pour être la plus sévère (**figure 2**). Après le diagnostic clinique, les muscles respiratoires (thoraciques, intercostaux et le diaphragme) sont affectés ce qui entrainent le décès du patient à la suite de troubles respiratoires graves (dyspnée, orthopnée) (Chio et al., 2011). Par ailleurs, le type de mutation peut influencer le site d'apparition de la pathologie. Chez des patients fALS avec des mutations dans les gènes *SOD1* ou *TARDBP,* le site d'apparition est majoritairement spinal au contraire des formes bulbaires qui sont retrouvées associées aux mutations dans le gène *C9ORF72* (Millecamps et al., 2012). Malgré ces différences, ces trois formes de SLA convergent toutes vers une paralysie progressive et généralisée des muscles volontaires conduisant inévitablement à la mort du patient.

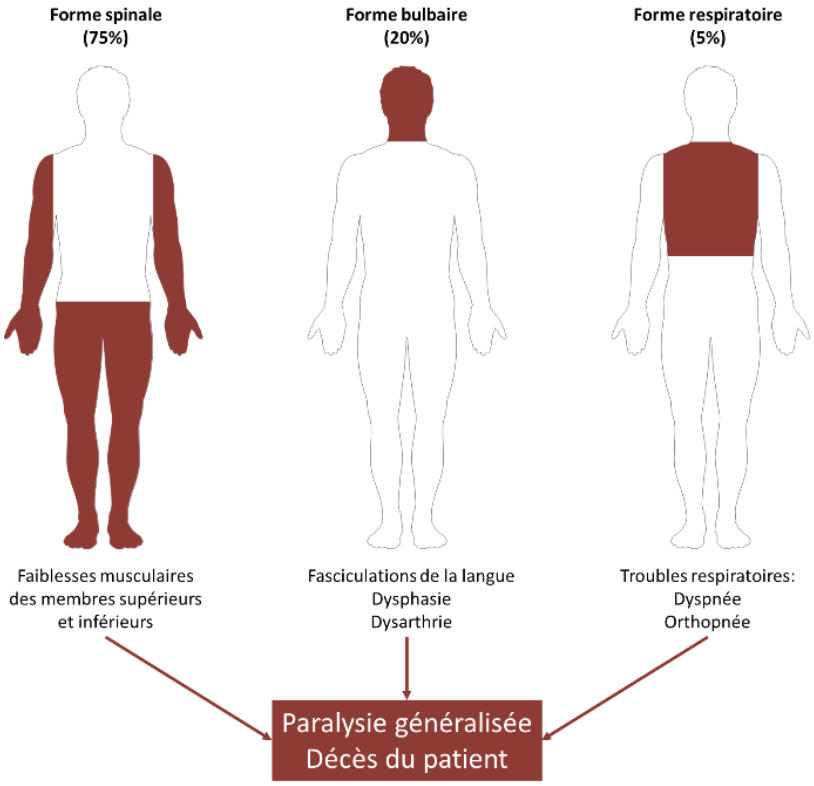


Figure 2: Sites d'initiation de la SLA et symptômes associés.
La forme spinale est retrouvée dans 75% des cas de SLA et entraine des troubles moteurs dans les muscles squelettiques supérieurs et inférieurs. Moins fréquente, la forme bulbaire (20% des cas) se caractérise par une atteinte des muscles de la zone oro-pharyngée. Dans 5% des cas, la forme respiratoire cause des difficultés respiratoires (dyspnée et orthopnée) et présente le pronostic vital le plus sévère. Quel que soit la forme, une paralysie généralisée s'installe et provoque inévitablement le décès du patient.

3.3. Les signes cliniques

Les symptômes moteurs de la SLA font suite à la dégénérescence des neurones moteurs corticaux (NMC) et des MN bulbaires et spinaux qui définiront le site d'initiation de la SLA (**figure 3**). Les NMC prennent leur origine dans la couche V du cortex moteur et projettent sur les MN bulbaires et spinaux situés dans le bulbe rachidien et la corne ventrale de la moelle épinière respectivement pour former le faisceau pyramidal (Taylor et al., 2016). Ce faisceau assure l'innervation des muscles striés squelettiques à contraction volontaire. Cliniquement, l'hyperréflexie, l'hypotonie et la spasticité retrouvées chez le patient SLA sont associées à la perte des NMC et à celle des neurones sérotoninergiques (Dentel et al., 2013; El Oussini et al., 2017). En outre, la dégénérescence des MN bulbaires et spinaux entraine une dysphagie, une dysarthrie, une faiblesse musculaire, une atrophie musculaire ainsi que des fasciculations et des crampes des muscles atteints (Rowland and Shneider, 2001; Swinnen and Robberecht, 2014; Wijesekera and Leigh, 2009). Toutefois, l'hétérogénéité et la diversité des symptômes moteurs qui peuvent être identifiées dans d'autres pathologies du motoneurone (MND : « Motor Neuron Disease ») compliquent le diagnostic clinique de la SLA.

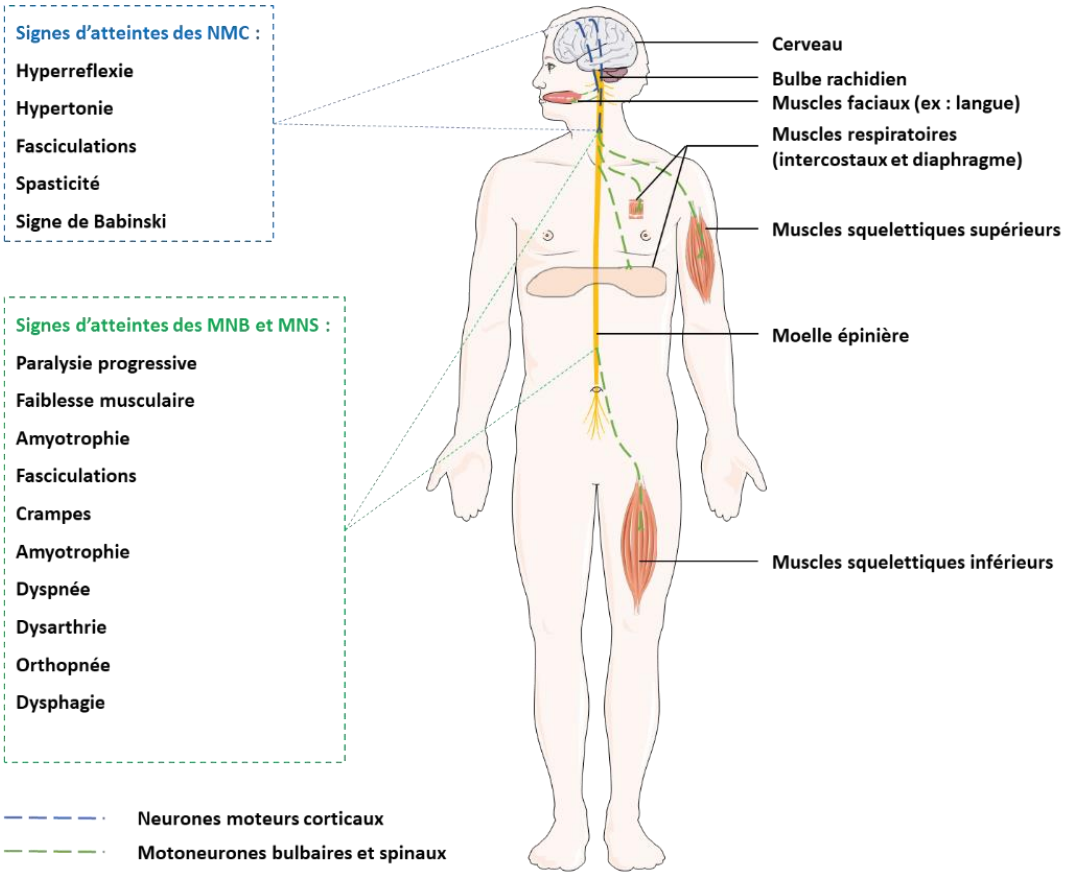


Figure 3 : Dégénérescence des populations neuronales associée aux signes cliniques de la SLA.
Le contrôle des muscles à contraction volontaire met en jeu trois populations neuronales : les neurones moteurs corticaux (NMC) et les motoneurones bulbaires (MNB) et spinaux (MNS). Les NMC projettent sur les MNs qui vont à leur tour innerver les muscles squelettiques. Dans la SLA, l'atteinte de ces deux populations neuronales distinctes provoque divers symptômes caractéristiques.

4. Etablissement d'un diagnostic différentiel de la SLA

L'importante diversité des symptômes moteurs peut reflétée tous types de maladies du motoneurone, dont la SLA, et ainsi constituer un problème majeur dans le diagnostic clinique (Traynor et al., 2000). Celui-ci est réalisé sur la base de l'évaluation des critères selon l' « El Escorial World Federation of Neurology » et prend généralement plus d'un an à être établit grâce aux différentes méthodes d'évaluation actuellement disponibles (van Es et al., 2017; Paganoni et al., 2014).

4.1 les critères de diagnostic d' « El Escorial »

En clinique, une SLA est caractérisée lorsqu'une dégénérescence simultanée des NMC et des MN est constatée et que toutes autres MND soient écartées (van Es et al., 2017). En revanche, le degré de sévérité de l'atteinte varie d'un patient à l'autre et nécessite ainsi une classification claire. C'est le rôle des critères de diagnostic d' « El Escorial » définis en 1994 par Brooks et ses collaborateurs (Brooks, 1994; Brooks et al., 2000) et révisés récemment (Carvalho and Swash, 2009; de Carvalho et al., 2008; Geevasinga et al., 2016; Ludolph et al., 2015). Ces critères sont organisés en 4 catégories où le

diagnostic de SLA de chaque patient peut être : « possible » , « probable avec confirmation en laboratoire », « probable » et « définie » (Costa et al., 2012; van Es et al., 2017). La SLA est dite « possible » lorsque des signes de l'atteinte des NMC et des MN dans une même région ou lorsque l'atteinte concerne soit les NMC soit les MN dans une seule région. Des signes d'atteinte des NMC dans au moins une région avec preuves électromyographiques de l'atteinte des MN dans deux régions différentes caractérisent une SLA « probable avec confirmation en laboratoire » ou des signes d'atteinte des NMC et MN dans deux régions différentes signifient une SLA « probable ». Enfin, une SLA est « établie » lorsque des atteintes des NMC et MN sont constatées dans au moins trois régions (van Es et al., 2017). De plus, l'évaluation clinique se base également sur les critères d'Awaji qui supplémentent les critères d'El Escorial en apportant une composante neurophysiologique au diagnostic (Carvalho and Swash et al., 2009 ; de Carvalho et al., 2008 ; Geevasinga et al., 2016). Cependant, l'utilisation de ces critères est limitante du fait de leur complexité pouvant conduire à des erreurs de diagnostic avec d'autres pathologies comme la sclérose latérale primitive. C'est pourquoi, les critères de diagnostic de Gold Coast sont actuellement utilisés puisqu'ils considèrent la SLA comme un trouble progressif du système moteur avec des anomalies cognitives, comportementales et/ou psychiatriques. Ces critères plus récents prennent en compte la déficience motrice progressive documentée par des antécédents ou évaluation clinique répétée, présence d'un dysfonctionnement des NMC et des MN dans au moins une région du corps ou un dysfonctionnement des MN dans au moins deux régions du corps. Ils permettent également d'exclure les maladies mimant les caractéristiques de la SLA par des approches appropriées (Hannaford et al., 2021). A l'appui de ces critères, différentes examens cliniques permettent d'étudier la neurodégénérescence des NMC et des MN et l'atteinte musculaire retrouvées dans la SLA.

4.2 Les méthodes d'évaluation

L'absence de biomarqueurs spécifiques de la SLA ne permet pas encore de délaisser les méthodes d'évaluation comme l'électrophysiologie et les biopsies musculaires qui sont invasives ou encore l'intervention de l'imagerie par résonnance magnétique (Dorst et al., 2018; van Es et al., 2017; Mitchell and Borasio, 2007). De plus, la pénétrance étant parfois incomplète rend difficile l'analyse du génome dans le cas des patients atteints de fALS (van Es et al., 2017).

4.2.1 Analyse du tissu musculaire par mesures électrophysiologiques et biopsies musculaires

L'enregistrement électromyographique est l'une des principales méthodes renseignant sur l'innervation correcte d'un muscle et indique un dysfonctionnement potentiel d'innervation MN-muscle. L'électromyographie (EMG) est une méthode invasive classique, qui met en évidence des activités électriques spontanées traduisant des dénervations musculaires observées dans la SLA (Joyce and Carter, 2013; Julien, 2001; Sorenson, 2012). Chez un patient SLA, les résultats d'EMG révèlent des

fibrillations (contractions spontanées et anarchiques des fibres musculaires), des fasciculations (contractions brèves et incontrôlées) faisant suite à une dénervation musculaire et donc d'une dégénérescence des MN (Joyce and Carter, 2013; Krarup, 2011; Vucic and Rutkove, 2018). A l'aide de ce test, il est également possible de mesurer d'autres paramètres comme le nombre d'unités motrices sollicitées à la suite d'une stimulation nerveuse, c'est-à-dire le nombre d'axones qui innerve un muscle (McComas et al., 1971). Cette technique permet de suivre l'innervation musculaire durant la progression de la maladie (Bromberg and Brownell, 2008; van Es et al., 2017; Wang et al., 2004). L'intérêt de ces études est d'éliminer un maximum les autres pathologies motrices ou neuropathiques qui masqueraient le diagnostic d'une SLA (de Carvalho and Swash, 2000; de Carvalho et al., 2008; Mills and Nithi, 1998; Pugdahl et al., 2008). Malgré la contribution majeure de ces méthodes dans l'établissement du diagnostic de la SLA, des approches alternatives sont nécessaires pour le compléter. C'est notamment le cas des biopsies du muscle deltoïde de patients SLA. Par cette stratégie, il est possible de révéler les signes d'une dénervation, d'une atrophie musculaire ou encore d'une nécrose de fibres musculaires (Jokela et al., 2016). Néanmoins, l'utilisation de cet outil n'est pas systématique en raison de son caractère invasif et douloureux.

4.2.2 La neuroimagerie

Pour aider au diagnostic différentiel d'une SLA, les médecins ont également recours à des techniques non invasives comme la neuroimagerie. L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) permet d'étudier l'intégralité des structures du système nerveux central (SNC). Des études ont montré une réduction du volume de certaines zones du SNC comme le cortex moteur chez les patients SLA (Senda et al., 2011). De nombreuses études ont aussi révélé des altérations de l'activité cérébrale chez les patients SLA par l'intermédiaire d'imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle (IRMf) qui repose sur la variation de flux sanguin (Agosta et al., 2010; Konrad et al., 2006; Schoenfeld et al., 2005; Stanton et al., 2007). De plus, à l'aide d'une autre technique d'imagerie comme la Tomographie par Emission de Positons (TEP), des atteintes métaboliques ont pu être détectées dans diverses régions du SNC (Kassubek and Pagani, 2019). Même si l'utilisation de ces techniques d'IRM et de TEP est onéreuse, ils demeurent importants tant dans le diagnostic différentiel que dans l'évaluation de la progression de la SLA.

4.2.3 Les biomarqueurs

Un des enjeux majeurs dans le diagnostic de la SLA est l'identification de signatures moléculaires spécifiques. En effet, la communauté scientifique tente d'identifier des biomarqueurs de la SLA à la fois dans le sang et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) afin d'établir le meilleur diagnostic, de suivre l'évolution de la pathologie mais également d'évaluer les effets de traitements. Dans le sérum de patients SLA, des marqueurs inflammatoires tels que les immunoglobulines de type G (IgG), le TGFβ,

le facteur de nécrose tumorale α (TNFα), les chimiokines (MCP1), des marqueurs associés au stress oxydant ou encore au dysfonctionnement métabolique (Blasco et al., 2017; Houi et al., 2002; Hwang et al., 2013; Ilzecka and Stelmasiak, 2003; Kirk et al., 2019; Robelin and Gonzalez De Aguilar, 2014; Simpson et al., 2004). Concernant le LCR des patients SLA, le neurofilament (protéine structurale du neurone) est le biomarqueur le plus étudié dans la SLA puisqu'il est libéré en grande quantité dans ce compartiment à la suite d'une lésion neuronale. Il constitue un outil essentiel puisqu'il est associé directement à la progression de la pathologie (van Es et al., 2017; Gille et al., 2019; Tortelli et al., 2012; Xu et al., 2016). Dernièrement, une méta-analyse a révélé que la quantité d'une dizaine de protéines était particulièrement modifiée dans le LCR de patients atteints de SLA (Barschke et al., 2017). Enfin, des niveaux élevés du facteur glial GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) (Grundström et al., 2000) ou encore de certains métabolites sont retrouvés augmentés dans le LCR des patients SLA (Blasco et al., 2013, 2017; Kirk et al., 2019; Spreux-Varoquaux et al., 2002). Par ailleurs, diverses analyses sur les biopsies musculaires de patients SLA ont révélé une augmentation anormale de Nogo-A (neurite out growth inhibitor) et semble corréler avec la sévérité de la pathologie (Dupuis et al., 2002; Pradat et al., 2007, 2012). Toutefois, Nogo-A n'est pas retrouvé augmenté dans le sérum des patients SLA (Harel et al., 2009). Malheureusement, ces études ne permettent pas d'identifier un biomarqueur spécifique de la SLA et présentent des limites notables. D'une part, plusieurs de ces biomarqueurs sont mesurés dans d'autres maladies neurodégénératives, c'est le cas du neurofilament et de MCP1 (Fenoglio et al., 2004; Mattsson et al., 2016) et d'autre part, certains biomarqueurs ne sont dérégulés qu'au stade symptomatique de la maladie empêchant ainsi une prise en charge précoce. Cependant, les connaissances actuelles et celles à venir sont fondamentales puisqu'elles contribuent activement au diagnostic de la SLA.

4.3 Evaluation et progression des symptômes de la SLA

L'évaluation des symptômes et la progression de la SLA est possible à l'aide d'une échelle scorée permettant l'évaluation fonctionnelle de la SLA (ALSFRS pour « *Amyotrophic Lateral Sclerosis Functionnal Rating Scale* ») créée en 1997 par Cedarbaum et ses collaborateurs (Cedarbaum and Stambler, 1997). Cet outil peu cher et réalisé sous forme de questionnaire par le patient permet d'anticiper et d'adapter leur prise en charge médicamenteuse, de fournir une assistance respiratoire, une aide socio-médicale (Johnston et al., 1999) voire une inclusion potentielle dans des essais cliniques. Cette échelle évalue les capacités motrices générales du patient regroupant : la motricité fine, la motricité générale et les atteintes bulbaires (parole, déglutition et salivation). Un score de 0 à 4 est attribué à chaque critère en fonction de l'incapacité à réaliser une tâche de la vie quotidienne (**figure 4**). Deux ans plus tard, l'échelle ALSFRS est révisée incluant les atteintes respiratoires du patient (Cedarbaum et al., 1999). Ainsi, la somme des points obtenue à ce questionnaire permet de surveiller

la progression de la pathologie et constitue un indicateur pronostic fiable puisqu'il a été montré comme étant significativement corrélé à la qualité de vie du patient (Elamin et al., 2015; Gordon et al., 2004; Kaufmann et al., 2005; Kimura et al., 2006; Labra et al., 2016). Par conséquent, ce score ALSFRS représente une aide indispensable pour le patient ainsi que pour l'équipe médicale permettant d'assurer une prise en charge maximale.

Bulbaire	Motricité fine	Motricité générale	Respiration
Parole 4. Normale 3. Perturbations détectables 2. Intelligible avec répétition 1. Utilise occasionnellement une communication non verbale 0. perte de la parole	Ecriture 4. Normale 3. Lente et imprécise mais compréhensible 2. Tous les mots sont incompréhensibles 1. Préhension possible du stylo mais n'écrit pas 0. Incapacité pour tenir le stylo	Mobilisation au lit 4. Normale 3. Autonome mais lenteur et maladresse 2. Ajuste les draps avec difficulté 1. Peut bouger mais pas se retourner dans le lit 0. Dépendant	Dyspnée 4. Absente 3. À la marche 2. Dans au moins une situation : repas, toilette, habillage 1. Au repos, difficultés respiratoires en position assise ou allongée 0. difficulté importante, ventilation assistée envisagée
Salivation 4. Normale 3. Hypersialorrhée discrète avec bavage nocturne 2. Hypersialorrhée modérée mais permanente 1. Hypersialorrhée gênante 0. bavage continu nécessitant un mouchoir	Hygiène 4. Normale 3. Autonome mais efficacité diminuée 2. Assistance occasionnelle 1. Assistance d'une tierce personne requise 0. assistance permanente totale	Marche 4. Normale 3. Difficultés de déambulation 2. Marche avec assistance 1. Mouvements sans déambulation 0. Aucun mouvement des jambes	Orthopnée 4. Absente 3. Quelques difficultés pour dormir la nuit en raison d'un souffle court, 2 oreillers max 2. Besoin de plus de 2 oreillers pour dormir 1. Ne peut dormir qu'assis 0. Ne peut pas dormir
Déglutition 4. Normale 3. Quelques fausses routes 2. Consistance des aliments modifiée 1. Suppléments alimentaires 0. Alimentation parentérale exclusive	Préparation des aliments 4. Normale 3. Autonome mais lente et maladroite 2. Aide occasionnelle pour couper les aliments 1. Aliments préparés mais mange seule 0. Doit être nourri	Montée d'escaliers 4. Normale 3. Lente 2. Fatigue 1. Aide nécessaire 0. Impossible	Insuffisance respiratoire 4. Absente 3. Utilisation intermittente d'une assistance ventilatoire 2. Utilisation continue d'une ventilation non invasive la nuit 1. Utilisation continue d'une ventilation non invasive jour et nuit 0. Ventilation mécanique invasive par intubation ou trachéotomie

Figure 4 : Critères d'évaluation de la progression de la SLA selon l'échelle ALSFRS-R.
L'incapacité motrice et la progression de la maladie sont régulièrement évaluées chez le patient SLA grâce au score ALSFRS-R. La somme de ce score est inversement proportionnelle à la sévérité de leur inaptitude à réaliser les tâches de la vie quotidienne. Les critères sont notés de 0 à 4. 4 reflète l'aptitude totale pour une tache et 0 indique une incapacité totale. (Tableau adapté de (Cedarbaum et al., 1999).

5. Du traitement symptomatique au traitement curatif ?

La sévérité, la progression rapide, l'hétérogénéité des mécanismes physiopathologiques ainsi que l'étiologie encore méconnue de la SLA font qu'à ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible. Toutefois, la recherche constante d'un diagnostic toujours plus complet et plus précoce permet d'améliorer au mieux les conditions de vie des patients notamment avec l'intervention d'équipes médicales pluridisciplinaires mais également avec des traitements symptomatiques.

5.1 Les traitements symptomatiques non médicamenteux

5.1.1 Prise en charge médicale

Au cours de sa vie, le patient SLA est soutenu par une équipe médicale pluridisciplinaire qui l'accompagne psychologiquement et l'aide à améliorer ses conditions de vie (Dorst et al., 2018) (**figure 5**). Premièrement, l'intervention de psychothérapeutes est indispensable pour le patient qui doit faire face à cette maladie. Ensuite, la physiothérapie permet quant à elle de préserver, renforcer et maintenir au maximum les capacités motrices des patients. Elle participera également à la gestion des crampes musculaires, de la raideur musculaire, limiter les douleurs et assurer une mobilisation musculaire suffisante pour contrer l'atrophie musculaire associée à l'inactivité physique (Chio, 2006; Dorst et al., 2018; Paganoni et al., 2015).

5.1.2 Exercice physique

Pour prévenir de la perte des fonctions motrices, il est recommandé aux patients une activité physique modérée autant que possible. Toutefois, la nature et l'intensité de l'exercice physique peuvent s'avérer plus ou moins néfastes pour le patient. Bien que le lien entre le sport de haut niveau et la SLA soit controversé, un exercice modéré permettrait d'améliorer le score ALSFRS-R des patients SLA (Dal Bello-Haas and Florence, 2013). De plus, il a été montré que la survie et les fonctions motrices sont augmentées dans le modèle murin *SOD1*^{G93A} soumis à un exercice modéré en comparaison à des souris *SOD1*^{G93A} sédentaires (Carreras et al., 2010; Kirkinezos et al., 2003; Mahoney et al., 2004). En effet, un exercice modéré comme la natation ralentit l'apparition des symptômes moteurs, préserve l'intégrité des fibres musculaires et le nombre de motoneurones, mais allonge également la survie des animaux (Deforges et al., 2009; Desseille et al., 2017). Il convient également de noter que la natation permet de lutter contre le stress oxydant et d'induire le métabolisme glucidique faisant défaut dans le muscle de souris SLA (Desseille et al., 2017; Flis et al., 2019). A l'inverse, un exercice physique trop intense est délétère pour la souris *SOD1*^{G93A} (Deforges et al., 2009) et est dommageable pour la survie des MN et la progression de la maladie (Dorst et al., 2018; Mahoney et al., 2004). Ainsi, une mobilisation musculaire par le physiothérapeute et/ou l'exercice physique constitue une aide précieuse pour lutter contre les différents symptômes de la SLA.

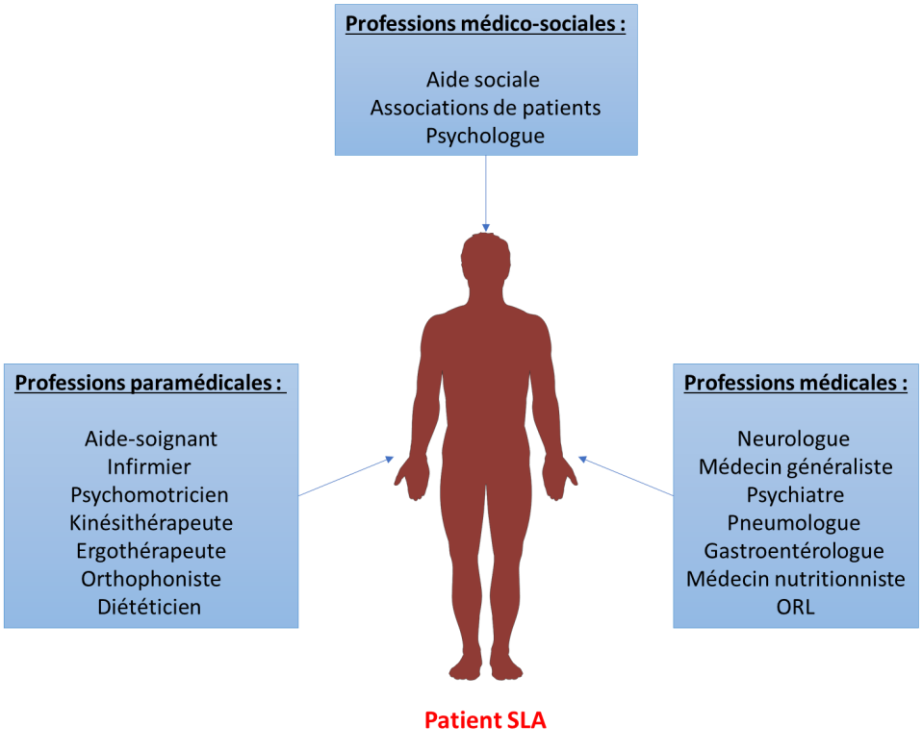


Figure 5 : Accompagnement médical multidisciplinaire du patient SLA.
Plusieurs professionnels de la santé agissent de concert pour assurer une prise en charge optimale du patient atteint de SLA. Cette prise en charge complète permet un meilleur suivi de la pathologie, aide à l'acceptation de la maladie et améliore au maximum les conditions de vie du patient SLA.

5.1.3 Nutrition

Bien avant le début des symptômes moteurs, un déficit métabolique est détecté et serait à l'origine de la perte de poids des patients SLA (Mariosa et al., 2017; Peter et al., 2017). S'ajoute à cela, les difficultés de mastication, de salivation et de déglutition que développent les patients SLA au cours de la pathologie. Il est maintenant admis que la perte de poids est un facteur pronostic préjudiciable et est associée à la sévérité de la SLA (Dupuis et al., 2008; Lindauer et al., 2013; Moglia et al., 2019). Plusieurs travaux indiquent une corrélation négative entre un indice de masse corporelle (IMC) faible et la survie du patient (Desport et al., 1999; Dupuis et al., 2008; Marin et al., 2011; O'Reilly et al., 2013; Paganoni et al., 2011). Ainsi, un faible IMC allié à une malnutrition constitue un facteur de risque aggravant (Dardiotis et al., 2018; Jawaid et al., 2010; O'Reilly et al., 2013; Paganoni et al., 2011). A l'inverse, les données cliniques montrent que des rapports élevés en LDL/HDL circulants chez les patients représentent un avantage plus élevé pour leur survie (Dorst et al., 2011; Dupuis et al., 2008). Bien que l'obésité sévère soit également un facteur de risque (Reich-Slotky et al., 2013), un individu avec un IMC élevé (<30) aurait moins de risque de contracter une SLA (Nakken et al., 2019; Pape and Grose, 2020). C'est pourquoi des régimes alimentaires hypercaloriques et/ou hyperlipidiques sont envisagés pour subvenir aux besoins nutritionnels des patients (Dorst et al., 2013; Körner et al., 2013; Wills et al.,

2014). Très récemment, une étude a montré les effets bénéfiques d'un régime hypercalorique supplémenté en graisse sur la survie d'une sous-population de patients SLA à progression rapide (Ludolph et al., 2020). Enfin, lorsque les troubles alimentaires due à l'incapacité du patient à mastiquer ou à déglutir (dysphagie) sont observées, le recours à une gastrostomie endoscopique percutanée s'impose (Desport et al., 1999; Dorst et al., 2015, 2018; Greenwood, 2013; ProGas Study Group, 2015). Ce dispositif permet une alimentation directe par voie entérale par l'intermédiaire d'une sonde et un apport nutritionnel réadapté.

5.1.4 La ventilation assistée

Au fur et à mesure que la pathologie évolue, les insuffisances respiratoires s'installent due à la paralysie progressive des muscles respiratoires. Par conséquent, divers dispositifs de ventilation assistée invasifs ou non sont requis pour pallier ces difficultés respiratoires. Premièrement, la ventilation assistée non invasive assure un rôle de soutien respiratoire des voies aériennes supérieures (Dorst et al., 2018). Son principe repose sur un masque nasal ou intégral qui à montrer son efficacité sur la qualité de vie des patients (Butz et al., 2003; Dorst et al., 2018; Mustfa et al., 2006) en augmentant notamment leur survie de 7 à 13 mois (Berlowitz et al., 2016; Bourke et al., 2006). Cependant, lorsqu'un stade très avancé de la maladie est atteint et que la paralysie est presque généralisée, l'installation d'une ventilation assistée plus invasive par trachéotomie devient obligatoire. Celle-ci permet de soutenir les voies aériennes inférieures et est également capable d'améliorer de plusieurs mois l'espérance de vie des patients SLA (Spataro et al., 2012).

5.2 Les traitements symptomatiques médicamenteux

Les patients SLA font également face à des symptômes plus ou moins sévères et handicapants qui nécessites une prise en charge médicamenteuse. En effet, les patients SLA se voient prescrire des analgésiques afin de réduire la douleur qui peut être causée par des crampes, de la spasticité ou encore des douleurs neuropathiques (Brettschneider et al., 2013; Ganzini et al., 1999). Malgré l'absence de d'études sur la douleur des patients dans la SLA, la prescription médicale d'un analgésique repose sur les recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) qui préconise la délivrance d'anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) associés ou non à des opioïdes en fonction du degré de douleur ressentie. De plus, d'autres agents pharmacologiques peuvent être délivrés pour d'autres symptômes récurrents dans la SLA comme les crampes musculaires, les états d'anxiété et de dépression ou d'insomnies par exemple (Dorst et al., 2018; Radunović et al., 2007; Wijesekera and Leigh, 2009).

5.3 Les traitements médicamenteux autorisés

Malgré l'efficacité avérée de nombreuses molécules dans les études précliniques, celle-ci n'est pas retrouvée lors de la transposition à l'Homme (DeLoach et al., 2015; Kumar et al., 2016; Petrov et al.,

2017). En revanche, seuls deux agents pharmacologiques sont actuellement disponibles pour le traitement de la SLA.

5.3.1 Le riluzole

En 1995, la "Food and Drug Administration" (FDA) approuve le premier traitement pour la SLA : le riluzole (Rilutek®). Administrer à raison de 100mg/jour, le riluzole permet de prolonger de quelques mois l'espérance de vie des patients. Même si ses effets restent toujours controversés, l'efficacité semble être patient-dépendant. En effet, les patients souffrants de formes bulbaires seraient plus sensibles au riluzole en comparaison avec ceux atteints de formes spinales (Bensimon et al., 1994, 2002; van Es et al., 2017; Miller et al., 1996, 2012; Zoccolella et al., 2007). Bien que les effets du riluzole aient été remis en question récemment sur trois modèles murins de SLA (Hogg et al., 2018), cette molécule a montré à multiples reprises des effets positifs sur la perte de force musculaire et sur la survie dans le modèle *SOD1*^{G93A} (Bryson et al., 1996; Gurney et al., 1998; Kennel et al., 2000; Pandya et al., 2013; Waibel et al., 2004). Néanmoins, les mécanismes d'action du riluzole qui régissent de ses effets bénéfiques sont toujours incompris. Plusieurs hypothèses tentent tout de même de les expliquer. Il est souvent rapporté que le riluzole réduirait l'excitotoxicité au glutamate en inhibant sa libération et en augmentant sa recapture extracellulaire (Distad et al., 2008). Par conséquent, en agissant sur les récepteurs Acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA), il limiterait une suractivation des neurones post-synaptiques et donc une potentielle toxicité due à une entrée massive de calcium (Bellingham, 2011; Cheah et al., 2010). Ainsi, il protègerait de l'hyperexcitabilité neuronale due à une excitotoxicité au glutamate (Distad et al., 2008; Dorst et al., 2018). Seulement, ses effets neuroprotecteurs ne peuvent actuellement pas s'expliquer par cette voie étant donné l'absence d'effet de traitements anti-glutamatergiques déjà testés sur des patients atteints de SLA (Cudkowicz et al., 2014; Pascuzzi et al., 2010). Cela dit, le riluzole provoque dans certains cas, des effets indésirables non négligeables tels que des maux de tête, une asthénie, de la somnolence, de l'anxiété ou de l'anorexie (Bensimon et al., 1994; Groeneveld et al., 2003). Aujourd'hui, le riluzole est le seul traitement autorisé pour la SLA en Europe.

5.3.2 L'Edaravone

En 2017, la FDA autorise l'Edaravone (Radicava®) comme deuxième traitement pour la SLA au Japon, en Corée du Sud et aux Etats-Unis (Abe et al., 2017; Mejzini et al., 2019; Sawada, 2017). Lors d'un essai clinique, des doses à raison de 60mg en intraveineuse ont été administrées chez des patients SLA. Le traitement a permis de préserver les fonctions respiratoires et le déclin fonctionnel sans pour autant identifier de mécanisme exact. En revanche, aucune donnée n'est disponible concernant la survie des patients traités avec l'Edaravone. De plus, cette étude n'a été effectuée uniquement sur une sous-population de patients SLA japonais avec une symptomatologie légère, c'est-à-dire une atteinte légère

de la fonction motrice et une faible dysphagie. Ainsi, une étude incluant des patients présentant des atteintes plus sévères est nécessaire pour juger de son efficacité. Cette dernière a été remise en question très récemment lors d'un essai clinique, où aucun patient n'a répondu au traitement (Turnbull, 2018). Enfin, non autorisé en Europe, son administration en intraveineuse régulière reste lourde pour le patient (Abe et al., 2017; Dorst et al., 2018).

Le développement de telles molécules est possible grâce à la création de modèles animaux transgéniques qui permettent l'étude des différents mécanismes physiopathologiques de la SLA.

6. Les causes du décès

Selon les données de la littérature, la cause première de décès chez les patients atteints de SLA est l'arrêt respiratoire. En 2008, une étude révèle que 77% des 302 patients inclus sont décédés à la suite d'un arrêt respiratoire parmi lesquels 58% étaient en insuffisance respiratoire terminale, 14% avaient contracté une pneumonie infectieuse ou d'aspiration, 3% sont morts d'une asphyxie due à un corps étranger et 2% d'une embolie pulmonaire. 10% des patients sont décédés d'autres causes comprenant 5% de conditions traumatiques, 3,4% d'évènements cardiaques, 1,3% de suicides et 0,7% de mort subite. Enfin, la cause de la mort n'a pas pu être identifiée dans 13% des cas (Gil et al., 2008). Deux études confirment que les détresses respiratoires sont à l'origine de la plupart des décès (Corcia et al., 2008; Kurian et al., 2009). De plus, les auteurs remarquent que l'insuffisance cardiaque est deux fois plus fréquente pour les formes bulbaires de SLA alors que l'embolie pulmonaire est retrouvée exclusivement dans les formes spinales (Corcia et al., 2008). D'autres études révèlent que plus de 60% des patients SLA meurent d'insuffisance respiratoire et plus de 25% meurent de dysphagie (Paulukonis et al., 2015; Tsai et al., 2013; Yang et al., 2011). Par ailleurs, le lieu du décès des patients est aussi étudié et celui-ci diffère en fonction des études. Par exemple, une étude chinoise révèle que 82% des patients inclus sont décédés à leur domicile (Yang et al., 2011) tandis que plus de 2/3 des patients français, écossais et taiwanais meurent à l'hôpital (Gil et al., 2008; Kurian et al., 2009; Tsai et al., 2013). Ces résultats contradictoires s'expliquent par des différences économiques et culturelles notables poussant les patients à refuser certains soins thérapeutiques. A ce jour, pour des raisons évidentes de bien-être animal, la véritable cause de la mort des modèles animaux de SLA n'est pas connue.

B. Modélisation animale

Plus d'une vingtaine de gènes mutés (*SOD1, TARDBP, FUS et C9ORF72* principalement) sont identifiées et impliquées dans les cas familiaux de SLA. La découverte de ces gènes de causalité a permis la création d'animaux transgéniques permettant ainsi d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la maladie (Turner and Talbot, 2008). Dans cette partie, nous parlerons uniquement des principaux modèles transgéniques créés à partir de mutations *SOD1* humaines ou murines sur lesquels j'ai travaillé au cours de ma thèse.

1. Identification du 1er gène associé à la SLA

En 1993, Rosen et ses collègues identifient pour la première fois des mutations dans le gène *SOD1* associées au développement de la SLA (Rosen, 1993). Le gène *SOD1* est localisé sur le chromosome 21 et code pour l'enzyme Superoxyde Dismutase 1 (SOD1), une métalloenzyme antioxydante ubiquitaire (Smith et al., 2019; Valentine et al., 2005). Cette métalloenzyme protéique assure une protection contre le stress oxydant et assure une détoxification des radicaux libres formés dans la cellule. Plus précisément, elle catalyse une réaction de dismutation des anions superoxydes ($O2^{\cdot-}$) (espèces réactives de l'oxygène ou « ROS ») en dioxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Aujourd'hui, on dénombre plus d'une centaine de mutations dans le gène *SOD1* qui induit une SLA (Saccon et al., 2013) (ALSOD consortium : http://alsod.iop.kcl.ac.uk/). En effet, ces mutations représentent la deuxième cause génétique de SLA avec ~12% de cas familiaux et ~3% des cas sporadiques (Couratier et al., 2016; Millecamps et al., 2010; Renton et al., 2014; Rotunno and Bosco, 2013). La transmission de ces mutations se fait généralement de façon autosomique dominante (Andersen and Al-Chalabi, 2011; Couratier et al., 2016; Millecamps et al., 2010) et provoquent de nombreux dommages cellulaires comme les altérations mitochondriales tels un stress oxydant (Bogdanov et al., 2000; Shaw et al., 1995), un stress du réticulum endoplasmique (RE) (Kiskinis et al., 2014; Wate et al., 2005), une altération du processus autophagique (Chen et al., 2009), un défaut du transport axonal ou encore une excitotoxicité au glutamate (Beckman et al., 1993; Hayashi and Ito, 2016). De plus, des inclusions protéiques SOD1 sont retrouvées dans les neurones et les astrocytes de patients porteurs de mutations *SOD1* (Bruijn et al., 2004; Rotunno and Bosco, 2013; Zhang et al., 2007) mais celles-ci ne sont jamais observées avec des inclusions FUS et TDP43. Plusieurs études montrent à la fois *in vitro* qu'*in vivo* que les protéines mutées SOD1 forment des agrégats protéiques entre-elles et qu'elles pourraient se propager de cellule en cellule mimant un comportement de type prion (Ayers et al., 2014; Chattopadhyay et al., 2008; Grad et al., 2017; Münch et al., 2011; Reaume et al., 1996). L'origine de tous ces mécanismes induits par les mutations dans le gène *SOD1* pourraient s'expliquer par un mauvais repliement protéique empêchant ainsi la fixation des ions métalliques (Cu^{2+} et Zn^{2+}) indispensables à son activité enzymatique (Deng et al., 1993). Outre les agrégats de protéines mutées,

celles-ci seraient capables de piéger les protéines SOD1 sauvages (Chattopadhyay et al., 2008). Enfin, les données actuelles tentent d'expliquer ces phénomènes par le gain de fonction toxique ou par la perte de fonction de la protéine SOD1 à l'aide de modèles murins SOD1 (Philips and Rothstein, 2015).

2. Les modèles murins *SOD1* de la SLA

La compréhension des mécanismes physiopathologiques dans diverses maladies est maintenant possible grâce aux modèles animaux transgéniques. L'utilisation d'un organisme complexe tel qu'un animal transgénique est primordiale pour étudier l'étiologie et les symptômes associés à une maladie dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Toutefois, le choix du type de modèle transgénique *in vivo* doit être réfléchit et cohérent avec l'hypothèse initiale de travail. Par ailleurs, les modèles animaux ont conduit à d'énormes progrès en recherche thérapeutique pour les maladies humaines. En revanche, ces outils présentent tout de même des limites puisqu'ils ne pourront pas complètement refléter la pathologie étudiée. Le modèle animal est catégorisé de « modèle complet » s'il valide trois critères cruciaux pour être considéré comme représentatif de la maladie humaine :

- L'homologie : similitude étiologique et mécanismes engendrés analogues à l'Homme
- L'isomorphisme : totalité ou en partie des symptômes similaires et signes associés (anatomopathologique, biochimique, etc.) à ceux retrouvés chez l'Homme. L'origine peut être différente entre le modèle animal et l'Homme.
- La prédictivité : réactivité similaire face à un traitement pharmacologique connu pour être efficace chez l'Homme.

Dans la plupart des cas, les modèles animaux sont qualifiés de « partiels » puisqu'ils ne peuvent pas modéliser totalement une pathologie humaine (Poindron et al., 2008).

2.1 Le modèle SOD1^{G93A}

Etant le premier gène à être caractérisé dans la SLA (Rosen, 1993), le premier modèle murin transgénique *SOD1^{G93A}* voit le jour en 1994 dans l'équipe de Gurney (Gurney et al., 1994). Le modèle *SOD1^{G93A}* surexprime la protéine humaine SOD1 avec une mutation de type substitution où une glycine est remplacée par une alanine en position 93. Ces souris récapitulent l'ensemble des symptômes observables dans la pathologie humaine à savoir : les atteintes motrices, des inclusions protéiques SOD1, la perte des MN spinaux, une dénervation musculaire ainsi qu'une paralysie progressive de l'animal le conduisant à sa mort (Gurney et al., 1994). Il déclare les premiers symptômes aux alentours de 2,5 mois (~70 jours) et meurt entre 4 et 5 mois (~150 jours). La découverte des mutations dans le gène *SOD1* et la création du premier modèle murin *SOD1^{G93A}* font qu'il reste le modèle le mieux caractérisé et le plus utilisé. Il a été montré que l'augmentation du nombre de copies du transgène

intégré est significativement corrélée avec la sévérité de la maladie. Il existe des modèles *SOD1*^{G93A} avec moins de 5 copies (« low copy ») qui ont une progression lente de la SLA tandis que ceux avec plus de 30 copies (« high copy ») ont une progression accélérée (Canto and Gurney, 1997; Dal Canto and Gurney, 1995). Pour comprendre les phénomènes pathologiques retrouvés dans ces modèles, plusieurs études ont tenté d'élucider l'hypothèse de la perte ou du gain de fonction de la protéine SOD1. Chez les patients, la majorité des mutations du gène *SOD1* entraine une diminution de son activité enzymatique (Saccon et al., 2013). Malgré cela, l'invalidation totale du gène *SOD1* n'engendre pas tous les stigmates associés à une SLA comme un déficit moteur particulier, une perte de NMC et de MN mais plutôt un modèle de stress oxydant (Reaume et al., 1996). Toutefois, ces souris présentent une dénervation et une atrophie musculaire ainsi qu'une survie diminuée (Fischer et al., 2012; Flood et al., 1999; Muller et al., 2006). Bien que cette invalidation ne soit pas suffisante pour induire tous les phénotypes de SLA dans un même modèle, l'hypothèse de la perte de fonction semble tout de même contribuer à la pathogénicité de la SLA. A l'inverse, des données montrent qu'une surexpression de la protéine SOD1 sauvage chez les souris *SOD1*^{G93A} n'affecte pas la progression de la maladie (Bruijn et al., 1998) et que les mutations *SOD1*^{G93A} induisent une activité enzymatique plus élevée (Borchelt et al., 1994; Yim et al., 1996). Ainsi, il est probable que les mécanismes pathologiques résultent d'effets concomitants de gain et de perte de fonction dans le développement de la SLA.

2.2 Le modèle Sod1^{G86R}

En 1995, une lignée de souris transgéniques fut générée, les souris *Sod1*^{G86R} surexprimant la SOD1 murine avec une mutation de type substitution où une glycine est remplacée par une arginine en position 86 (Ripps et al., 1995). En comparaison avec le modèle murin *SOD1*^{G93A}, le modèle *Sod1*^{G86R} surexprime une protéine SOD1 murine dont aucune activité enzymatique n'est mesurée (site catalytique affectée) lui faisant perdre ainsi ses propriétés antioxydantes. L'utilisation de ce modèle murin *Sod1*^{G86R} dans notre laboratoire est judicieuse puisqu'il est l'équivalent de la mutation *SOD1*^{G85R} retrouvée chez l'Homme. Ainsi, cela permet de s'affranchir d'une toxicité due à la surexpression d'une protéine humaine, retrouvée chez les souris *SOD1*^{G93A}. Le modèle *Sod1*^{G86R} est décrit avec une phase asymptomatique avant 75 jours. A cet âge, aucun symptôme moteur visible n'est détecté. Pourtant, une dénervation musculaire aurait déjà commencée bien avant la perte des MN spinaux (Dupuis et al., 2000). Avant le développement des premiers symptômes moteurs, les souris *Sod1*^{G86R} commencent à perdre du poids : signe caractéristique de la SLA. Aux alentours de 90 jours, les symptômes moteurs s'installent progressivement avec : une altération du réflexe d'extension des pattes postérieures, une perte de force musculaire et une dénervation musculaire est détectable par des enregistrements électromyographiques (EMG). Ensuite, la maladie progresse très rapidement dans ce modèle avec une aggravation de ces symptômes et l'installation d'une paralysie progressive des membres postérieurs

qui conduit à leur mort vers l'âge de 110 jours (Dupuis et al., 2004a; Ripps et al., 1995). Au stade terminal, la perte de MN spinaux, une amyotrophie, un démantèlement des jonctions neuromusculaires (JNM) et des inclusions de neurofilaments phosphorylées sont observées chez les souris *Sod1^{G86R}* (Dupuis et al., 2004a; Morrison et al., 1998). Le modèle *Sod1^{G86R}* constitue l'un des meilleurs modèles de SLA récapitulant de manière homogène tous les signes caractéristiques d'une SLA humaine. En plus de tous ces troubles moteurs et signes associés identifiés dans les modèles murins *SOD1^{G93A}* et *Sod1^{G86R}* (**Figure 6**) de sévères altérations du métabolisme énergétique sont à noter durant la progression de la maladie dans ces deux modèles (cf. partie 2 « la composante métabolique »).

		SOD1^{G93A}	***Sod1^{G86R}***	**Références**
Caractéristiques du transgène	Mutation	G93A	G86R	Gurney et al., 1994 ; Ripps et al., 1995
	Promoteur	SOD1 humain	Sod1 murin	
	Activité enzymatique	OUI	NON	
Caractéristiques métaboliques	Hypermétabolisme	OUI	OUI	Dupuis et al., 2004a
	Mitochondriopathie	++++	+	Dal Canto and Gurney, 1995; Kong and Xu, 1998; Wong et al., 1995; Morrison et al., 1998
	Déséquilibre balance énergétique	OUI	OUI	Palamiuc et al., 2015 ; Desseilles et al., 2017
Caractéristiques phénotypiques	Déclenchement de la maladie (jours)	~70	~90	Gurney et al., 1994 ; Ripps et al., 1995 ; Canto and Gurney, 1997; Dupuis et al., 2004a; Morrison et al., 1998
	Durée de la maladie (jours)	~80	~20	
	Survie (jours)	~150	~110	
	Perte de poids	OUI	OUI	
	Perte de force musculaire	OUI	OUI	
	Altération démarche	OUI	OUI	
Caractéristiques histopathologiques	Perte des NMC	OUI	OUI	Gurney et al., 1994; Ripps et al., 1995 ; Canto and Gurney, 1997; Dupuis et al., 2004a; Morrison et al., 1998
	Perte des MN	OUI	OUI	
	Perte des JNM	OUI	OUI	

Figure 6 : Caractéristiques principales observées dans deux modèles murins de SLA.
NMC : neurones moteurs corticaux ; MN : motoneurones ; JNM : jonctions neuromusculaires.

C. Les mécanismes physiopathologiques décrits dans la SLA

Plusieurs mécanismes physiopathologiques sont soupçonnés d'intervenir dans le développement de la SLA. En revanche, il n'est aujourd'hui pas possible de les classer dans les causes ou les conséquences de la SLA. L'identification du premier gène muté *SOD1* chez les patients atteints de SLA a encouragé la communauté scientifique à se focaliser sur le stress oxydant au vue de la perte de fonction supposée de l'enzyme SOD1.

1. Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydant

Dans les formes familiales et sporadiques de la SLA, le dysfonctionnement mitochondrial est une des caractéristiques principales avec toutes les altérations cellulaires qui en découlent (Bowling et al., 1993; Carrì et al., 2017; Cozzolino and Carrì, 2012, 2012; Dupuis et al., 2004b; Sasaki et al., 2007; Smith et al., 2019; Vandoorne et al., 2018). Des anomalies structurelles et fonctionnelles identiques sont observées chez les patients SLA (Hirano et al., 1984; Okamoto et al., 1990; Sasaki and Iwata, 1999; Sasaki et al., 2007) et dans différents modèles murins de SLA (Dal Canto and Gurney, 1995; De Vos et al., 2007; Gautam et al., 2019; Higgins et al., 2003; Jaarsma et al., 2001a; Magrané et al., 2014; Wang et al., 2013). En effet, des amas de mitochondries ont été détectés dans la moelle épinière lombaire (Sasaki and Iwata, 1996) ainsi que des gonflements des mitochondries dans les MN de patients SLA (Siklós et al., 1996). Des phénomènes de vacuolisation et de fragmentation de mitochondries ont été observés dans les souris modèles de SLA (Canto and Gurneyt, 1994; Kong and Xu, 1998; Wong et al., 1995) et de MN en culture (Magrané and Manfredi, 2009; Song et al., 2013). En plus de ces anomalies morphologiques, la fonction mitochondriale est particulièrement affectée puisque l'activité des complexes de la chaîne respiratoire est défaillante (Wiedemann et al., 2002) notamment dans les MN des patients SLA (Borthwick et al., 1999) et chez les souris SLA (Mattiazzi et al., 2002). De manière intéressante, il a été montré que la respiration mitochondriale et la production d'ATP étaient significativement diminuées et précédaient les déficits moteurs des souris *SOD1*^{G93A} (Jung et al., 2002; Mattiazzi et al., 2002; Szelechowski et al., 2018). Par son interaction avec le RE, la mitochondrie intervient également dans la régulation calcique de la cellule. Dans la SLA, cette capacité est perdue et déclencherait une excitotoxicité calcique (Damiano et al., 2006). Une importante concentration en Ca^{2+} a été retrouvée dans les mitochondries de patients SLA (Siklós et al., 1996) et dans différents modèles murins et cellulaires (Carrì, 1997; Damiano et al., 2006; Jaiswal et al., 2009). Ces phénomènes peuvent sous-tendre un défaut de signalisation entre la mitochondrie et le RE (Lau et al., 2018; Siklós et al., 1996; Stoica et al., 2014, 2016). L'utilisation de Ca^{2+} est indispensable à la synthèse d'ATP (Jouaville et al., 1999). Il a été montré qu'une amélioration de la régulation calcique préservait la fonction mitochondriale dans la moelle épinière, diminue l'astrogliose et limite la dégénérescence des MN

(Parone et al., 2013). En revanche, cela n'a pas permis d'empêcher la dégénérescence axonale mais souligne le rôle crucial de la mitochondrie dans la gestion du calcium.

Suspecter le stress oxydant comme étant l'élément déclencheur de la SLA avec des mutations dans le gène *SOD1* est légitime, puisque l'action principale de la protéine SOD1 qui est de détoxifier la cellule des radicaux libres ou ROS (« reactive oxygen species ») est malmenée dans cette maladie (Barber and Shaw, 2010). Le stress oxydant est un phénomène qui survient lorsqu'une production accrue de ROS devient toxique pour la cellule. De nombreux travaux ont souligné la présence anormalement élevée de marqueurs de ROS dans les fluides (Mitsumoto et al., 2008; Simpson et al., 2004; Smith et al., 1998) et dans les tissus post-mortem de patients sALS (Mahoney et al., 2006; Shaw et al., 1995; Shibata et al., 2001), justifiant ainsi la contribution du stress oxydant dans la SLA (Barber and Shaw, 2010; Barber et al., 2006; Mahoney et al., 2006). En condition aérobique, les ROS sont des métabolites qui résultent de la phosphorylation oxydative, c'est-à-dire lors de la production d'énergie (sous forme d'ATP) via une consommation d'oxygène (O_2) qui se fait par la respiration mitochondriale. Physiologiquement, l'élimination des ROS d'une cellule s'effectue par l'intervention de molécules antioxydantes comme les superoxydes dismutases (SOD) qui permettent d'assurer un certain équilibre (Li et al., 2016). Ainsi, la production de ROS ne provoque pas systématiquement un stress oxydant à la cellule. En revanche, si le processus d'élimination est altéré alors une production de ROS accrue entrainera divers dommages cellulaires comme une forte réponse inflammatoire, une excitotoxicité, une agrégation protéique ou encore l'apoptose (Gandhi and Abramov, 2012; Kim et al., 2015). En plus des arguments ci-dessus et des mutations identifiées dans le gène *SOD1* en 1993 chez les patients SLA, les chercheurs débâtent sur une potentielle perte de fonction ou gain de fonction toxique de la protéine mutée SOD1 (mSOD1). Habituellement, la protéine normale SOD1 dismute les anions superoxydes ($O2^{-\cdot}$) en dioxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En 1996, Deng et ses collègues montrent une diminution de l'activité de la mSOD1 dans les érythrocytes des patients SLA (Deng et al., 2006) mais une invalidation totale de l'enzyme n'entraine pas de phénotype moteur particulier (Reaume et al., 1996). A contrario, une accumulation de protéines mSOD1 conduit à des altérations tant morphologiques que fonctionnelles dans les mitochondries de MN et de cellules musculaires squelettiques de souris modèles de SLA (Jung et al., 2002). De plus, plusieurs données révèlent que la protéine mSOD1 serait capable d'entraver le passage d'enzymes importantes pour l'homéostasie mitochondriale en s'accumulant dans l'espace intermembranaire (Liu et al., 2004; Wong et al., 1995). Outre l'impact important de l'agrégation de mSOD1 sur la fonction mitochondriale et l'augmentation accrue de ROS (Israelson et al., 2010; Pickles et al., 2013, 2016), il est probable que la protéine mSOD1 soit sensible au stress oxydant en raison de sa mauvaise conformation (Rakhit et al., 2002). En effet, une structure conformationnelle défaillante de la mSOD1 serait responsable de

réactions oxydatives indésirables. Celles-ci seraient due à une spécificité de liaison altérée aux ions métalliques indispensables à une activité enzymatique optimale. De plus, le type de mutations de la mSOD1 provoque des différences de repliement de la protéine et démontre ainsi une certaine complexité dans l'établissement d'un stress oxydant (Beckman et al., 1993; Cleveland and Rothstein, 2001; Deng et al., 1993). Il est à noter également que les agrégats protéiques mSOD1 peuvent conduire au recrutement de facteurs pro-apoptotiques déclenchant une activation anormale de l'apoptose (Pasinelli et al., 2004; Pedrini et al., 2010). Malgré toutes ces données, il n'est pas possible d'émettre un mécanisme causatif de la mSOD1 et du stress oxydant.

L'ensemble de ces preuves ne peut affirmer un lien direct entre les désordres mitochondriaux et la protéine mSOD1 mais démontre leur contribution avérée dans la pathogenèse de la SLA.

2. L'homéostasie protéique

Comme dans de nombreuses maladies neurodégénératives, l'accumulation de protéines toxiques est retrouvée. Dans la SLA, les agrégats protéiques sont des signes histopathologiques classiques dans les neurones moteurs où sont retrouvées diverses protéines mutées : mSOD1, mFUS, mTDP43 et mC9ORF72 (Ash et al., 2013; Mori et al., 2013; Neumann et al., 2006; Pasinelli et al., 2004; Watanabe et al., 2001). En effet, des inclusions contenant des protéines mSOD1 sont détectées à la fois dans les neurones et les astrocytes des patients sALS et fALS (Bosco et al., 2010; Forsberg et al., 2010; Ray et al., 2004; Shibata et al., 1996) mais également dans différents modèles murins SLA (Bruijn et al., 1998; Shibata et al., 1998; Watanabe et al., 2001). De plus, l'accumulation d'agrégats mSOD1 est concomitante au développement de la maladie chez les souris mais absente avant la perte de force musculaire (Bruijn et al., 1998). Par conséquent, il est donc légitime de se demander si ces accumulations de protéines mutées constituent une cause ou une conséquence à la maladie, voire un mécanisme de protection pour lutter contre la toxicité potentielle des inclusions. Pour contrecarrer ces inclusions protéiques, la cellule dispose de deux voies d'élimination : la voie protéasomale et la voie autophagique. Cependant, ces deux voies sont perturbées dans la SLA (Li et al., 2008; Neumann et al., 2006; Sasaki, 2011). Par exemple, la mSOD1 peut interagir directement avec le protéasome et inhiber son action (Kabashi et al., 2004; Urushitani et al., 2002). En parallèle, les protéines impliquées dans le processus autophagique telles que l'ubiquitine-2, le sequestosome-1 (Deng et al., 2011; Fecto, 2011) ou CHMP2B (Parkinson et al., 2006) sont retrouvées mutées affectant ainsi le fonctionnement de ces deux voies, cruciales pour la dégradation protéique. Par ailleurs, il est également connu que les agrégats mSOD1 participent activement à l'apoptose neuronale (Pasinelli et al., 2004; Pedrini et al., 2010). Par sa liaison à la protéine anti-apoptotique Bcl2, le mSOD1 favorise l'apoptose dans les MN de souris *SOD1*^{G93A} (Pasinelli et al., 2004). Ces données ne permettent tout de même pas d'identifier un mécanisme toxique clair. Néanmoins, la piste d'une propagation de type prion est en vogue depuis

quelques années. Des études ont souligné la capacité de propagation des agrégats protéiques d'une cellule à une autre. C'est notamment le cas pour la plupart des mutations liées à la SLA, où les protéines agrégées de mSOD1 (Ayers et al., 2016; Basso et al., 2013; Münch et al., 2011) et mTDP43 (Braak et al., 2013; Nonaka et al., 2013) sont libérées et endocytées par les protéines avoisinantes reproduisant ainsi le schéma d'une transmission de type prion. Enfin, un mécanisme potentiel qui résulterait de cette propagation de type prion serait la capacité qu'auraient les protéines mutées à provoquer une mauvaise conformation de leurs alter egos sauvages (Grad et al., 2011).

3. Excitotoxicité glutamatergique

Principal neurotransmetteur excitateur du SNC, le glutamate peut parfois se révéler toxique dans plusieurs conditions pathologiques telles que l'épilepsie, des ischémies cérébrales ou encore des maladies neurodégénératives comme la SLA. L'excitotoxicité glutamatergique est souvent mise en exergue dans la SLA car il a été décrit une augmentation anormale de glutamate dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients SLA (Rothstein et al., 1990; Shaw et al., 1995). Une étude montre également le caractère toxique qu'a le LCR de patients SLA sur des cellules neuronales saines (Couratier et al., 1993). L'action neurotoxique du glutamate s'explique par une activation exacerbée des récepteurs glutamatergiques neuronaux conduisant à une élévation drastique de la concentration intracellulaire en calcium qui est délétère pour le neurone. Ce phénomène peut s'expliquer par une quantité trop importante de glutamate dans la fente synaptique dû à un défaut des transporteurs de sa recapture, une augmentation du nombre de récepteurs postsynaptiques ou une modification de l'affinité pour ces récepteurs (Ferraiuolo et al., 2011). Les MN expriment majoritairement des récepteurs au glutamate très perméable au Ca^{2+} comme le récepteur AMPA et les rendent particulièrement vulnérables à une toxicité au Ca^{2+} en raison de la sous-unité Glur2 qu'ils expriment (Williams et al., 1997). L'inhibition du récepteur AMPA à l'aide d'un antagoniste protège les MN en culture de l'effet toxique du LCR des patients (Couratier et al., 1993). Par ailleurs, le tamponnage du glutamate par les astrocytes n'est plus assuré puisqu'une répression du transporteur de recapture EAAT2 est observée dans le cerveau et la moelle épinière de patients SLA (Bristol and Rothstein, 1996; Rothstein et al., 1990, 1992). Ces mêmes observations ont été faites dans le modèle *SOD1*^{G93A} (Howland et al., 2002; Trotti et al., 1999; Van Damme et al., 2007). Fait intéressant, une surexpression d'EAAT2 protège de la cytotoxicité induite par le glutamate et de la mort cellulaire dans des neurones en culture. *In vivo*, la surexpression d'EAAT2 dans le modèle *SOD1*^{G93A} retarde la perte de force musculaire et la mort des MN mais n'améliore pas la survie de ces animaux (Guo, 2003). Néanmoins, la surexpression d'EAAT2 ne peut être la cause de la SLA mais y participe activement. Aujourd'hui, le Riluzole connu pour son action anti-glutamatergique en inhibant la libération de glutamate dans la fente synaptique (Ferraiuolo et al., 2011) a montré des effets satisfaisants dans les modèles

transgéniques de SLA (Gurney et al., 1998) mais son action n'augmente que de quelques mois la vie des patients SLA (Miller et al., 2012). Bien que l'excitotoxicité glutamatergique soit un fait avéré dans la SLA, ces données ont mis l'accent sur une implication majeure pluricellulaire dans la pathogénicité de la SLA.

D. Pathogénicité pluricellulaire

Du fait de la dégénérescence des MN chez les patients et les modèles animaux, les premières recherches scientifiques étaient majoritairement focalisées sur une pathologie centrée sur le neurone moteur. Cependant, plusieurs études s'intéressant à l'environnement du neurone moteur ont montré une réelle contribution d'autres types cellulaires que sont les cellules gliales ou les cellules musculaires par exemple.

1. Les neurones moteurs

La SLA est classiquement décrite comme la maladie du MN la plus fréquente chez l'adulte (Worms 2001). Par ailleurs, il est tout de même admis que la SLA induit une dégénérescence conjointe des neurones moteurs corticaux (NMC) et des MN bulbaires et/ou spinaux (Brooks and Fischbeck, 1995; Bruijn et al., 2004; Cleveland and Rothstein, 2001; Jaarsma et al., 2008). L'atteinte des NMC et des MN est due à un certain nombres de mécanismes physiopathologiques comme le stress oxydant, les agrégats protéiques ou encore l'excitotoxicité glutamatergique présentés en amont (cf partie C). L'intérêt porté à ces événements pathologiques a permis de distinguer diverses populations cellulaires impliquées dans la SLA. A ce jour, il est connu qu'une surexpression ciblée de la protéine mSOD1 dans les neurones moteurs n'induit pas de SLA (Lino et al., 2002; Pramatarova et al., 2001) mais que la toxicité rapportée de la mSOD1 dans les neurones moteurs est tout de même établie puisqu'elle contribue à la progression de la SLA. Boillée et ses collègues montrent qu'une mutation conditionnelle de *SOD1*^{G37R} (autre mutation retrouvée dans la SLA) engendre une perte de poids, une atrophie musculaire, ainsi qu'une dénervation musculaire. La diminution de ce mutant spécifiquement dans les MN par l'intervention d'un croisement avec des souris exprimant la CRE recombinase montre un retard de développement de la pathologie et une survie augmentée de 64 jours (Boillée et al., 2006). Deux ans plus tard, ces résultats sont confirmés et affirment que la toxicité de la mSOD1 joue un rôle crucial dans la SLA. En effet, l'expression d'un mutant mSOD1 dans les MN entraine également une perte de poids et une diminution du nombre de MN (Wang et al., 2008). Cependant, cela ne se restreint pas seulement aux différents mutants SOD1. Les souris TDP43 montrent des déficits moteurs dès 3 mois alors que celles avec une diminution de TDP3 spécifiquement dans les MN ne présentent aucun symptôme moteur avant 10 mois. Malheureusement, lors d'un stade trop avancé, l'effet bénéfique de cette réduction de TDP43 sur l'intégrité des JNM et des performances motrices n'est plus conservé

(Ditsworth et al., 2017). Par conséquent, la contribution des neurones moteurs dans la SLA est réelle mais ne peut être réduite à leur unique implication.

2. Les cellules gliales

Le système nerveux central dispose d'un système de défense robuste qui est composé d'astrocytes, de microglies et d'oligodendrocytes, ce sont les cellules gliales résidantes, mais interviennent également les cellules immunitaires circulantes (monocytes, les neutrophiles, lymphocytes). Ces cellules vont être activées lors d'événements nocifs pour l'homéostasie cellulaire comme une infection, une lésion ou encore une dégénérescence, c'est la neuroinflammation (McCauley and Baloh, 2019). Dans la SLA, de plus en plus de preuves soutiennent le rôle crucial de la neuroinflammation dans le développement et/ou la progression de la SLA. En effet, les analyses de différents travaux révèlent une neuroinflammation dans les tissus de patients et de modèles murins de SLA (Brites and Vaz, 2014; Corcia et al., 2012) avec notamment l'identification de niveaux élevés de prostaglandines E2 dans le LCR (Almer et al., 2002) et de COX2 dans la moelle épinière de patients et de souris SLA (Yasojima et al., 2001), tous deux marqueurs de la neuroinflammation. De plus, avec la progression de la pathologie, l'installation d'une inflammation systémique est décrite par la présence de cellules immunitaires circulantes (lymphocytes T) dans le tissu nerveux (Engelhardt et al., 1993) mais aussi des marqueurs inflammatoires dans le LCR (Chang et al., 2008; Simpson et al., 2004; Sjogren, 2004), dans le sang des patients SLA (Almer et al., 2002; Henkel et al., 2004; Lu et al., 2016; Murdock et al., 2017; Zhang et al., 2005, 2011) et dans les modèles animaux (Alexianu et al., 2001; Jara et al., 2012, 2017; Keller et al., 2009; Ozdinler et al., 2011). De là, les cellules gliales ont été étudiées séparément pour essayer de comprendre leur rôle dans la pathologie.

Des études montrent que les microglies sont déjà recrutées dès un stade présymptomatique dans le modèle *SOD1*^{G93A} laissant donc penser à une neuroinflammation précoce bien avant le développement des symptômes caractéristiques de la SLA (Alexianu et al., 2001; Hall et al., 1998; Kriz et al., 2002). En effet, des signes d'activation de la microglie sont observés précocement dans le moelle épinière de ces souris et vont progressivement s'accentués tout au long de la maladie (Gerber et al., 2012). Lors de cette activation microgliale, des cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées (Corcia et al., 2012; Henkel et al., 2004, 2006; Meissner et al., 2010; Nguyen et al., 2001) mais s'ajoutent également les sécrétions émises par les astrocytes (Endo et al., 2015; Johann et al., 2015; Pehar et al., 2004) qui sont toutes connues pour être neurotoxiques (Nagai et al., 2007). Ces constatations ont suggéré que la neuroinflammation pouvait être considérée comme un mécanisme neuroprotecteur dans la SLA mais qui devient délétère au fur et à mesure que la maladie s'installe. En effet, la microglie aurait des marqueurs connus pour favoriser la réparation tissulaire dès un stade précoce de la SLA (Appel et al., 2011). De manière intéressante, il a été montré *in vitro* que des microglies issues de souris *SOD1*^{G93A}

asymptomatiques préservent l'intégrité des MN issus de souris non-transgéniques (nTg). En revanche, les MN de souris nTg ne survivent pas lorsque c'est une microglie provenant d'une souris en stade terminal qui est apportée (Liao et al., 2012). Par ailleurs, l'administration d'une microglie saine à des souris *SOD1*^{G93A} qui en sont dépourvues limite la perte de MN et prolonge leur survie (Beers et al., 2006). Nous savons aujourd'hui qu'une surexpression de la mSOD1 exclusivement dans les MN n'est pas suffisante pour engendrer une SLA. Comme expliqué précédemment, la responsabilité des MN n'est pas totale dans la SLA et fait intervenir les cellules gliales notamment. De surcroît, une induction spécifique de mSOD1 dans les cellules gliales de souris cause des symptômes semblables à une SLA mais les MN sont sauvés (Lino et al., 2002; Pramatarova et al., 2001). De plus, la survie est augmentée dans les modèles de SLA qui n'ont pas la mSOD1 dans la microglie (Boillée et al., 2006).

Les études ont également souligné l'importance des astrocytes dans la SLA. Précédemment, nous avons vu que les astrocytes contribuaient massivement au développement de la SLA avec une recapture du glutamate défaillante entrainant une excitotoxicité du Ca^{2+} dans la cellule surstimulée (Liu and Wang, 2017). Il est montré qu'une induction ciblée de mSOD1 dans les astrocytes est capable de provoquer la mort des MN dans la SLA (Nagai et al., 2007). De plus, l'introduction d'astrocytes exprimant la mSOD1 dans un rat nTg engendre la dégénérescence des MN (Papadeas et al., 2011) au contraire d'une invalidation de la mSOD1 dans les astrocytes ralentit la progression de la maladie (Wang et al., 2011; Yamanaka et al., 2008). Ces effets bénéfiques sont également mis en évidence lorsqu'une transplantation d'astrocytes nTg est réalisée chez des rats *SOD1*^{G93A} (Lepore et al., 2008).

Responsables de la myélinisation, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann sont aussi affectés puisqu'une dégénérescence de la gaine de myéline est observée chez les patients atteints de SLA (Hayashi et al., 2001) et les rats *SOD1*^{G93A} (Niebroj-Dobosz et al., 2007). Cette observation est également faite dans d'autres modèles murins de SLA, avec des altérations structurales et fonctionnelles des oligodendrocytes dans un modèle murin FUS (Scekic-Zahirovic et al., 2017) et dans le modèle *SOD1*^{G93A} (Kang et al., 2013). Enfin, le rôle des cellules de Schwann dans la SLA reste très discuté. Des troubles myéliniques sont présents dans le SNP des patients SLA (Perrie et al., 1993) révélant ainsi des atteintes des cellules de Schwann. De manière étonnante, les travaux de Lopsiger montrent qu'une diminution de synthèse de mSOD1 dans les cellules de Schwann aggrave la maladie (Lobsiger et al., 2009). A l'inverse, la surexpression de mSOD1 dans ces cellules n'est pas pathologique et n'induit aucun signe caractéristique de la SLA comme un quelconque signe moteur ou perte de MN (Turner et al., 2010). Toutes ces preuves démontrent l'impact des cellules gliales dans la physiopathologie de la SLA bien que les mécanismes soient toujours incompris.

3. Implication de la JNM et du muscle

Ces dernières années, le champ des recherches s'est considérablement élargi et n'a fait que renforcer l'extrême complexité de la SLA en la qualifiant de pathologie multicellulaire. En effet, l'hypothèse d'une étiologie périphérique reste controversée mais fait sens puisque le démantèlement de la jonction neuromusculaire (JNM) est le premier évènement pathologique à survenir au cours de la maladie (Lepore et al., 2019). L'altération de cette connexion MN-muscle précède la rétraction des terminaisons nerveuses chez les patients et les modèles murins SOD1 (Aggarwal, 2002; Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Gonzalez de Aguilar et al., 2008; Pun et al., 2006; Siklós et al., 1996; Tsujihata et al., 1984; Vinsant et al., 2013) suggérant que cette déconnexion apparaitrait avant tout signe de dénervation et de mort des MN (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Gould, 2006; Pun et al., 2006; Vinsant et al., 2013). De plus, la sauvegarde du corps cellulaire du MN n'a pas empêché la destruction JNM (Gould, 2006; Rouaux et al., 2007). Ainsi, cela démontre que le démantèlement de la JNM est encore plus précoce et n'est pas causé par la mort du MN. Pour tenter d'expliquer ce phénomène et de comprendre l'origine du démantèlement de la JNM, la toxicité de la SOD1 serait mise en jeu (Fischer et al., 2004). C'est pourquoi une équipe a tenté le pari d'une diminution de la mSOD1 dans le muscle de souris *SOD1*^{G37R} par excision de gène mais n'a rapporté aucun effet bénéfique aux souris (Miller et al., 2006; Towne et al., 2008). A l'inverse, une surexpression musculaire de mSOD1 a des effets néfastes sur les souris puisqu'elles ont une faiblesse musculaire, des dommages musculaires et une perte de MN (Dobrowolny et al., 2008; Wong and Martin, 2010). Toutefois, sur la base de ces données, le tissu musculaire ne semble pas être au centre des préoccupations sur la pathologie de la JNM. Or, l'implication de la toxicité de mSOD1 est bien présente dans la SLA. Plusieurs troubles mitochondriaux ont été rapportés dans le muscle de patients (Echaniz-Laguna et al., 2002, 2006) et de modèles animaux de SLA (Luo et al., 2013; Zhou et al., 2010) probablement dus aux agrégats de mSOD1. Et, plusieurs études ont montré qu'une induction spécifique de mSOD1 dans le tissu musculaire provoque atrophie musculaire, stress oxydant, activation gliale et dégénérescence des MN (Dobrowolny et al., 2008; Wong and Martin, 2010). D'autres acteurs renforcent le statut important du muscle dans la mort du MN. C'est le cas de l'inhibiteur de la croissance neuritique Nogo-A qui est significativement élevé dans le muscle des patients et des souris modèles et qui est corrélé avec la sévérité de la maladie (Jokic et al., 2006). Enfin, notre laboratoire a montré également des altérations métaboliques sévères dans le muscle qui apparaissent bien avant le développement des symptômes moteurs et notamment avant que les MN soient affectés (Dupuis et al., 2004a, 2011). A ce jour, toutes ces preuves soulignent des désordres musculaires précoces au développement des symptômes moteurs de la SLA soutenant ainsi la contribution indiscutable du muscle strié squelettique (cf. partie 2). Les altérations métaboliques retrouvées dans la SLA feront l'objet d'une partie distincte dans ce manuscrit (cf partie 2).

PARTIE 2 : La composante métabolique : cause ou conséquence de la SLA ?

A. Physiologie du métabolisme énergétique à l'échelle de l'organisme

1. La flexibilité métabolique au service de l'homéostasie énergétique

Chaque jour, notre corps consomme une certaine quantité d'énergie pour assurer les fonctions vitales telles que la respiration, le fonctionnement cardiovasculaire et du système nerveux ou encore maintenir une température corporelle constante à 37°C, c'est le métabolisme de base (MB) ou dépense énergétique au repos (DER). Celui-ci représente environ 60 à 75% des dépenses énergétiques totales et dépendra de plusieurs facteurs comme l'âge, l'état nutritionnel, la composition corporelle *etc*. (Connolly et al., 1999). Le pourcentage restant des dépenses énergétiques totales représente la consommation d'énergie liée à la thermogénèse et à l'activité physique (Clapham, 2012; Westerterp, 2004). Pour cela, le maintien de la balance énergétique demeure indispensable et nécessite un équilibre subtil entre les apports énergétiques et les dépenses énergétiques totales (DET). Différents facteurs entrent ainsi en jeu : le nombre, la quantité, la valeur calorique du repas, la consommation des aliments ou encore les facteurs socio-environnementaux prenant en compte le type d'aliments, le rythme et la qualité de vie. La faculté permanente qu'a notre organisme à trouver l'équilibre entre tous ces facteurs définit la flexibilité métabolique, indispensable au maintien de l'homéostasie énergétique (Berthoud, 2007). La sédentarité, la fonte musculaire du au vieillissement ou des troubles métaboliques comme l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 peuvent provoquer la perte de cette flexibilité métabolique (Kelley and Mandarino, 2000). A l'inverse, celle-ci peut être améliorée avec l'exercice physique (Bergouignan et al., 2013; Rynders et al., 2018; Weyer et al., 1999). La maintien de l'homéostasie énergétique repose sur des mécanismes de régulation très fins qui font intervenir des signaux hormonaux (insuline, leptine), métaboliques (acides aminés, acides gras, peptides, sucres) et nerveux provenant de l'hypothalamus permettant le contrôle de la prise alimentaire (Migrenne et al., 2006).

L'énergie contenue dans les aliments doit pouvoir être convertie pour être utilisée par le corps. Les aliments sont donc digérés, transformés et stockés par exemple sous forme de glycogène dans le foie et le muscle ou sous forme de triglycérides (TG) dans le tissu adipeux. La transformation de ces macronutriments fournit une énergie chimique utilisable par l'organisme qui est l'adénosine triphosphate (ATP). Cet ATP est produit à la suite d'une série de réactions biochimiques nécessitant la consommation d'oxygène et la libération de gaz carbonique (CO_2) (Soares and Müller, 2018; Suarez, 2012). Ces échanges gazeux permettant la synthèse d'ATP peuvent être mesurés par le quotient

respiratoire (QR). Le QR définit le rapport entre la quantité de gaz carbonique produite lors de l'oxydation totale d'un substrat (VCO_2) sur la quantité d'oxygène nécessaire à cette oxydation (VO_2) à l'échelle du corps entier. Le QR renseigne sur la nature du substrat oxydé pour la production d'ATP et sa valeur mesurée dépend du substrat utilisé. Il est égal à 1 pour les glucides, à 0,8 pour les protides et à 0,7 pour les lipides. Pour accéder à ce QR, plusieurs méthodes d'évaluation sont disponibles comme la calorimétrie indirecte qui reste la plus utilisée. Cette méthode est couramment utilisée en physiologie du sport ou dans le cas de pathologies graves comme la SLA, où les patients présentent des troubles sévères de l'alimentation qui affectent cette homéostasie énergétique.

2. Voies biochimiques principales

Le métabolisme énergétique d'une cellule est un équilibre constant entre synthèse (anabolisme) et dégradation (catabolisme) de substrats (acides aminés, sucres, lipides) représenté par de nombreuses voies bioénergétiques maintenant au maximum l'homéostasie énergétique. Ces voies génèrent ou consomment de l'énergie sous forme d'ATP. Pour ce manuscrit nous nous concentrerons uniquement sur les deux voies métaboliques principales de catabolisme du glucose et des lipides.

2.1 Le métabolisme glucidique

2.1.1 Transport du glucose et régulation

Durant un repas, l'amidon (un glucide complexe ou polysaccharide) ingéré sera progressivement hydrolysé dans la lumière du tube digestif en plusieurs molécules de glucose. Ces molécules de glucose seront ensuite absorbées au niveau intestinal et redistribuées par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques à l'ensemble de l'organisme. D'une part, les co-transporteurs sodium-glucose SGLT (*sodium glucose transporter*) assurent l'absorption intestinale et rénale du glucose et d'autre part, les transporteurs du glucose GLUT (*glucose transporter*) présents de manière ubiquitaire, permettent de réguler le métabolisme énergétique (Kanwal and Banerjee, 2013; Thorens and Mueckler, 2010). Une fois dans la circulation sanguine, le glucose est acheminé dans la cellule cible via les GLUT pour y être utilisé ou stocké. Chez l'Homme, 12 isoformes de GLUT existent dont les plus connues sont les GLUT1 à GLUT4. De manière générale, les GLUT1 et 3 sont ubiquitaires, GLUT2 est exprimé au niveau du rein, du foie, des cellules β du pancréas et de l'intestin. Enfin, GLUT4 est majoritairement retrouvé dans le muscle strié squelettique et les adipocytes. Tous ces transporteurs vont pouvoir être régulés par différents acteurs comme l'insuline ou l'AMPK (AMP-activated protein kinase) (Huang and Czech, 2007; Leto and Saltiel, 2012; Wang and Lei, 2018). En cas d'hyperglycémie, les cellules β du pancréas sécrètent et libèrent l'insuline, une hormone hypoglycémiante. Celle-ci va réguler le transport du glucose en stimulant la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique au niveau du muscle et du tissu adipeux. Par l'intermédiaire de son récepteur, l'insuline entraine plusieurs cascades de réactions dont celle de la phosphatidyl - inositol 3 kinase (Pi3K) activant différentes protéines kinases (Akt, PKC,

etc.) qui provoqueront la translocation des GLUT4 à la membrane plasmique de la cellule (Saltiel and Kahn, 2001). Indépendamment de la voie de l'insuline, l'AMPK peut également réguler l'entrée de glucose dans la cellule via GLUT4 en stimulant sa translocation (Kurth-Kraczek et al., 1999). Cette voie fait intervenir la synthèse de divers agents comme l'oxyde nitrique (NOS) qui stimule (Fryer et al., 2000, 2002) ou comme l'AS160 (Akt substrate of 160 kDa) qui inhibe la translocation de GLUT4 à la membrane (Sakamoto and Holman, 2008; Treebak et al., 2006) (figure 7). La régulation du transport du glucose dans les cellules permet ainsi de maintenir une glycémie physiologique (entre 0,7 à 1,1 g/L) face à différentes situations : postprandiale, de jeûne ou pathologique.

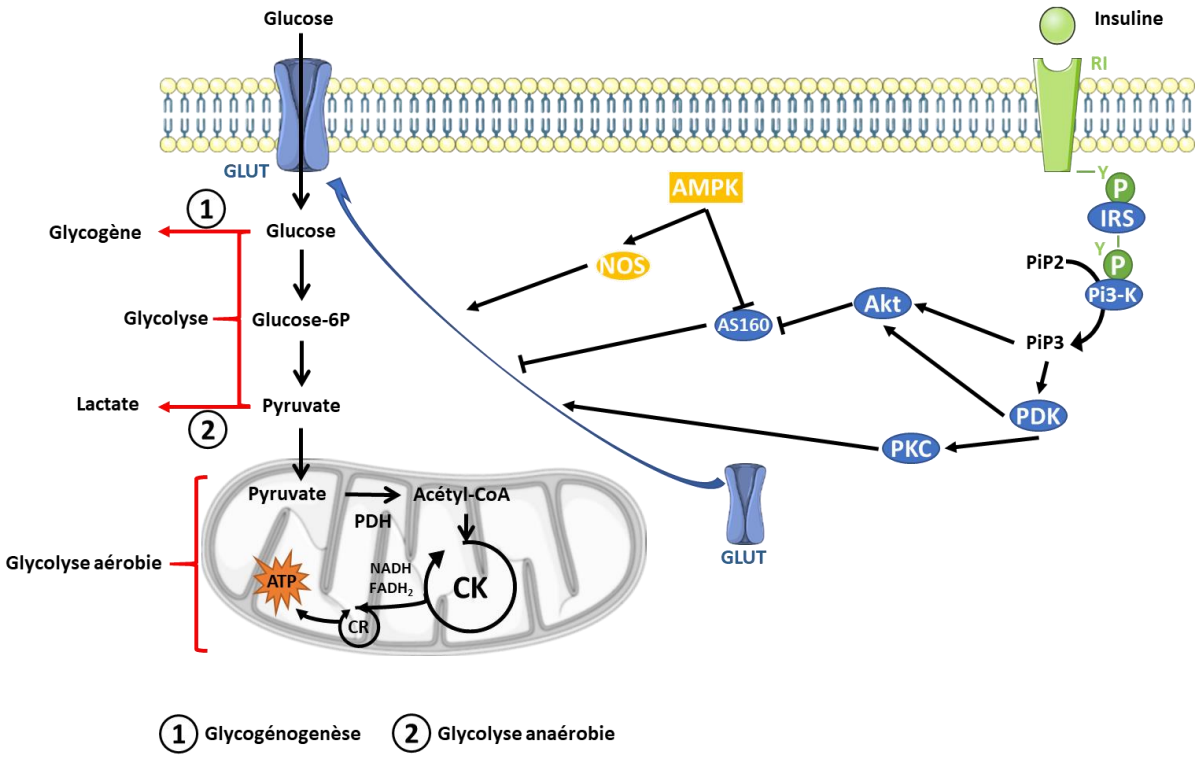


Figure 7 : Voies métaboliques du glucose et régulation de son transport.
Le glucose entre dans la cellule grâce aux transporteurs GLUTs enchâssés dans la membrane plasmique de la cellule et est utilisé de différentes façons. Le glucose peut soit être stocké sous forme de glycogène (1: glycogénogenèse) soit être oxydé lors de la glycolyse pour former du pyruvate. Ce pyruvate pourra donner du lactate (2 : glycolyse anaérobie) ou entrer dans la matrice mitochondriale pour être transformé en acétyl-CoA par la PDH. Puis l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs pour donner du NADH et FADH2 qui seront utilisés par la chaine respiratoire pour produire de l'énergie sous forme d'ATP. Parallèlement, l'import du glucose est régulé par deux acteurs majeurs : l'insuline et l'AMPK. En se fixant à son récepteur, l'insuline déclenche la cascade de réaction de la Pi3-K qui formera du PiP3. Ce PiP3 stimulera la translocation de récepteurs GLUTs assurée par une

vésicule intracellulaire (non représentée) par la voie PDK/PKC et l'inhibera par la voie Akt. Indépendamment de l'insuline, l'AMPK peut inhiber cette translocation par l'AS160 (substrat de l'Akt) ou la stimuler via NOS.

AMPK : AMP-activated Protein Kinase ; AS160 : Akt substrate of 160 kDa ; CK : Cycle de Krebs ; CR : Chaine respiratoire ; GLUT : Glucose Transporter ; IRS : Insulin receptor substrate 1 ; NOS : Oxyde Nitrique ; PDH : Pyruvate DesHydrogenase ; PDK : Phosphoinositide Dependant Kinase ; PKC : Protéine Kinase C ; Pi3-K : Phosphoinositol-3-kinase ; PiP2 : Phophoinositol-2-Phosphate ; PiP3 : phosphoinosotol-3-phosphate.

2.1.2 Devenir, utilisation du glucose et régulation

Une fois entré dans la cellule, le glucose peut soit être stocké sous forme de glycogène (glycogénogenèse) ou soit être métabolisé pour produire de l'énergie à la cellule (glycolyse anaérobie ou aérobie). La glycogénogenèse se fait grâce à la glycogène synthase (GS) et permet le stockage du glucose sous forme de glycogène uniquement dans le foie et le muscle squelettique. Ces réserves de glycogène constituent un apport rapide d'énergie aux cellules. En parallèle de la glycogénogenèse, le glucose peut être directement utilisé pour produire de l'énergie : c'est la glycolyse. On parle de glycolyse anaérobie (absence d'oxygène) lorsque le pyruvate produit à l'issue de la glycolyse est transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH). A l'inverse, la glycolyse aérobie (en présence d'oxygène) décrit l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie et son oxydation pour produire de l'énergie via le cycle de Krebs. A noter que la glycolyse est la voie principale du métabolisme glucidique de l'organisme mais surtout l'unique source d'énergie pour le tissu nerveux. Seule la glycolyse aérobie et ses éléments de régulation seront présentés dans cette section. Pour produire de l'énergie, le glucose sera transformé plusieurs fois grâce à diverses enzymes au cours de la glycolyse expliquée en trois grandes étapes. Tout d'abord, l'enzyme hexokinase (HK) phosphoryle le glucose en glucose-6-phosphate (G6P). Le G6P est ensuite transformé en fructose 1,6 biphosphate (F-1,6-bisP) par la phosphofructokinase (PFK). Puis le clivage du F-1,6-bisP donne deux molécules : le glycéraldéhyde-3P (G3P) et le dihydroxyacétone P qui peut lui-même être converti en G3P. Ces deux molécules G3P seront ensuite oxydées pour produire du pyruvate. L'ensemble de ces réactions consomment et produisent de l'ATP ou des coenzymes telles que $NADH,H^+$. Une fois produit, le pyruvate entre dans la mitochondrie par une série de transporteurs spécifiques (membrane externe : VDAC « voltage-gated anionic channel » ; membrane interne : MPC « mitochondria pyruvate carrier ») et converti en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Enfin, l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs pour produire de l'énergie et générer divers coenzymes (NADH, $FADH_2$) qui seront utilisés par la chaîne respiratoire de la mitochondrie, qui sera présentée plus loin. Comme nous l'avons vu précédemment, l'apport du glucose et donc le niveau énergétique de la cellule sont régulés par l'insuline et l'AMPK dans le muscle et le tissu adipeux (Hayashi et al., 1998; Holmes et al., 1999). De plus, la glycolyse dépendra également du rapport AMP/ATP puisque celui-ci permet l'activation de la PFK, enzyme indispensable à cette voie. Des taux élevés d'AMP dans la cellule entrainent l'activation de la PFK1 et donc une augmentation de F-1,6-bisP pour produire *in fine* du pyruvate. Il est également

montré que l'AMPK active la PFK2 et stimule de la même manière la glycolyse. En revanche, trop d'ATP cytosolique engendre l'inhibition de la PFK1, une augmentation de la production de G6P qui vient lui-même bloquer l'activité de l'HK et donc stopper la glycolyse (Marsin et al., 2000). Ainsi, la régulation du métabolisme glucidique dépend de la régulation de l'apport de glucose dans la cellule par différents acteurs (insuline, AMPK) (Wang and Lei, 2018) mais résulte aussi d'une boucle de rétrocontrôle via le rapport AMP/ATP.

2.2 Le métabolisme lipidique

2.2.1 Transport des acides gras et régulation

L'autre source d'énergie est apportée par l'oxydation des acides gras qui est la plus importante pour la majorité des tissus, excepté pour le tissu nerveux. En effet, 30 à 40% de l'énergie apportée à l'organisme provient de l'ingestion de lipides, essentiellement sous forme de triglycérides (TG). Les AG sont définis comme des acides carboxyliques à chaîne aliphatique contenant une ou plusieurs doubles liaisons (AG insaturés) ou aucune liaison double (AG saturés). Les AG font partie d'une catégorie de lipides et peuvent être sous forme d'acides gras libres non estérifiée (AG) ou sous forme estérifiée qui représente les TG. En raison de leur caractère hydrophobe, le transport des AG circulants doit se faire à l'aide de protéines plasmatiques comme l'albumine ou de lipoprotéines telles que les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) par exemple (Foretz et al., 2006) (**figure 8**). Par l'intermédiaire de lipoprotéine lipase (LPL), une hydrolase présente à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, permettra de capter et d'hydrolyser les TG contenus dans les VLDL afin de les acheminer dans les tissus cibles (Lafontan, 2008). En revanche, la protéine ABP (*Albumin Binding Protein*) exprimée à la surface de l'endothélium vasculaire permettrait de reconnaitre et de se fixer à l'albumine. Cela servirait donc à l'acheminement des AG liés à l'albumine de rentrer dans les cellules (Kiens, 2006). Durant des années, le transport des AG à l'intérieur d'une cellule était fortement controversé puisqu'il était longtemps considéré comme une simple diffusion passive (Hamilton et al., 2001, 2002). Mais cette hypothèse a été reconsidérée puisque plusieurs travaux ont démontré l'existence de protéines de transport (Abumrad et al., 1981, 1984; Bonen et al., 1998). En 1993, le transporteur FAT/CD36 (*Fatty Acid Translocase/ Cluster of Differentiation 36*) est identifié étant exprimé de manière ubiquitaire et est le principal transporteur dans le muscle squelettique (Abumrad et al., 1993; Bezaire et al., 2006; Coburn et al., 2000). La régulation du transport des AG repose sur divers agents moléculaires. Il a été montré que l'insuline provoque la synthèse de LPL dans les adipocytes ce qui augmente donc la disponibilité des AG via les LDL et donc leur assimilation dans les tissus. L'expression protéique et la translocation des transporteurs des AG à la membrane plasmique peuvent également être modulées par différents stimuli. Bien que les mécanismes moléculaires soient méconnus, l'insuline, l'AMPK et la contraction musculaire permettent une meilleure translocation des FAT à la membrane plasmique

augmentant le passage des AG dans les cellules (Bonen et al., 2000; Glatz et al., 2002; Ke et al., 2018; Luiken et al., 2002; Thomson and Winder, 2009; Wang and Lei, 2018). Une fois dans la cellule, l'AG sera soit estérifié pour être stocké sous forme de TG ou alors oxydé pour produire de l'énergie.

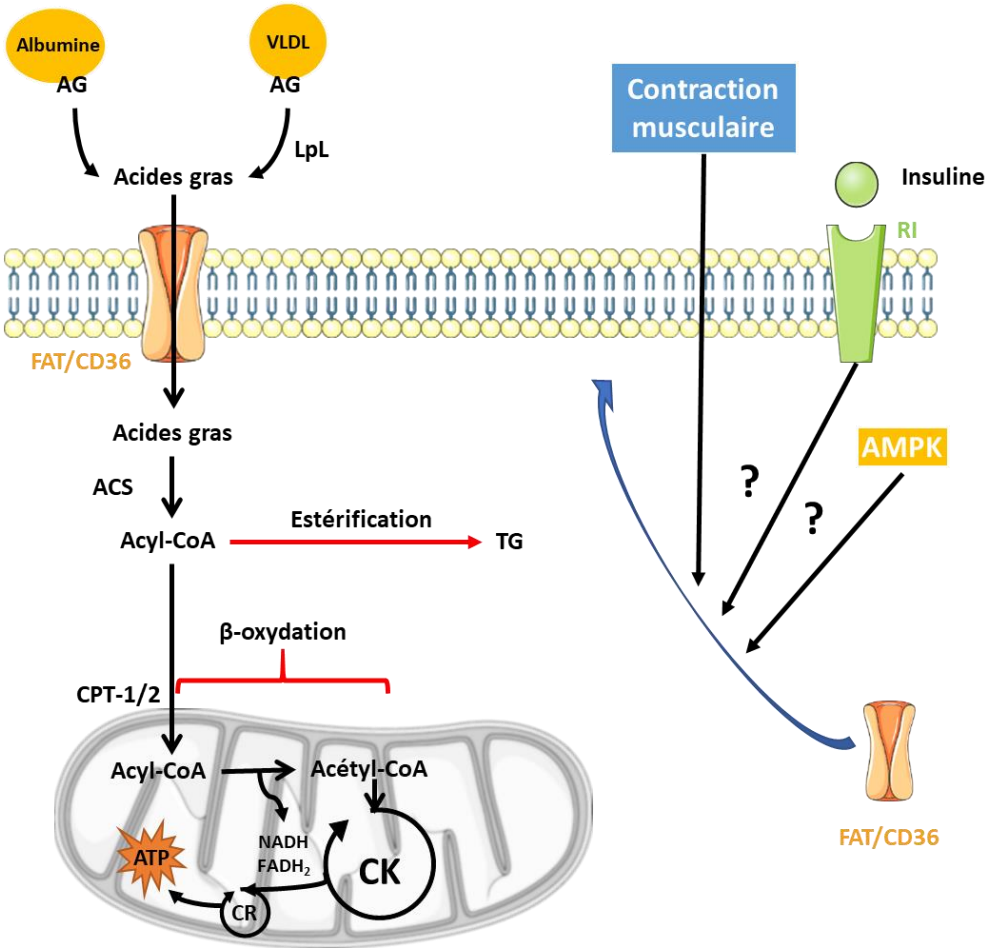


Figure 8 : Voies métaboliques des AG et régulation de son transport.
Les AG entrent dans la cellule par le transporteur FAT/CD36 et sont activés par l'ACS pour donner de l'acyl-CoA. Celui-ci pourra être estérifié en TG ou alors traverser la membrane interne et externe de la mitochondrie à l'aide de CPT1 et 2 respectivement. Une fois dans la mitochondrie, l'acyl-CoA sera oxydé par la β-oxydation et l'acétyl-CoA généré entrera dans le cycle de Krebs. Les coenzymes NADH et FADH2 sont libérés au cours de ces processus et seront utilisés par la chaine respiratoire de la mitochondrie pour produire de l'ATP. La translocation du transporteur FAT/CD36 assurée par une vésicule intracellulaire (non représentée) est stimulée par l'action de l'insuline, de l'AMPK et la contraction musculaire favorisant la voie oxydative mais les mécanismes associés restent incompris.

ACS : acyl-CoA synthétase ; AG: Acide gras; CK: Cycle de Krebs; CR; Chaîne Respiratoire ; CPT1 et 2 : Carnitine Palmitoyl Transferase 1 et 2 ; FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase/ Cluster of Differentiation 36) ; LpL : Lipoprotéine Lipase ; VLDL : Very Low Density Lipoprotein; TG: Triglycérides

2.2.2 Devenir, utilisation des AG et régulation

De la même manière que celle du glucose, les AG sont activés en acyl-CoA dans le cytosol de la cellule par l'acyl-CoA synthétase (ACS) qui utilise du Coenzyme A et de l'ATP. Cet acyl-CoA pourra donc entrer dans le processus d'estérification pour créer ou maintenir une réserve d'AG sous forme de TG dans la

cellule du tissu adipeux ou du foie mais quelques fois dans les muscles squelettiques et cardiaque en conditions pathologiques (**figure 8**). Par ailleurs, les AG activés vont pouvoir rejoindre la mitochondrie et y être oxydés dans la matrice pour fournir de l'énergie via la chaîne respiratoire. Les AG à chaine courte peuvent diffuser librement à travers les membranes mitochondriales et être activés dans la matrice alors que les AG à chaine longue nécessitent une activation via les translocases CPT1 et 2 (*Carnitine Palmitoyl Transferase*). Une fois dans la matrice mitochondriale, l'oxydation des AG ou β-oxydation peut débuter. L'acyl-CoA va subir une succession de coupures le réduisant de deux carbones à chaque cycle pour donner deux acétyl-CoA, c'est le cycle de Lynen. La β-oxydation est composée de quatre réactions permettant la dégradation complète de l'acyl-CoA en acétyl-CoA. Les produits formés lors de la β-oxydation serviront pour le cycle de Krebs et les réactions de phosphorylation oxydative de la chaine respiratoire. Ainsi, le nombre de carbone dans une molécule d'un type d'AG nécessitera plus ou moins de cycle de dégradation et influencera donc la quantité de coenzymes produits. Certains acteurs majeurs sont connus pour réguler le métabolisme lipidique, et modulant plus particulièrement l'entrée des AG dans la mitochondrie permis par CPT1 (cf. cycle de Randle plus bas). En effet, CPT1 serait modulé par le malonyl-CoA formé à partir d'un acétyl-CoA carboxylé par l'enzyme ACC (acetyl-CoA carboxylase) (Zammit, 1999). De plus, il a été montré que l'AMPK, principal chef d'orchestre de la régulation de la balance énergétique, diminuerait et inactiverait par conséquent l'action d'inhibition qu'a le malonyl-CoA sur CPT1 (Carling et al., 1987; Saha et al., 2000). Ainsi, l'AMPK favoriserait la β-oxydation des AG dans le muscle et le foie notamment (Merrill et al., 1997; Park et al., 2002; Velasco et al., 1997). Par ailleurs, plusieurs travaux ont révélé une modulation par les récepteurs nucléaires PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) sur l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la voie lipidique (Evans et al., 2004). Par exemple, l'activation de PPARα et de PPARβ/δ (tous deux majoritaires dans le muscle squelettique) induit l'oxydation des AG tandis que PPARγ favorise la synthèse et leur stockage (Reddy and Hashimoto, 2001; Tanaka et al., 2003b; Vega et al., 2000).

2.3 Le chaine respiratoire et la phosphorylation oxydative

Les différents produits formés (NADH et $FADH_2$) lors du cycle de Krebs issus de la dégradation des substrats de types glucides ou lipides, vont être utilisés ultérieurement par la chaîne respiratoire de la mitochondrie pour produire de l'énergie. La chaîne respiratoire est composée de cinq complexes protéiques transmembranaires : une ATP synthase et quatre complexes mitochondriaux (C-I à C-IV). Ces complexes vont réaliser des réactions d'oxydoréduction permettant le transport d'électrons générant un gradient de protons et assurer ainsi la synthèse d'ATP : c'est la phosphorylation oxydative. En plus de ces éléments fixes s'ajoutent des éléments mobiles qui les relient entre eux. L'ubiquinone (ou coenzyme Q) relie le C-I au C-III et le C-II au C-III. Le cytochrome C quant à lui, fait la jonction entre

le C-III et le C-IV. Pour entrer dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, les produits réduits NADH et $FADH_2$ formés subiront différentes réactions biochimiques (figure 9).

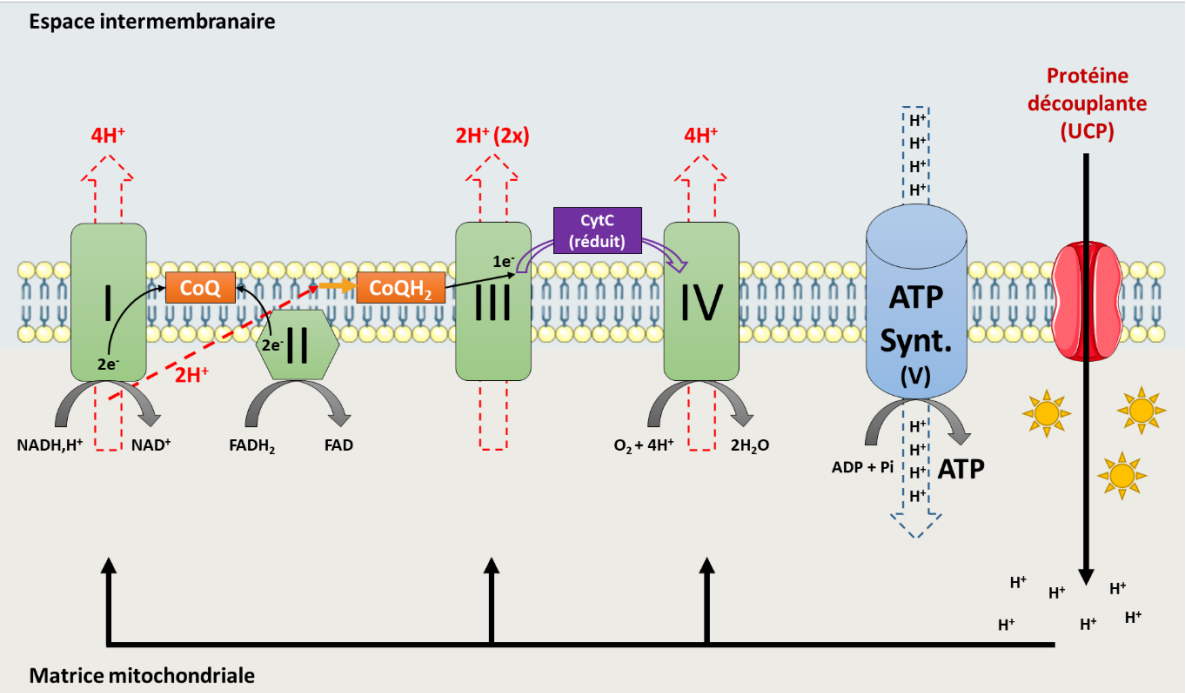


Figure 9 : Couplage de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative.
Lors du cycle de Krebs, du NADH et $FADH_2$ sont formés et seront oxydés dans la chaine respiratoire. L'oxydation du NADH,H+ fait sortir 4 protons (4H+), libère 2 électrons (2e-) qui traverseront le complexe I et récupéré par le coenzyme Q. Celui-ci sera réduit en $CoQH_2$ par 2H+ pour transporter les électrons au complexe III et y sera réduit pour les transférer en libérant des protons. Les électrons libérés sont pris en charge par le cytochrome C oxydé et seront transmis complexe IV une fois que le cytochrome C est réduit. Le complexe IV transmet ensuite les électrons à l'oxygène pour produire 2 molécules d'H_2O, en diffusant 4H+ dans l'espace intermembranaire. Le $FADH_2$ sera oxydé en FAD libérant 2e- qui sont transférés au CoQ qui est réduit en $CoQH_2$ et transmis au complexe III. Les protons générés lors de ces échanges sont recyclés dans la matrice grâce à l'ATP synthase pour former de l'ATP ou diffuser au travers de protéines découplantes (UCP) produisant de la chaleur.

En effet, le NADH est oxydé en NAD^+ dans ce premier complexe où deux électrons sont arrachés au NADH et vont traverser le C-I pour être transmis au coenzyme Q (CoQ). Le CoQ est l'accepteur final d'électrons du C-I qui assurera le transfert de ces électrons vers le C-III. Pour cela, le CoQ est réduit en $CoQH_2$ grâce à deux protons issus de la matrice mitochondriale, ce qui lui permettra d'assurer le transport des électrons jusqu'au C-III. Le relais des deux électrons apportés par le $CoQH_2$ au C-III n'est possible qu'après l'oxydation du $CoQH_2$ en CoQ. De cette réduction, sont libérés deux protons dans l'espace intermembranaire. Les électrons libérés sont recueillis par la forme oxydée du cytochrome C (accepteur final d'électrons du C-III) qui est située du côté de l'espace intermembranaire mitochondrial. Une fois réduit, le cytochrome C diffusera dans l'espace intermembranaire et rejoindra le C-IV. Enfin, le complexe IV transfère les électrons qu'il vient de recevoir à la molécule d'O_2 présente dans la matrice mitochondriale. Parallèlement, deux protons sont expulsés dans l'espace

intermembranaire et deux autres permettent de libérer deux molécules d'eau. L'ensemble de ces échanges génère un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane interne et constitue un réservoir d'énergie pour la cellule via la pompe ATP synthase (complexe V). Quant au $FADH_2$, produit qui est issu de la transformation du succinate en fumarate par la succinate déshydrogénase dans le cycle de Krebs (non représenté ici), sera oxydé en FAD par le complexe II. Une fois le $FADH_2$ formé, celui-ci reste lié au C-II puisque la succinate déshydrogénase est l'unique enzyme membranaire du cycle de Krebs. L'oxydation du $FADH_2$ en FAD génère deux électrons qui sont transférés au CoQ qui sera réduit en $CoQH_2$ où ils seront transmis au C-III. L'imperméabilité de la membrane interne vis-à-vis des protons et le gradient électrochimique de protons formé au cours de ces précédentes transformations nécessitent un mécanisme de retour pour ces protons. Ce retour est possible grâce à l'ATP synthase qui permet le passage des protons via ce canal et sert d'énergie pour la phosphorylation de l'ADP en ATP (Lemarie and Grimm, 2011). Parfois, la chaîne respiratoire est découplée conduisant à une thermogénèse (production et libération de chaleur) à défaut de produire de l'énergie. Ce phénomène s'explique par la présence de protéines découplantes UCP (UnCoupling Protein) localisées dans la membrane interne mitochondriale. UCP1 est la première protéine découplante identifiée (Ricquier and Kader, 1976) qui permet aux protons de revenir dans la matrice mitochondriale (Brand et al., 1994; Rolfe et al., 1994). Le recyclage protonique dans la matrice servira ainsi à exacerber la chaîne respiratoire (Bertholet et al., 2017; Fedorenko et al., 2012). D'autres UCPs sont découvertes, c'est le cas de UCP2 qui est ubiquitaire (Gimeno et al., 1997) et UCP3 qui est surtout exprimée dans le muscle squelettique (Boss et al., 1997).

3. Cycle de Randle : le régulateur énergétique à l'échelle de l'organisme.

Que ce soit en condition de période post-prandiale ou de jeûne, une coopération tissulaire s'impose afin d'adapter au mieux les besoins énergétiques des différents organes du corps. Lors d'une période post-prandiale, la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas fait suite à l'augmentation de la glycémie (taux de glucose circulant). Par son action hypoglycémiante, l'insuline entraine l'absorption du glucose circulant dans différents tissus exprimant les transporteurs associés au glucose (GLUT) (Prentki, 1996). Le foie est la plus grosse réserve énergétique puisqu'il récupère un tiers du glucose alimentaire et le stocke sous forme de glycogène grâce à la glucokinase. À tout moment le foie peut produire de l'énergie en utilisant ce glycogène. De cette manière, plusieurs devenirs du glucose sont envisageables sous l'action de l'insuline : (1) le stockage sous forme de glycogène dans le foie et le muscle (glycogénogenèse), (2) être transformé en AG via l'acétyl-CoA (lipogenèse de *novo*) puis (3) en TG (estérification des AG) dans le foie et le tissu adipeux ou (4) être utilisé pour produire de l'énergie (ATP) (glycolyse aérobie) (**figure 10**).

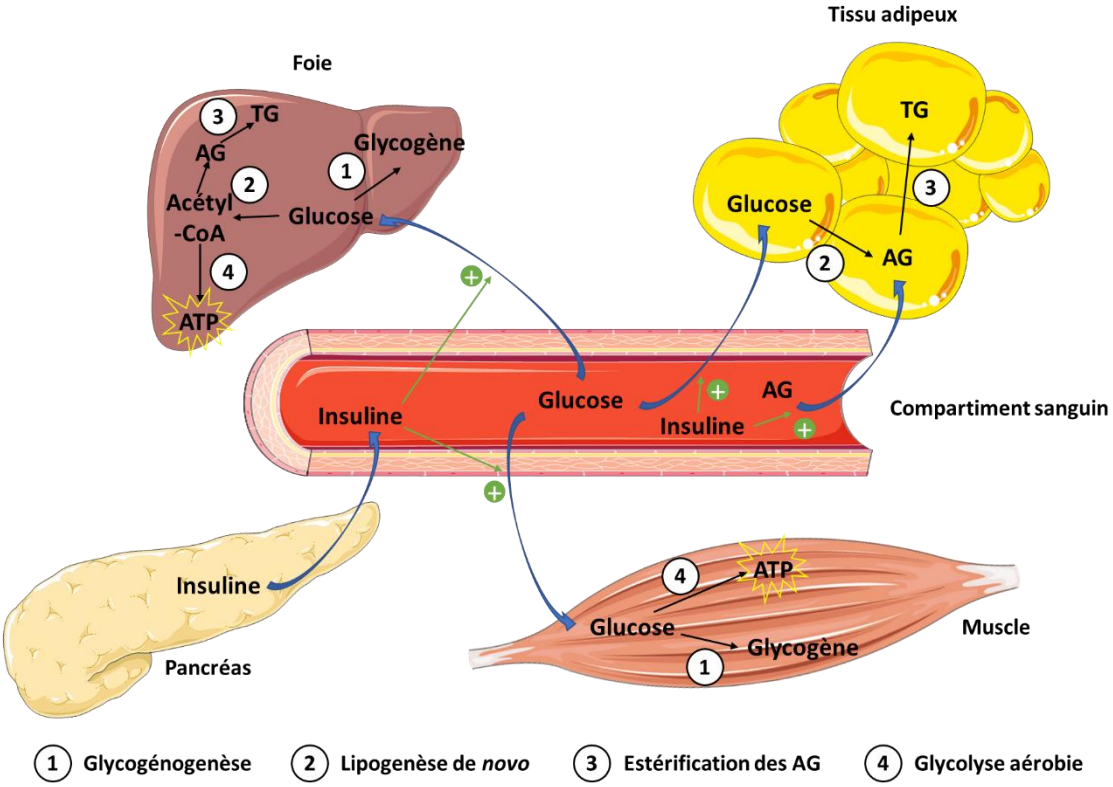


Figure 10 : Mobilisation des substrats énergétiques en période post-prandiale.
Après un repas, la digestion des aliments augmente le taux de glucose dans le compartiment sanguin. En réponse à cette hyperglycémie, les cellules β du pancréas sécrètent et libèrent dans le sang de l'insuline. Cette hormone va ensuite stimuler l'entrée du glucose circulant dans le foie, le tissu adipeux et le muscle. Une fois absorbé, le glucose peut être soit (1) stocké sous forme de glycogène (glycogénogenèse), soit (2) donner des AG (lipogenèse de novo) qui seront (3) stockés sous forme de TG (estérification des AG) ou encore être directement glycolysé pour produire de l'ATP (4). L'insuline facilite également la recapture des AG dans le tissu adipeux. Inspirée de (Evans et al., 2004)

En période de jeûne, ce sont les cellules α des îlots de Langerhans qui entrent en action puisqu'elles vont répondre à l'hypoglycémie en sécrétant du glucagon, un peptide ciblant le foie. Ce dernier assure l'homéostasie glycémique systémique mais également l'approvisionnement du tissu nerveux en glucose, seul tissu possédant un métabolisme glucose-dépendant. Pour cela, le foie peut adopter diverses stratégies sous l'influence du glucagon : (1) il utilise ses stocks de glycogène et libère du glucose (glycogénolyse), (2) synthétise du glucose à partir d'autres composés (néoglucogenèse) comme (3) le lactate (glycolyse anaérobie) issu des muscles et (4) du glycérol issu de la lipolyse adipocytaire. La lipolyse produit également des AG qui seront oxydés lors de la β-oxydation dans le foie et les muscles pour (5) produire de l'énergie sous forme d'ATP (figure 11). Ainsi, optimiser l'utilisation d'AG permet de réduire l'entrée du glucose dans les tissus et donc de favoriser l'apport de glucose dans le cerveau en condition de jeûne. En d'autres termes, l'utilisation d'AG au détriment du glucose dans une condition donnée et vice versa, caractérise le cycle de Randle.

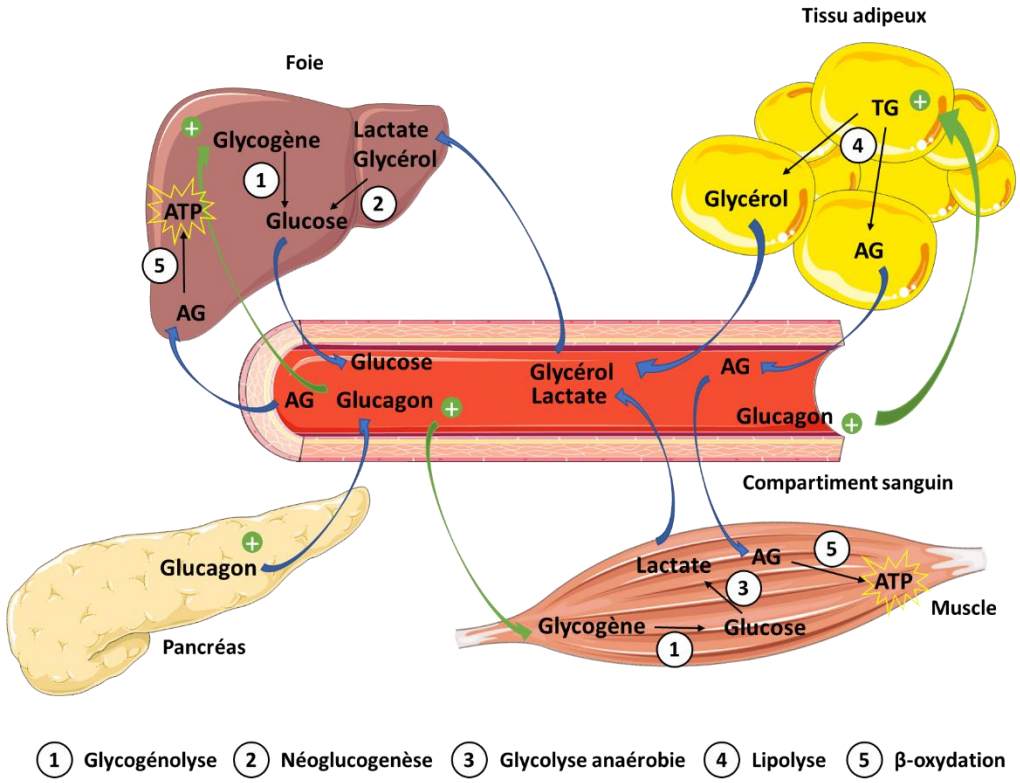


Figure 11 : Mobilisation des substrats énergétiques en période de jeûne.
Lors d'un jeûne, le taux de glucose dans le sang est faible. En réponse à cette hypoglycémie, les cellules α du pancréas sécrètent et libèrent dans le sang du glucagon. Cette hormone va ensuite stimuler la production du glucose via la glycogénolyse (1) dans le foie et le muscle mais aussi la néoglucogenèse (2) dans le foie. Pour réaliser la néoglucogenèse, (3) le lactate formé dans le muscle et (4) le glycérol dans le tissu adipeux seront libérés dans la circulation sanguine et rejoindront le foie. Les AG circulants issus du tissu adipeux seront utilisés par le foie et le muscle pour produire de l'ATP (5).

En effet, la première hypothèse était de dire que les AG pouvaient inhiber l'activation de la voie glycolytique, usuellement stimulée par l'insuline. En 1963, l'équipe de Randle montre une augmentation des taux intracellulaires de glucose et G6P après une incubation d'un cœur de rat avec des AG. Dans ces conditions, cela provoque l'augmentation du rapport acétyl-CoA/CoA et NADH/NAD^+ traduisant d'une utilisation des AG ajoutés et conduit à une inhibition de la PDH. De plus, l'élévation des niveaux de citrate entraine l'inhibition de la PFK augmentant la concentration intracellulaire en G6P qui inhibe à son tour l'hexokinase (**figure 12**). De cette manière, l'accumulation de glucose dans la cellule est constatée révélant un défaut du métabolisme lipidique (Randle, 1998; Randle et al., 1963). Réciproquement, Mac Garry et ses collègues démontrent quant à eux l'effet inverse. En effet, en présence de fortes concentrations de glucose l'oxydation des lipides est diminuée. Lorsque la glycémie est élevée, l'insuline stimule la réabsorption du glucose dans le foie notamment, où il sera oxydé pour donner du pyruvate. Celui-ci est transformé en acétyl-CoA qui rentre dans le cycle de Krebs pour donner du citrate. Ce citrate sera changé en acétyl-CoA puis en malonyl-CoA, connu pour inhiber CPT1 et donc empêcher l'entrée des AG dans la mitochondrie (Hue and Taegtmeyer, 2009; McGarry et al.,

1977) (figure 12). L'ensemble de ces travaux soulignent l'intérêt majeur du cycle de Randle dans la gestion des substrats énergétiques en fonction du statut nutritionnel. Cette capacité d'adaptation est résumée sous l'appellation : flexibilité métabolique (Kelley et al., 1999).

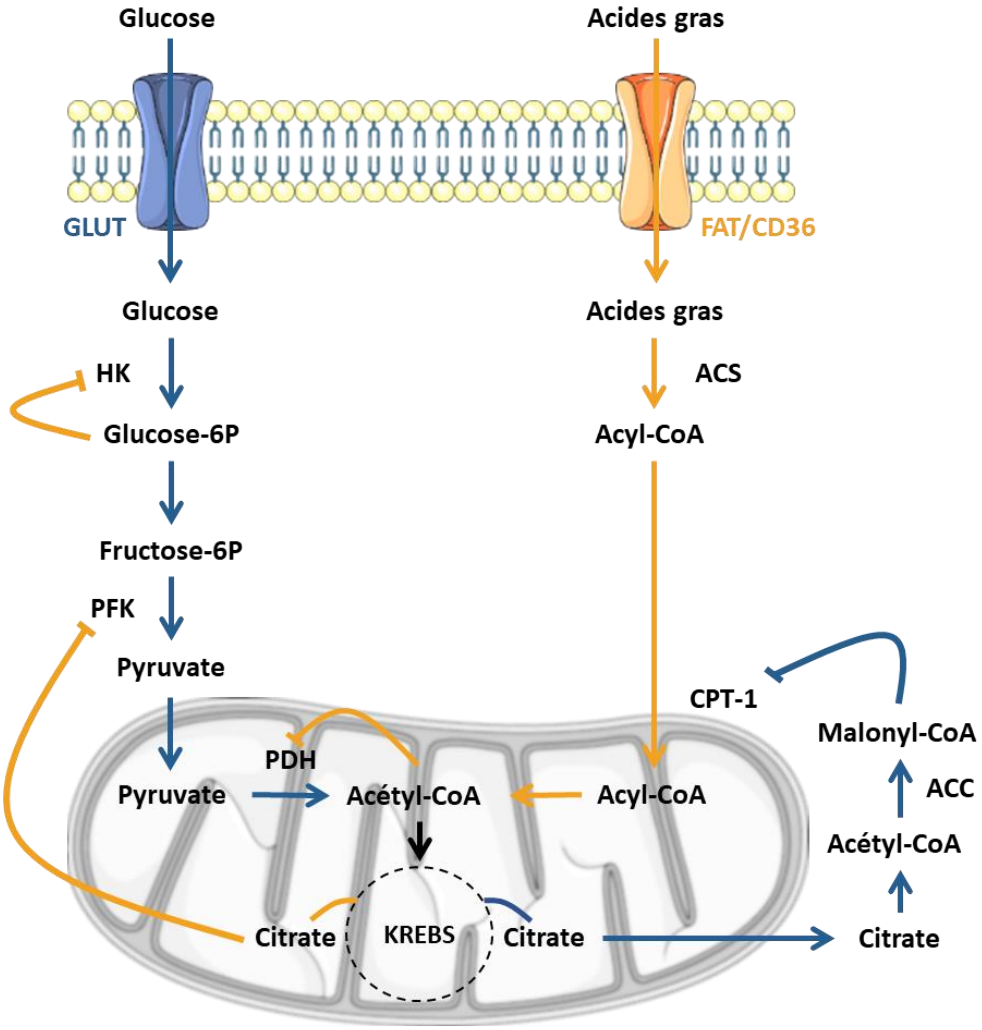


Figure 12 : Le cycle de Randle, régulateur du métabolisme énergétique.
A gauche du schéma, un flux important de glucose (bleu) dans la cellule favorise la voie glycolytique et conduit à la production de pyruvate et d'acétyl-CoA dans la mitochondrie. Soumis au cycle de Krebs, du citrate est formé et pourra ressortir de la mitochondrie pour se convertir à nouveau en acétyl-CoA puis en malonyl-CoA via l'acétyl-CoA Carboxylase (ACC). Le malonyl-CoA inhibe alors l'entrée des AG dans la mitochondrie en ciblant les transporteurs CPT1 bloquant ainsi leur entrée et donc limiter leur oxydation.
A droite du schéma, l'entrée massive d'AG (orange) dans la cellule provoque une stimulation de leur oxydation produisant de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA inhibe la pyruvate déshydrogénase (PDH) et donc une surproduction d'acétyl-CoA provenant de pyruvate. Le citrate synthétisé dans le cycle de Krebs sort de la mitochondrie et inhibe la phosphofructokinase (PFK), une enzyme de la glycolyse. Cela provoque l'accumulation de G6P qui à son tour inhibe l'hexokinase (HK) limitant plus fortement la voie glycolytique. Figure adaptée de (Hue and Taegtmeyer, 2009).

B. Altérations du métabolisme énergétique dans la SLA

1. Hypermétabolisme systémique

Classiquement présentée comme une maladie stricte des neurones moteurs corticaux et des motoneurones bulbaires et spinaux, les altérations musculaires observées dans la SLA sont souvent considérées comme le reflet de la perte de ces neurones. Cependant, de très nombreux travaux remettent en cause ce dogme, notamment sur les différentes pistes concernant l'origine de la pathologie comme la toxicité au glutamate, les agrégats protéiques, l'astrocytose ou encore le stress oxydant (Musarò, 2013; Rossi et al., 2016). Une nouvelle composante majeure est à prendre en considération : le métabolisme énergétique. L'un des symptômes majeurs de la SLA est la perte de poids qui est souvent étudié à travers l'indice de masse corporelle (IMC). Au fur et à mesure que la SLA progresse, une réduction de l'IMC et de la graisse corporelle sont notifiées chez les patients atteints de SLA (Kasarskis et al., 1996). Ces observations s'associent aux travaux de Reyes en 1984, qui mettent déjà en évidence un problème d'ordre métabolique avec une résistance à l'insuline précoce (Reyes et al., 1984) s'expliquant par une intolérance au glucose (Pradat et al., 2010). En 2001, Desport et ses collaborateurs identifient une augmentation anormale de la dépense énergétique au repos chez les patients atteints de SLA, c'est l'hypermétabolisme, qui est confirmé par la suite dans une étude plus conséquente dans 2/3 des patients SLA (Desport et al., 2001, 2005). Les données de la littérature rapportent que l'hypermétabolisme concerne 2/3 des patients SLA, est précoce et présent durant toute la pathologie (Bouteloup et al., 2009; Funalot et al., 2009; Peter et al., 2017). Récemment, il a été également été montré que la perte de poids (Moglia et al., 2019), l'hypermétabolisme ainsi qu'une dyslipidémie sont des facteurs de risques majeurs de la maladie chez les patients et sont associés à la sévérité de la SLA (Bouteloup et al., 2009; Dupuis et al., 2008; Jésus et al., 2018; Ngo et al., 2015; Steyn et al., 2018). Enfin, une nouvelle fois l'hypermétabolisme est confirmé chez plus de 50% des 287 patients SLA inclus dans une étude (Fayemendy et al., 2021) et soutient que ce profil métabolique anormal est une réalité à prendre en compte dans la SLA. Ce phénomène est associé à une malnutrition due à la dysphagie notamment, entrainant donc une perte de poids progressive et une aggravation de la maladie (Desport et al., 1999; Marin et al., 2011). L'IMC est donc un facteur de pronostic important dans la SLA. Aujourd'hui, il est admis qu'un IMC faible associé à une malnutrition est un facteur aggravant de la survie (Dardiotis et al., 2018; Desport et al., 1999; Jawaid et al., 2010; O'Reilly et al., 2013; Paganoni et al., 2011). A l'inverse, un IMC élevé (<30) serait associé à un faible risque de développer la SLA (Armon and Traynor, 2019; Nakken et al., 2019; Pape and Grose, 2020). A noter tout de même, qu'un IMC supérieur à 30 traduit une obésité sévère qui est également un facteur de risque (Reich-Slotky et al., 2013). Ainsi, toutes ces altérations métaboliques systémiques impactent négativement la progression de la pathologie.

2. Hypermétabolisme cérébrale

2.1 Couplage métabolique astrocyte-motoneurone

Au cours des dernières décennies, plusieurs équipes se sont intéressées au métabolisme énergétique cérébral impliquant les astrocytes et les neurones. Le fonctionnement neuronal est en grande partie dû aux astrocytes qui assurent un grand nombre de processus comme : la signalisation neuronale, la recapture de neurotransmetteurs mais surtout dans l'apport et la régulation des besoins énergétiques des neurones (Kreft et al., 2012; Pellerin and Magistretti, 2004; Petit and Magistretti, 2016). Ainsi, une altération d'un de ces mécanismes clefs prouve la contribution majeure des astrocytes dans les maladies neurodégénératives, et notamment dans la SLA (Allaman et al., 2011). Le tissu nerveux est un organe dépendant du glucose comme source d'énergie. Celui-ci est transporté dans le sang et est capturé par les neurones et les astrocytes grâce aux transporteurs GLUT3 et GLUT1 respectivement où il sera métabolisé via la glycolyse et le cycle de Krebs (Maher et al., 1994). En 2001, une étude révélait que la majorité de la consommation énergétique en glucose était associée aux neurones (~90-95%) contre ~5-10% pour les astrocytes (Attwell and Laughlin, 2001). Cependant, une équipe strasbourgeoise montre que l'assimilation du 2-déoxyglucose (2DG), un analogue radioactif du glucose, est identique entre les neurones et les astrocytes (Wittendorp-Rechenmann et al., 2002). Un an plus tard, il est montré que la consommation du glucose est associée à 80% aux cellules gliales (Véga et al., 2003). De plus, les astrocytes transforment le glucose circulant en lactate qui pourra être transféré aux neurones et être oxydé pour produire de l'énergie (Kreft et al., 2012; Pellerin and Magistretti, 2004; Pellerin et al., 1998; Poitry-Yamate et al., 1995; Tsacopoulos et al., 1988). Il est maintenant connu que la recapture du glutamate dans l'astrocyte par les transporteur EEATs active la pompe NA^+/K^+-ATPase et stimule la consommation de glucose et la production de lactate qui est ensuite transporté dans le neurone via les transporteurs MCTs (Pellerin and Magistretti, 1994) (**figure 13**). En effet, l'inactivation par oligonucléotides antisens de transporteurs GLAST (EEAT) provoque une diminution de la consommation de glucose dans le cortex somatosensoriel de rats (Cholet et al., 2001). Cette augmentation de consommation de glucose a également été observée chez des souris KO pour le récepteur au glutamate GLT1 (Voutsinos-Porche, 2003). De plus, le glutamate déclencherait le transport rapide du glucose dans les astrocytes (Loaiza et al., 2003) et celui-ci peut servir de précurseur au glutamate (Hertz and Dienel, 2002). Plusieurs études ont démontré l'implication des astrocytes dans la dégénérescence des motoneurones et la propagation de la SLA (cf. partie D : « pathogénicité pluricellulaires »). En effet, les mutations SOD1 dans les astrocytes sont toxiques pour la viabilité des motoneurones (Nagai et al., 2007) mais la complexité des interactions astrocytes-motoneurones rend difficile la compréhension de ces processus pathologiques (Ferraiuolo et al., 2011). Plusieurs études ont révélé une réduction du transporteur du glutamate GLAST, de la pompe NA^+/K^+-ATPase ainsi

qu'une réduction du transporteur du lactate MCT dans les astrocytes de souris *SOD1*^{G93A} présymptomatiques. De plus, une diminution de l'expression de MCT est notée dans les astrocytes de patients SLA et de plus de 50% dans leur cortex moteur (Ferraiuolo et al., 2011; Lee et al., 2012). Toutes ces études soulignent l'importance du couplage métabolique astrocyte-neurone dans la SLA.

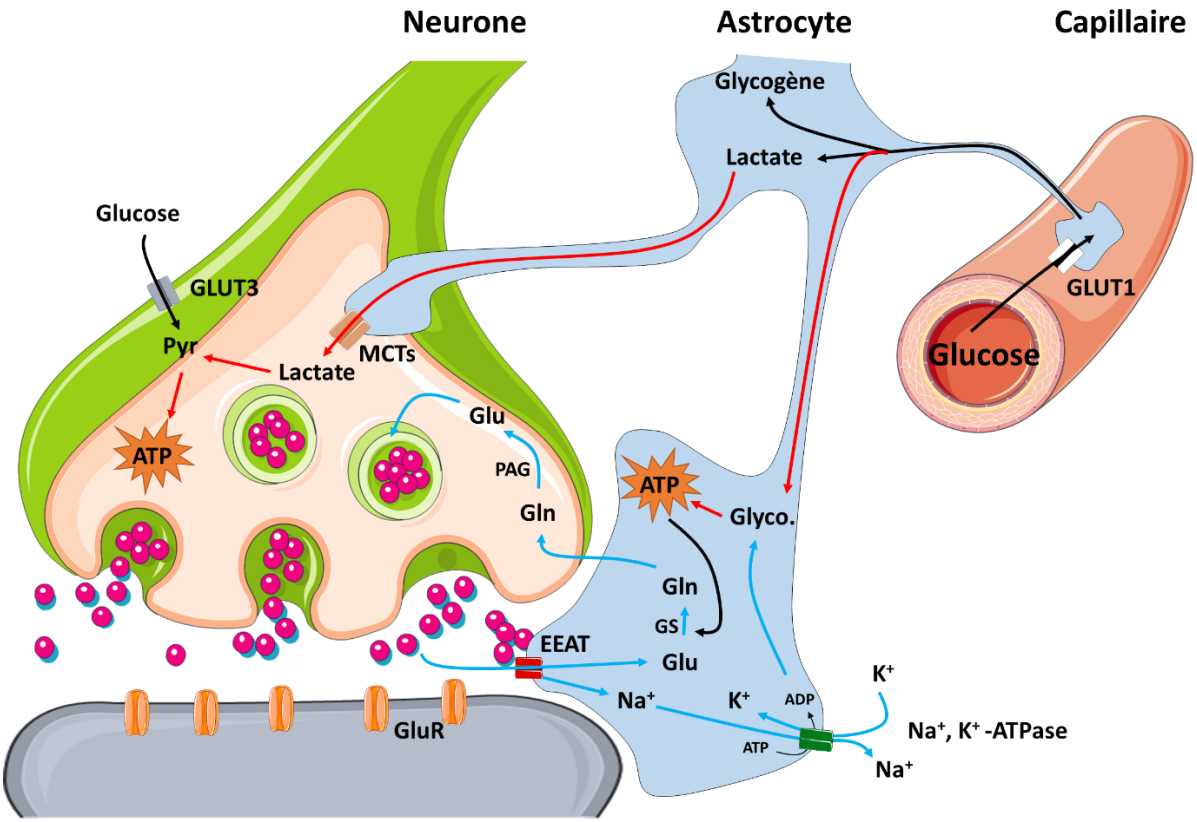


Figure 13 : Représentation schématique du couplage métabolique astrocyte-neurone.
Le tissu nerveux est un organe dépendant de sa seule source d'énergie, le glucose. Le glucose circulant est absorbé par les astrocytes et les neurones par l'intermédiaire des transporteurs GLUT 1 et 3 respectivement. Une fois dans l'astrocyte, le glucose est soit stocké sous forme de glycogène soit entrer dans la glycolyse pour produire de l'ATP ou encore être convertit en lactate par l'enzyme LDH (Lactate déshydrogénase) à l'issue de la glycolyse. Le lactate est acheminé dans le neurone à l'aide des transporteurs MCTs (monocarboxylase receptors) pour y être transformé en pyruvate (Pyr) servant à la synthèse d'énergie sous forme d'ATP (voie en rouge). A la suite d'un potentiel d'action, le glutamate est libéré dans la fente synaptique, se fixe à ses récepteurs ionotropiques GluR produisant la dépolarisation de l'élément postsynaptique. Le glutamate de la fente synaptique est largement recyclé par les transporteurs EAATs (excitatory amino acid transporters) de l'astrocyte entrainant un échange d'ions Na^+ et K^+. Le Na+ sortira ensuite par la pompe Na^+/K^+-ATPase formant de l'ADP qui stimulera la glycolyse et la production d'ATP mais également l'absorption de glucose circulant. Ces deux voies constituent la navette lactate astrocyte-neurone. L'ATP formée provoquera la conversion du glutamate (Glu) en glutamine (Gln) par la glutamine synthase (GS). La Glu formée retournera dans le neurone pour y être transformée en Glu par l'enzyme PAG (phosphate activated glutaminase) et être re-vésiculé : c'est le cycle glutamate-glutamine (voie bleue). (Inspirée de (Petit and Magistretti, 2016)

2.2 Altération centrale du métabolisme énergétique dans la SLA

De nombreux travaux ont révélé l'existence de modifications de l'assimilation et de l'utilisation du glucose dans différentes régions cérébrales et de la moelle épinière aussi bien dans des modèles animaux que chez des patients atteints de SLA (Tefera et al., 2021). Pour quantifier l'utilisation du glucose dans le SNC, la tomographie par émission de positons (TEP) est classiquement utilisée. Cette technique est basée sur l'utilisation d'un analogue radioactif du glucose 18-fluoro-2-désoxyglucose (FDG) qui est absorbé par les cellules via les transporteurs GLUT et sera phosphorylé en FDG-6-phosphate (FDG-6P) par l'hexokinase. Cependant, cet analogue n'est pas une source d'énergie utilisable pour la cellule et ne pourra être oxydé dans les voies biochimiques. Il faut tout de même noter que l'interprétation des études d'imagerie avec la TEP associée à de l'autoradiographie repose uniquement sur les modifications de transport du glucose entre le sang et le tissu nerveux ou sur la première étape de la glycolyse via l'hexokinase. Ainsi, une faible utilisation de l'analogue ne peut pas renseigner sur un hypométabolisme (diminution de l'utilisation de glucose) puisque l'analogue du glucose n'est pas reconnu par la machinerie métabolique (Huang and Veech, 1985; Rodrigues et al., 2013). De nombreuses études d'imagerie ont révélé d'une part, un hypométabolisme du glucose dans plusieurs régions du cortex moteur de patients SLA (Cistaro et al., 2014; Dalakas et al., 1987; Endo et al., 2017; Hatazawa et al., 1988; Ludolph et al., 1992; Matías-Guiu et al., 2016) ; et d'autre part, un hypermétabolisme est constaté dans d'autres régions cérébrales (Canosa et al., 2016; Cistaro et al., 2012, 2014; Matías-Guiu et al., 2016; Pagani et al., 2014) mais aussi dans la moelle épinière de patients SLA (Marini et al., 2018; Yamashita et al., 2017) s'expliquant par l'activation locale d'astrocytes notamment (Cistaro et al., 2012; Marini et al., 2018; Pagani et al., 2014). L'identification des ces événements pathologiques dans la SLA a conduit à étudier leur impact sur l'évolution de la pathologie. En effet, plusieurs études ont montré que le développement progressif de l'hypo- et de l'hypermétabolisme dans le SNC est associé à l'évolution de la SLA chez les patients (Dalakas et al., 1987; Endo et al., 2017; Rajagopalan and Pioro, 2019; Van Laere et al., 2014; Van Weehaeghe et al., 2016) avec une diminution du score ALSFRS et de la survie des patients avec un hypométabolisme cérébral (Van Laere et al., 2014; Van Weehaeghe et al., 2016). Avant même l'apparition des symptômes moteurs, un hypo- et un hypermétabolisme ont également été identifiés dans le cortex moteur et la moelle épinière de souris *SOD1*^{G93A} (Browne et al., 2006; Miyazaki et al., 2012) et de souris *TDP43* (Weerasekera et al., 2020). L'altération du métabolisme du glucose retrouvée à la fois chez l'Homme et dans les modèles animaux SLA en fait un signe caractéristique persistant de la pathologie. Il est cependant impossible d'expliquer pourquoi une région cérébrale est plus atteinte d'hypométabolisme que d'hypermétabolisme et réciproquement. Toutefois, une réduction du débit sanguin cérébral et / ou des anomalies du transport du glucose ou encore une densité neuronale réduite peuvent participer à ces altérations métaboliques (Canosa et al., 2016; Cistaro et al., 2012; Garbuzova-Davis et al., 2007;

Miyazaki et al., 2012; Tanaka et al., 2003a; Waldemar et al., 1992). Bien que les mécanismes qui sous-tendent l'hypo- et l'hypermétabolisme soient toujours incompris, l'ensemble de ces études souligne l'importance de ces altérations dans le SNC et encourage à investiguer d'autres tissus énergivores comme le muscle squelettique, particulièrement touché par la SLA.

3. Contribution du muscle strié squelettique

Le système musculaire est divisé en deux types de muscles : les muscles lisses et les muscles striés. Ces derniers sont subdivisés 3 catégories en fonction de leur caractère contractile : le muscle strié cardiaque à contraction involontaire, le muscle strié à insertion conjonctive (ex : sphincter) à contraction involontaire et volontaire (mixte) et le muscle strié squelettique à contraction volontaire. Cette partie sera consacrée uniquement au muscle strié squelettique puisqu'il est le seul à être touché dans la SLA.

3.1 Structure et diversité des fibres musculaires

Le muscle strié squelettique est constitué de plusieurs faisceaux de fibres musculaires enveloppés par un tissu conjonctif fibreux : l'aponévrose. Il assure un rôle de protection, de structure et sert de point d'attache aux os (aponévrose d'insertion). En continuité avec la formation tendineuse du muscle, l'épimysium englobe plusieurs faisceaux de fibres musculaires. On y retrouve le tissu conjonctif, les vaisseaux et les nerfs. Ensuite, le périmysium entoure chaque faisceau musculaire qui contient plusieurs fibres musculaire séparées elles-mêmes par l'endomysium (**figure 14**).

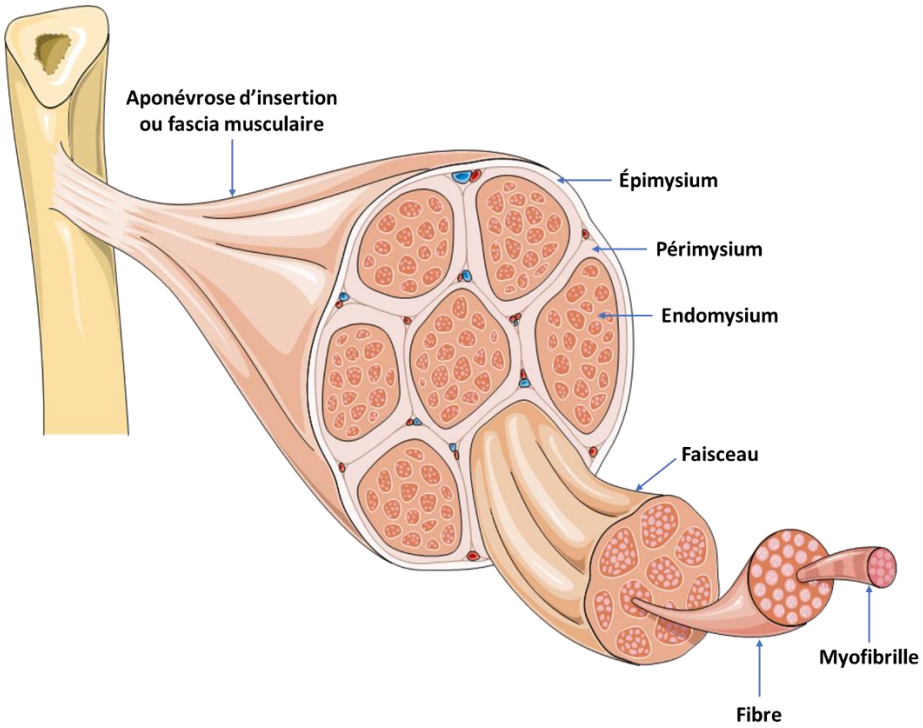
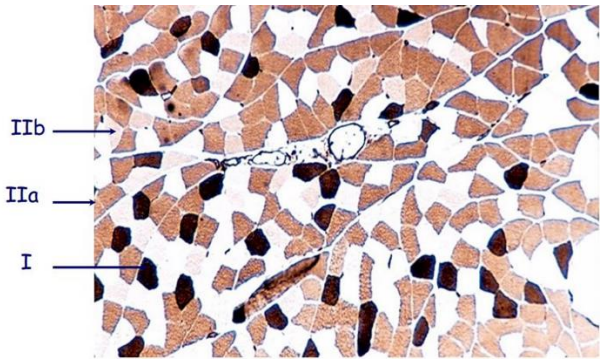


Figure 14 : Représentation structurale du muscle strié squelettique.
L'aponévrose d'insertion ou fascia musculaire enveloppe l'intégralité du muscle strié squelettique. Le muscle strié squelettique est composé de plusieurs faisceaux de fibres musculaires entourés par différentes enveloppes de tissus conjonctifs : l'épimysium, le périmysium et l'endomysium. L'épimysium ou aponévrose d'enveloppe contient plusieurs faisceaux de fibres musculaires, les vaisseaux sanguins et les nerfs. Chaque faisceau musculaire contient entre 10 et 100 fibres musculaires et est délimité par le périmysium. A l'intérieur du faisceau musculaire, chaque fibre musculaire ou myocyte est séparée par l'endomysium. On y retrouve des capillaires et des nerfs. L'endomysium est apposé sur le sarcolemme.

Cette organisation structurale est commune à tous les muscles striés squelettiques mais la composition en fibres musculaires est différente. En effet, il existe les fibres musculaires rouges (fibres I) et blanches (fibres II) qui sont classées selon leurs caractéristiques physiologiques (**figure 15**):

- Les fibres de type I ou fibre à vitesse de contraction lente (Slow twitch ou ST) sont oxydatives, de petit diamètre, un important volume mitochondrial qui fait qu'elles sont peu fatigables et sont sollicitées lors d'exercice peu intense (faible force de contraction) mais soutenu dans le temps. La teneur élevée en myoglobine donne un aspect rouge à la fibre I ou ST.
- Les fibres de types II (Fast twitch ou FT) :
    - Les types IIa ou à vitesse de contraction intermédiaire sont dites « mixtes ou intermédiaires » car elles sont oxydatives et glycolytiques. Riche en myoglobine et un volume mitochondrial diminué. Leur résistance à la fatigue est diminuée mais leur force et vitesse de contraction augmentées.
    - Les types IIb ou à contraction rapide, sont glycolytiques, de gros diamètre, avec un faible volume mitochondrial, pauvre en myoglobine (aspect blanchâtre), une faible

résistance à la fatigue mais une force et vitesse de contraction très élevées. Ces fibres sont utilisées lors d'exercices courts, intenses et puissants.



Caractéristiques structurales	**Type I**	**Types IIa**	**Type IIb**
Couleur	Rouge	Rose	Blanc
Taille et diamètre	Petit	Moyen	Gros
Volume mitochondrial	+++	++	+
Enzymes oxydatives	+++	++	+
Enzymes glycolytiques	+	++	+++
Myoglobine	+++	++	+
Caractéristiques fonctionnelles	**Type I**	**Types IIa**	**Type IIb**
Métabolisme	Oxydatif	Mixte	Glycolytique
Résistance à la fatigue	+++	++	+
Force de contraction	+	++	+++
Vitesse de contraction	+	++	+++

Figure 15 : Illustration représentative des trois types de fibres musculaires et tableau récapitulant leurs principales caractéristiques structurales et fonctionnelles.

La classification de ces fibres musculaires a été possible grâce aux progrès histochimiques. En effet, les fibres musculaires ont des profils enzymatiques différents associés à des statuts métaboliques différents (oxydatif vs glycolytique). Les fibres rouges (fibres I) sont identifiables grâce aux nombreuses enzymes oxydatives qu'elles contiennent telles que la succinate déshydrogénase (SDH) ou et la cyclooxygénase (COX). Quant aux fibres blanches à contraction rapide, celles-ci dépendent de la forte production d'ATP et donc d'ATPases (enzyme responsable de la synthèse d'ATP) (Bottinelli et al., 1994; Burke et al., 1971; Edstrom and Kugelberg, 1968). Cette caractérisation est bien connue et largement acceptée. Elle a permis également de mettre en évidence que les fibres oxydatives (SDH positives) plus

petites, ont un volume mitochondrial bien plus important que les fibres glycolytiques (SDH négatives) qui sont plus grosses (Schiaffino et al., 1970). Il est tout de même important de noter que la cartographie musculaire n'est pas exclusive à un type de fibre en particulier mais repose plus sur une prédominance de type de fibres (figure 16).

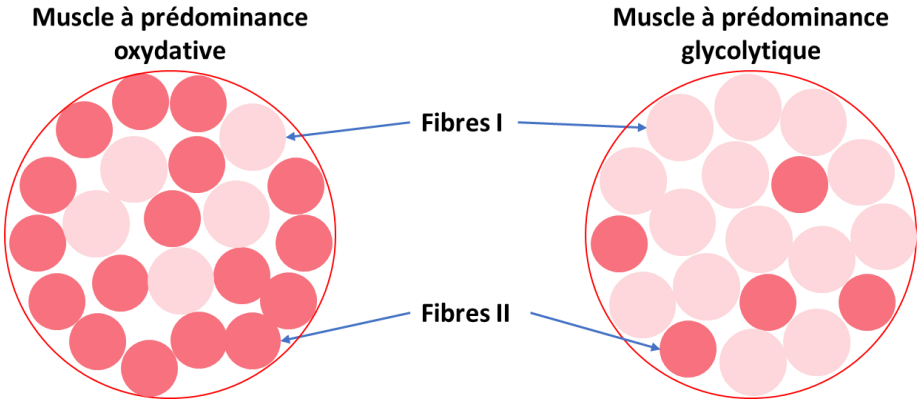


Figure 16 : Représentation schématique de la proportion du types de fibres musculaires retrouvée dans les muscles à prédominance oxydative et glycolytique.

Le diamètre et la vitesse de conduction nerveuse sont aussi différents en fonction de la fibre musculaire. Chaque motoneurone (MN) innerve plusieurs fibres musculaires mais une fibre musculaire n'est contactée que par un seul MN. C'est la zone de contact entre les terminaisons du MN et la fibre musculaire qui constitue l'unité motrice (UM) ou la jonction neuromusculaire (JNM). Enfin, les cellules de Schwann complètent la JNM (Castonguay et al., 2001). Les MN qui innervent les fibres de type I ont un petit diamètre et une vitesse de conduction lente alors que les MN qui contactent les fibres de type II ont un diamètre plus gros et une vitesse de conduction plus élevée (figure 17) (Schiaffino and Reggiani, 2011).

Caractéristiques d'innervation/UM	Type I	Types IIa	Type IIb
Taille de l'UM	+	++	+++
Diamètre du MN	+	++	+++
Vitesse de conduction	Lente	Rapide	Très rapide
Seuil de recrutement	Bas	Elevé	Elevé

Figure 17 : Caractéristiques d'innervation des différents types d'unité motrice.

3.2 Sarcomère et contraction musculaire

La myofibre est entourée du sarcolemme (membrane plasmique de la cellule musculaire) et de réticulum sarcoplasmique (réservoir de calcium de la cellule musculaire). Ce dernier présente des invaginations de sarcolemme qui correspondent aux tubules T. L'aspect strié des myofibres provient de l'alternance de zones sombres et claires appelées bandes A et I respectivement. Ces bandes sont elles aussi délimitées par d'autres bandes et lignes qui formeront le sarcomère (**figure 18**). La myofibre a pour unité de base le sarcomère. Le sarcomère est un système complexe de protéines contractiles (actine, myosine), de structure (titine, desmine, nébuline, α-actinine) et régulatrices (tropomyosine, troponine C, I et T) (Frontera and Ochala, 2015).

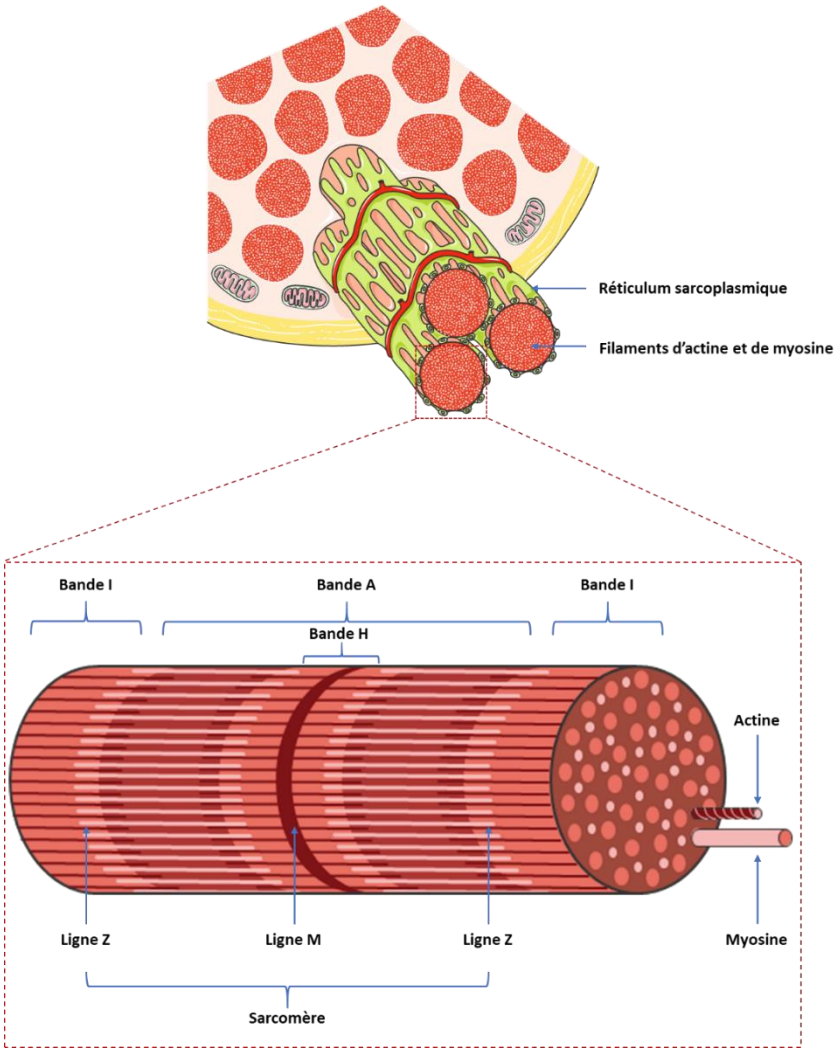


Figure 18 : Représentation schématique de l'ultrastructure d'une myofibrille.
Chaque myofibrille est entourée par le sarcolemme (non représenté) et juste en dessous le réticulum sarcoplasmique qui épouse les filaments d'actine et de myosine. L'organisation spatiale de ces filaments donne cet aspect strié aux fibres. Les bandes A sombres contiennent les filaments fins d'actine et épais de myosine qui se chevauchent alors que les bandes I claires ne sont composées que de filaments fins d'actine. Dans la bande A se trouve la bande H et la ligne M qui contient uniquement les filaments épais de myosine alors que la ligne Z se trouve dans la bande A. Un sarcomère est délimité entre deux lignes Z.

Le couplage neuromusculaire met en jeu le MN et l'ensemble des fibres musculaires qu'il innerve. L'axone du MN (élément présynaptique) provient de la racine ventrale de la moelle épinière ou d'un nerf crânien du tronc cérébral pour innerver un muscle strié squelettique (élément postsynaptique) (Heckman and Enoka, 2012). La dépolarisation des MN génère un potentiel d'action (PA) qui entraine la libération d'acétylcholine (Ach : principal neurotransmetteur) dans la fente synaptique de la JNM (Wood and R. Slater, 2001). Une fois libéré, l'Ach se lie aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (AchR) couplés à des canaux sodiques (Flucher and Daniels, 1989) et entraine un influx d'ions qui induit une dépolarisation de la membrane musculaire. Celle-ci se propage dans l'élément post-synaptique à travers le tubule T qui comprend un récepteur sensible aux variations de voltage : le récepteur dihydropyridine (DPH). Ce récepteur DPH change de conformation après un PA, ce qui active les récepteurs à la ryanodine qui permettent la libération de calcium dans le sarcoplasme. Le calcium libéré est capté par la troponine C ce qui entraine le glissement actine-myosine et par conséquent la contraction musculaire (Wood and R. Slater, 2001) (**figure 19**). La relaxation musculaire survient d'une part lorsque l'acétylcholine estérase hydrolyse l'Ach présent dans la fente synaptique et d'autre part grâce aux pompes SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase) qui permet de recapturer le calcium dans le réticulum sarcoplasmique (Taylor and Radić, 1994). Enfin, les cellules de Schwann assurent la maturation, la stabilité et l'efficacité des JNM via différents facteurs complétant ainsi la synapse tripartite (Ko and Robitaille, 2015).

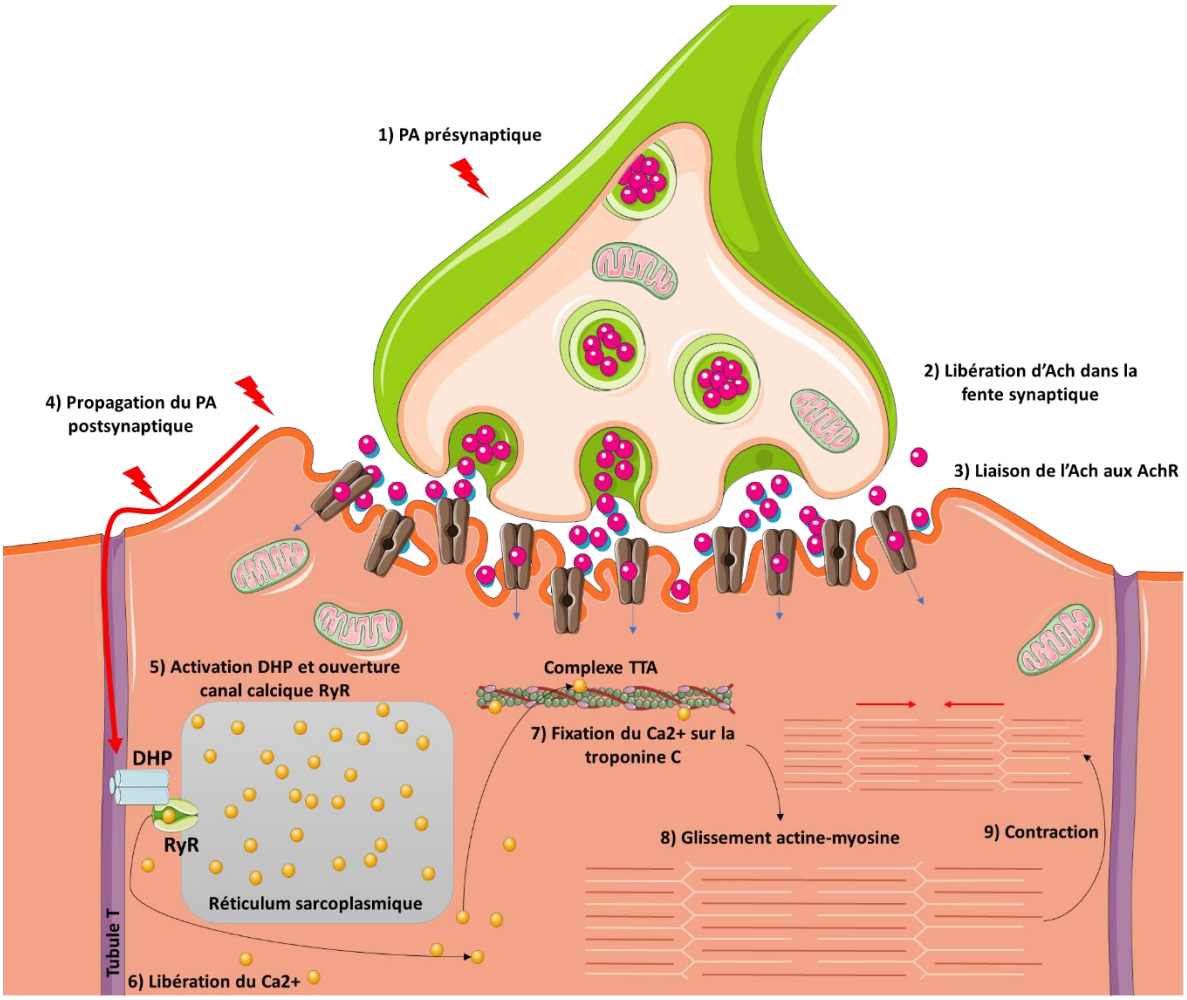


Figure 19 : Représentation schématique du couplage neuromusculaire.
Lorsqu'un potentiel d'action (PA) parcourt l'axone du motoneurone, celui-ci ira jusque dans les boutons synaptiques qui forment la jonction neuromusculaire (JNM) (cellules de Schwann non représentées). 1) Le PA présynaptique entraine la libération d'Ach (2) dans la fente synaptique de la JNM. Une fois libéré, l'Ach se liera à au récepteur majoritaire de la JNM, le récepteur nicotinique de l'Ach (AchR). Le PA postsynaptique se propage ensuite le long de la membrane sarcoplasmique (4) et diffuse dans le tubule T entrainant l'activation des récepteurs dihydropyridines (DHP) et l'activation des récepteurs ryanodines (RyR) (5) situés dans le réticulum sarcoplasmique. Le calcium (Ca^{2+}) libéré dans le cytoplasme est capté par la sous-unité C de la troponine qui fait partie du complexe TTA (Troponine-tropomyosine-actine). Une fois fixé, les sites de liaison de l'actine sont libérés et la myosine peut alors se fixer sur la tropomyosine. Le glissement actine-myosine s'effectue raccourcissant la taille du sarcomère, c'est la contraction musculaire.

3.3 Dénervation sélective et progressive des muscles dans la SLA

Dans la SLA, la déstabilisation de la JNM est un des premiers évènements pathologiques, et ce, avant même la perte du corps cellulaire du MN. Cette observation laisse penser à un phénomène de « dying-back » avec une dégénérescence séquentielle allant de la dénervation musculaire puis d'une perte des terminaison du MN suivie de la mort des MN (Fischer et al., 2004).

Nous avons vu précédemment que l'innervation de fibres musculaires dépend du type de MN selon ses propres caractéristiques. En effet, les MN diffèrent par leur diamètre somatique et axonal, leur

capacité de décharge et les fibres musculaires qu'ils innervent. Ainsi, une catégorisation est possible pour les MN et plusieurs études ont montré que les MN n'étaient pas tous égaux face à la SLA. Il existe trois familles de MN qui innervent des fibres musculaires différents. Les MN α innervent les fibres musculaires extrafusales et sont responsables de la contraction musculaire lors du mouvement. Ils sont majoritaires et représentent les plus gros MN. Les MN γ sont de petite taille et innervent les fibres musculaires intrafusales du fuseau neuromusculaire, important dans la régulation de la proprioception statique et jouent un rôle sensoriel lors de la contraction musculaire. Enfin, moins bien définis, les MN β innervent les fibres intrafusales et extrafusales (Heckman and Enoka, 2012; Kanning et al., 2010). Actuellement, seuls les MN α sont touchés dans la SLA. Dans les MN α, trois sous-catégories de MN sont identifiées en fonction de l'UM qu'ils innervent. On distingue les UM lentes (« slow » ou S), les UM rapides et résistantes (« fast fatigue-resistant » ou FR) et les UM rapides et fatigables (« fast fatigable » ou FF). Les UM lentes sont contactées par les MN S qui sont plus petits que les autres et permettent une très grande résistance à la fatigue lorsqu'ils sont activés (**figure 20**). Ils innervent les fibres musculaires lentes rouges de type oxydatif (type I). A l'opposé, les MN FF sont les plus grandes cellules disposant d'un réseau neuritique très développé. Lorsqu'ils sont activés, la force musculaire développée est considérable mais se fatiguent très vite. Les MN FF innervent les fibres musculaires blanches de type glycolytique (type IIb). Enfin, les MN FR se situent au milieu des MN S et FF. Ils présentent des propriétés intermédiaires (Frey et al., 2000). Le recrutement de ces différents MN et UM dépend de la situation rencontrée. Lors d'exercices courts et intenses, ce sont les MN et les UM FF qui sont sollicités, tandis que les MN et UM S sont utilisées pour une contraction modérée et maintenue dans le temps (Heckman and Enoka, 2012; Kanning et al., 2010).

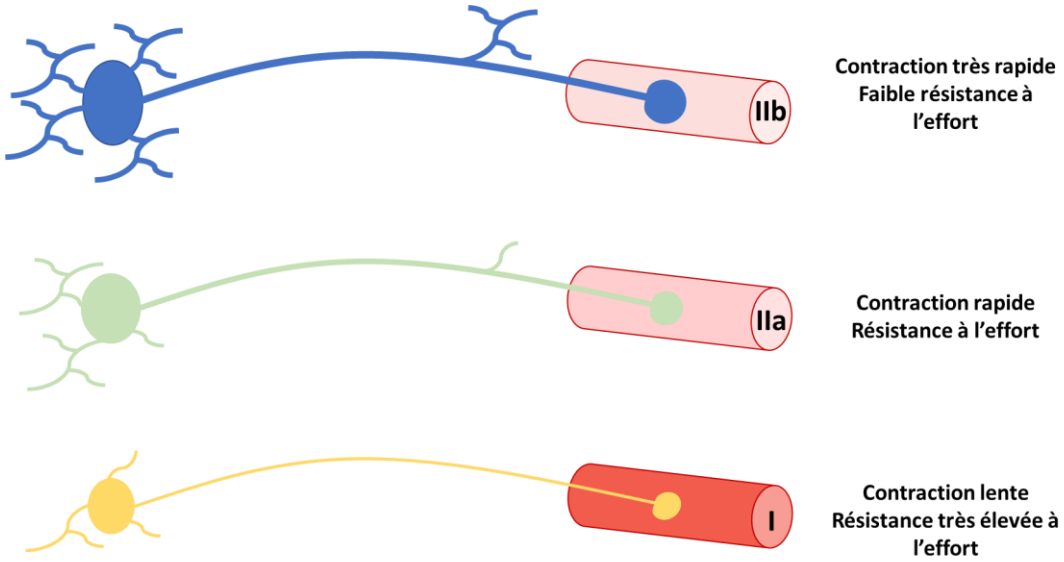


Figure 20 : Caractéristiques morpho-fonctionnelles des motoneurones α et leurs unités motrices.
Il existe trois sous-types de motoneurones α qui se différencient entre eux par la taille du soma, du diamètre de leur axone, de leur ramification mais en fonction de l'unité motrice qu'ils innervent. Les MN FF (« fast twitch fatigable ») contactent les fibres de type IIb, les MN FR (« fast twitch resistant ») innervent les fibres de type IIa et les MN S (« slow –twitch ») contactent les fibres de type I. Ces trois types d'unités motrices seront sollicitées selon le type d'effort que subit le muscle associé. (Illustration adaptée de (Kanning et al., 2010).

Les données de la littérature montrent un perte précoce, sélective et progressive des MN FF dans le muscle gastrocnémien des souris *SOD1*^{G93A} (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006) (figure 21). Etant donnée leur perte précoce aux alentours de 45 jours, les MN sont donc qualifiés de « vulnérables ». La dénervation des MN α continue avec la perte des MN FR autour de 80 jours et celle des MN S (« résistants ») au stade final uniquement (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006). Or, les raisons de cette dénervation séquentielle et ordonnée de MN FF, FR puis S ne sont pas encore élucidées. En revanche, plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Premièrement, la plus grande sensibilité des MN FF proviendrait de leur taille et leurs besoins énergétiques bien plus conséquents que ceux des MN FR et S. Par ailleurs, comme nous l'avions vu plut tôt (cf. partie 1-C), il est décrit que la mSOD1 altère le fonctionnement mitochondrial impactant la synthèse d'ATP, source d'énergie importante du MN. Ainsi, les MN FF en restriction énergétique dégénèrent plus rapidement que les autres MN de type FR et S. Le deuxième argument repose sur la capacité de bourgeonnement du MN lors de situations pathologiques. En effet, des études de lésion de l'axone ont montré que les MN FF ont une faculté de bourgeonnement nettement plus faible que les MN FR et S, suggérant que ces derniers puissent réinnerver les UM délaissés par les MN FF qui ont dégénérés (Duchen, 1973; Frey et al., 2000; Schaefer et al., 2005). Ainsi, l'observation de la perte musculaire observée presque 40 jours après la dégénérescence des MN FF s'explique par cette faculté qu'ont les MN FR et S de réinnerver les fibres de type IIb. Ces données obtenues chez les souris *SOD1*^{G93A} sont également vérifiées chez les patients atteints de SLA (Fischer et al., 2004). L'ensemble de ces preuves indiquent que la sensibilité d'un

muscle à prédominance glycolytique n'est pas la même qu'un muscle à prédominance oxydative dans la SLA. C'est la raison pour laquelle les muscles glycolytiques sont les premiers et les plus affectés dans la maladie tant chez l'Homme que dans les animaux modèles.

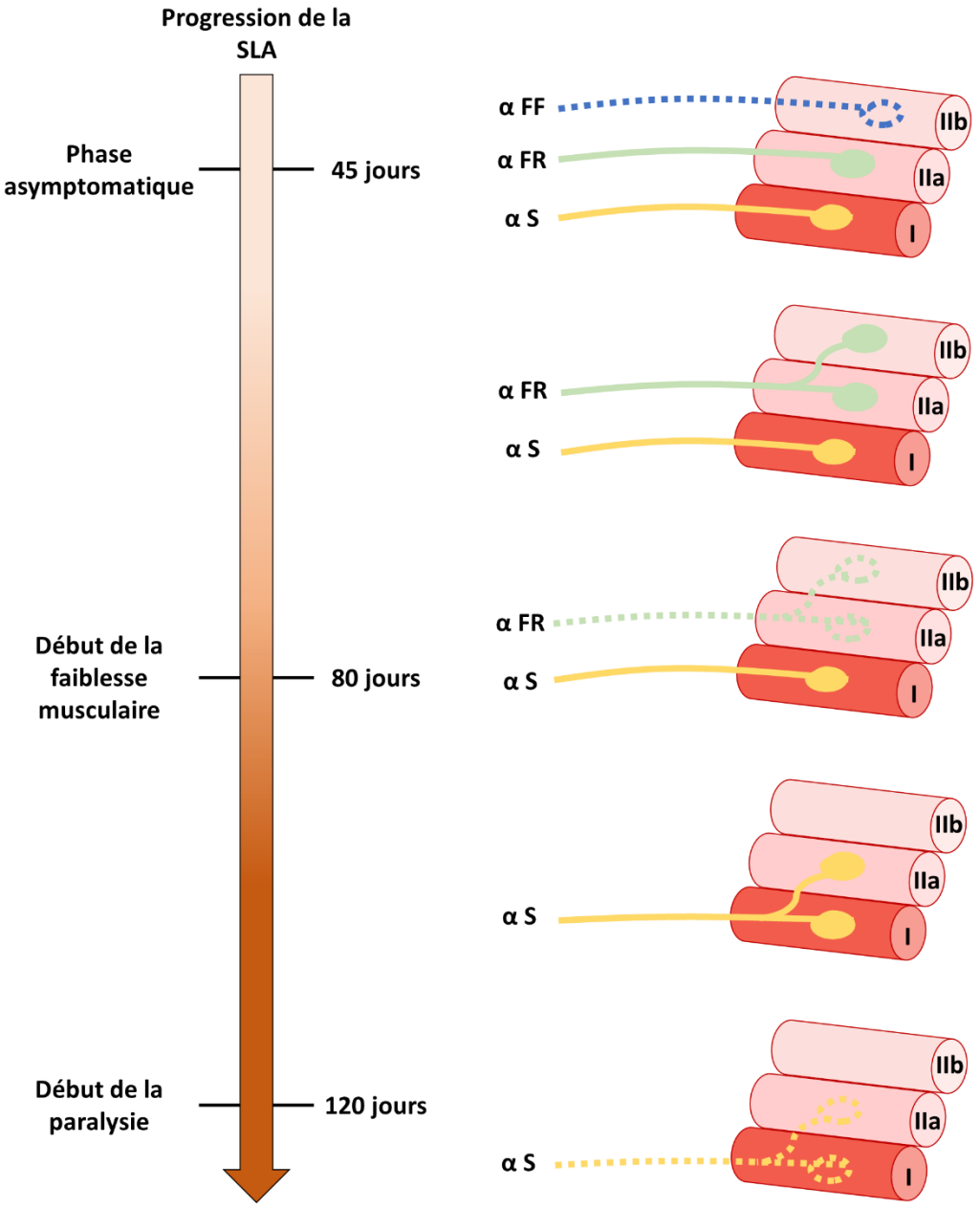


Figure 21 : Dénervation séquentielle des motoneurones α concomitante à la progression de la maladie des souris SOD1^{G93A}.
Dès 45 jours environ (phase asymptomatique), une dénervation importante des fibres musculaires de type IIb (glycolytique) affectant les MN α FF est observée tandis que les autres fibres de types I et IIa restent intactes. Progressivement, les MN FR ou S contactent les fibres IIb grâce à leur capacité de bourgeonnement et de croissance. Aux alentours de 80 jours, le démantèlement des JNM des fibres de type IIa et la perte des MN FR sont constatées. De la même manière, les MN S vont compenser ces pertes en innervant les fibres IIa avant de dégénérer à un stade avancé de la maladie autour de 120 jours. (Illustration adaptée de Kanning et al., 2010).

3.4 Acteurs moléculaires et désordres du métabolisme musculaire impliqués dans la SLA

Jusqu'ici, nous avons vu que la SLA est une pathologie systémique de haute complexité faisant intervenir plusieurs types cellulaires. Chez les patients comme chez les souris modèles de SLA, il est maintenant admis que le démantèlement de la jonction neuromusculaire (JNM) est un des premiers évènements pathologiques de la maladie (Fischer et al., 2004; Gonzalez de Aguilar et al., 2008; Jokic et al., 2006; Moloney et al., 2014) et ce bien avant la perte des MN (Frey et al., 2000; Gould, 2006; Pun et al., 2006; Vinsant et al., 2013) et des premiers symptômes moteurs (Dupuis et al., 2000; Rocha et al., 2013). Il a également été montré que l'accumulation de mutant SOD spécifiquement dans le muscle est responsable de l'altération des JNM (Dobrowolny et al., 2018) et que la surexpression de Nogo-A dans le muscle est délétère pour la JNM, les MN et est négativement corrélée à la sévérité de la maladie (Dupuis et al., 2002; Jokic et al., 2005, 2006; Pradat et al., 2007, 2012). Par ailleurs, les dysfonctionnements mitochondriaux représentent un autre point majeur de la SLA. En effet, des anomalies de structure et de fonction mitochondriale sont observées dans le muscle de patients SLA et d'animaux transgéniques (Chung and Suh, 2002; Crugnola et al., 2010; Echaniz-Laguna et al., 2006; Luo et al., 2013; Menzies, 2002; Vielhaber et al., 1999; Zhou et al., 2010). S'ajoute à cela, le stress oxydant induit par une production anarchique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) retrouvées en grande quantité dans les fluides et tissus de patients SLA (Chang et al., 2008; Mitsumoto et al., 2008; Shaw et al., 1995; Shibata et al., 2001; Simpson et al., 2004; Smith et al., 1998). En 2010, notre laboratoire met en évidence un stress oxydant musculaire bien avant le développement de symptômes moteurs et tout autre signe de dénervation musculaire dans le modèle *Sod1*^{G86R} (Halter et al., 2010). Ces altérations ne constituent pas l'origine de la pathologie mais y contribuent fortement. Début du 21ème siècle, l'hypermétabolisme systémique et la dyslipidémie sont caractérisés à la fois chez les patients atteints de SLA mais également chez les souris modèles (Desport et al., 2001; Dupuis et al., 2004a). Ces altérations représentent des facteurs de risques pour contracter une SLA (Dupuis et al., 2008; Jésus et al., 2018; Ngo et al., 2015; Steyn et al., 2018). De plus, notre laboratoire démontre qu'un hypermétabolisme musculaire expérimental cause une dénervation musculaire, une perte de MN, un démantèlement des JNM et réduit l'espérance de vie des animaux, mimant ainsi toutes les caractéristiques d'une SLA (Dupuis et al., 2009). Enfin, il est clairement établi que l'exercice physique, le changement de statut métabolique des fibres musculaires et la dérégulation d'acteurs moléculaires majeurs du métabolisme énergétique musculaire contribuent activement à la physiopathologie de la SLA. Enfin, notre laboratoire a mis en évidence une perte de la flexibilité métabolique musculaire dès un stade présymptomatique chez les souris modèles de SLA (et ce avant la mise en place de l'hypermétabolisme systémique. Cela se traduit par l'incapacité d'utiliser le glucose comme source

d'énergie, qui s'explique par une augmentation de la β-oxydation et une diminution de la glycolyse (Palamiuc et al., 2015; Scaricamazza et al., 2020) dans le muscle strié squelettique. Un des acteurs majeurs de ce déséquilibre énergétique est la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4), une isoforme majeure de PDK dans le muscle (Jeoung et al., 2006; Zhang et al., 2014), qui joue un rôle crucial dans cette balance. Une induction significative de ce marqueur métabolique est retrouvée dans les muscles striés squelettiques des souris modèles *Sod1*^{G86R} et *SOD1*^{G93A} mais également dans le muscle de patient SLA (Palamiuc et al., 2015).

Nous formulons donc l'hypothèse qu'une correction de la balance énergétique (glucose vs acide gras) dans le muscle strié squelettique permettrait d'atténuer ou de ralentir le développement de la SLA. Ainsi, la contribution du muscle squelettique et ses altérations énergétiques associées sont synthétisées dans la revue que j'ai rédigée ci-dessous.

cells

MDPI

Review

Skeletal Muscle Metabolism: Origin or Prognostic Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Development?

Cyril Quessada [1,†], Alexandra Bouscary [1,2,†], Frédérique René [1], Cristiana Valle [3], Alberto Ferri [3], Shyuan T. Ngo [4,5,6] and Jean-Philippe Loeffler [1,*]

1 Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, INSERM, UMR_S 1118, Centre de Recherche de Biomédecine de Strasbourg (CRBS), Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France; cyril.quessada@etu.unistra.fr (C.Q.); alexandra.bouscary@neuro-sys.com (A.B.); frederique.rene@unistra.fr (F.R.)
2 Neuro-Sys SAS, F-13120 Gardanne, France
3 IRCCS Fondazione Santa Lucia, Institute of Translational Pharmacology, CNR, 00133 Roma, Italy; cristiana.valle@cnr.it (C.V.); alberto.ferri@cnr.it (A.F.)
4 Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia; s.ngo@uq.edu.au
5 Centre for Clinical Research, The University of Queensland, Herston, QLD 4006, Australia
6 Queensland Brain Institute, The University of Queensland, St. Lucia, QLD 4072, Australia
* Correspondence: loeffler@unistra.fr; Tel.: +33-368853837
† These authors contributed equally to this work.

check for updates

Citation: Quessada, C.; Bouscary, A.; René, F.; Valle, C.; Ferri, A.; Ngo, S.T.; Loeffler, J.-P. Skeletal Muscle Metabolism: Origin or Prognostic Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Development?. *Cells* **2021**, *10*, 1449. https://doi.org/10.3390/cells10061449

Academic Editors: Gabriella Dobrowolny, Bianca Maria Scicchitano and Giorgio Tasca

Received: 2 May 2021
Accepted: 7 June 2021
Published: 9 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by progressive and selective loss of motor neurons, amyotrophy and skeletal muscle paralysis usually leading to death due to respiratory failure. While generally considered an intrinsic motor neuron disease, data obtained in recent years, including our own, suggest that motor neuron protection is not sufficient to counter the disease. The dismantling of the neuromuscular junction is closely linked to chronic energy deficit found throughout the body. Metabolic (hypermetabolism and dyslipidemia) and mitochondrial alterations described in patients and murine models of ALS are associated with the development and progression of disease pathology and they appear long before motor neurons die. It is clear that these metabolic changes participate in the pathology of the disease. In this review, we summarize these changes seen throughout the course of the disease, and the subsequent impact of glucose–fatty acid oxidation imbalance on disease progression. We also highlight studies that show that correcting this loss of metabolic flexibility should now be considered a major goal for the treatment of ALS.

Keywords: skeletal muscle; ALS; neuromuscular junction; hypermetabolism; PDK4; metabolic imbalance; trimetazidine

1. Introduction

In humans, the muscular system is divided into two distinct categories: smooth and striated muscles. The number, organization, and function of striated muscle require considerable energy consumption when compared to the entire human body. In this review, we first present a summary of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Second, we examine the role of muscle energy metabolism in the pathophysiology of ALS and we further discuss how targeting muscle offers an avenue for treating the disease.

1.1. Amyotrophic Lateral Sclerosis

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal and incurable neurodegenerative disease. The gradual loss of weight and muscle strength and the onset and progression of muscle paralysis are the main visible presentations of this disease. From a cellular perspective, the loss of cortical motor neurons and spinal and bulbar motor neurons is clearly established [1].

ALS typically affects patients between the ages of 50 and 60 and invariably causes death 3 to 5 years after onset [2]. Worldwide, 60,000 people die of ALS each year [3] with an incidence of 1.75 to 3 per 100,000 per year [4]. In France, there are 3 to 4 new cases per year per 100,000 individuals and a prevalence of 6000 [5]. Many genes have been directly linked with the sporadic (90% of cases) and familial forms (10% of cases) of ALS [6]. In the latter, the pattern of inheritance is generally autosomal dominant. Among the main major susceptibility genes, *C9ORF72*, *SOD1*, *FUS* and *TARDBP* account for 48%, 12%, 5% and 5% in familial forms, respectively [5–11]. Currently, only two FDA-approved treatments are indicated for the treatment of ALS: Rilutek and Edaravone. These molecules increase the life expectancy of some patients by a few months [12,13]. The pathogenic mechanisms that are proposed to contribute to the degeneration of motor neurons include excitotoxicity, oxidative stress, protein aggregation, alteration of RNA metabolism and mitochondrial dysfunction [14–20] (Figure 1). Two hypotheses integrating these pathogenic mechanisms leading to ALS are currently proposed: the corticofugal dying-forward hypothesis which describes the progressive descending neurodegeneration, initiated in the motor cortex, spreading to the motor neuron and ultimately affecting the neuromuscular junctions (NMJ) [21–23] and the dying back hypothesis which is initiated at the NMJ with a retrograde progression of degeneration [24]. These two hypotheses are not mutually exclusive and may coexist to initiate ALS. The topic of this review is focused on the dying-back process of the motor neurons initiated at the NMJ and how skeletal muscle can be involved in ALS.

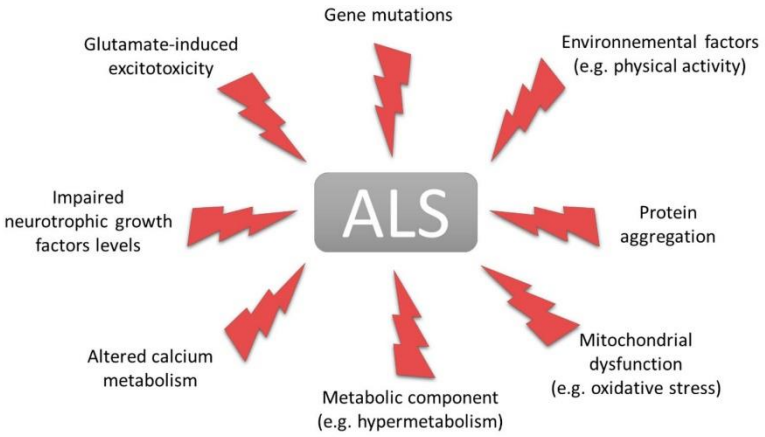


Figure 1. Pathogenic mechanisms thought to contribute to the development of ALS. Current data support several hypotheses that may explain the onset of ALS. Taken individually, these toxic events can mimic some of the hallmarks of ALS. This representation shows the complexity and multifactorial character of this disease.

1.2. Neuromuscular Junction

While ALS is clearly a complex disease, skeletal muscle is now being considered a key player in its pathogenesis. Although recent neurophysiological data obtained in ALS patients support an early hyperexcitability of cortical motor neurons, the dismantling of the NMJ is one of the first anatomical pathogenic events in ALS [25]. In both ALS patients and in SOD1 mouse models of ALS [26–30], the dismantling of the NMJ takes place before the degeneration of motor neurons [31–34], when no clinical motor signs are visible [35] (see Table 1). This supports the idea that motor neuron death is not the only cause of NMJ dismantlement but that degeneration begins in the most distal portion of the axon, namely the synapse. In addition, the safeguard of soma does not prevent the loss of NMJs [36,37]. Indeed, the destabilization of NMJs precedes motor neuron death

and induces the dying-back phenomenon of motor neurons [24]. To clarify the reasons of this dismantling, several studies have been carried out. It was shown that the expression of mutant $SOD1^{G93A}$ and $SOD1^{G37R}$ specifically in muscle led to the loss of NMJ before the loss of motor neuron [38–40]. These data demonstrate that expression of SOD1 mutant limited to skeletal muscle is sufficient by itself to induce NMJ destabilization and may lead to motor neuron death.

Table 1. Summary of the main NMJ alterations found in ALS patients and in ALS mouse models.

		Change Relative to Onset of Symptoms	Results	Ref.
NMJ alterations	Patients	Before	• Decrease of motor unit number measured by MUNE in 2 asymptomatic SOD1 mutation carriers out of 19 (no statistics)	[30]
		After	• 33.8% of NMJ denervated in ALS (n = 10) vs. 9.8% in controls (n = 5) $p < 0.05$	[28]
	$SOD1^{G93A}$ mice	Before	• P47: Denervation of 40% of NMJ in *medial gastrocnemius* (n = 890) (no statistics) • P80: decrease by 60% of intact ventral root axons (n = 4/genotype, $n < 0.01$ vs. control)	[26]
			• P58: Denervation of 78% of type IIb and 30% of type IIa fibers in *medial gastrocnemius* (2 mice/genotype; 20–30 muscle fibers analyzed; no statistics)	[31]
			• P48: preferential denervation of type IIb NMJ followed by IIa and I in *gastrocnemius* (n = 3/genotype; 450 NMJ analyzed; no statistics)	[32]
			• P30: 40% denervation of type IIb NMJ in *tibialis anterior* (n = 11/genotype; $p \leq 0.05$)	[33]
			• P30-36: Decrease by 15.5% of motor unit number measured by Baysian MUNE in *gastrocnemius* (n = 10/genotype; p = 0.018)	[34]

MUNE: motor unit number estimation.

In the skeletal muscle of ALS patients [41,42] and in presymptomatic $Sod1^{G86R}$ mice, expression of Nogo-A (neurite outgrowth inhibitor) was significantly increased and was correlated with the severity of disease [43,44]. Nogo-A could therefore participate in the destabilization of the NMJ and therefore in the degeneration of axon terminals of motor neurons. Ablation of Nogo-A in the muscle of $Sod1^{G86R}$ mice was shown to prevent muscle atrophy and denervation and to prolong survival by 10%. Conversely, muscle overexpression of Nogo-A induced muscle atrophy and denervation, and significantly reduced the size of the NMJ [45]. Thus, these data suggest that Nogo-A plays a role in maintaining the integrity and stabilization of neuromuscular synapses in $SOD1^{G93A}$ mice. However, none of these processes would, by itself, be the sole cause of ALS but they could all contribute together to induce ALS.

2. Mitochondrial Failure and Oxidative Stress in ALS

2.1. Muscle Mitochondria and Respiratory Complexes

One of the main features of ALS is mitochondrial dysfunction [19,46–50] (Figure 1). Defects in mitochondrial structure [51–53] and function have been observed in the skeletal muscle of sporadic ALS patients [54,55] and animal models of ALS [56,57] (Table 2).

Table 2. Summary of the main mitochondrial changes found in skeletal muscle of ALS patients and ALS mouse models.

		Change Relative to Onset of Symptoms	Results	Ref.
Mitochondrial alterations in skeletal muscle	Patients	After	• Complex I activity reduced by 40% (n = 26 ALS, n = 28 controls; $p < 0.01$) • Abnormal morphology (partially swollen, para-crystalline inclusions, vacuoles)	[51]
			• Mitochondrial aggregates in the sub-sarcolemma zone in 49 out of 49ALS cases • Ultrastructural abnormalities (giant mitochondria, para-crystalline inclusions) in 5 out of 49 ALS cases	[52]
			• 46% of patients with cytochrome c oxidase deficiency • Respiratory chain complex activity decreased by at least 30% in patients with severe COX deficiency (8 out of 50)	[54]
			• Increase of the maximal oxidative phosphorylation capacity of muscular mitochondria (V_{max}) by 1.8 fold (n = 7 ALS, n = 7 controls; $p < 0.05$) • Progressive decrease of complex IV activity as disease progresses (n = 7 ALS, n = 7 controls; $p < 0.05$)	[55]
			• Complex I activity reduced by 47.5% (n = 14 ALS, n = 28 controls; $p < 0.01$)	[58]
			• Complex I and IV activity reduced by 37.1% and 43.6% respectively (n = 17 ALS, n = 21 controls; $p < 0.01$)	[59]
	$SOD1^{G93A}$ mice	Before	• P37: Localized loss of inner membrane potential near the NMJ • Localized increase of calcium release by altered mitochondria after osmotic choc (n = 6/genotype; $p < 0.0001$)	[57]
			• P55: Complex I activity reduced by 20% in the *tibialis anterior* (n = 5 independent experiments, $p < 0.0001$); • P55: Decrease of oxygen consumption rate (OCR) by 30% (four independent experiments, with each sample tested in quadruplicate, $p < 0.0001$)	[60]

Moreover, early abnormalities in mitochondrial dynamics contribute to the degeneration of motor neurons in culture [61] and may contribute to the pathophysiology of ALS [56]. In addition, mitochondrial calcium overload occurs in the nerve endings of ALS patients [29] and disruption in calcium homeostasis was seen in different cell models expressing mutant SOD1 [62,63], and in the CNS [62,64] and the skeletal muscles of $SOD1^{G93A}$ mice [57]. Moreover, in asymptomatic ALS mice, mitochondria of muscle cells are no longer able to regulate calcium signaling around NMJs, and an excessively high concentration of

calcium in the cytosol may contribute to the progression of muscle atrophy in ALS [57,65]. These data confirm a close link between mitochondrial dysfunction and calcium deregulation, where the latter would consequently cause a defect in the mitochondrial respiratory chain, triggering a vicious cycle.

The main mitochondrial abnormalities found in ALS concern respiratory complexes. Wiedemann and colleagues [58] reported severe deregulation of the respiratory chain complex I, and a decrease in the activity of respiratory complexes I and IV in the muscle of sporadic ALS patients as well as in the muscles of the *SOD1*^{G93A} mouse model from a presymptomatic stage [51,54,55,59,66,67]. Mitochondrial functions also become progressively impaired when disease progresses [55] and abnormalities in mitochondrial DNA result in decreased activity of certain enzymes (e.g., NADH, COX) [59]. In addition, a significant induction of UCP3 protein has been observed in the muscles of ALS patients and ALS mice [68]. UCP3 is an uncoupling protein mainly expressed in the mitochondria of skeletal muscles, and overexpression of UCP3 in this tissue would induce an increase in lipid oxidation (β-oxidation) and energy expenditure [69,70]. Finally, the overexpression of UCP1 in *Sod1*^{G86R} mice leads to the degeneration of motor neurons, dismantling of the NMJ and decreased survival [71]. Importantly, the alterations observed in skeletal muscle can be detrimental to the integrity of the NMJ [39] without necessarily representing a causal link [72]. Despite data indicating a strong relationship between mitochondrial abnormalities and the progression of ALS, it is still impossible to establish a causal link between these two phenomena [39,71–74].

2.2. ROS and Oxidative Stress

Reactive oxygen species (ROS) are very short-lived metabolites produced during oxidative phosphorylation. Under normal physiological conditions, a cell consumes oxygen to produce energy, and at the same time must eliminate the ROS produced via defense mechanisms such as superoxide dismutase (SOD) and antioxidant metalloenzymes [75]. Under conditions of oxidative stress and reduced mitochondrial respiration, large amounts of ROS are produced and lead to cellular damage such as inflammatory response, excitotoxicity, protein aggregation and apoptosis [76,77]. Furthermore, increased β-oxidation of fatty acids leads to the generation of lipid by-products which contribute to lipotoxicity and to ROS production [78,79]. Several studies have already demonstrated the implication of oxidative stress in aging and in ALS [14,80,81]. Abnormally high levels of ROS markers were observed in fluids [82,83] and post-mortem tissues from sporadic ALS patients [84–86] (Figure 1). In muscle of *Sod1*^{G86R} mice, oxidative stress was observed even before the onset of motor symptoms and obvious signs of denervation [87]. Moreover, in muscle of *SOD1*^{G93A}, SOD1 activity was increased throughout ALS progression, indicating the presence of oxidative stress in muscle [81,88]. Dobrowolny and colleagues demonstrated that muscle expression of mutant *SOD1*^{G93A} was sufficient to induce oxidative damage, muscle atrophy and dismantlement of the NMJs [38,73]. Recently, an increased production of ROS was shown in the muscle of *SOD1*^{G93A} mice and in muscle of wild-type mice with transient overexpression of the *SOD1*^{G93A} mutation [89]. Changes in mitochondrial functions were dependent on the progression of pathology, and the *SOD1*^{G93A} mutation was found to directly contribute to mitochondrial dysfunction long before the death of motor neurons. Although the induction of oxidative stress was not sufficient to cause motor neuron death, the above evidence supports the contribution of uncontrolled ROS production in skeletal muscle to ALS development. However, other studies suggest that mitochondrial disorders in ALS are minor [66,90–92] but are increased as ALS escalates [55]. Altogether, these data support the hypothesis of a major involvement of oxidative stress and mitochondrial alterations in ALS progression.

3. Metabolic Alterations in Amyotrophic Lateral Sclerosis

3.1. Discovery of Hypermetabolism

Classically presented as a strict disease of the cortical, bulbar and spinal motor neurons, the alterations of skeletal muscle observed in ALS are often considered to reflect the loss of these neurons. However, many studies examining the involvement of altered energy metabolism in ALS are starting to challenge this dogma. One of the major symptoms of ALS is weight loss, which is often studied through the measurement of the body mass index (BMI). As ALS progresses, a reduction in BMI and body fat is reported in patients with ALS [93]. Early insulin resistance [94] and glucose intolerance [95] have also been reported in ALS patients. This insulin resistance, which leads to a decreased sensitivity of the peripheral tissues to insulin and limits nutrients entry into the cells, could participate to the reduced BMI seen in patients. The loss of BMI in ALS is also associated with malnutrition due to dysphagia, and a worse survival outcome [96,97], whereas a high BMI is linked to a lower risk of developing ALS [98,99]. BMI is therefore a prognostic factor for ALS [96,100–103].

In 2001, Desport et al. [104] identified an abnormal increase by 10% in resting energy expenditure in patients with ALS (n = 62; sex ratio M/F = 1.07) compared to healthy control group (n = 31). Defined as hypermetabolism, this phenomenon was subsequently confirmed, in a larger study, and was shown to be significantly increased by 14% and affected 62.3% of the 168 ALS patients (sex ratio M/F = 0.97) [105]. Data from the literature report that hypermetabolism affects up to 66% of ALS patients [104–109] and is an early event that persists throughout the course of disease [108,110,111]. Weight loss [112], hypermetabolism, and dyslipidemia are now considered as three major risk factors for ALS [107,109,113,114], and are associated with the severity of disease [108] (Figure 1). Remarkably, similar to what was seen in ALS patients, $Sod1^{G86R}$ and $SOD1^{G93A}$ mice were hypermetabolic and this metabolic change was already detectable at the clinically asymptomatic stage of the disease [115]. Moreover, an experimental induction of muscle hypermetabolism was sufficient to cause muscle denervation and motor neurons loss [71]. As such, it appears that hypermetabolism negatively impacts the progression of the disease. ALS mice also develop a loss of metabolic flexibility before any motor symptoms. This results in the inability to use glucose for energy production, leading to a decreased glycolysis and an increased β-oxidation in skeletal muscle [116] (Figure 2).

In addition, this loss of metabolic flexibility preceded hypermetabolism in $SOD1^{G93A}$ mice [60]. Interestingly, both $Sod1^{G86R}$ [116] and $SOD1^{G93A}$ [60] mice had marked glucose intolerance from an early stage of ALS, and glucose intolerance is, with dyslipidemia, one of the key features of metabolic dysregulations in ALS patients [117]. One of the major players in this energy imbalance is pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), the major muscle isoform of pyruvate dehydrogenase kinase [118,119], which plays a crucial role in balancing glucose–fatty acid flux. A significant induction of this metabolic marker was found in the skeletal muscles of $Sod1^{G86R}$ and $SOD1^{G93A}$ mice but also in the muscle of ALS patients [116]. The main metabolic changes are summarized below in Table 3.

According to these observations, it can therefore be hypothesized that correcting the energy balance (glucose vs. fatty acid) in skeletal muscle would reduce or slow down the development and/or progression of ALS.

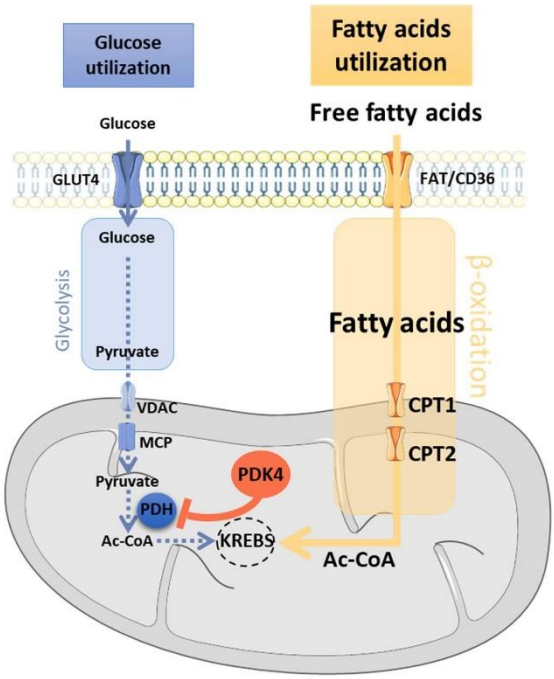


Figure 2. Altered energy metabolism in ALS skeletal muscle. In skeletal muscle, glucose enters into the cell through the GLUT4 transporter. It is then either stored as glycogen (not shown) or phosphorylated to give rise to pyruvate, the final product of glycolysis. Once formed, pyruvate enters into the mitochondria through a series of specific carriers (outer membrane: VDAC, inner membrane: MPC). In the mitochondria, pyruvate is oxidized into acetyl-CoA by PDH before entering the Krebs cycle to produce energy. Fatty acids enter the cell via FAT/CD36 transporters and get into the mitochondrial matrix thanks to CPT1 where β-oxidation will begin and produce acetyl-CoA which produces energy once in the Krebs cycle. In ALS, the oxidative pathway is greatly enhanced while the glycolytic pathway is reduced by abnormal induction of PDK4 in skeletal muscle which inactivates PDH by phosphorylation. PDK4 is believed to be at the root of this energy imbalance. Ac-CoA: acetyl-coenzyme A; CPT1: carnitine palmitoyltransferase 1; FAT/CD36: fatty acid translocase/cluster of differentiation 36; GLUT4: Glucose transporter type 4; MPC: mitochondria pyruvate carrier, PDH: pyruvate deshydrogenase; PDK4: pyruvate deshydrogenase kinase 4; VDAC: voltage-gated anionic channel.

Table 3. Summary of the main alterations of metabolism and contractile properties of skeletal muscle in ALS patients and ALS mouse models.

		Change Relative to Onset of Symptoms	Results	Ref.
Alteration of skeletal muscle metabolism and contractile properties	Patients	After	• 3-fold increase of *PDK4* mRNA level compared to controls (ALS: $n = 11$, control $n = 7$; $p = 0.035$)	[116]
			• 4-fold increase of *PDK4* mRNA level and 20% decrease *GAPDH* mRNA level in ALS *vs* control cases (*anconeus* or *deltoid* muscle; ALS: $n = 10$, control: $n = 6$; $p < 0.05$)	[120]
			• Switch in muscle fiber type from glycolytic to oxidative in muscle biopsies of ALS patients (ALS: $n = 9$, 200–300 fibers/biopsy, $p < 001$)	[121]
	$SOD1^{G93A}$ mice	Before	• P55: *Pdk4* mRNA level is increased 2.5-fold in *tibialis anterior* ($p < 0.05$) • P70: decrease of type IIb fiber mRNA level by 0.5-fold ($n \geq 4$; $p < 0.05$) and *Glut4* mRNA level by 0.4-fold ($n \geq 4$; $p < 0.05$), and increase of CPT1 by 4.8-fold ($n = 4$, $p < 0.01$) in *TA* →Bioenergetics defects	[60]
			• P70: glucose tolerance is significantly decreased ($n = 6$/genotype, $p < 0.05$)	[120]
			• P40: 22% decrease of motor unit number in the glycolytic gastrocnemius muscle compared to control mice ($p < 0.05$) • P80: 45% decrease of tetanic force in the glycolytic muscle (extensor digitorum longus) and 48% decrease of motor units number compared to control mice ($p < 0.05$) → Sequential denervation of glycolytic muscles with disease progression	[122]
			• P60: the tetanic contractile force developed by the glycolytic muscle *TA* is reduced by 80% ($p < 0.01$) and the number of motor units declines by 60% ($p < 0.01$) compared to control mice • P60: the number of innervated type IIb fibers is reduced by 40% in *TA* ($p < 0.01$) • P60: decrease of cross sectioning area of type IIbfibers ($p < 0.001$) → Selective vulnerability of fast-twitch type IIb muscle fibers → Preferential denervation of fast motor neurons	[123]
			• P60: decrease of fast-twitch muscle fibers diameter by 12.5% compared to control mice (*gastrocnemius* muscle, number of fibers analyzed: ALS $n = 63$, control $n = 65$; $p < 0.01$)	[124]

Table 3. *Cont.*

		Change Relative to Onset of Symptoms	Results	Ref.
Alteration of skeletal muscle metabolism and contractile properties			• Swimming straining started at P70 delays disease onset by 2 weeks ($p < 0.001$) and extends survival by 3 weeks ($p < 0.01$) ($n = 8$/genotype) • P115: the fast-to-slow myofiber transition in the fast-twitch *plantaris* and *TA* are significantly limited by the swimming program	[125]
	SOD1^{G93A} mice	After	• P115: *Glut4* and *Gapdh* mRNA level are reduced by around 75% in the *TA* and *soleus* muscles ($p < 0.05$); Swimming training increases *Glut4* and *Gapdh* mRNA levels to control levels in TA but not in *soleus*; *Pdk4* mRNA level is increased by 2-fold in TA ($n = 5$/genotype, $p < 0.05$) → Impairment of glycolytic pathway → Physical activity improves metabolism	[120]
			• P105: Swimming training started at P70 maintains grip strength in ALS mice ($n = 8$/genotype, $p < 0.05$ vs ALS sedentary mice • P105: Citrate synthase activity is reduced by 30% in ALS sedentary mice compared to control ($p = 0.0007$) and swimming training prevents this decrease ($n = 8$/condition). • P105: Malate dehydrogenase activity is increased ed by 25% ($n = 8$/condition, $p < 0.0001$) → Altered glucose metabolism → Swimming exercise modulates skeletal muscle energy metabolism	[126]
	Sod1^{G86R} *mice*	Before	• P65: ALS mice have improved performance during endurance exercise • P65: glucose handling is altered. In TA, glycogen stores are increased, PFK activity is decreased by 23% (ALS mice $n = 7$, control: $n = 6$; $p = 0;016$), pyruvate level is 1.7 fold increased ($n = 5$/genotype; $p = 0;019$) *Pdk4* mRNA level is 2.2-fold increased in TA compared to control mice (ALS mice $n = 8$, control: $n = 7$; $p = 0;014$) while unchanged in *soleus*. • Relative mRNA levels of genes involved in lipid handling pathway (*Lpl; Cd36; Acsf2; Cpt1; PparB/∂*) are increased in TA →Metabolic switch: glycolytic pathway is strongly inhibited, and β-oxidation is enhanced	[116]
		After	• P95: grip strength is decreased in ALS mice ($n = 8$/genotype, $p = 0.03$) and dichloroacetate treatment prevents grip strength loss (ALS mice: $n = 8$; control: $n = 9$, $p = 0.0003$) DCA corrects the metabolic switch in TA	[116]

Acsf2: acyl-CoA synthetase family member 2; *Cd36/Fat*: fatty acid translocase; *Cpt1*: carnitine palmitoyltransferase 1; *Gapdh*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Glut4*: glucose transporter 4; *Lpl*: lipoprotein lipase; *Pdk4*: pyruvate dehydrogenase kinase 4; *Pfk*: phospho-fructokinase; *Pparβ/δ*: Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ; TA: *tibialis anterior.*

3.2. Impairment of Skeletal Muscle Metabolism by Physical Activity

The muscular system requires a considerable supply of energy to handle a variety of physical challenges. To do this, skeletal muscle adapts its energy needs continuously, according to its environment. The selection of fuel source is based on the interaction between the metabolism of glucose and that of fatty acids and is controlled by the Randle cycle [127]. During short and intense exercise (e.g., sprinting), the involvement of fast-type glycolytic fibers necessitates that glucose oxidation (glycolysis) is favored as the primary fuel pathway. Conversely, during sustained moderate exercise (e.g., a marathon, jogging), which mobilizes slow type oxidative fibers, the oxidation of fatty acids (β-oxidation) is preferred [128]. Subjected to different conditions (e.g., intensive and repeated sports activity), muscle fibers adapt and change their phenotypic profile. For example, endurance training is correlated with a strong release of fatty acids and an improved fatty acid muscle absorption [129], thus reflecting improved β-oxidation and changes in muscle fiber type composition [130]. Intense physical exercise is increasingly studied in ALS due to the large number of patients diagnosed with ALS having had a sustained athletic career (Figure 1). Several studies reported a high risk of ALS for athletes such as soccer players, baseballers or tennis players [131–134]. However, one cannot exclude that other associated factors such as exposure to pesticides, doping agents or repeated injuries could be the cause or could participate in the development of the disease [135–137].

However, this link between high level athletes [133] or people with an intense lifestyle [138,139] and ALS is still debated. Indeed, some studies do not observe any link between physical activity and ALS [140,141] nor report activity as being a risk factor for the disease [142] given that ALS patients who perform moderate exercise in the clinic have improved ALSFRS scores [143]. As such, considering physical activity as a risk factor is highly controversial. Based on published data, it appears that if physical activity is not directly causative of ALS, it might in some cases worsen disease progression. Interestingly, in ALS mice, the type of physical exercise performed appeared to be either deleterious or protective. Indeed, Mahoney and his colleagues showed that high intensity exercise was detrimental to motor performance and survival in male *SOD1*^{G93A} mice [144]. In contrast, in the same ALS mouse line, high frequency and large amplitude exercise, such as swimming, improved motor functions, delayed the loss of motor neurons, and significantly lengthened survival [125]. In addition, swimming had significant benefits on energy metabolism in the muscle, allowing it to reuse glucose as an energy source at the expense of lipids [120], while improving muscle strength [126]. Moreover, moderate exercise (low-speed treadmill running or free access to running wheel) significantly preserved motor performance as well as motor neuron density [145,146], unlike intense exercise (high-speed treadmill running) which slightly accelerated the onset of motor disorders [145]. The differences in effects between these two types of exercise result from the documented fact that swimming causes fast twitch fiber type transition and lactate production which promotes glucose metabolism [147]. Overall, the beneficial effects of swimming can be explained by the type of fibers recruited during this type of physical exercise. Swimming preferentially solicits fast fibers while endurance exercise recruits slow fibers [147]. These data demonstrate the benefit of preserving and/or stimulating glycolytic metabolism in skeletal muscle which is compromised in ALS.

3.3. The Metabolic Switch of Muscle Fiber Types in ALS

In ALS, fast-type synaptic connections are more vulnerable as the disease progresses, while slow-type synapses are relatively spared until the end stage of the disease [31]. In 2007, Hegedus and colleagues proposed that the loss of motor units occurred before the detection of key motor symptoms and loss of motor neurons [122]. In addition, in the *SOD1*^{G93A} mouse model, they showed that contraction force of the tibialis anterior (TA), a glycolytic muscle, was reduced when compared to the gastrocnemius, an oxidative muscle. This observation was correlated with a selective and progressive degeneration of motor neurons innervating glycolytic fibers twitch (especially IIB fibers) [123]. It is now accepted that there is a change in muscle fiber types from glycolytic to oxidative in muscle of ALS patients [121], of *SOD1*^{G93A} mice [123–125] and of mice expressing SOD1

mutant specifically in skeletal muscle [38,39,73]. Interestingly, at the onset of the disease, the entry of glucose into muscle fibers was not affected [115,148], suggesting that glucose is rerouted to glycogen stores, rather than being immediately used as a source of energy. Indeed, a decrease in glycogen synthase was observed at the presymptomatic stage of disease in $Sod1^{G86R}$ mice, and this was associated with the deterioration of glycolysis as well as unused glycogen stores in muscle [116]. In $SOD1^{G93A}$, the proportion of glycolytic fibers was reduced when compared to oxidative fibers. This was consistent with the induction of oxidative myosin heavy chains and the repression of glycolytic myosin heavy chains [60,125]. Additionally, a muscle transition from a glycolytic to oxidative phenotype was described in $Sod1^{G86R}$ mice throughout the development of ALS [116]. In short, these studies demonstrate that metabolic changes in skeletal muscle are a hallmark of ALS, appear before the motor symptoms in mouse models and can have consequences at the NMJ. They further show that altered energy balance plays a role in the progression of ALS.

3.4. Main Actors of the Randle Cycle

To best ensure energy homeostasis, the Randle cycle continuously adapts specific fuel usage (glycolysis vs. ß-oxidation) to cellular demand by modifying blood glucose and free fatty acid concentrations via their respective GLUT4 and FAT/CD36 transporters (Figure 2). GLUT4 expression is drastically reduced in patients with ALS [149] and $SOD1^{G93A}$ mice [60,120] while FAT/CD36 is significantly increased in presymptomatic $Sod1^{G86R}$ mice [116]. Thus, the supply of glucose to muscle fibers is no longer assured, leading to insulin resistance [150–152] and glucose intolerance [94,95,153,154] in ALS. At the same time, the CPT1 transporter which allows the entry of fatty acids into the mitochondria was also overexpressed in the $SOD1^{G93A}$ [60] and $Sod1^{G86R}$ models [115,116]. These data are indicative of a disturbance in the assimilation of energy substrates and highlight metabolic imbalance at the level of the muscle.

Once in the cell, glucose enters glycolysis or is stored as glycogen through the action of glycogen synthase. In $Sod1^{G86R}$ mice, at the asymptomatic stage, glycogen synthase activity and glycogen accumulation are significantly increased in skeletal muscle, suggesting that muscle cells are no longer able to use glycogen to produce energy, reflecting a problem with carbohydrate metabolism [116]. Regarding glycolysis, one of the first enzymes to be affected in ALS is phosphofructokinase 1 (PFK1). Indeed, from a presymptomatic stage, the expression of PFK1 and its activity were significantly reduced in the muscle of $Sod1^{G86R}$ mice [116]. The decrease in PFK1 expression in $Sod1^{G86R}$ mice could be a consequence of an increased uptake of fatty acid, enabled by induction of FAT/CD36 and CPT1 transporters, known to strongly inhibit PFK1 [155]. The reduction in PFK1 expression and activity occurs in response to an overexpression of PDK4 and high levels of PDK4 have been observed in the muscle of ALS patients, and in $SOD1^{G93A}$ and $Sod1^{G86R}$ mice even before any detectable sign of denervation [60,120]. While suggesting that the overexpression of PDK4 is not specific for mutations in the SOD1 gene, these data highlight that Randle cycle intermediates become altered in response to changes in glucose–fatty acid flux.

The expression of PDK4 depends on several transcription factors including Foxo1, PGC1α and PPARβ/δ. Foxo1 is an ubiquitous transcription factor that was strongly induced in muscles of $SOD1^{G93A}$ and $Sod1^{G86R}$ mice, as well as non-transgenic animals after sciatic nerve injury [116]. PGC1α plays an essential role in regulating the expression of genes involved in energy metabolism, lipid metabolism and in mitochondrial biogenesis [156–160]. Muscle overexpression of PGC1α leads to an induction of genes involved in the oxidative pathway, causing repression of glycolytic enzymes and glucose intolerance [161]. In mutant $SOD1^{G37R}$ mice, skeletal muscle induction of PGC1α led to maintenance of mitochondrial biogenesis, improved muscle function at the latter stages of disease [162], and was associated with an increase in oxidative type IIA fibers [163]. Alternatively, overexpression of PPARβ/δ in skeletal muscle increased the proportion of type 1 oxidative fibers [164], and constitutive overexpression of PPARβ/δ increases mitochondrial biogenesis and caused a switch from fast to slow fiber type [165].

Taken together, these studies demonstrate the crucial role of muscle energy balance in the pathogenesis of ALS, and are in agreement with the idea that correcting for, or preventing the loss of, metabolic flexibility could be a promising therapeutic approach in ALS.

4. Pharmacological Strategies for Targeting Energetic Imbalance in ALS

Below, we present a brief overview of two pharmacological modulators of energy balance that were studied for their possible repositioning as ALS treatments and a third one which is currently under investigation.

4.1. Dichloroacetate (DCA)

DCA is a drug that restores optimal glucose oxidation while inhibiting the oxidation of fatty acids [166]. DCA inhibits the activity of PDK and thus stimulates the activity of PDH [167] (Figure 3). In 2012, Miquel and colleagues found that DCA improved mitochondrial function in astrocytes expressing the $SOD1^{G93A}$ mutation, while preventing their toxicity on cultured motor neurons. Additionally, they found that DCA improved muscle strength, preserved the integrity of NMJs, reduced motor neuron loss and prolonged survival in $SOD1^{G93A}$ mice [168]. In addition, DCA also delayed the onset of motor symptoms in $Sod1^{G86R}$ mice by limiting denervation and muscle atrophy [116]. The benefits observed in $Sod1^{G86R}$ mice could be explained by the protective effect of DCA on muscle fibers by restoring the energy balance or preventing its imbalance. Treatment with DCA limited the expression of genes controlling the oxidative pathway (e.g., PDK4, Foxo1 and PPARβ/δ) and increased the expression of those involved in the glycolytic pathway (e.g., PFK1). Moreover, DCA treatment improved motor functions, reduced the expression of denervation and atrophy markers, and limited oxidative stress [116]. These data therefore prove that restoring or preserving the metabolic balance can prevent oxidative stress, protect mitochondria, and prevent denervation and muscle atrophy in $Sod1^{G86R}$ mice. Although DCA exerts a number of beneficial effects, translation into the clinic is limited as long-term use of DCA leads to hepatotoxicity [169].

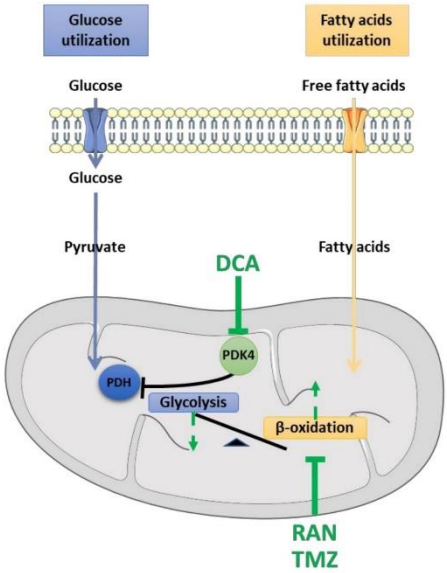


Figure 3. Metabolic reprogramming of skeletal muscle by pharmacological approaches.

In ALS skeletal muscle, energy metabolism is disturbed: glycolysis is decreased while β-oxidation is increased. The three presented drugs could help normalize this energy imbalance. DCA can restore glycolysis by inhibiting PDK4 activity. RAN and TMZ inhibit β-oxidation. A correction of the glucose–fatty acid balance could explain the beneficial effects of these molecules found in various studies on ALS.

4.2. Ranolazine (RAN)

RAN is a β-oxidation inhibitor approved by the FDA for the treatment of angina pectoris [170–173]. RAN increases the oxidation of glucose [174–176] in patients with symptoms of chronic angina pectoris [177] or congenital myotonia [178] (Figure 3). Several studies have shown its efficacy against insulin resistance in animals [179] and patients with type 2 diabetes [180,181]. Despite its beneficial effects on energy metabolism, only one group of researchers working on ALS have exploited RAN efficacy. In 2020, RAN was shown to significantly improve motor functions, restore metabolic homeostasis of skeletal muscle, and prevent hypermetabolism in $SOD1^{G93A}$ mice. Due to the extreme severity of ALS, the positive effects of RAN could not be sustained until the final stage of the disease and could not affect the survival of animals [60]. Therefore, the putative utility of RAN remains an open question. Further preclinical studies, followed by clinical trials, are still needed at this stage to clarify whether RAN can be used as a clinically relevant drug to cure ALS.

4.3. Trimetazidine (TMZ)

TMZ is an anti-anginal and anti-ischemic agent [182,183] that inhibits the oxidation of fatty acids and promotes the oxidation of glucose [175,184,185]. The target of TMZ is the 3-ketoacyl thiolase, an enzyme involved in the last step of β-oxidation [184] (Figure 3). Recently, Ferraro and colleagues showed improved motor performance in a mouse model of sarcopenia after TMZ treatment [186]. In addition, this molecule increased the differentiation of C2C12 myoblasts and induced myogenesis in a tumor-bearing mouse model [187]. A recent study investigating the effects of TMZ on the peripheral nervous system demonstrated an antioxidant effect of TMZ, which resulted in a microenvironment conducive to nerve regeneration and increased remyelination [188]. Based on its pharmacological properties, TMZ appears as an interesting drug to test on ALS models. In preliminary experiments, TMZ significantly increased the motor functions of $Sod1^{G86R}$ mice. We are currently pursuing these experiments to decipher the molecular mechanisms by which TMZ exerts its positive effects on ALS mice.

5. Open Questions and Future Directions

From recent works, it is now clear that ALS is not solely a neuronal disease but that the target of motor neurons, namely the skeletal muscle, is also a major player in disease initiation and progression. Further, the type of metabolism (e.g., glycolysis versus β-oxidation) is also decisive. There is clearly a shift in metabolism from glycolytic toward β-oxidation when disease progresses. This might account for the increased oxidative stress since, at a given ATP demand, producing the cellular fuel from β-oxidation consumes more oxygen and subsequently increases ROS production. We saw above that several molecules such as DCA, but also FDA-approved drugs such RAN or TMZ, can be repositioned for treating ALS to restore glycolysis in ALS mouse models and exert positive effects on muscle strength. Future studies should now be aimed at studying the effects of these drugs in ALS patients.

6. Conclusions

In conclusion, ALS is a highly complex disease. ALS etiology and the multiple pathophysiological mechanisms that trigger the disease remain poorly understood. However, it is clear that skeletal muscle and its bioenergetic disturbances are involved in the development of the disease. Metabolic alterations observed in skeletal muscle in patients with ALS,

and in mouse models of the disease prior to motor neuron degeneration, challenge the idea of ALS being a disease that originates from the neuron. Further investigations of muscle energy metabolism are essential and necessary to define new therapeutic approaches and to develop drug candidates for treating ALS.

Funding: Not applicable.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rowland, L.P.; Shneider, N.A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 13. [CrossRef] [PubMed]
2. van Es, M.A.; Hardiman, O.; Chio, A.; Al-Chalabi, A.; Pasterkamp, R.J.; Veldink, J.H.; van den Berg, L.H. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Lancet* **2017**, *390*, 2084–2098. [CrossRef]
3. Petrov, D.; Mansfield, C.; Moussy, A.; Hermine, O. ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*. [CrossRef] [PubMed]
4. Masrori, P.; Van Damme, P. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Clinical Review. *Eur. J. Neurol.* **2020**, *27*, 1918–1929. [CrossRef]
5. Couratier, P.; Corcia, P.; Lautrette, G.; Nicol, M.; Preux, P.-M.; Marin, B. Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Review of Literature. *Rev. Neurol.* **2016**, *172*, 37–45. [CrossRef]
6. Renton, A.E.; Chiò, A.; Traynor, B.J. State of Play in Amyotrophic Lateral Sclerosis Genetics. *Nat. Neurosci.* **2014**, *17*, 17–23. [CrossRef]
7. Renton, A.E.; Majounie, E.; Waite, A.; Simón-Sánchez, J.; Rollinson, S.; Gibbs, J.R.; Schymick, J.C.; Laaksovirta, H.; van Swieten, J.C.; Myllykangas, L.; et al. A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* **2011**, *72*, 257–268. [CrossRef]
8. Millecamps, S.; Salachas, F.; Cazeneuve, C.; Gordon, P.; Bricka, B.; Camuzat, A.; Guillot-Noel, L.; Russaouen, O.; Bruneteau, G.; Pradat, P.-F.; et al. SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS Mutations in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: Genotype-Phenotype Correlations. *J. Med. Genet.* **2010**, *47*, 554–560. [CrossRef]
9. Millecamps, S.; Boillée, S.; Le Ber, I.; Seilhean, D.; Teyssou, E.; Giraudeau, M.; Moigneu, C.; Vandenberghe, N.; Danel-Brunaud, V.; Corcia, P.; et al. Phenotype Difference between ALS Patients with Expanded Repeats in *C9ORF72* and Patients with Mutations in Other ALS-Related Genes. *J. Med. Genet.* **2012**, *49*, 258–263. [CrossRef]
10. Kwiatkowski, T.J.; Bosco, D.A.; LeClerc, A.L.; Tamrazian, E.; Vanderburg, C.R.; Russ, C.; Davis, A.; Gilchrist, J.; Kasarskis, E.J.; Munsat, T.; et al. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* **2009**, *323*, 1205–1208. [CrossRef]
11. Vance, C.; Rogelj, B.; Hortobagyi, T.; De Vos, K.J.; Nishimura, A.L.; Sreedharan, J.; Hu, X.; Smith, B.; Ruddy, D.; Wright, P.; et al. Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science* **2009**, *323*, 1208–1211. [CrossRef]
12. Abe, K. Safety and Efficacy of Edaravone in Well Defined Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Lancet Neurol.* **2017**, *16*, 8. [CrossRef]
13. Dorst, J.; Ludolph, A.C.; Huebers, A. Disease-Modifying and Symptomatic Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Adv. Neurol. Disord.* **2018**, *11*, 1756285617734734. [CrossRef]
14. Barber, S.C.; Shaw, P.J. Oxidative Stress in ALS: Key Role in Motor Neuron Injury and Therapeutic Target. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48*, 629–641. [CrossRef]
15. Fischer-Hayes, L.R.; Brotherton, T.; Glass, J.D. Axonal Degeneration in the Peripheral Nervous System: Implications for the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Exp. Neurol.* **2013**, *246*, 6–13. [CrossRef]
16. Ling, S.-C.; Polymenidou, M.; Cleveland, D.W. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* **2013**, *79*, 416–438. [CrossRef]
17. Blokhuis, A.M.; Groen, E.J.N.; Koppers, M.; van den Berg, L.H.; Pasterkamp, R.J. Protein Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Acta. Neuropathol.* **2013**, *125*, 777–794. [CrossRef]
18. Bogaert, E.; d'Ydewalle, C.; Van Den Bosch, L. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Excitotoxicity: From Pathological Mechanism to Therapeutic Target. *CNSNDDT* **2010**, *9*, 297–304. [CrossRef]
19. Cozzolino, M.; Carrì, M.T. Mitochondrial Dysfunction in ALS. *Prog. Neurobiol.* **2012**, *97*, 54–66. [CrossRef]
20. Mejzini, R.; Flynn, L.L.; Pitout, I.L.; Fletcher, S.; Wilton, S.D.; Akkari, P.A. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 1310. [CrossRef]
21. Eisen, A.; Kim, S.; Pant, B. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): A Phylogenetic Disease of the Corticomotoneuron? *Muscle Nerve* **1992**, *15*, 219–224. [CrossRef]

22. Eisen, A.; Braak, H.; Del Tredici, K.; Lemon, R.; Ludolph, A.C.; Kiernan, M.C. Cortical Influences Drive Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2017**, *88*, 917–924. [CrossRef] [PubMed]
23. Brunet, A.; Stuart-Lopez, G.; Burg, T.; Scekic-Zahirovic, J.; Rouaux, C. Cortical Circuit Dysfunction as a Potential Driver of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 363. [CrossRef] [PubMed]
24. Dadon-Nachum, M.; Melamed, E.; Offen, D. The "Dying-Back" Phenomenon of Motor Neurons in ALS. *J. Mol. Neurosci.* **2011**, *43*, 470–477. [CrossRef] [PubMed]
25. Moloney, E.B.; de Winter, F.; Verhaagen, J. ALS as a Distal Axonopathy: Molecular Mechanisms Affecting Neuromuscular Junction Stability in the Presymptomatic Stages of the Disease. *Front. Neurosci.* **2014**, *8*. [CrossRef]
26. Fischer, L.R.; Culver, D.G.; Tennant, P.; Davis, A.A.; Wang, M.; Castellano-Sanchez, A.; Khan, J.; Polak, M.A.; Glass, J.D. Amyotrophic Lateral Sclerosis Is a Distal Axonopathy: Evidence in Mice and Man. *Exp. Neurol.* **2004**, *185*, 232–240. [CrossRef]
27. 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. Gene Profiling of Skeletal Muscle in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Physiol. Genom.* **2008**, *32*, 207–218. [CrossRef]
28. Tsujihata, M.; Hazama, R.; Yoshimura, T.; Satoh, A.; Mori, M.; Nagataki, S. The Motor End-Plate Fine Structure and Ultrastructural Localization of Acetylcholine Receptors in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Muscle Nerve.* **1984**, *7*, 243–249. [CrossRef]
29. Siklós, L.; Engelhardt, J.; Harati, Y.; Smith, R.G.; Joó, F.; Appel, S.H. Ultrastructural Evidence for Altered Calcium in Motor Nerve Terminals in Amyotrophc Lateral Sclerosis: Calcium in ALS Motor Nerve Terminals. *Ann. Neurol.* **1996**, *39*, 203–216. [CrossRef]
30. Aggarwal, A. Detection of Preclinical Motor Neurone Loss in SOD1 Mutation Carriers Using Motor Unit Number Estimation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2002**, *73*, 199–201. [CrossRef]
31. Frey, D.; Schneider, C.; Xu, L.; Borg, J.; Spooren, W.; Caroni, P. Early and Selective Loss of Neuromuscular Synapse Subtypes with Low Sprouting Competence in Motoneuron Diseases. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 2534–2542. [CrossRef]
32. Pun, S.; Santos, A.F.; Saxena, S.; Xu, L.; Caroni, P. Selective Vulnerability and Pruning of Phasic Motoneuron Axons in Motoneuron Disease Alleviated by CNTF. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 408–419. [CrossRef]
33. Vinsant, S.; Mansfield, C.; Jimenez-Moreno, R.; Moore, V.D.G.; Yoshikawa, M.; Hampton, T.G.; Prevette, D.; Caress, J.; Oppenheim, R.W.; Milligan, C. Characterization of Early Pathogenesis in the SOD1 ^{G93A} Mouse Model of ALS: Part II, Results and Discussion. *Brain Behav.* **2013**, *3*, 431–457. [CrossRef]
34. Ngo, S.T.; Baumann, F.; Ridall, P.G.; Pettitt, A.N.; Henderson, R.D.; Bellingham, M.C.; McCombe, P.A. The Relationship between Bayesian Motor Unit Number Estimation and Histological Measurements of Motor Neurons in Wild-Type and SOD1G93A Mice. *Clin. Neurophysiol.* **2012**, *123*, 2080–2091. [CrossRef]
35. Rocha, M.C.; Pousinha, P.A.; Correia, A.M.; Sebastião, A.M.; Ribeiro, J.A. Early Changes of Neuromuscular Transmission in the SOD1(G93A) Mice Model of ALS Start Long before Motor Symptoms Onset. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73846. [CrossRef]
36. Gould, T.W.; Buss, R.R.; Vinsant, S.; Prevette, D.; Sun, W.; Knudson, C.M.; Milligan, C.E.; Oppenheim, R.W. Complete Dissociation of Motor Neuron Death from Motor Dysfunction by Bax Deletion in a Mouse Model of ALS. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 8774–8786. [CrossRef]
37. Rouaux, C.; Panteleeva, I.; Rene, F.; Gonzalez de Aguilar, J.-L.; Echaniz-Laguna, A.; Dupuis, L.; Menger, Y.; Boutillier, A.-L.; Loeffler, J.-P. Sodium Valproate Exerts Neuroprotective Effects In Vivo through CREB-Binding Protein-Dependent Mechanisms But Does Not Improve Survival in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 5535–5545. [CrossRef]
38. Dobrowolny, G.; Lepore, E.; Martini, M.; Barberi, L.; Nunn, A.; Scicchitano, B.M.; Musarò, A. Metabolic Changes Associated with Muscle Expression of SOD1G93A. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 831. [CrossRef]
39. Wong, M.; Martin, L.J. Skeletal Muscle-Restricted Expression of Human SOD1 Causes Motor Neuron Degeneration in Transgenic Mice. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 2284–2302. [CrossRef]
40. Martin, L.J.; Wong, M. Skeletal Muscle-Restricted Expression of Human SOD1 in Transgenic Mice Causes a Fatal ALS-Like Syndrome. *Front. Neurol.* **2020**, *11*. [CrossRef]
41. Pradat, P.-F.; Dubourg, O.; de Tapia, M.; di Scala, F.; Dupuis, L.; Lenglet, T.; Bruneteau, G.; Salachas, F.; Lacomblez, L.; Corvol, J.-C.; et al. Muscle Gene Expression Is a Marker of Amyotrophic Lateral Sclerosis Severity. *Neurodegener. Dis.* **2012**, *9*, 38–52. [CrossRef] [PubMed]
42. Pradat, P.-F.; Bruneteau, G.; Gonzalez de Aguilar, J.-L.; Dupuis, L.; Jokic, N.; Salachas, F.; Le Forestier, N.; Echaniz-Laguna, A.; Dubourg, O.; Hauw, J.-J.; et al. Muscle Nogo-a Expression Is a Prognostic Marker in Lower Motor Neuron Syndromes. *Ann. Neurol.* **2007**, *62*, 15–20. [CrossRef] [PubMed]
43. Jokic, N.; Gonzalez de Aguilar, J.-L.; Pradat, P.-F.; Dupuis, L.; Echaniz-Laguna, A.; Muller, A.; Dubourg, O.; Seilhean, D.; Hauw, J.-J.; Loeffler, J.-P.; et al. Nogo Expression in Muscle Correlates with Amyotrophic Lateral Sclerosis Severity. *Ann. Neurol.* **2005**, *57*, 553–556. [CrossRef] [PubMed]
44. 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, F.S.; et al. Nogo Provides a Molecular Marker for Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **2002**, *10*, 358–365. [CrossRef]
45. Jokic, N.; Gonzalez de Aguilar, J.; Dimou, L.; Lin, S.; Fergani, A.; Ruegg, M.A.; Schwab, M.E.; Dupuis, L.; Loeffler, J. The Neurite Outgrowth Inhibitor Nogo-A Promotes Denervation in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Model. *Embo. Rep.* **2006**, *7*, 1162–1167. [CrossRef]

46. Bowling, A.C.; Schulz, J.B.; Brown, R.H.; Beal, M.F. Superoxide Dismutase Activity, Oxidative Damage, and Mitochondrial Energy Metabolism in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 2322–2325. [CrossRef]
47. Dupuis, L.; Gonzalez de Aguilar, J.-L.; Oudart, H.; de Tapia, M.; Barbeito, L.; Loeffler, J.-P. Mitochondria in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Trigger and a Target. *Neurodegener. Dis.* **2004**, *1*, 245–254. [CrossRef]
48. Sasaki, S.; Horie, Y.; Iwata, M. Mitochondrial Alterations in Dorsal Root Ganglion Cells in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Acta Neuropathol.* **2007**, *114*, 633–639. [CrossRef]
49. Vandoorne, T.; De Bock, K.; Van Den Bosch, L. Energy Metabolism in ALS: An Underappreciated Opportunity? *Acta. Neuropathol.* **2018**, *135*, 489–509. [CrossRef]
50. Carrì, M.T.; D'Ambrosi, N.; Cozzolino, M. Pathways to Mitochondrial Dysfunction in ALS Pathogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *483*, 1187–1193. [CrossRef]
51. Vielhaber, S.; Winkler, K.; Kirches, E.; Kunz, D.; Büchner, M.; Feistner, H.; Elger, C.E.; Ludolph, A.C.; Riepe, M.W.; Kunz, W.S. Visualization of Defective Mitochondrial Function in Skeletal Muscle Fibers of Patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **1999**, *169*, 133–139. [CrossRef]
52. Chung, M.J.; Suh, Y.-L. Ultrastructural Changes of Mitochondria in the Skeletal Muscle of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ultrastruct. Pathol.* **2002**, *26*, 3–7. [CrossRef]
53. Menzies, F.M. Mitochondrial Dysfunction in a Cell Culture Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain* **2002**, *125*, 1522–1533. [CrossRef]
54. Crugnola, V.; Lamperti, C.; Lucchini, V.; Ronchi, D.; Peverelli, L.; Prelle, A.; Sciacco, M.; Bordoni, A.; Fassone, E.; Fortunato, F.; et al. Mitochondrial Respiratory Chain Dysfunction in Muscle from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch. Neurol.* **2010**, *67*, 6. [CrossRef]
55. Echaniz-Laguna, A.; Zoll, J.; Ponsot, E.; N'Guessan, B.; Tranchant, C.; Loeffler, J.-P.; Lampert, E. Muscular Mitochondrial Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis Is Progressively Altered as the Disease Develops: A Temporal Study in Man. *Exp. Neurol.* **2006**, *198*, 25–30. [CrossRef]
56. Luo, G.; Yi, J.; Ma, C.; Xiao, Y.; Yi, F.; Yu, T.; Zhou, J. Defective Mitochondrial Dynamics Is an Early Event in Skeletal Muscle of an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82112. [CrossRef]
57. Zhou, J.; Yi, J.; Fu, R.; Liu, E.; Siddique, T.; Ríos, E.; Deng, H.-X. Hyperactive Intracellular Calcium Signaling Associated with Localized Mitochondrial Defects in Skeletal Muscle of an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 705–712. [CrossRef]
58. Wiedemann, F.R.; Winkler, K.; Kuznetsov, A.V.; Bartels, C.; Vielhaber, S.; Feistner, H.; Kunz, W.S. Impairment of Mitochondrial Function in Skeletal Muscle of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *156*, 65–72. [CrossRef]
59. Vielhaber, S. Mitochondrial DNA Abnormalities in Skeletal Muscle of Patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain* **2000**, *123*, 1339–1348. [CrossRef]
60. Scaricamazza, S.; Salvatori, I.; Giacovazzo, G.; Loeffler, J.P.; Renè, F.; Rosina, M.; Quessada, C.; Proietti, D.; Heil, C.; Rossi, S.; et al. Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-SOD1G93A Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target. *iScience* **2020**, *23*, 101087. [CrossRef]
61. Magrané, J.; Manfredi, G. Mitochondrial Function, Morphology, and Axonal Transport in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 1615–1626. [CrossRef] [PubMed]
62. Jaiswal, M.; Zech, W.-D.; Goos, M.; Leutbecher, C.; Ferri, A.; Zippelius, A.; Carrì, M.; Nau, R.; Keller, B.U. Impairment of Mitochondrial Calcium Handling in a MtSOD1 Cell Culture Model of Motoneuron Disease. *BMC Neurosci.* **2009**, *10*, 64. [CrossRef] [PubMed]
63. Carrì, M.T. Expression of a Cu, Zn Superoxide Dismutase Typical of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Induces Mitochondrial Alteration and Increase of Cytosolic Ca $^{2+}$ Concentration in Transfected Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 365–368. [CrossRef] [PubMed]
64. Damiano, M.; Starkov, A.A.; Petri, S.; Kipiani, K.; Kiaei, M.; Mattiazzi, M.; Flint Beal, M.; Manfredi, G. Neural Mitochondrial Ca^{2+} Capacity Impairment Precedes the Onset of Motor Symptoms in G93A Cu/Zn-Superoxide Dismutase Mutant Mice: Mitochondrial Ca^{2+} Capacity in Mutant SOD1 Mice. *J. Neurochem.* **2006**, *96*, 1349–1361. [CrossRef]
65. Rossi, A.E.; Boncompagni, S.; Dirksen, R.T. Sarcoplasmic Reticulum-Mitochondrial Symbiosis: Bidirectional Signaling in Skeletal Muscle. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **2009**, *37*, 29–35. [CrossRef]
66. Al-Sarraj, S.; King, A.; Cleveland, M.; Pradat, P.-F.; Corse, A.; Rothstein, J.D.; Leigh, P.N.; Abila, B.; Bates, S.; Wurthner, J.; et al. Mitochondrial Abnormalities and Low Grade Inflammation Are Present in the Skeletal Muscle of a Minority of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis; an Observational Myopathology Study. *Acta Neuropathol. Commun.* **2014**, *2*, 165. [CrossRef]
67. Capitanio, D.; Vasso, M.; Ratti, A.; Grignaschi, G.; Volta, M.; Moriggi, M.; Daleno, C.; Bendotti, C.; Silani, V.; Gelfi, C. Molecular Signatures of Amyotrophic Lateral Sclerosis Disease Progression in Hind and Forelimb Muscles of an SOD1 ^{G93A} Mouse Model. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *17*, 1333–1350. [CrossRef]
68. Dupuis, L.; Scala, F.; Rene, F.; Tapia, M.; Oudart, H.; Pradat, P.-F.; Meininger, V.; Loeffler, J.-P. Up-regulation of Mitochondrial Uncoupling Protein 3 Reveals an Early Muscular Metabolic Defect in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *FASEB J.* **2003**, *17*, 1–19. [CrossRef]
69. Nabben, M.; Hoeks, J. Mitochondrial Uncoupling Protein 3 and Its Role in Cardiac- and Skeletal Muscle Metabolism. *Physiol. Behav.* **2008**, *94*, 259–269. [CrossRef]

70. Aguer, C.; Fiehn, O.; Seifert, E.L.; Bézaire, V.; Meissen, J.K.; Daniels, A.; Scott, K.; Renaud, J.; Padilla, M.; Bickel, D.R.; et al. Muscle Uncoupling Protein 3 Overexpression Mimics Endurance Training and Reduces Circulating Biomarkers of Incomplete B-oxidation. *FASEB J.* **2013**, *27*, 4213–4225. [CrossRef]
71. Dupuis, L.; Gonzalez de Aguilar, J.-L.; Echaniz-Laguna, A.; Eschbach, J.; Rene, F.; Oudart, H.; Halter, B.; Huze, C.; Schaeffer, L.; Bouillaud, F.; et al. Muscle Mitochondrial Uncoupling Dismantles Neuromuscular Junction and Triggers Distal Degeneration of Motor Neurons. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5390. [CrossRef]
72. Loeffler, J.; Picchiarelli, G.; Dupuis, L.; Gonzalez De Aguilar, J. The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathol.* **2016**, *26*, 227–236. [CrossRef]
73. Dobrowolny, G.; Aucello, M.; Rizzuto, E.; Beccafico, S.; Mammucari, C.; Bonconpagni, S.; Belia, S.; Wannenes, F.; Nicoletti, C.; Del Prete, Z.; et al. Skeletal Muscle Is a Primary Target of SOD1G93A-Mediated Toxicity. *Cell Metab.* **2008**, *8*, 425–436. [CrossRef]
74. Ioannides, Z.A.; Ngo, S.T.; Henderson, R.D.; McCombe, P.A.; Steyn, F.J. Altered Metabolic Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mechanisms of Energy Imbalance and Contribution to Disease Progression. *Neurodegener. Dis.* **2016**, *16*, 382–397. [CrossRef]
75. Smith, E.F.; Shaw, P.J.; De Vos, K.J. The Role of Mitochondria in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurosci. Lett.* **2019**, *710*, 132933. [CrossRef]
76. Kim, G.H.; Kim, J.E.; Rhie, S.J.; Yoon, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp. Neurobiol.* **2015**, *24*, 325–340. [CrossRef]
77. Gandhi, S.; Abramov, A.Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2012**, *2012*, 1–11. [CrossRef]
78. Zhang, L.; Keung, W.; Samokhvalov, V.; Wang, W.; Lopaschuk, G.D. Role of Fatty Acid Uptake and Fatty Acid β-Oxidation in Mediating Insulin Resistance in Heart and Skeletal Muscle. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Biol. Lipids* **2010**, *1801*, 1–22. [CrossRef]
79. Aon, M.A.; Bhatt, N.; Cortassa, S.C. Mitochondrial and Cellular Mechanisms for Managing Lipid Excess. *Front. Physiol.* **2014**, *5*. [CrossRef]
80. Barber, S.C.; Mead, R.J.; Shaw, P.J. Oxidative Stress in ALS: A Mechanism of Neurodegeneration and a Therapeutic Target. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2006**, *1762*, 1051–1067. [CrossRef]
81. Mahoney, D.J.; Kaczor, J.J.; Bourgeois, J.; Yasuda, N.; Tarnopolsky, M.A. Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Upregulation in SOD1-G93A Mouse Skeletal Muscle. *Muscle Nerve.* **2006**, *33*, 809–816. [CrossRef] [PubMed]
82. Smith, R.G.; Henry, Y.K.; Mattson, M.P.; Appel, S.H. Presence of 4-Hydroxynonenal in Cerebrospinal Fluid of Patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann. Neurol.* **1998**, *44*, 696–699. [CrossRef] [PubMed]
83. Mitsumoto, H.; Santella, R.M.; Liu, X.; Bogdanov, M.; Zipprich, J.; Wu, H.-C.; Mahata, J.; Kilty, M.; Bednarz, K.; Bell, D.; et al. Oxidative Stress Biomarkers in Sporadic ALS. *Amyotroph. Lateral Scler.* **2008**, *9*, 177–183. [CrossRef] [PubMed]
84. Shaw, P.J.; Ince, P.G.; Falkous, G.; Mantle, D. Oxidative Damage to Protein in Sporadic Motor Neuron Disease Spinal Cord. *Ann. Neurol.* **1995**, *38*, 691–695. [CrossRef] [PubMed]
85. Shibata, N.; Nagai, R.; Uchida, K.; Horiuchi, S.; Yamada, S.; Hirano, A.; Kawaguchi, M.; Yamamoto, T.; Sasaki, S.; Kobayashi, M. Morphological Evidence for Lipid Peroxidation and Protein Glycoxidation in Spinal Cords from Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Brain Res.* **2001**, *917*, 97–104. [CrossRef]
86. Chang, Y.; Kong, Q.; Shan, X.; Tian, G.; Ilieva, H.; Cleveland, D.W.; Rothstein, J.D.; Borchelt, D.R.; Wong, P.C.; Lin, C.G. Messenger RNA Oxidation Occurs Early in Disease Pathogenesis and Promotes Motor Neuron Degeneration in ALS. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2849. [CrossRef] [PubMed]
87. Halter, B.; Gonzalez de Aguilar, J.-L.; Rene, F.; Petri, S.; Fricker, B.; Echaniz-Laguna, A.; Dupuis, L.; Larmet, Y.; Loeffler, J.-P. Oxidative Stress in Skeletal Muscle Stimulates Early Expression of Rad in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48*, 915–923. [CrossRef]
88. Leclerc, N.; Ribera, F.; Zoll, J.; Warter, J.-M.; Poindron, P.; Lampert, E.; Borg, J. Selective Changes in Mitochondria Respiratory Properties in Oxidative or Glycolytic Muscle Fibers Isolated from G93AhumanSOD1 Transgenic Mice. *Neuromuscul. Disord.* **2001**, *11*, 722–727. [CrossRef]
89. Xiao, Y.; Karam, C.; Yi, J.; Zhang, L.; Li, X.; Yoon, D.; Wang, H.; Dhakal, K.; Ramlow, P.; Yu, T.; et al. ROS-Related Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle of an ALS Mouse Model during the Disease Progression. *Pharmacol. Res.* **2018**, *138*, 25–36. [CrossRef]
90. Echaniz-Laguna, A.; Zoll, J.; Ribera, F.; Tranchant, C.; Warter, J.-M.; Lonsdorfer, J.; Lampert, E. Mitochondrial Respiratory Chain Function in Skeletal Muscle of ALS Patients. *Ann. Neurol.* **2002**, *52*, 623–627. [CrossRef]
91. Krasnianski, A.; Deschauer, M.; Neudecker, S.; Gellerich, F.N.; Müller, T.; Schoser, B.G.; Krasnianski, M.; Zierz, S. Mitochondrial Changes in Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Neurogenic Atrophies. *Brain* **2005**, *128*, 1870–1876. [CrossRef]
92. Ryan, T.E.; Erickson, M.L.; Verma, A.; Chavez, J.; Rivner, M.H.; Mccully, K.K. Skeletal Muscle Oxidative Capacity in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Muscle Metabolism in ALS. *Muscle Nerve.* **2014**, *50*, 767–774. [CrossRef] [PubMed]
93. Kasarskis, E.J.; Berryman, S.; Vanderleest, J.G.; Schneider, A.R.; McClain, C.J. Nutritional Status of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Relation to the Proximity of Death. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63*, 130–137. [CrossRef]

94. Reyes, E.T.; Perurena, O.H.; Festoff, B.W.; Jorgensen, R.; Moore, W.V. Insulin Resistance in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **1984**, *63*, 317–324. [CrossRef]
95. Pradat, P.-F.; Bruneteau, G.; Gordon, P.H.; Dupuis, L.; Bonnefont-Rousselot, D.; Simon, D.; Salachas, F.; Corcia, P.; Frochot, V.; Lacorte, J.-M.; et al. Impaired Glucose Tolerance in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* **2010**, *11*, 166–171. [CrossRef]
96. Desport, J.C.; Preux, P.M.; Truong, T.C.; Vallat, J.M.; Sautereau, D.; Couratier, P. Nutritional Status Is a Prognostic Factor for Survival in ALS Patients. *Neurology* **1999**, *53*, 1059. [CrossRef]
97. Marin, B.; Desport, J.C.; Kajeu, P.; Jesus, P.; Nicolaud, B.; Nicol, M.; Preux, P.M.; 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. [CrossRef]
98. Nakken, O.; Meyer, H.E.; Stigum, H.; Holmøy, T. High BMI Is Associated with Low ALS Risk: A Population-Based Study. *Neurology* **2019**, *93*, e424–e432. [CrossRef]
99. Pape, J.A.; Grose, J.H. The Effects of Diet and Sex in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Rev. Neurol.* **2020**, *176*, 301–315. [CrossRef]
100. Jawaid, A.; Murthy, S.B.; Wilson, A.M.; Qureshi, S.U.; Amro, M.J.; Wheaton, M.; Simpson, E.; Harati, Y.; Strutt, A.M.; York, M.K.; et al. A Decrease in Body Mass Index Is Associated with Faster Progression of Motor Symptoms and Shorter Survival in ALS. *Amyotroph. Lateral Scler.* **2010**, *11*, 542–548. [CrossRef]
101. Paganoni, S.; Deng, J.; Jaffa, M.; Cudkowicz, M.E.; Wills, A.-M. Body Mass Index, Not Dyslipidemia, Is an Independent Predictor of Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Muscle Nerve.* **2011**, *44*, 20–24. [CrossRef] [PubMed]
102. Dardiotis, E.; Siokas, V.; Sokratous, M.; Tsouris, Z.; Aloizou, A.-M.; Florou, D.; Dastamani, M.; Mentis, A.-F.A.; Brotis, A.G. Body Mass Index and Survival from Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. *Neurol. Clin. Pract.* **2018**, *8*, 437–444. [CrossRef] [PubMed]
103. O'Reilly, É.J.; Wang, H.; Weisskopf, M.G.; Fitzgerald, K.C.; Falcone, G.; McCullough, M.L.; Thun, M.; Park, Y.; Kolonel, L.N.; Ascherio, A. Premorbid Body Mass Index and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **2013**, *14*, 205–211. [CrossRef] [PubMed]
104. Desport, J.C.; Preux, P.M.; Magy, L.; Boirie, Y.; Vallat, J.M.; Beaufrère, B.; Couratier, P. Factors Correlated with Hypermetabolism in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74*, 328–334. [CrossRef]
105. Desport, J.-C.; Torny, F.; Lacoste, M.; Preux, P.-M.; Couratier, P. Hypermetabolism in ALS: Correlations with Clinical and Paraclinical Parameters. *Neurodegener. Dis.* **2005**, *2*, 202–207. [CrossRef]
106. Fayemendy, P.; Marin, B.; Labrunie, A.; Boirie, Y.; Walrand, S.; Achamrah, N.; Coëffier, M.; Preux, P.-M.; Lautrette, G.; Desport, J.-C.; et al. Hypermetabolism Is a Reality in Amyotrophic Lateral Sclerosis Compared to Healthy Subjects. *J. Neurol. Sci.* **2021**, *420*, 117257. [CrossRef]
107. Jésus, P.; Fayemendy, P.; Nicol, M.; Lautrette, G.; Sourisseau, H.; Preux, P.-M.; Desport, J.-C.; Marin, B.; Couratier, P. Hypermetabolism Is a Deleterious Prognostic Factor in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25*, 97–104. [CrossRef]
108. Bouteloup, C.; Desport, J.-C.; Clavelou, P.; Guy, N.; Derumeaux-Burel, H.; Ferrier, A.; Couratier, P. Hypermetabolism in ALS Patients: An Early and Persistent Phenomenon. *J. Neurol.* **2009**, *256*, 1236–1242. [CrossRef]
109. Steyn, F.J.; Ioannides, Z.A.; van Eijk, R.P.A.; Heggie, S.; Thorpe, K.A.; Ceslis, A.; Heshmat, S.; Henders, A.K.; Wray, N.R.; van den Berg, L.H.; et al. Hypermetabolism in ALS Is Associated with Greater Functional Decline and Shorter Survival. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2018**, *89*, 1016–1023. [CrossRef]
110. Funalot, B.; Desport, J.-C.; Sturtz, F.; Camu, W.; Couratier, P. High Metabolic Level in Patients with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* **2009**, *10*, 113–117. [CrossRef]
111. Peter, R.S.; Rosenbohm, A.; Dupuis, L.; Brehme, T.; Kassubek, J.; Rothenbacher, D.; Nagel, G.; Ludolph, A.C. Life Course Body Mass Index and Risk and Prognosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results from the ALS Registry Swabia. *Eur. J. Epidemiol.* **2017**, *32*, 901–908. [CrossRef]
112. Moglia, C.; Calvo, A.; Grassano, M.; Canosa, A.; Manera, U.; D'Ovidio, F.; Bombaci, A.; Bersano, E.; Mazzini, L.; Mora, G.; et al. Early Weight Loss in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Outcome Relevance and Clinical Correlates in a Population-Based Cohort. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2019**, *90*, 666–673. [CrossRef]
113. Dupuis, L.; Corcia, P.; Fergani, A. Dyslipidemia Is a Protective Factor in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology* **2008**, *7*, 1004–1009. [CrossRef]
114. Ngo, S.T.; Steyn, F.J.; Huang, L.; Mantovani, S.; Pfluger, C.M.M.; Woodruff, T.M.; O'Sullivan, J.D.; Henderson, R.D.; McCombe, P.A. Altered Expression of Metabolic Proteins and Adipokines in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **2015**, *357*, 22–27. [CrossRef]
115. Dupuis, L.; Oudart, H.; Rene, F.; de Aguilar, J.-L.G.; Loeffler, J.-P. Evidence for Defective Energy Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Benefit of a High-Energy Diet in a Transgenic Mouse Model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11159–11164. [CrossRef]
116. Palamiuc, L.; Schlagowski, A.; Ngo, S.T.; Vernay, A.; Dirrig-Grosch, S.; Henriques, A.; Boutillier, A.; Zoll, J.; Echaniz-Laguna, A.; Loeffler, J.; et al. 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.* **2015**, *7*, 526–546. [CrossRef]

117. Joardar, A.; Manzo, E.; Zarnescu, D.C. Metabolic Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Challenges and Opportunities. *Curr. Genet. Med. Rep.* **2017**, *5*, 108–114. [CrossRef]
118. Jeoung, N.H.; Wu, P.; Joshi, M.A.; Jaskiewicz, J.; Bock, C.B.; Depaoli-Roach, A.A.; Harris, R.A. Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoenzyme 4 (PDHK4) in Glucose Homoeostasis during Starvation. *Biochem. J.* **2006**, *397*, 417–425. [CrossRef]
119. Zhang, S.; Hulver, M.W.; McMillan, R.P.; Cline, M.A.; Gilbert, E.R. The Pivotal Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Metabolic Flexibility. *Nutr. Metab. (Lond.)* **2014**, *11*, 10. [CrossRef]
120. Desseille, C.; Deforges, S.; Biondi, O.; Houdebine, L.; D'amico, D.; Lamazière, A.; Caradeuc, C.; Bertho, G.; Bruneteau, G.; Weill, L.; et al. Specific Physical Exercise Improves Energetic Metabolism in the Skeletal Muscle of Amyotrophic-Lateral- Sclerosis Mice. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 332. [CrossRef]
121. Telerman-Toppet, N.; Coërs, C. Motor Innervation and Fiber Type Pattern in Amyotrophic Lateral Sclerosis and in Charcot-Marie-Tooth Disease: Motor Units in ALS and CMT. *Muscle Nerve.* **1978**, *1*, 133–139. [CrossRef] [PubMed]
122. Hegedus, J.; Putman, C.T.; Gordon, T. Time Course of Preferential Motor Unit Loss in the SOD1G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **2007**, *28*, 154–164. [CrossRef] [PubMed]
123. Hegedus, J.; Putman, C.T.; Tyreman, N.; Gordon, T. Preferential Motor Unit Loss in the SOD1 ^{G93A} Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Motor Units in Mouse ALS. *J. Physiol.* **2008**, *586*, 3337–3351. [CrossRef] [PubMed]
124. Atkin, J.D.; Scott, R.L.; West, J.M.; Lopes, E.; Quah, A.K.J.; Cheema, S.S. Properties of Slow- and Fast-Twitch Muscle Fibres in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuromuscul. Disord.* **2005**, *15*, 377–388. [CrossRef] [PubMed]
125. Deforges, S.; Branchu, J.; Biondi, O.; Grondard, C.; Pariset, C.; Lécolle, S.; Lopes, P.; Vidal, P.-P.; Chanoine, C.; Charbonnier, F. Motoneuron Survival Is Promoted by Specific Exercise in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Motoneuron Activation and Neuroprotection in ALS Mice. *J. Physiol.* **2009**, *587*, 3561–3572. [CrossRef] [PubMed]
126. Flis, D.J.; Dzik, K.; Kaczor, J.J.; Cieminski, K.; Halon-Golabek, M.; Antosiewicz, J.; Wieckowski, M.R.; Ziolkowski, W. Swim Training Modulates Mouse Skeletal Muscle Energy Metabolism and Ameliorates Reduction in Grip Strength in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *IJMS* **2019**, *20*, 233. [CrossRef] [PubMed]
127. Randle, P.J.; Garland, P.B.; Hales, C.N.; Newsholme, E.A. The Glucose Fatty-Acid Cycle. Its Role in Insulin Sensitivity and the Metabolic Disturbances of Diabetes Mellitus. *Lancet* **1963**, *1*, 785–789. [CrossRef]
128. Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 19–37. [CrossRef]
129. Talanian, J.L.; Holloway, G.P.; Snook, L.A.; Heigenhauser, G.J.F.; Bonen, A.; Spriet, L.L. Exercise Training Increases Sarcolemmal and Mitochondrial Fatty Acid Transport Proteins in Human Skeletal Muscle. *Endocrinol. Metab.* **2010**, *299*, 9. [CrossRef]
130. Pette, D.; Staron, R.S. Transitions of Muscle Fiber Phenotypic Profiles. *Histochem Cell Biol.* **2001**, *115*, 359–372. [CrossRef]
131. Lacorte, E.; Ferrigno, L.; Leoncini, E.; Corbo, M.; Boccia, S.; Vanacore, N. Physical Activity, and Physical Activity Related to Sports, Leisure and Occupational Activity as Risk Factors for ALS: A Systematic Review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2016**, *66*, 61–79. [CrossRef]
132. Bozzoni, V. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Environmental Factors. *Funct. Neurol.* **2016**, *31*. [CrossRef]
133. Chio, A. Severely Increased Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis among Italian Professional Football Players. *Brain* **2005**, *128*, 472–476. [CrossRef]
134. Chio, A.; Mora, G.; Calvo, A.; Mazzini, L.; Bottacchi, E.; Mutani, R. On behalf of the PARALS Epidemiology of ALS in Italy: A 10-Year Prospective Population-Based Study. *Neurology* **2009**, *72*, 725–731. [CrossRef]
135. Beghi, E. Are Professional Soccer Players at Higher Risk for ALS? *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **2013**, *14*, 501–506. [CrossRef]
136. Piazza, O.; Sirén, A.-L.; Ehrenreich, H. Soccer, Neurotrauma and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Is There a Connection? *Curr. Med. Res. Opin.* **2004**, *20*, 505–508. [CrossRef]
137. Al-Chalabi, A.; Hardiman, O. The Epidemiology of ALS: A Conspiracy of Genes, Environment and Time. *Nat. Rev. Neurol.* **2013**, *9*, 617–628. [CrossRef]
138. Scarmeas, N.; Shih, T.; Stern, Y.; Ottman, R.; Rowland, L.P. Premorbid Weight, Body Mass, and Varsity Athletics in ALS. *Neurology* **2002**, *59*, 773–775. [CrossRef]
139. Huisman, M.H.B.; Seelen, M.; de Jong, S.W.; Dorresteijn, K.R.I.S.; van Doormaal, P.T.C.; van der Kooi, A.J.; de Visser, M.; Schelhaas, H.J.; van den Berg, L.H.; Veldink, J.H. Lifetime Physical Activity and the Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2013**, *84*, 976–981. [CrossRef]
140. Longstreth, W.T.; McGuire, V.; Koepsell, T.D.; Wang, Y.; van Belle, G. Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis and History of Physical Activity: A Population-Based Case-Control Study. *Arch Neurol* **1998**, *55*, 201. [CrossRef]
141. Valenti, M.; Pontieri, F.E.; Conti, F.; Altobelli, E.; Manzoni, T.; Frati, L. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Sports: A Case-Control Study. *Eur. J. Neurol.* **2005**, *12*, 223–225. [CrossRef] [PubMed]
142. Turner, M.R.; Goldacre, R.; Ramagopalan, S.; Talbot, K.; Goldacre, M.J. Autoimmune Disease Preceding Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Epidemiologic Study. *Neurology* **2013**, *81*, 1222–1225. [CrossRef] [PubMed]
143. Dal Bello-Haas, V.; Florence, J.M. Therapeutic Exercise for People with Amyotrophic Lateral Sclerosis or Motor Neuron Disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2013**. [CrossRef] [PubMed]
144. Mahoney, D.J.; Rodriguez, C.; Devries, M.; Yasuda, N.; Tarnopolsky, M.A. Effects of High-Intensity Endurance Exercise Training in the G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Muscle Nerve.* **2004**, *29*, 656–662. [CrossRef]

145. Carreras, I.; Yuruker, S.; Aytan, N.; Hossain, L.; Choi, J.-K.; Jenkins, B.G.; Kowall, N.W.; Dedeoglu, A. Moderate Exercise Delays the Motor Performance Decline in a Transgenic Model of ALS. *Brain Res.* **2010**, *1313*, 192–201. [CrossRef]
146. Kaspar, B.K.; Frost, L.M.; Christian, L.; Umapathi, P.; Gage, F.H. Synergy of Insulin-like Growth Factor-1 and Exercise in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann. Neurol.* **2005**, *57*, 649–655. [CrossRef]
147. Grondard, C.; Biondi, O.; Pariset, C.; Lopes, P.; Deforges, S.; Lécolle, S.; Gaspera, B.D.; Gallien, C.-L.; Chanoine, C.; Charbonnier, F. Exercise-Induced Modulation of Calcineurin Activity Parallels the Time Course of Myofibre Transitions. *J. Cell. Physiol.* **2008**, *214*, 126–135. [CrossRef]
148. Smittkamp, S.E.; Morris, J.K.; Bomhoff, G.L.; Chertoff, M.E.; Geiger, P.C.; Stanford, J.A. SOD1-G93A Mice Exhibit Muscle-Fiber-Type-Specific Decreases in Glucose Uptake in the Absence of Whole-Body Changes in Metabolism. *Neurodegener. Dis.* **2013**. [CrossRef]
149. Zubiri, I.; Lombardi, V.; Bremang, M.; Mitra, V.; Nardo, G.; Adiutori, R.; Lu, C.-H.; Leoni, E.; Yip, P.; Yildiz, O.; et al. Tissue-Enhanced Plasma Proteomic Analysis for Disease Stratification in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol. Neurodegener.* **2018**, *13*, 60. [CrossRef]
150. Ren, J.M.; Marshall, B.A.; Mueckler, M.M.; McCaleb, M.; Amatruda, J.M.; Shulman, G.I. Overexpression of Glut4 Protein in Muscle Increases Basal and Insulin-Stimulated Whole Body Glucose Disposal in Conscious Mice. *J. Clin. Investig.* **1995**, *95*, 429–432. [CrossRef]
151. Leturque, A.; Loizeau, M.; Vaulont, S.; Salminen, M.; Girard, J. Improvement of Insulin Action in Diabetic Transgenic Mice Selectively Overexpressing GLUT4 in Skeletal Muscle. *Diabetes* **1996**, *45*, 23–27. [CrossRef]
152. Tsao, T.-S.; Burcelin, R.; Katz, E.B.; Huang, L.; Charron, M.J. Enhanced Insulin Action Due to Targeted GLUT4 Overexpression Exclusively in Muscle. *Diabetes* **1996**, *45*, 28–36. [CrossRef]
153. Dupuis, L.; Pradat, P.-F.; Ludolph, A.C.; Loeffler, J.-P. Energy Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Lancet. Neurol.* **2011**, *10*, 75–82. [CrossRef]
154. Saccà, F.; Quarantelli, M.; Rinaldi, C.; Tucci, T.; Piro, R.; Perrotta, G.; Carotenuto, B.; Marsili, A.; Palma, V.; Michele, G.; et al. A Randomized Controlled Clinical Trial of Growth Hormone in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Clinical, Neuroimaging, and Hormonal Results. *J. Neurol.* **2012**, *259*, 132–138. [CrossRef]
155. Massao Hirabara, S.; de Oliveira Carvalho, C.R.; Mendonça, J.R.; Piltcher Haber, E.; Fernandes, L.C.; Curi, R. Palmitate Acutely Raises Glycogen Synthesis in Rat Soleus Muscle by a Mechanism That Requires Its Metabolization (Randle Cycle). *FEBS Lett.* **2003**, *541*, 109–114. [CrossRef]
156. Puigserver, P.; Spiegelman, B.M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator 1α (PGC-1α): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 78–90. [CrossRef]
157. Thau, N.; Knippenberg, S.; Korner, S.; Rath, K.J.; Dengler, R.; Petri, S. Decreased MRNA Expression of PGC-1> and PGC-1>YRegulated Factors in the SOD1G93A ALS Mouse Model and in Human Sporadic ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2012**, *71*, 11. [CrossRef]
158. Cho, Y.; Hazen, B.C.; Russell, A.P.; Kralli, A. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 (PGC-1)- and Estrogen-Related Receptor (ERR)-Induced Regulator in Muscle 1 (PERM1) Is a Tissue-Specific Regulator of Oxidative Capacity in Skeletal Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 25207–25218. [CrossRef]
159. Cresci, S.; Wright, L.D.; Spratt, J.A.; Briggs, F.N.; Kelly, D.P. Activation of a Novel Metabolic Gene Regulatory Pathway by Chronic Stimulation of Skeletal Muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **1996**, *270*, C1413–C1420. [CrossRef]
160. Gulick, T.; Cresci, S.; Caira, T.; Moore, D.D.; Kelly, D.P. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Regulates Mitochondrial Fatty Acid Oxidative Enzyme Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11012–11016. [CrossRef]
161. Finck, B.N.; Bernal-Mizrachi, C.; Han, D.H.; Coleman, T.; Sambandam, N.; LaRiviere, L.L.; Holloszy, J.O.; Semenkovich, C.F.; Kelly, D.P. A Potential Link between Muscle Peroxisome Proliferator- Activated Receptor-α Signaling and Obesity-Related Diabetes. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 133–144. [CrossRef] [PubMed]
162. Da Cruz, S.; Parone, P.A.; Lopes, V.S.; Lillo, C.; McAlonis-Downes, M.; Lee, S.K.; Vetto, A.P.; Petrosyan, S.; Marsala, M.; Murphy, A.N.; et al. Elevated PGC-1α Activity Sustains Mitochondrial Biogenesis and Muscle Function without Extending Survival in a Mouse Model of Inherited ALS. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 778–786. [CrossRef] [PubMed]
163. Lin, J.; Wu, H.; Tarr, P.T.; Zhang, C.-Y.; Wu, Z.; Boss, O.; Michael, L.F.; Puigserver, P.; Isotani, E.; Olson, E.N.; et al. Transcriptional Co-Activator PGC-1α Drives the Formation of Slow-Twitch Muscle Fibres. *Nature* **2002**, *418*, 797–801. [CrossRef] [PubMed]
164. Luquet, S.; Lopez-Soriano, J.; Holst, D.; Fredenrich, A.; Melki, J.; Rassoulzadegan, M.; Grimaldi, P.A. Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ Controls Muscle Development and Oxydative Capability. *FASEB J.* **2003**, *17*, 2299–2301. [CrossRef]
165. Wang, Y.-X.; Zhang, C.-L.; Yu, R.T.; Cho, H.K.; Nelson, M.C.; Bayuga-Ocampo, C.R.; Ham, J.; Kang, H.; Evans, R.M. Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPARδ. *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e294. [CrossRef]
166. McVeigh, J.J.; Lopaschuk, G.D. Dichloroacetate Stimulation of Glucose Oxidation Improves Recovery of Ischemic Rat Hearts. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **1990**, *259*, H1079–H1085. [CrossRef]
167. Whitehouse, S.; Randle, P.J. Activation of Pyruvate Dehydrogenase in Perfused Rat Heart by Dichloroacetate (Short Communication). *Biochem. J.* **1973**, *134*, 651–653. [CrossRef]
168. Miquel, E.; Cassina, A.; Martínez-Palma, L.; Bolatto, C.; Trías, E.; Gandelman, M.; Radi, R.; Barbeito, L.; Cassina, P. Modulation of Astrocytic Mitochondrial Function by Dichloroacetate Improves Survival and Motor Performance in Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34776. [CrossRef]

169. DeAngelo, A.B.; George, M.H.; House, D.E. Hepatocarcinogenicity In The Male B6c3f1 Mouse Following A Lifetime Exposure To Dichloroacetic Acid In The Drinking Water: Dose-Response Determination And Modes Of Action. *J. Toxicol. Environ. Health* **1999**, *58*, 485–507. [CrossRef]
170. Lionetti, V.; Stanley, W.C.; Recchia, F.A. Modulating Fatty Acid Oxidation in Heart Failure. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *90*, 202–209. [CrossRef]
171. McCormack, J.G.; Stanley, W.C.; Wolff, A.A. Ranolazine: A Novel Metabolic Modulator for the Treatment of Angina. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **1998**, *30*, 639–645. [CrossRef]
172. Tafreshi, M.J.; Fisher, E. Ranolazine: A New Approach to Management of Patients with Angina. *Ann. Pharm.* **2006**, *40*, 689–693. [CrossRef]
173. Hill, J.A.; Schofield, R.S. The Use of Ranolazine in Cardiovascular Disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2002**, *11*, 117–123. [CrossRef]
174. Clarke, B. Ranolazine Increases Active Pyruvate Dehydrogenase in Perfused Normoxic Rat Hearts: Evidence for an Indirect Mechanism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1996**, *28*, 341–350. [CrossRef]
175. Stanley, W.C. Partial Fatty Acid Oxidation Inhibitors for Stable Angina. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2002**, *11*, 615–629. [CrossRef]
176. Mourouzis, I.; Mantzouratou, P.; Galanopoulos, G.; Kostakou, E.; Dhalla, A.K.; Belardinelli, L.; Pantos, C. The Beneficial Effects of Ranolazine on Cardiac Function After Myocardial Infarction Are Greater in Diabetic Than in Nondiabetic Rats. *J. Cardiovasc Pharm.* **2014**, *19*, 457–469. [CrossRef]
177. Chaitman, B.R.; Pepine, C.J.; Parker, J.O.; Skopal, J.; Chumakova, G.; Kuch, J.; Wang, W.; Skettino, S.L.; Wolff, A.A. Combination Assessment of Ranolazine In Stable Angina (CARISA) Investigators Effects of Ranolazine with Atenolol, Amlodipine, or Diltiazem on Exercise Tolerance and Angina Frequency in Patients with Severe Chronic Angina: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* **2004**, *291*, 309–316. [CrossRef]
178. Novak, K.R.; Norman, J.; Mitchell, J.R.; Pinter, M.J.; Rich, M.M. Sodium Channel Slow Inactivation as a Therapeutic Target for Myotonia Congenita. *Ann. Neurol.* **2015**, *77*, 320–332. [CrossRef]
179. Fu, Z.; Zhao, L.; Chai, W.; Dong, Z.; Cao, W.; Liu, Z. Ranolazine Recruits Muscle Microvasculature and Enhances Insulin Action in Rats: Ranolazine, Microvasculature and Insulin Action. *J. Physiol.* **2013**, *591*, 5235–5249. [CrossRef]
180. Eckel, R.H.; Henry, R.R.; Yue, P.; Dhalla, A.; Wong, P.; Jochelson, P.; Belardinelli, L.; Skyler, J.S. Effect of Ranolazine Monotherapy on Glycemic Control in Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2015**, *38*, 1189–1196. [CrossRef]
181. Caminiti, G.; Fossati, C.; Battaglia, D.; Massaro, R.; Rosano, G.; Volterrani, M. Ranolazine Improves Insulin Resistance in Non-Diabetic Patients with Coronary Heart Disease. A Pilot Study. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *219*, 127–129. [CrossRef] [PubMed]
182. Wolff, A.A.; Rotmensch, H.H.; Stanley, W.C.; Ferrari, R. Metabolic Approaches to the Treatment of Ischemic Heart Disease: The Clinicians' Perspective. *Heart Fail. Rev.* **2020**, *7*, 187–203. [CrossRef] [PubMed]
183. Lopaschuk, G.D.; Ussher, J.R.; Folmes, C.D.L.; Jaswal, J.S.; Stanley, W.C. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 207–258. [CrossRef] [PubMed]
184. Kantor, P.F.; Lucien, A.; Kozak, R.; Lopaschuk, G.D. The Antianginal Drug Trimetazidine Shifts Cardiac Energy Metabolism From Fatty Acid Oxidation to Glucose Oxidation by Inhibiting Mitochondrial Long-Chain 3-Ketoacyl Coenzyme A Thiolase. *Circ. Res.* **2000**, *86*, 580–588. [CrossRef]
185. Fang, Y.-H.; Piao, L.; Hong, Z.; Toth, P.T.; Marsboom, G.; Bache-Wiig, P.; Rehman, J.; Archer, S.L. Therapeutic Inhibition of Fatty Acid Oxidation in Right Ventricular Hypertrophy: Exploiting Randle's Cycle. *J. Mol. Med.* **2012**, *90*, 31–43. [CrossRef]
186. Ferraro, E.; Pin, F.; Gorini, S.; Pontecorvo, L.; Ferri, A.; Mollace, V.; Costelli, P.; Rosano, G. Improvement of Skeletal Muscle Performance in Ageing by the Metabolic Modulator Trimetazidine: Metabolism Remodeling in Skeletal Muscle. *J. CachexiaSarcopenia Muscle* **2016**, *7*, 449–457. [CrossRef]
187. Gatta, L.; Vitiello, L.; Gorini, S.; Chiandotto, S.; Costelli, P.; Giammarioli, A.M.; Malorni, W.; Rosano, G.; Ferraro, E. Modulating the Metabolism by Trimetazidine Enhances Myoblast Differentiation and Promotes Myogenesis in Cachectic Tumor-Bearing C26 Mice. *Oncotarget* **2017**, *8*, 113938–113956. [CrossRef]
188. Karahan, G.; Kaya, H.; Erdogan, M.A.; Yigitturk, G.; Gokyayla, E.; Erbas, O. Effects of Trimetazidine on Nerve Regeneration in a Rat Sciatic Nerve Injury Model. *Bratisl. Lek. Listy* **2019**, *120*, 777–782. [CrossRef]

PROBLÉMATIQUE DE THÈSE

PROBLÉMATIQUE DE THÈSE

Bien que la SLA soit décrite depuis plus de 150 ans maintenant, il n'existe toujours pas de traitements curables. En effet, seules deux molécules sont prescrites dans cette maladie (Riluzole et Edaravone) mais leur efficacité reste limitée et controversée. Au cours de l'introduction, nous avons pu nous rendre compte que la SLA est une maladie fatale, complexe, multifactorielle et systémique. De plus, la SLA est retrouvée sous différentes formes : spinale, bulbaire ou respiratoire convergeant toutes vers une paralysie progressive et le décès du patient. L'origine de la SLA est aujourd'hui inconnue mise à part les SLA associées à des mutations génétiques héréditaires (familial) ou non (sporadique). Considérée comme la maladie du motoneurone la plus fréquente chez l'adulte, les dernières avancées de la recherche ont permis de redéfinir la physiopathologie de la SLA, trop longtemps centrées sur le motoneurone. En 2001, Desport et ses collègues identifient une composante métabolique importante chez les patients SLA. Celle-ci se caractérise par une augmentation de la dépense énergétique au repos : c'est l'hypermétabolisme (Desport et al., 2001). De là, plusieurs études s'y intéressent et confirment le statut hypermétabolique des patients SLA sur des cohortes plus importantes et rapportent également une dyslipidémie (Bouteloup et al., 2009; Desport et al., 2005; Dupuis et al., 2008, 2011; Fayemendy et al., 2021; Funalot et al., 2009; Jésus et al., 2018; Ngo et al., 2015; Peter et al., 2017; Steyn et al., 2018). Les mêmes constatations ont été faites sur les modèles murins de SLA *SOD1*^{G93A} et *Sod1*^{G86R} (Dupuis et al., 2004a). Ces caractéristiques précèdent les symptômes moteurs de la SLA et sont prédictifs de l'évolution de la maladie. En effet, l'hypermétabolisme et la dyslipidémie sont des facteurs de risque de la SLA. A noter qu'une hyperlipidémie est aussi retrouvée et semble être protectrice chez certains patients atteints de SLA (Dorst et al., 2011; Dupuis et al., 2008; Jésus et al., 2018; Steyn et al., 2018). Enfin, l'apport d'une nutrition riche et supplémentée en lipides est bénéfique pour la progression de la maladie des patients SLA (Dorst et al., 2013; Ludolph et al., 2020) et pour le modèle murin *Sod1*^{G86R} (Dupuis et al., 2004a). La précocité de ces altérations métaboliques questionne sur la responsabilité de ces atteintes dans la SLA. C'est pourquoi, notre laboratoire s'est intéressé à l'origine et à la compréhension des mécanismes potentiels de la mise en place des altérations métaboliques dans le modèle murin *Sod1*^{G86R}. En 2015, une perte de flexibilité métabolique est identifiée dans le muscle squelettique de ces souris qui se traduit par une incapacité d'utiliser le glucose comme source d'énergie principale (Palamiuc et al., 2015). Ainsi, une diminution de l'oxydation du glucose (glycolyse) et une augmentation concomitante de l'utilisation des acides gras (β-oxydation) sont constatées à un stade asymptomatique. Parmi l'ensemble des marqueurs mesurés dans cette étude, le rôle crucial de la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4) entre ces deux voies est avéré. Une induction significative de l'expression de l'ARNm de *PDK4* est mesurée dans le muscle de patients SLA ainsi que dans le muscle des souris *Sod1*^{G86R} aux stades asymptomatique et symptomatique. A ce

stade, il est suggéré que PDK4 est à l'origine du déséquilibre de la balance glycolyse/β-oxydation et qu'il représente un marqueur métabolique important dans la SLA. De ce postulat, le laboratoire a utilisé le dichloroacétate (DCA), un agent pharmacologique connu pour limiter la β-oxydation et stimuler la glycolyse en inhibant l'activité de la PDK4 (McVeigh and Lopaschuk, 1990; Whitehouse and Randle, 1973). Bien qu'à long terme le DCA soit hépatotoxique (DeAngelo et al., 1999), le traitement au DCA a permis d'empêcher la surexpression de PDK4, de restaurer la glycolyse tout en préservant les performances motrices des souris *Sod1*^{G86R} (Palamiuc et al., 2015). De fait, l'utilisation du DCA n'est pas compatible avec une étude clinique potentielle sur des patients SLA.

L'objectif premier de mon travail était de sélectionner des agents pharmacologiques disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), d'une certaine innocuité même à long terme et de propriétés bénéfiques sur la balance énergétique qui s'avèreraient intéressantes pour mon projet. Ainsi, l'utilisation de molécules avec AMM faciliterait l'établissement d'un repositionnement médicamenteux et la préparation d'un essai clinique.

Mon hypothèse de travail est qu'une modulation pharmacologique de la balance énergétique glucose/acides-gras en corrigeant ou prévenant son déséquilibre pourrait être bénéfique pour la progression de la SLA des souris *Sod1*^{G86R}.

Au cours de ma thèse, je me suis donc focalisé sur les effets de deux agents pharmacologiques ayant les mêmes propriétés que le DCA sur la balance énergétique des souris *Sod1*^{G86R}. Avec une équipe italienne avec qui nous collaborons étroitement, nous avons pu montrer des effets bénéfiques de l'une de ces deux molécules sur le modèle murin *SOD1*^{G93A} (voir annexe).

Les résultats présentés dans ce manuscrit seront organisés sous forme d'un article scientifique en tant que premier auteur qui montre les effets positifs d'un traitement à la TMZ tant sur la balance énergétique que sur le développement de la SLA dans le modèle *Sod1*^{G86R}. Cette étude a été possible grâce à l'étude pilote que j'ai mené (voir annexe) qui avait pour but de comparer les effets de la ranolazine (RAN) et de la trimétazidine (TMZ) : deux molécules disponibles sur le marché et connues pour leurs propriétés intéressantes sur le métabolisme énergétique. L'objectif de cette étude pilote était de comparer les effets bénéfiques potentiels sur la balance énergétique et sur le développement de la SLA, pour *in fine* sélectionner le meilleur candidat médicament. A l'issue de cette étude, la TMZ s'est avérée plus efficace et plus prometteuse que la RAN dans le développement de la SLA chez une petite cohorte de souris *Sod1*^{G86R}. C'est pourquoi j'ai réalisé une seconde étude avec une cohorte plus conséquente afin de vérifier les effets de la TMZ sur le modèle *Sod1*^{G86R} dans le but de confirmer les résultats préliminaires.

Au cours de mes trois années de thèse, j'ai pu contribuer à d'autres études en collaboration avec une équipe italienne qui présentent les effets bénéfiques de la TMZ et du RAN sur le modèle *SOD1*^{G93A}. J'ai également pu participer à d'autres études qui s'intéressent au métabolisme des lipides et plus particulièrement aux dérégulations des sphingolipides observées dans la SLA. En effet, notre laboratoire a montré une altération de la voie des sphingolipides dans la moelle épinière des souris *Sod1*^{G86R} à un stade présymptomatique de la maladie (Henriques et al., 2015, 2018). Ainsi, en modulant le métabolisme des sphingolipides par une approche pharmacologique utilisant l'ambroxol hydrochloride (AMB), nous avons mis en évidence des effets neuroprotecteurs de l'AMB sur l'axe moteur des souris *Sod1*^{G86R} mais également sur leur sur survie (Bouscary et al., 2019). L'ensemble des publications auxquelles j'ai pu participer est uniquement présenté en annexe de ce manuscrit.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

A. Publication en préparation

La trimétazidine : un modulateur cardiaque efficace contre les désordres métaboliques et de l'axe moteur dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique

Cyril QUESSADA[1], Alexandra BOUSCARY[1], Marion BOUTRY[1], Cristiana VALLE[3], Alberto FERRI[3], Noëlle Callizot[2], Alexandre HENRIQUES[2], Shyuan T NGO[4,5,6], Frédérique RENE[1,2], and Jean-Philippe LOEFFLER[1,2,*]

[1] Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, INSERM, UMR_S 1118, Centre de Recherche de Biomédecine de Strasbourg (CRBS), Université de Strasbourg, F-67000, Strasbourg, France ;

[2] Neuro-sys SAS, F-13120 Gardanne, France

[3] IRCCS Fondazione Santa Lucia, Institute of Translational Pharmacology, CNR, 00133 Roma, Italy

[4] Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia

[5] Centre for Clinical Research, The University of Queensland, QLD 4006, Australia

[6] Queensland Brain Institute Building 79, The University of Queensland, St Lucia QLD 4072, Australia

***** Correspondance to Dr Jean-Philippe Loeffler, loeffler@unistra.fr

Contribution personnelle :

Pour cette publication, j'ai rédigé l'ensemble du papier et réalisé toutes les expériences et figures présentées dans le papier à l'exception des études *in vitro* qui ont été effectuées par l'entreprise de biotechnologie Neuro-sys.

1. INTRODUCTION

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie du motoneurone la plus fréquente chez l'adulte. Cette pathologie neurodégénérative et fatale est définie par la mort progressive et sélective des neurones moteurs corticaux et des motoneurones bulbaires et spinaux (Brooks and Fischbeck, 1995; Bruijn et al., 2004; Cleveland and Rothstein, 2001; van Es et al., 2017; Masrori and Van Damme, 2020). Or, cette caractérisation ne peut plus se résumer à cela puisque d'autres cellules comme la cellule musculaire est sévèrement affectée dans la SLA. De plus, l'hypermétabolisme et la dyslipidémie recensés comme facteurs de risque chez les patients (Bouteloup et al., 2009; Desport et al., 2001, 2005; Dupuis et al., 2008, 2011; Fayemendy et al., 2021; Funalot et al., 2009; Jésus et al., 2018; Ngo et al., 2015; Peter et al., 2017; Steyn et al., 2018) et les modèles animaux (Dupuis et al., 2004; Palamiuc et al., 2015; Scaricamazza et al., 2020) font de la SLA une maladie pluricellulaire et systémique. Ces atteintes métaboliques s'associent à la perte de poids, à l'intolérance au glucose et à la résistance à l'insuline observées chez les patients et les animaux modèles (Dupuis et al., 2004; Palamiuc et al., 2015; Pradat et al., 2010; Reyes et al., 1984). Toutes ces perturbations sont sévèrement liées à la progression de la pathologie (Jésus et al., 2018; Steyn et al., 2018). En 2015, nous identifions très précocement un déséquilibre de la balance énergétique chez les souris *Sod1*^{G86R}. Cela se traduit par l'incapacité d'utiliser le glucose (glycolyse) comme source d'énergie principale et d'une augmentation concomitante de l'oxydation des acides-gras (β-oxydation). L'un des acteurs majeurs de ce déséquilibre est la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4) qui est significativement induit dans le muscle des patients et des souris *Sod1*^{G86R} (Palamiuc et al., 2015). PDK4 est une isoforme retrouvée majoritairement dans le muscle strié squelettique, qui a pour rôle de phosphoryler la pyruvate déshydrogénase (PDH) contrôlant ainsi la conversion du pyruvate en acétyl-CoA pour donner de l'énergie via le cycle de Krebs dans la matrice mitochondriale. Ainsi, une surexpression de PDK4 induit l'inactivation de PDH et provoque l'inhibition de la voie glycolytique favorisant la voie oxydative. La modulation de l'expression de PDK4 pourrait empêcher le déséquilibre de cette balance. En effet, nous montrons que l'utilisation de dichloroacétate (DCA), un inhibiteur de l'activité de PDK4, rétablit la glycolyse tout en diminuant la β-oxydation. De même que le DCA améliore les fonctions motrices des souris *Sod1*^{G86R} (Palamiuc et al., 2015). Malgré ses effets bénéfiques, le DCA ne peut pas être envisagé à long terme du fait de son hépatotoxicité (DeAngelo et al., 1999). La modulation du métabolisme énergétique par des agents pharmacologiques comme le DCA (Palamiuc et al., 2015) ou la RAN (Scaricamazza et al., 2020) montre l'effet bénéfique sur le développement de la SLA de modèles murins. Dans cette étude, nous nous intéressons aux effets potentiels de la trimétazidine (TMZ), un modulateur énergétique cardiaque approuvé par l'EMA. C'est un traitement connu pour améliorer l'homéostasie énergétique du myocarde en cas d'ischémie ou d'angine de poitrine (Shu et al., 2020). Le TMZ possède les mêmes propriétés que la RAN, puisqu'il restaure la glycolyse et limite la β-oxydation en inhibant l'enzyme 3

kétoacyl-CoA thiolase qui catalyse l'oxydation des acides gras (Kantor et al., 2000; Marzilli et al., 2019). De plus, d'autres effets sont alloués à cet agent pharmacologique qui pourrait être intéressant dans le contexte de la SLA. En effet, le TMZ stimule la myogenèse, améliore le métabolisme énergétique des muscles squelettiques, la force musculaire et la communication neuromusculaire (Belli et al., 2019). Nous postulons ici qu'une correction de la balance énergétique pourrait ralentir le développement de la SLA dans le modèle *Sod1*^{G86R}. Pour répondre à cette question, nous avons évalué les effets du TMZ sur l'axe moteur aux stades présymptomatique et symptomatique. L'intérêt de se placer à un stade présymptomatique est d'une part évaluer le potentiel effet préventif du traitement sur la dérégulation du métabolisme énergétique et le déclenchement des premiers symptômes moteurs d'un modèle murin qui développe une SLA familiale et d'autre part à un stade symptomatique pour évaluer les effets du traitement sur l'évolution des symptômes moteurs et la survie des animaux transgéniques. Nos résultats révèlent que la TMZ améliore le métabolisme énergétique du muscle strié squelettique, limite la perte de force musculaire et préserve l'axe moteur des souris *Sod1*^{G86R} en protégeant les motoneurones et les jonctions neuromusculaires de la dénervation. Par ailleurs, nous montrons également la capacité de réinnervation qu'a le TMZ sur des modèles *in vivo* et *in vitro*.

Pour compléter ces données, nous menons actuellement différentes expériences de biologie moléculaires et biochimiques pour conclure sur l'ensemble des effets obtenus avec ce traitement.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Déclaration éthique

Les expérimentations ont été réalisées par des enquêteurs agréés, conformément aux réglementations actuelles de l'Union européenne (directive 2010/63 /UE) et après approbation par le comité d'éthique régional en expérimentation animale de Strasbourg (CEEA35) et par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (APAFIS) # 21432; # 28602).

2.2 Animaux et conditions expérimentales d'élevage

Des souris femelles non transgéniques FVB/NRj générées chez Janvier Labs ont été utilisées pour établir un modèle de compression nerveuse. Pour les autres études, des souris transgéniques (Tg) mâles *Sod1*^{G86R}, fond FVB/NRj, surexprimant le mutant *Sod1*^{G86R} murin (Ripps et al., 1995) et des souris non-transgéniques (nTg) issues des mêmes portées ont été générées. Ces souris ont été hébergées dans l'animalerie centrale de la faculté de médecine à Strasbourg, à 23°C avec un cycle lumière/obscurité de 12 h et un accès illimité à l'eau et à la nourriture (Safe, A04). Le traitement avec le TMZ (20 mg/kg/jour, Sigma-Aldrich) a été administré dans l'eau de boisson. Les souris non traitées ou « véhicules » (VEH), ont reçu l'eau de boisson habituelle de l'animalerie. Pour l'étude au stade

présymptomatique, le traitement a débuté à 80 jours et s'est achevé à 95 jours. A cet âge, les tissus ont été récoltés pour des analyses de biochimie et de biologie moléculaire. Pour l'étude au stade symptomatique (expérience de survie), le traitement a également commencé à 80 jours et s'est arrêté seulement quand les souris ont été euthanasiées après avoir atteint le stade final de la maladie. Les souris développant précocement des symptômes moteurs sévères avant 90 jours ont été mises à mort et exclues des analyses. Les animaux ont été euthanasiés lorsqu'ils étaient totalement paralysés et incapables de se retourner dans les 5 secondes après avoir été placés sur le dos (stade final). Pour l'euthanasie, les souris préalablement anesthésiées ont été mises à mort par une injection intrapéritonéale d'Euthasol (120 mg/kg, Virbac) et ont été perfusées par voie intracardiaque avec du PBS à 4°C. Avant le début de chaque étude, une base pour le poids et la force musculaire ont été réalisées afin d'avoir des groupes expérimentaux les plus homogènes possibles.

2.3 Evaluation de la force musculaire

La force musculaire a été évaluée par le test d'agrippement à l'aide d'un dynamomètre (Bioseb, Chaville, France). Pour réaliser ce test, la souris est placée sur une grille métallique qu'elle saisit instinctivement pour tenter d'arrêter le mouvement de recul involontaire effectué par le manipulateur jusqu'à ce que la force de traction dépasse sa force de préhension. Le dynamomètre enregistre la force de traction maximale. La force musculaire (en gramme) est mesurée trois fois pour chaque souris. Les résultats présentés sont la moyenne des trois essais consécutifs pour chaque animal et réalisés par le même expérimentateur pour réduire au maximum les biais liés à la procédure expérimentale.

2.4 Electromyographie

Tous les enregistrements ont été réalisés avec un appareil électromyographique (EMG) standard (Dantec, Les Ulis, France) conformément aux directives de l'American Association of Electrodiagnosis Medicine (AAEM). Durant la procédure, les souris sont anesthésiées avec 100 mg/kg de chlorhydrate de kétamine et 5 mg/kg de xylazine et sont maintenues à 37°C à l'aide d'un tapis thermostaté. Afin de minimiser la variabilité, tous les enregistrements ont été réalisés par le même expérimentateur. Les enregistrements ont été effectués pendant 2 min avec une électrode à aiguille concentrique (9013S0011, diamètre 0,3 mm; Medtronic, USA) insérée dans le muscle gastrocnémien et tibial antérieur. Une électrode à aiguille monopolaire (9013R0312, diamètre 0,3 mm; Medtronic) a été insérée dans la queue de la souris pour relier le système à la terre et fermer le circuit. L'activité électrique spontanée (principalement des fibrillations) caractéristique de la dénervation musculaire a été différenciée de l'activité volontaire (décharges régulières qui disparaissent avec la relaxation

musculaire) par l'inspection visuelle et auditive. L'activité électrique spontanée avec une amplitude d'au moins 50 µV a été considérée comme significative.

2.5 Compression du nerf sciatique

La compression du nerf sciatique a été effectuée sur des souris femelles FVB/NRj non transgéniques âgées de 8 semaines. Ces souris ont été anesthésiées avec du chlorhydrate de kétamine (100 mg/kg) et de la xylazine (5 mg/kg). Le nerf sciatique a été exposé au niveau de la mi-cuisse et comprimé avec une pince fine pendant 30 secondes. L'incision cutanée a été soigneusement suturée et les souris ont pu récupérer leur fonction motrice au cours du temps. Le membre postérieur, controlatéral à la lésion, servait de témoin. La veille de la chirurgie, une partie des souris a reçu le traitement à différentes doses de TMZ selon les groupes (5, 20 et 50 mg/kg/jour) dans l'eau de boisson. Le poids et la force musculaire des souris ont été mesurés quotidiennement. Au 12ème jour de récupération motrice, les souris préalablement anesthésiées ont été mises à mort par injection intrapéritonéale d'Euthasol (120 mg/kg, Virbac) et perfusées par voie intracardiaque avec du PBS à 4°C.

2.6 Préparation des tissus

Pour l'ensemble des études, les souris préalablement anesthésiées ont été mises à mort par injection intrapéritonéale d'Euthasol (120mg/kg, Virbac) puis perfusées par voie intracardiaque avec du PBS à 4°C. Pour des analyses biochimiques, les tissus ont été directement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Pour des analyses d'immunohistochimie, les tissus ont été fixés au paraformaldéhyde à 4% dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,4 (pendant 24h pour les moelles lombaires, 2h pour les muscles), puis stockés dans du PBS contenant 0,002% de thimérosal à 4°C jusqu'à utilisation.

Marquage des jonctions neuromusculaires (JNMs)

Sous une loupe binoculaire, les fibres du muscle *Extensor Digitorum Longus* (EDL) ont été séparées en minces faisceaux. Les JNMs ont été visualisés en marquant les récepteurs postsynaptiques de l'acétylcholine avec de l'α-bungarotoxine (αBGT) et en marquant les terminaisons nerveuses avec des anticorps dirigés contre les neurofilaments et la synaptophysine. Les faisceaux ont été prétraités avec une solution de saturation/perméabilisation contenant 5% de sérum de cheval (#CCVCHL00, Eurobio) et 0,5% de TritonX100 dans du PBS1X pendant 30 minutes à température ambiante, puis incubés pendant une nuit à température ambiante avec deux anticorps primaires: un anticorps polyclonal anti-synaptophysine de lapin (#AB578, Eurogentec) et un anticorps polyclonal anti-neurofilament de lapin (#NF575, Eurogentec) dilués chacun au 1/100 dans du PBS1X contenant 0,1% de TritonX100 (PBST).

Après trois lavages de 10 minutes avec du PBST, les faisceaux ont été incubés avec des anticorps IgG secondaires d'âne anti-lapin conjugués à Alexa 488 (1/500, #711-547-003, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) pour visualiser les terminaisons nerveuses et αBGT conjugué à la rhodamine (1 µg / ml, #T0195, Sigma-Aldrich) pour visualiser les récepteurs postsynaptiques de l'acétylcholine. Après 1 heure et 30 minutes d'incubation et trois lavages avec du PBS, les faisceaux de fibres musculaires ont été montés entre la lame et la lamelle dans un milieu aqueux (#18606, Aqua-Poly/monture, Polysciences). Les JNMs ont été analysés avec un microscope à fluorescence (ApoTome 2, Zeiss). 100 à 120 JNMs ont été quantifiées par animal avec 5 souris par groupe pour les souris nTg et 8 souris par groupe pour les souris transgéniques. Bien que la séparation des fibres musculaires soit faite délicatement durant la préparation des échantillons, une perte d'environ 10% est systématiquement retrouvée. Une perte systématique d'environ 10% d'innervation des JNM dans le groupe témoin. Pour l'expérience de lésion du nerf sciatique, 100 à 120 JNMs ont été quantifiées par animal avec 7 souris par groupe pour les souris nTg (traitées ou non).

Comptage des motoneurones (MNs)

Les moelles épinière lombaire (L3-L5) incluses dans 4% d'agarose ont été coupées dans le plan coronal au vibratome Leica VT1000S à une épaisseur de 40 µm. Les sections ont été incubées dans un tampon citrate 10 mM pH 6 pendant 30 min à 80°C, saturées pendant 30 minutes avec une solution de PBS contenant 5% de sérum de cheval et 0,5% de TritonX100, puis incubées pendant une nuit à température ambiante avec un anticorps primaire anti-acétylcholine transférase de chèvre (ChaT) (1/100, #AB144P - Millipore, France) dilué dans du PBST. Après trois lavages de 10 minutes avec du PBST, les coupes ont été incubées avec des anticorps IgG de lapin anti-chèvre conjugués à Alexa594 (1/500, #A11058, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, USA) pendant 1h30 à température ambiante. Les noyaux ont été marqués à l'Hoechst 33342 (1 pg/ml; Sigma-Aldrich). Après trois lavages avec du PBS, les coupes ont été montées entre la lame et la lamelle dans un milieu aqueux (#18606, Aqua-Poly/monture, Polysciences). Six coupes de moelle épinière par animal ont été observées avec le microscope ApoTome 2 (Zeiss). Les deux cornes ventrales de chaque section ont été photographiées avec l'objectif x20. Tous les neurones de plus de 400 µm² ont été considérés comme des MNα. Les groupes de souris nTg étaient composés de 5 souris par groupe, et les groupes de souris Tg étaient composés de 6 souris par groupe (traitées ou non).

Extraction d'ARN et RT-PCR en temps réel

Les ARN ont été préparés selon un protocole du laboratoire. Brièvement, chaque échantillon congelé (muscle tibial antérieur ou TA) a été placé sur de la glace dans un tube contenant une bille en acier inoxydable de 5mm. 500µL de réactif Trizol (Invitrogen, Groningen, Pays-Bas) a été ajouté et

l'homogénéisation a été effectuée trois fois dans un TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) à 30Hz pendant 5min. L'ARN a été extrait à l'aide d'une série de solutions contenant chloroforme/isopropanol/éthanol et ensuite stocké à -80°C jusqu'à utilisation. Un microgramme d'ARN total a été utilisé pour synthétiser l'ADNc en utilisant la transcriptase inverse (iScriptTM Reverse Transcription Supermix, 1708841, Bio-Ras, USA) et les amorces oligo-dT comme spécifié par le fabricant. L'expression génique a été mesurée par PCR quantitative en temps réel avec les amorces adaptées à chaque ARNm, dNTP, ADN polymérase hot-start et SYBR Green en tampon, selon les instructions du fabricant (SsoAdavancedTM Universal SYBR Green Supermix, BioRad) dans un Bio-Rad Thermocycleur iCycler. La PCR a été réalisée dans des conditions optimisées : dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, suivie de 40 cycles de 10 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C. Les séquences d'amorces (Eurogentec Seraing, Belgique) utilisées pour chaque gène sont données dans le tableau supplémentaire 1. La quantification relative de chaque ARNm a été réalisée à l'aide du logiciel Biorad (CFX Maestro Software, BioRad) et calculée en fonction du facteur de normalisation généré à partir des gènes de référence (H2AC, H2AX, H1H2BC) à l'aide du logiciel Genorm v3.5.

Pour l'étude de compression du nerf sciatique, l'expression relative de chaque ARNm a été exprimée sous la forme d'un rapport d'expression dans le muscle TA ipsilatéral (du côté de la lésion) / muscle TA controlatéral (opposé à la lésion).

2.7 Culture d'explants de moelle épinière

2.7.1 Culture primaire de motoneurones spinaux

Toutes les expériences ont été effectuées conformément au guide des instituts nationaux de la santé pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire et en adéquation avec les règlementations de l'Union Européenne (Directive 2010/63/UE ; n° d'autorisation : B1301310). Les neurones moteurs (MN) de la moelle épinière de rat ont été cultivés selon (Martinou et al., 1992; Wang et al., 2013). Les fœtus ont été extraits de l'utérus des rates gravides de 14 jours de gestation (Rats Wistar; Janvier Labs France) anesthésiées profondément en chambre à CO_2 et mis à mort par luxation cervicale. Une fois retirés, les fœtus ont immédiatement été placés dans un milieu L15 Leibovitz réfrigéré avec une solution de pénicilline à 2% (10000 U/mL) et de streptomycine (10 mg/mL) (PS) et de l'albumine de sérum bovin à 1% (BSA). La moelle épinière a été traitée pendant 20 min à 37°C avec une solution de trypsine-EDTA à une concentration finale de 0,05% de trypsine et 0,02% d'EDTA. La dissociation a été arrêtée par l'addition du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) avec 4,5 g/L de glucose, contenant de la DNAse I grade II (concentration finale 0,5 mg/ml) et 10% de sérum de veau fœtal (FCS). Les cellules ont été dissociées mécaniquement par trois passages forcés à l'aide de la pointe d'une pipette de 10 ml. Les cellules ont été ensuite centrifugées à 515 x g pendant 10 min à 4°C. Une fois le

surnageant éliminé, le culot a été re-suspendu dans un milieu de culture composé de milieu Neurobasal avec une solution à 2% de supplément B27, 2 mmol/litre de L-glutamine, 2% de solution de PS et 10 ng/mL du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Les cellules viables ont été comptées dans un cytomètre Neubauer, en utilisant le test d'exclusion au bleu trypan. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 20000 par puit en plaques de 96 puits ou 120000 par puit en plaques 24 puits, pré-enduites de poly-L-lysine et ont été cultivées à 37°C dans un air (95%) - Incubateur CO_2 (5%). Le support a été changé tous les 2 jours. Les puits des premières lignes et colonnes n'ont pas été utilisées pour la culture (pour éviter tout effet de bord) et ont été remplis d'eau stérile.

2.7.2 Traitement au TMZ et induction du stress glutamatergique

La solution véhicule constitue le milieu de culture (0,1% DMSO final). Pour la phase de préincubation, les MN primaires ont été prétraités avec du TMZ pendant une heure. Pour le stress glutamatergique, au 13ème jour de culture et après la préincubation, le glutamate a été ajouté sans lavage préalable à une concentration finale de 5µM dilué dans du milieu témoin pendant 20 min. Après cette phase, le glutamate a été retiré par lavage et un milieu de culture frais a été ajouté en présence de TMZ pendant 24 heures supplémentaires.

2.7.3 Méthodes d'évaluation

Révélation immunohistochimique : 24 heures après l'intoxication, les surnageants ont été éliminés et les cellules ont été fixées par une solution froide d'éthanol (95%) et d'acide acétique (5%) pendant 5 min à -20°C. Après perméabilisation avec 0,1% de saponine, les cellules ont été incubées pendant 2 heures avec un anticorps monoclonal de souris anti-protéine associée aux microtubules 2 (MAP-2) (dilution au 1/400) dans du PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal et 0,1% de saponine. Cet anticorps a été révélé avec des IgG anti-souris de chèvre Alexa Fluor 488 (dilution 1/400) dans du PBS contenant 1% de FCS, 0,1% de saponine, pendant 1 heure à température ambiante. Pour chaque condition, 30 images (représentatives de la zone de tous les puits) par puits ont été automatiquement prises en utilisant ImageXpress® (Molecular Devices) avec un grossissement de 20x, en utilisant le mêmes paramètres d'acquisition. À partir de cette acquisition, les analyses ont été directement et automatiquement effectuées par MetaXpress® (Molecular Devices).

Les points suivants ont été automatiquement mesurés:

- Analyse de la survie des neurones (coloration MAP-2, nombre de neurones),
- Analyse du réseau de neurites (coloration MAP-2, longueur totale des neurites en µm)

2.8 Statistiques

Les données présentées sont exprimées en moyenne ± Erreur Standard de la moyenne (ESM) et ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism version 8.0. Le test t de Student a été utilisé pour comparer deux groupes, et le test d'analyse de variance ANOVA a été appliqué pour comparer plus de

deux groupes. La PCR quantitative, le comptage des JNMs et des MN ont été analysés avec un test ANOVA à un facteur. Les évaluations motrices et comportementales ont été analysées avec un test ANOVA à deux facteurs.

3. RÉSULTATS

3.1 La TMZ ralentit la progression de la maladie, préserve l'axe moteur de la dégénérescence sans affecter la survie des souris Sod1^{G86R}

Les patients atteints de SLA développent progressivement une perte de poids, subissent une perte de force musculaire qui s'accompagne d'une atrophie et d'une paralysie progressive. Au-delà de ces symptômes visibles, la dégénérescence des MN et la déstabilisation des JNM sont des caractéristiques clefs de cette pathologie. Les souris *Sod1^{G86R}* qui récapitulent la totalité de ces stigmates, développent les premiers symptômes visibles aux alentours de 90 jours puis s'intensifient et provoquent la mort des animaux aux alentours de 105 jours. Pour déterminer si le TMZ serait capable d'influencer la progression de la maladie, nous avons réalisé une première étude à un stade présymptomatique et collectés les tissus pour des analyses biochimiques et immunohistochimiques. Les paramètres tels que le poids et la force musculaire ont été évalués de 60 à 95 jours. Les souris non-transgéniques (nTg) sont significativement plus massives que les souris transgéniques *Sod1^{G86R}* (Tg) (différence non représentée). Au cours du temps, il n'existe aucune différence de poids entre les souris Tg Veh ou TMZ (**figure 1A**). Cependant, entre 88 et 95 jours une perte significative de force musculaire est constatée de 16,68% chez les souris Tg Veh par rapport aux souris Tg TMZ (**figure 1B**). Enfin, le TMZ décale significativement l'apparition des premiers symptômes des souris Tg en comparaison aux souris Tg Veh (p-valeur=0,0473) (**figure 1C**).

À la suite des effets positifs du traitement sur la force musculaire, nous nous sommes intéressés à l'impact du TMZ sur la dégénérescence des MN et des JNM. En effet, une perte significative de MN est observée à 95 jours dans la corne ventrale de la moelle épinière lombaire des souris *Sod1^{G86R}* (Henriques et al., 2017). En comparaison avec les souris nTg Veh (12,48 ± 1,54), 45,4% des MN sont perdus chez les souris Tg Veh (6,82 ± 0,29) à cet âge (**Figure 1E**). Aucune différence significative n'est observée entre les groupes nTg. Aucune perte n'est constatée chez les souris Tg TMZ (11,76 ± 1,75) par rapport aux souris nTg TMZ (12,15 ± 2,54). Le nombre de MN est significativement plus élevé chez les souris Tg TMZ (11,76 ± 1,75) que les souris Tg Veh (6,82 ± 0,29) (**Figure 1E**). Nous nous sommes intéressés ensuite à l'extrémité distale de l'axe moteur : l'innervation des JNM. Comme le montre la **figure 1G**, aucune différence d'innervation des JNM n'est observée entre les groupes nTg Veh et TMZ. 49,5% des JNM sont dénervées chez les souris Tg Veh (46,16 ± 8,53) par rapport aux souris nTg Veh (90,96 ± 1,3). A l'inverse, aucune différence significative n'est constatée chez les souris Tg TMZ (77,11 ± 1,7) par rapport aux souris nTg TMZ (88,45 ± 0,63). L'innervation des JNM est significativement plus

élevée chez les souris Tg TMZ (77,11 ± 1,7) par rapport aux souris Tg Veh (46,16 ± 8,53). L'administration d'un traitement au TMZ à un stade présymptomatique de la maladie (80 jours) permet de préserver le nombre de MN ainsi que l'intégrité de l'innervation des JNM.

En parallèle du suivi longitudinal, nous avons mené des études électrophysiologiques dans le muscle tibial antérieur pour évaluer les effets potentiels du traitement sur la dénervation musculaire (**figure 2A)**. Avant traitement (78 jours), aucune dénervation musculaire n'est détectée dans les groupes de souris Tg traitées ou non (**figure 2B**). A 93 jours, ~62% des souris Tg Veh ont de l'activité électrique spontanée, synonyme de dénervation musculaire. A l'inverse, aucune souris Tg TMZ ne développe de dénervation musculaire. A l'issue de ces enregistrements électromyographiques, nous avons quantifié les marqueurs de dénervation (AchR α et γ) dans le muscle qui a été évalué physiologiquement. Aucune différence d'expression d'AchR α n'est observée entre les groupes de souris nTg traitées (1,1 ± 0,24) ou non (0,99 ± 0,2). Dans le muscle des souris Tg Veh (40,53 ± 23,35), l'expression d'AchR α est 40x plus élevée par rapport aux souris nTg Veh (0,99 ± 0,2). Pour les souris Tg TMZ (4,43 ± 2,27), l'expression d'AchR α est significativement plus réduite par rapport aux souris Tg Veh (40,53 ± 23,35) (**Figure 2C**). Concernant l'expression d'AchR γ, aucune différence statistiquement n'est observée entre les groupes mais une tendance à l'augmentation est notée chez les souris Tg Veh (62,61 ± 51,96) (**Figure 2D**). Ces données montrent que le TMZ prévient de la dénervation musculaire ainsi que la surexpression des marqueurs de dénervation associés dans le muscle tibial antérieur des souris *Sod1*^{G86R}.

Les effets bénéfiques du traitement obtenus lors de l'étude à un stade présymptomatique, nous ont menés à tester le TMZ à un stade symptomatique de la maladie pour évaluer son effet sur la survie des souris Sod*1*^{G86R}. Dans les mêmes conditions de traitement, les mesures de poids et de force musculaire ont été poursuivis jusqu'au stade final de chaque animal selon des critères éthiques validés (cf matériel et méthodes). Les souris nTg sont significativement plus massives que les souris Tg. Au cours du temps, il n'y a pas de différence significative de poids entre les souris Tg Veh et TMZ. Toutefois, la perte de poids débute à 98 jours et s'accentue de 34,65% jusqu'à 120 jours dans les groupes Tg Veh et TMZ (**Figure 3A**). La **figure 3B** ne montre aucune différence notable de force musculaire entre les deux groupes de souris Tg. Cependant, les deux groupes commencent à perdre de la force musculaire entre 90 et 95 jours pour ensuite s'aggraver jusqu'au stade final avec une perte de 87,4% et de 78,6% pour les souris Tg Veh et TMZ respectivement. Enfin, la survie des souris Tg TMZ n'est pas augmentée par rapport aux souris Tg Veh (**figure 3C**). Dans cette étude, le traitement à la TMZ ne permet pas d'améliorer les fonctions motrices et l'espérance de vie des souris *Sod1*^{G86R}.

3.2 La TMZ module le métabolisme énergétique des fibres musculaires des souris Sod1^{G86R}

Nous savons que le métabolisme énergétique est un paramètre important dans la progression de la pathologie. En effet, il est connu que les muscles squelettiques à prédominance glycolytique sont vulnérables et qu'un remodelage du profil métabolique des unités motrices est observé tout au long de la pathologie (Deforges et al., 2009; Hegedus et al., 2008; Kanning et al., 2010; Palamiuc et al., 2015). Tout d'abord, l'expression de *Pdk4* est significativement augmentée de 2,5 fois dans le muscle glycolytique TA des souris Tg Veh par rapport aux souris nTg Veh. L'expression de *Pdk4* est significativement diminuée chez les souris Tg TMZ par rapport aux souris Tg Veh. Cette induction n'est pas retrouvée chez les souris Tg TMZ qui ont des niveaux d'expression de *Pdk4* similaires aux souris nTg TMZ (**figure 4A**). Puis, nous avons quantifié l'expression de *Foxo1*, *PPAR* et *PGC1*, des facteurs de transcription qui régulent l'expression de *Pdk4*. Comme le montre la **figure 4B**, aucune différence d'expression de *Foxo1* n'est constatée mise à part dans le groupe des souris Tg Veh où l'expression de *Foxo1* est significativement doublée par rapport au groupe nTg Veh. Aucune différence significative n'est constatée pour l'expression de *PPAR* et de *PGC1* entre les groupes (**figure 4C-D**). L'expression de la *Pfk1* (phosphofructokinase, enzyme de la glycolyse) tend à diminuer chez les souris Tg veh et est significativement diminuée de moitié chez les souris Tg TMZ (**figure 4E**). Enfin, une tendance à la diminution de l'expression de la *CS* est notée chez les souris Tg TMZ (**figure 4F**). Ainsi, la TMZ semble limiter la surexpression de *Pdk4* et de *Foxo1*, connus pour engendre le déséquilibre de la balance glycolyse/β-oxydation dans le muscle glycolytique TA des souris *Sod1^{G86R}*.

Nous avons ensuite déterminé le profil métabolique du muscle TA en quantifiant l'expression des chaînes lourdes de myosine (*MyHC*) qui est altérée dans le modèle *SOD1^{G93A}* (Deforges et al., 2009; Desseille et al., 2017; Hegedus et al., 2008; Scaricamazza et al., 2020). Cela nous permet de savoir si le TMZ permet d'empêcher le changement de statut métabolique des fibres musculaires dont nous savons que les muscles à prédominance glycolytique progressent au fur et à mesure que la maladie se développe vers un profil énergétique de type oxydatif (Desseille et al., 2017; Scaricamazza et al., 2020). Aucune différence significative n'est à noter pour l'expression des *MyHC* de type I et IIx/d dans les quatre groupes (**figure 5A et 5D**). Cependant, l'expression de *MyHC IIa*, un marqueur des fibres oxydatives, est 3 fois plus élevée chez les souris Tg Veh comparée aux souris nTg Veh. A l'inverse, l'expression de *MyHC IIa* est significativement diminuée chez les souris Tg TMZ par rapport aux souris Tg Veh **(figure 5B)**. Enfin, l'expression de *MyHC IIb*, un marqueur des fibres glycolytiques, est significativement réprimée de 50% chez les souris Tg Veh en comparaison avec les souris nTg Veh. Enfin, l'expression de *MyHC IIb* est significativement supérieure chez les souris Tg TMZ par rapport aux souris Tg Veh mais comparable aux niveaux d'expression des groupes nTg traités ou non (**figure 5C)**.

Finalement, le TMZ limite la dérégulation des myosines de type MyHC IIa et IIb suggérant le maintien du statut métabolique du muscle glycolytique TA durant la progression de la maladie chez les souris *Sod1*^{G86R}.

3.3 La TMZ facilite la récupération motrice d'un modèle de compression du nerf sciatique et favorise la pousse axonale in vitro

Précédemment, nous avons montré des effets remarquables du TMZ sur l'axe moteur des souris *Sod1*^{G86R} avec un nombre de MN et un taux d'innervation des JNM. Nous suggérons que ces effets sont dus à la capacité du TMZ à promouvoir la réinnervation des unités motrices en condition pathologique. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé une étude dose-réponse *in vitro* utilisant une culture primaire de MN spinaux et une étude dose-réponse *in vivo* utilisant un modèle de compression nerveuse chez des souris nTg. Après une intoxication de 5µM de glutamate, une diminution d'environ 40% de de l'intégrité du réseau neuritique (**figure 6A)** et du nombre de MN (**figure 6B)** est constatée par rapport à la situation contrôle. Après un traitement au TMZ, le pourcentage d'intégrité du réseau neuritique est significativement préservé pour les concentrations 3nM et 10nM. En revanche, l'effet n'est pas retrouvé avec des concentrations plus élevées (**figure 6A)**. Concernant la survie neuronale, la TMZ à raison de 3nM, 10nM, 30nM et 100nM protège significativement les MN de la toxicité au glutamate avec un taux de survie supérieur à 75%. Au-delà de 100nM, le TMZ n'a plus d'effet sur la survie des MN en culture (**figure 6B)**. Dans un étude dose-réponse *in vivo*, nous avons évalué le potentiel de réinnervation du TMZ sur la récupération motrice fonctionnelle après l'écrasement du nerf sciatique de souris nTg. Après la lésion, le poids et la force musculaire ont été mesurés quotidiennement. La **figure 6C** ne montre aucune différence significative de poids corporel entre les traitements. Dès le 9ème jour, la force musculaire est significativement améliorée au cours du temps chez les souris nTg TMZ par rapport au groupe Veh (**figure 6D**). Au 12ème jour, le taux d'innervation des JNM est significativement plus élevé chez les souris nTg TMZ (64,43 ± 6,44) que les souris nTg Veh (27,14 ± 7,34) (**figure 6E**). En association avec ces résultats, nous avons également quantifié l'expression de différents marqueurs de dénervation, d'atrophie musculaire et métaboliques. En effet, le rapport d'expression est significativement induit de 70 et 20 fois pour les marqueurs de dénervation *AchR α* et *Musk* chez les souris nTg Veh par rapport aux souris nTg TMZ (**figure 6F**). L'expression des marqueurs d'atrophie tels que *Murf* et *Atg* est significativement augmentée de 4 et 6 fois respectivement chez les souris nTg Veh (**figure 6G**). Enfin, l'induction des marqueurs métaboliques *Pdk4*, *Foxo1* et *PPAR* est significativement accentuée de 6, 2, 2,5 et 3 fois chez les souris nTg Veh comparée au groupe TMZ (**figure 6H**). De plus, nous montrons une force musculaire supérieure au 12ème jour dans le groupe recevant une dose de TMZ à 5mg/kg/j comparée aux souris nTg Veh et aucun effet n'a été observé avec la dose à 50mg/kg/jour (**figure supplémentaire 1**). La TMZ améliore la

récupération motrice fonctionnelle au cours du temps tout en limitant la surexpression des différents marqueurs de dénervation, d'atrophie musculaire et métabolique dans le muscle TA par rapport aux souris nTg Veh.

4. DISCUSSION

Au cours de la SLA, les patients développent des symptômes moteurs sévères associés à une paralysie progressive généralisée aboutissant à leur décès, généralement par détresse respiratoire. De plus, deux tiers des patients atteints de SLA sont hypermétaboliques bien avant tout symptôme moteur observable. Cet hypermétabolisme est défini comme un facteur de risque dans l'évolution de la SLA (Jésus et al., 2018; Steyn et al., 2018). Les déséquilibres métaboliques observés dans la SLA représentent un enjeu majeur dans la pronostic et le diagnostic de la maladie. Bien que de nombreuses molécules aient montré des effets bénéfiques dans les recherches précliniques sur les modèles animaux, seul le Riluzole est autorisé dans le traitement de la SLA pour ses effets positifs chez les patients.

Dans cette étude, nous montrons l'intérêt d'agir sur le métabolisme énergétique des souris *Sod1*^{G86R} à l'aide de la trimétazidine (TMZ), une molécule approuvée par l'EMA pour le traitement des angines de poitrine. La TMZ est un modulateur métabolique utilisé dans les cardiomyopathies et qui est intéressant pour ses propriétés sur le métabolisme énergétique du myocarde notamment. Par son action inhibitrice sur l'enzyme 3-kétoacyl thiolase, la TMZ inhibe l'oxydation des acides gras (β-oxydation) et stimule le métabolisme du glucose (Guarini et al., 2018; Marzilli et al., 2019). D'autres études ont également souligné l'action bénéfique du TMZ sur la fonction mitochondriale (Argaud et al., 2005 ; Dedkova et al., 2013 ; Meng et al., 2006), mis en évidence des propriétés antioxydantes (Dhote and Balaraman, 2008) en limitant la production de ROS et en supprimant la réponse inflammatoire (Kuralay et al., 2006; Martins et al., 2012), altérations caractéristiques de la SLA. Ainsi, l'intérêt du repositionnement du TMZ dans le contexte de la SLA est justifié dans le but de retarder au maximum son développement. Bien que nous révélions que le TMZ n'affecte pas la survie des souris *Sod1*^{G86R}, nous montrons que l'administration de TMZ à un stade présymptomatique (80 jours) apporte des effets bénéfiques tant sur le plan moteur que métabolique. En effet, le TMZ retarde significativement la perte de force musculaire des souris *Sod1*^{G86R} au cours du temps. Des études ont montré l'efficacité du TMZ sur les performances motrices dans des modèles animaux de sarcopénie ou de vieillissement (Ferraro et al., 2016; Molinari et al., 2017). En effet, le TMZ améliore le fonctionnement des muscles squelettiques en augmentant la force musculaire (Ferraro et al., 2016) et empêchant l'épuisement musculaire causé par le phénotype de cachexie (Molinari et al., 2017). De plus, le TMZ améliore le métabolisme énergétique et la biogénèse mitochondriale des muscles squelettiques (Ferraro et al., 2016; Molinari et al., 2017). En inhibant la β-oxydation, le TMZ limite le

muscle squelettique à utiliser les acides gras comme source d'énergie principale, et stimule l'utilisation du glucose augmentant ainsi les performances contractiles du muscle squelettique. En 2003, Lopaschuk et ses collègues montrent que le TMZ améliore la fonction du myocarde après l'induction d'une hypoxie transitoire (Lopaschuk et al., 2003). Ainsi, cela pourrait expliquer l'effet du TMZ sur la force musculaire des souris *Sod1*^{G86R}. Dans la SLA, la perte de la flexibilité métabolique du muscle squelettique est connue pour participer activement au développement de la maladie (Palamiuc et al., 2015; Scaricamazza et al., 2020). En effet, l'enzyme PDK4 qui joue un rôle crucial dans la régulation des voies glycolytiques et oxydatives est particulièrement dérégulée dans le muscle squelettique des souris SLA (Palamiuc et al., 2015; Scaricamazza et al., 2020). Cibler cette enzyme permettrait d'empêcher le déséquilibre énergétique qui pourrait accélérer le changement de type de fibre musculaire et le développement de l'atrophie musculaire. Nos résultats indiquent que le TMZ empêche la surexpression de *Pdk4* et *Foxo1*, un facteur de transcription directement lié à PDK4. Nous montrons également que l'expression des fibres glycolytiques de types IIb est préservée par le traitement et que celle des fibres oxydatives de type IIa n'est pas induite comme chez les souris *Sod1*^{G86R} non traitées. Au cours de la SLA, les muscles à prédominance glycolytique sont particulièrement affectés et la proportion du type de fibres oxydatives devient majoritaire (Scaricamazza et al., 2020). A ce stade, nous suggérons que le TMZ retarde le déséquilibre énergétique dans le muscle des souris *Sod1*^{G86R} en assurant une utilisation optimale du glucose comme source d'énergie, retardant le déclin des performances motrices. Cependant, l'effet bénéfique qu'exerce le TMZ sur le muscle squelettique peut s'expliquer par la flexibilité métabolique du muscle, capable de passer d'un substrat à un autre. Seulement, le tissu nerveux ne possède pas cette faculté d'adaptation et laisse ainsi penser que l'action du TMZ sur la β-oxydation ne peut expliquer à elle seule son effet neuroprotecteur des MN et des JNM observé dans cette étude.

De ces effets bénéfiques sur les performances motrices, nous nous sommes intéressés aux effets du TMZ sur l'axe moteur de ces mêmes souris. En effet, le TMZ empêche la mort des MN, préserve l'intégrité de l'innervation des JNM reflétant son action protectrice sur la dénervation musculaire retrouvée dans le modèle murin *Sod1*^{G86R}. Ces résultats peuvent être expliqués par la capacité antiinflammatoire (Hohensinner et al., 2021; Kuralay et al., 2006; Martins et al., 2012; Wan et al., 2017), antioxydante (Satyanarayana and Chopra, 2002; Wan et al., 2017) et/ou la capacité de stimuler l'autophagie (Ferraro et al., 2013; Yang et al., 2019) qu'aurait la TMZ sur le modèle Sod*1*^{G86R}. En effet, une production accrue de ROS serait associée au phénomène de dénervation musculaire qui serait ainsi défavorable à la survie des JNM et des MN (Muller et al., 2007; Qiu et al., 2018). Cependant, aucune de nos données pour le moment ne peut répondre à ces interrogations ce qui nécessite plus d'investigations sur ce sujet. Toutefois, les effets bénéfiques du TMZ constatés sur le déclin des

fonctions motrices des souris *Sod1*^{G86R} pourraient provenir d'un retard de déstabilisation de la JNM. Dans la SLA, la dégénérescence de l'axe moteur peut s'expliquer par le phénomène de « dying-back » (Dadon-Nachum et al., 2011). En effet, de nombreuses preuves affirment que le démantèlement des JNM précède la rétractation des axones distaux et ensuite survient la mort du soma des MN spinaux des souris *SOD1*^{G93A} (Clarke, 1996; Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Gurney et al., 1994; Ngo et al., 2012; Pun et al., 2006; Vinsant et al., 2013). En revanche, même si le TMZ protège les MN et préserve les JNM de la dénervation, il ne permet pas d'éviter la mort des souris *Sod1*^{G86R}. De même qu'il a déjà été montré que préserver les soma des MN n'était pas suffisant pour empêcher la mort des animaux car la stabilisation des JNM n'est plus assurée, connue pour être un des premiers événements dans la SLA (Rouaux et al., 2007). Une des raisons possibles qui peut expliquer les effets bénéfiques du TMZ sur l'axe moteur est la capacité de la molécule à promouvoir la réinnervation et la plasticité axonale pour compenser la dénervation des unités motrices lorsque la maladie se développe. Lors d'événements pathologiques, certains types de motoneurones ont la capacité de bourgeonner pour contacter des fibres musculaires dépourvues d'innervation. Dans la SLA, c'est le cas des MN FR et S qui peuvent réinnerver des unités motrices délaissées par les MN FF qui ont dégénérés et qui n'ont pas cette faculté (Duchen, 1973; Frey et al., 2000; Schaefer et al., 2005). Comme chez les patients SLA, cette faculté de réinnervation des MN FR et S est également retrouvée chez les souris *SOD1*^{G93A} (Fischer et al., 2004).

Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué d'une part, une étude *in vivo* qui évalue l'effet du TMZ sur la récupération motrice fonctionnelle dans un modèle de compression nerveuse ; et d'autre part, une étude *in vitro* qui détermine la capacité qu'a le TMZ sur la survie et le réseau neuritique des motoneurones en culture. Nos résultats montrent une récupération motrice fonctionnelle significativement améliorée et un taux d'innervation des JNM supérieur dans le groupe TMZ par rapport au groupe non traité. La quantification de l'innervation des JNM montre que le TMZ favorise une meilleure réinnervation musculaire comparée au groupe véhicule. En parallèle de ces effets, nous avons évalué l'expression relative des marqueurs de dénervation (*AchRα, AchRγ, Musk*), d'atrophie musculaire (*Murf, Atg*) et métaboliques (*Pdk4, Foxo1, PPAR*) dans les muscles tibial antérieur (ipsilatéral/controlatéral). Lors de phénomènes de dénervation et d'atrophie musculaire comme ici, une induction des marqueurs *AchR α* (Duclert and Changeux, 1995) et *Atg* (Pinheiro-Dardis et al., 2017) est constatée. De plus, l'expression de *Musk* qui joue un rôle dans le développement et la stabilisation des JNM (Sanes and Lichtman, 2001) est également augmentée dans le groupe véhicule par rapport au groupe TMZ. Cela suggère que le TMZ a la capacité de promouvoir la réinnervation musculaire chez des souris nTg après une compression du nerf sciatique. Ce phénomène de réinnervation axonale induit par le TMZ a également été associé à un processus de remyélinisation amélioré dans un modèle

de rat ayant subi l'écrasement du nerf sciatique (Karahan et al., 2019; Serarslan et al., 2009). Nous l'avons évoqué plus haut, le TMZ stimule l'autophagie ce qui pourrait expliquer l'élimination des débris cellulaires au site de lésion qui entraverait la remyélinisation faite par les cellules de Schwann. Toutefois, nous n'avons actuellement aucune donnée qui permet d'étayer cette piste mais nécessiterait qu'on s'y intéresse. Enfin, l'étude *in vitro* réalisée avec des MN en culture montre la capacité de régénération axonale et de protection motoneuronale à certaines doses de TMZ après une intoxication au glutamate. Par conséquent, ces données appuient les propriétés bénéfiques sur la plasticité axonale du TMZ tant *in vitro* qu'*in vivo*.

5. CONCLUSION

L'ensemble de cette étude met en avant les propriétés intéressantes du TMZ sur l'axe moteur mais aussi sur le métabolisme énergétique des souris *Sod1*^{G86R}. Ces travaux montrent que le TMZ ralentit l'apparition des symptômes moteurs en préservant un nombre de MN similaire au groupe contrôle et protège les JNM de la dénervation musculaire. En outre, la capacité du TMZ à favoriser la réinnervation axonale montre tout l'intérêt d'utiliser le TMZ dans le contexte de la SLA. Même si ce traitement n'améliore pas la survie du modèle murin *Sod1*^{G86R}, qui a un phénotype sévère et rapide, l'intérêt d'utiliser cette molécule dans d'autres modèles animaux de SLA à développement plus modéré est justifié. Toutefois, les mécanismes sous-tendant les effets bénéfiques du TMZ ne sont aujourd'hui toujours pas compris. Cependant, nous suggérons qu'une prise en charge précoce du métabolisme énergétique du muscle squelettique permettrait de préserver la jonction neuromusculaire de la dénervation et ainsi ralentir au maximum le développement de la SLA.

6. RÉFÉRENCES

Argaud, L., Gomez, L., Gateau-Roesch, O., Couture-Lepetit, E., Loufouat, J., Robert, D., and Ovize, M. (2005). Trimetazidine inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and prevents lethal ischemia-reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol 39, 893–899.

Belli, R., Bonato, A., De Angelis, L., Mirabilii, S., Ricciardi, M.R., Tafuri, A., Molfino, A., Leigheb, M., Costelli, P., Caruso, M., et al. (2019). Metabolic Reprogramming Promotes Myogenesis During Aging. Front. Physiol. 10, 897.

Bouteloup, C., Desport, J.-C., Clavelou, P., Guy, N., Derumeaux-Burel, H., Ferrier, A., and Couratier, P. (2009). Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. J Neurol 256, 1236–1242.

Brooks, B.P., and Fischbeck, K.H. (1995). Spinal and bulbar muscular atrophy: a trinucleotide-repeat expansion neurodegenerative disease. Trends in Neurosciences 18, 459–461.

Bruijn, L.I., Miller, T.M., and Cleveland, D.W. (2004). Unraveling The Mechanisms Involved In Motor Neuron Degeneration In ALS. Annu. Rev. Neurosci. 27, 723–749.

Clarke, B. (1996). Ranolazine Increases Active Pyruvate Dehydrogenase in Perfused Normoxic Rat Hearts: Evidence for an Indirect Mechanism. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 28, 341–350.

Cleveland, D.W., and Rothstein, J.D. (2001). From charcot to lou gehrig: deciphering selective motor neuron death in als. Nat Rev Neurosci 2, 806–819.

Dadon-Nachum, M., Melamed, E., and Offen, D. (2011). The “Dying-Back” Phenomenon of Motor Neurons in ALS. J Mol Neurosci 43, 470–477.

DeAngelo, A.B., George, M.H., and House, D.E. (1999). Hepatocarcinogenicity In The Male B6c3f1 Mouse Following A Lifetime Exposure To Dichloroacetic Acid In The Drinking Water: Dose-Response Determination And Modes Of Action. Journal of Toxicology and Environmental Health 58, 485–507.

Dedkova, E.N., Seidlmayer, L.K., and Blatter, L.A. (2013). Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure. J Mol Cell Cardiol 59, 41–54.

Deforges, S., Branchu, J., Biondi, O., Grondard, C., Pariset, C., Lécolle, S., Lopes, P., Vidal, P.-P., Chanoine, C., and Charbonnier, F. (2009). Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Motoneuron activation and neuroprotection in ALS mice. The Journal of Physiology 587, 3561–3572.

Desport, J.C., Preux, P.M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J.M., Beaufrère, B., and Couratier, P. (2001). Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. The American Journal of Clinical Nutrition 74, 328–334.

Desport, J.-C., Torny, F., Lacoste, M., Preux, P.-M., and Couratier, P. (2005). Hypermetabolism in ALS: Correlations with Clinical and Paraclinical Parameters. Neurodegener Dis 2, 202–207.

Desseille, C., Deforges, S., Biondi, O., Houdebine, L., D’amico, D., Lamazière, A., Caradeuc, C., Bertho, G., Bruneteau, G., Weill, L., et al. (2017). Specific Physical Exercise Improves Energetic Metabolism in the Skeletal Muscle of Amyotrophic-Lateral- Sclerosis Mice. Front. Mol. Neurosci. 10, 332.

Dhote, V., and Balaraman, R. (2008). Anti-oxidant activity mediated neuroprotective potential of trimetazidine on focal cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 35, 630–637.

Duchen, L.W. (1973). The effects of tetanus toxin on the motor end-plates of the mouse. An electron microscopic study. J Neurol Sci 19, 153–167.

Duclert, A., and Changeux, J.P. (1995). Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. Physiological Reviews 75, 339–368.

Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., de Aguilar, J.-L.G., and Loeffler, J.-P. (2004). 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 101, 11159–11164.

Dupuis, L., Corcia, P., and Fergani, A. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. 7.

Dupuis, L., Pradat, P.-F., Ludolph, A.C., and Loeffler, J.-P. (2011). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet Neurology 10, 75–82.

van Es, M.A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R.J., Veldink, J.H., and van den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet 390, 2084–2098.

Fayemendy, P., Marin, B., Labrunie, A., Boirie, Y., Walrand, S., Achamrah, N., Coëffier, M., Preux, P.-M., Lautrette, G., Desport, J.-C., et al. (2021). Hypermetabolism is a reality in amyotrophic lateral sclerosis compared to healthy subjects. Journal of the Neurological Sciences 420, 117257.

Ferraro, E., Giammarioli, A.M., Caldarola, S., Lista, P., Feraco, A., Tinari, A., Salvatore, A.M., Malorni, W., Berghella, L., and Rosano, G. (2013). The metabolic modulator trimetazidine triggers autophagy and counteracts stress-induced atrophy in skeletal muscle myotubes. FEBS J 280, 5094–5108.

Ferraro, E., Pin, F., Gorini, S., Pontecorvo, L., Ferri, A., Mollace, V., Costelli, P., and Rosano, G. (2016). Improvement of skeletal muscle performance in ageing by the metabolic modulator Trimetazidine: Metabolism remodeling in skeletal muscle. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 7, 449–457.

Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., and Glass, J.D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. Experimental Neurology 185, 232–240.

Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., and Caroni, P. (2000). Early and Selective Loss of Neuromuscular Synapse Subtypes with Low Sprouting Competence in Motoneuron Diseases. J. Neurosci. 20, 2534–2542.

Funalot, B., Desport, J.-C., Sturtz, F., Camu, W., and Couratier, P. (2009). High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis 10, 113–117.

Guarini, G., Huqi, A., Morrone, D., Giuseppina Capozza, P.F., Marzilli, M., Cardiovascular Medicine Division, Cardiothoracic and Vascular Department, University of Pisa, Italy, Giuseppina Capozza, P.F., Cardiovascular Medicine Division, Cardiothoracic and Vascular Department, University of Pisa, Italy, Marzilli, M., and Cardiovascular Medicine Division, Cardiothoracic and Vascular Department, University of Pisa, Italy (2018). Trimetazidine and Other Metabolic Modifiers. European Cardiology Review 13, 1.

Gurney, M., Pu, H., Chiu, A., Dal Canto, M., Polchow, C., Alexander, D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y., Deng, H., et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science 264, 1772–1775.

Hegedus, J., Putman, C.T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Motor units in mouse ALS. The Journal of Physiology 586, 3337–3351.

Henriques, A., Huebecker, M., Blasco, H., Keime, C., Andres, C.R., Corcia, P., Priestman, D.A., Platt, F.M., Spedding, M., and Loeffler, J.-P. (2017). Inhibition of β-Glucocerebrosidase Activity Preserves Motor Unit Integrity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Sci Rep 7, 5235.

Hohensinner, P.J., Lenz, M., Haider, P., Mayer, J., Richter, M., Kaun, C., Goederle, L., Brekalo, M., Salzmann, M., Sharma, S., et al. (2021). Pharmacological inhibition of fatty acid oxidation reduces atherosclerosis progression by suppression of macrophage NLRP3 inflammasome activation. Biochemical Pharmacology 190, 114634.

Jésus, P., Fayemendy, P., Nicol, M., Lautrette, G., Sourisseau, H., Preux, P.-M., Desport, J.-C., Marin, B., and Couratier, P. (2018). Hypermetabolism is a deleterious prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurol 25, 97–104.

Kanning, K.C., Kaplan, A., and Henderson, C.E. (2010). Motor Neuron Diversity in Development and Disease. Annu. Rev. Neurosci. 33, 409–440.

Kantor, P.F., Lucien, A., Kozak, R., and Lopaschuk, G.D. (2000). The Antianginal Drug Trimetazidine Shifts Cardiac Energy Metabolism From Fatty Acid Oxidation to Glucose Oxidation by Inhibiting Mitochondrial Long-Chain 3-Ketoacyl Coenzyme A Thiolase. Circulation Research 86, 580–588.

Karahan, G., Kaya, H., Erdogan, M.A., Yigitturk, G., Gokyayla, E., and Erbas, O. (2019). Effects of trimetazidine on nerve regeneration in a rat sciatic nerve injury model. BLL 120, 777–782.

Kuralay, F., Altekin, E., Yazlar, A.S., Onvural, B., and Goldeli, O. (2006). Suppression of Angioplasty-Related Inflammation by Pre-Procedural Treatment with Trimetazidine. Tohoku J. Exp. Med. 208, 203–212.

Lopaschuk, G.D., Barr, R., Thomas, P.D., and Dyck, J.R.B. (2003). Beneficial Effects of Trimetazidine in Ex Vivo Working Ischemic Hearts Are Due to a Stimulation of Glucose Oxidation Secondary to Inhibition of Long-Chain 3-Ketoacyl Coenzyme A Thiolase. Circulation Research 93.

Martinou, J.C., Martinou, I., and Kato, A.C. (1992). Cholinergic differentiation factor (CDF/LIF) promotes survival of isolated rat embryonic motoneurons in vitro. Neuron 8, 737–744.

Martins, G.F., Assunção, C., Vieira, F.B., Valência, A., de Carvalho, K.G., and Jessen, B. (2012). Trimetazidine and Inflammatory Response in Coronary Artery Bypass Grafting. 9.

Marzilli, M., Vinereanu, D., Lopaschuk, G., Chen, Y., Dalal, J.J., Danchin, N., Etriby, E., Ferrari, R., Gowdak, L.H., Lopatin, Y., et al. (2019). Trimetazidine in cardiovascular medicine. Int J Cardiol 293, 39–44.

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

Meng, D., Feng, L., Chen, X.-J., Yang, D., and Zhang, J.-N. (2006). Trimetazidine improved Ca2+ handling in isoprenaline-mediated myocardial injury of rats. Exp Physiol 91, 591–601.

Molinari, F., Pin, F., Gorini, S., Chiandotto, S., Pontecorvo, L., Penna, F., Rizzuto, E., Pisu, S., Musarò, A., Costelli, P., et al. (2017). The mitochondrial metabolic reprogramming agent trimetazidine as an 'exercise mimetic' in cachectic C26-bearing mice: Metabolic modulation in cancer cachexia. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 8, 954–973.

Muller, F.L., Song, W., Jang, Y.C., Liu, Y., Sabia, M., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2007). Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 293, R1159–R1168.

Ngo, S.T., Baumann, F., Ridall, P.G., Pettitt, A.N., Henderson, R.D., Bellingham, M.C., and McCombe, P.A. (2012). The relationship between Bayesian motor unit number estimation and histological measurements of motor neurons in wild-type and SOD1G93A mice. Clinical Neurophysiology 123, 2080–2091.

Ngo, S.T., Steyn, F.J., Huang, L., Mantovani, S., Pfluger, C.M.M., Woodruff, T.M., O'Sullivan, J.D., Henderson, R.D., and McCombe, P.A. (2015). Altered expression of metabolic proteins and adipokines in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Journal of the Neurological Sciences 357, 22–27.

Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S.T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J., et al. (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.

Peter, R.S., Rosenbohm, A., Dupuis, L., Brehme, T., Kassubek, J., Rothenbacher, D., Nagel, G., and Ludolph, A.C. (2017). Life course body mass index and risk and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: results from the ALS registry Swabia. Eur J Epidemiol 32, 901–908.

Pinheiro-Dardis, C.M., Erbereli, B.T., Gigo-Benato, D., Castro, P.A.T.S., and Russo, T.L. (2017). Electrical stimulation delays reinnervation in denervated rat muscle: ES and Reinnervation. Muscle Nerve 56, E108–E118.

Pradat, P.-F., Bruneteau, G., Gordon, P.H., Dupuis, L., Bonnefont-Rousselot, D., Simon, D., Salachas, F., Corcia, P., Frochot, V., Lacorte, J.-M., et al. (2010). Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis 11, 166–171.

Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L., and Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. Nat Neurosci 9, 408–419.

Qiu, J., Fang, Q., Xu, T., Wu, C., Xu, L., Wang, L., Yang, X., Yu, S., Zhang, Q., Ding, F., et al. (2018). Mechanistic Role of Reactive Oxygen Species and Therapeutic Potential of Antioxidants in Denervation- or Fasting-Induced Skeletal Muscle Atrophy. Front. Physiol. 9, 215.

Reyes, E.T., Perurena, O.H., Festoff, B.W., Jorgensen, R., and Moore, W.V. (1984). Insulin resistance in amyotrophic lateral sclerosis. Journal of the Neurological Sciences 63, 317–324.

Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., Morrison, J.H., and Gordon, J.W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 92, 689–693.

Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Menger, Y., Boutillier, A.-L., and 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. Journal of Neuroscience 27, 5535–5545.

Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. Nat Rev Neurosci 2, 791–805.

Satyanarayana, P.S.V., and Chopra, K. (2002). Oxidative Stress-mediated Renal Dysfunction By Cyclosporine A In Rats: Attenuation By Trimetazidine. Renal Failure 24, 259–274.

Scaricamazza, S., Salvatori, I., Giacovazzo, G., Loeffler, J.P., Renè, F., Rosina, M., Quessada, C., Proietti, D., Heil, C., Rossi, S., et al. (2020). Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-SOD1G93A Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target. IScience 23, 101087.

Schaefer, A.M., Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2005). A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J. Comp. Neurol. 490, 209–219.

Serarslan, Y., Bal, R., Altug, M.E., Kontaş, T., Keleş, O.N., Unal, D., and Unal, B. (2009). Effects of trimetazidine on crush injury of the sciatic nerve in rats: A biochemical and stereological study. Brain Research 1247, 11–20.

Shu, H., Peng, Y., Hang, W., Zhou, N., and Wang, D.W. (2020). Trimetazidine in Heart Failure. Front Pharmacol 11, 569132.

Steyn, F.J., Ioannides, Z.A., van Eijk, R.P.A., Heggie, S., Thorpe, K.A., Ceslis, A., Heshmat, S., Henders, A.K., Wray, N.R., van den Berg, L.H., et al. (2018). Hypermetabolism in ALS is associated with greater functional decline and shorter survival. J Neurol Neurosurg Psychiatry 89, 1016–1023.

Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Moore, V.D.G., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013). Characterization of early pathogenesis in the SOD1 G93A mouse model of ALS: part I, background and methods. Brain Behav 3, 335–350.

Wan, P., Su, W., Zhang, Y., Li, Z., Deng, C., and Zhuo, Y. (2017). Trimetazidine protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/Ho-1 pathway. Clinical Science 131, 2363–2375.

Wang, W., Li, L., Lin, W.-L., Dickson, D.W., Petrucelli, L., Zhang, T., and Wang, X. (2013). The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. Human Molecular Genetics 22, 4706–4719.

Yang, Y., Li, N., Chen, T., Zhang, C., Liu, L., Qi, Y., and Bu, P. (2019). Trimetazidine ameliorates sunitinib-induced cardiotoxicity in mice via the AMPK/mTOR/autophagy pathway. Pharmaceutical Biology 57, 625–631.

7. FIGURES & LÉGENDES

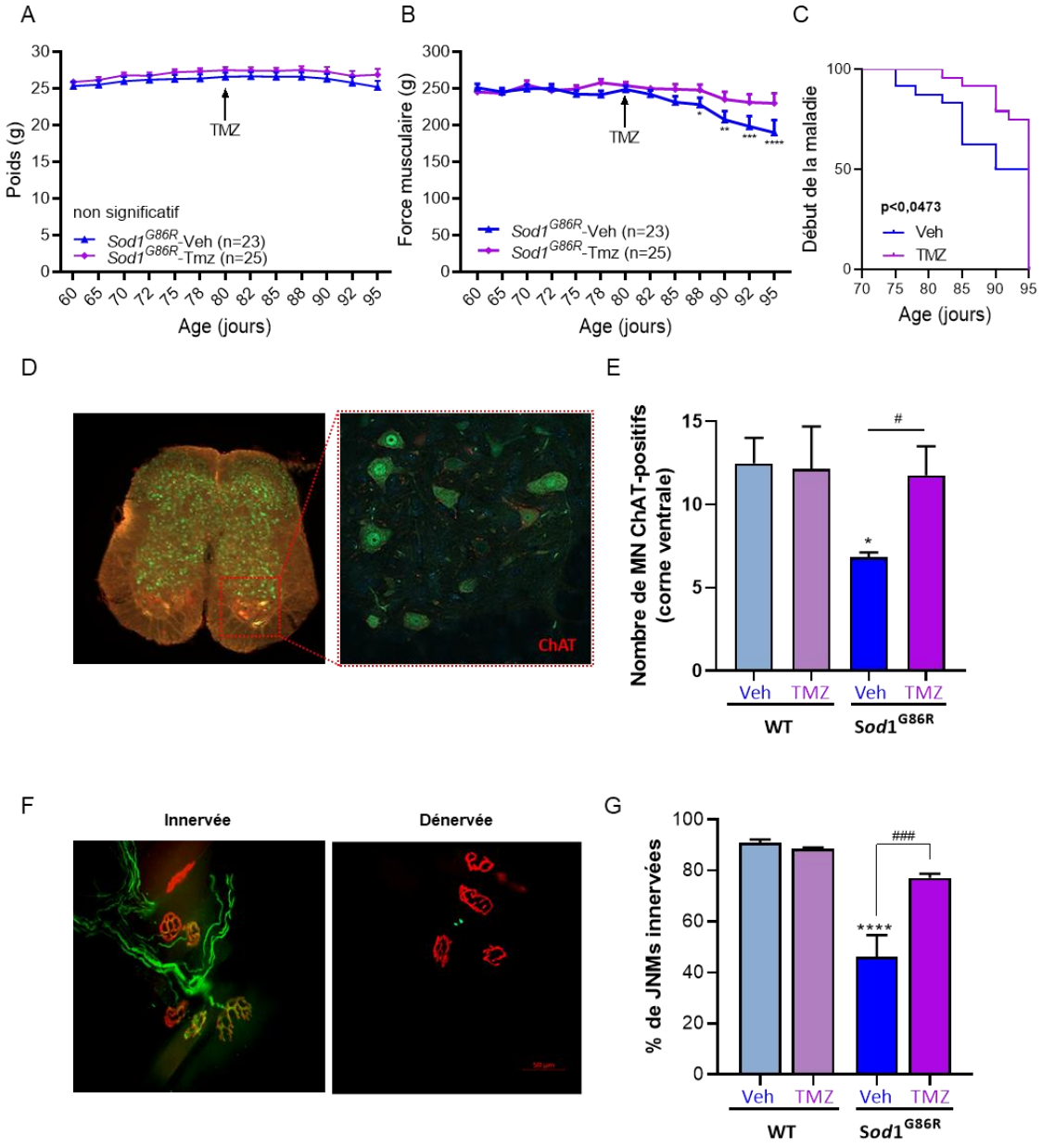


Figure 1: La TMZ améliore les fonctions motrices, préserve l'intégrité des jonctions neuromusculaires et la perte des motoneurones.

(A) *Evolution pondérale des souris Sod1^{G86R} avec ou sans traitement à la TMZ (non significatif ; n=23-25/groupe).* ***(B)*** *Evolution de la force musculaire et* ***(C)*** *du point de départ de la maladie des souris Sod1^{G86R} avec ou sans traitement à la TMZ (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001, Anova à 2 facteurs).* ***(D)*** *Photos représentatives de la section L2-L4 de la moelle épinière après une immunohistochimie avec l'anticorps anti-choline acétyl transférase (ChAT ; en rouge) qui marque les motoneurones (MN). Les MNα se trouvent dans la zone délimitée en pointillée. Barre d'échelle= 100 µm.* ***(E)*** *Quantification des cellules positives pour le marquage ChAT. Seuls les motoneurones ayant une superficie supérieure à 400 µm² ont été comptés (n=5 pour les souris non-transgéniques et n=6 pour les souris transgéniques ; Anova à un facteur).* ***(F)*** *Photos représentatives de jonctions neuromusculaires (JNM) entièrement innervées (image de gauche) et totalement dénervées (image de droite) (α-bungarotoxine (BTX) : en rouge ; neurofilament (NF) et synaptophysine (SYN) : en vert). Barre d'échelle = 50 µm.* ***(G)*** *Pourcentage d'innervation des JNM dans le muscle EDL âgé de 95 jours (n= 8/groupe; ***p<0,001; ****p<0,0001; Anova à un facteur).*

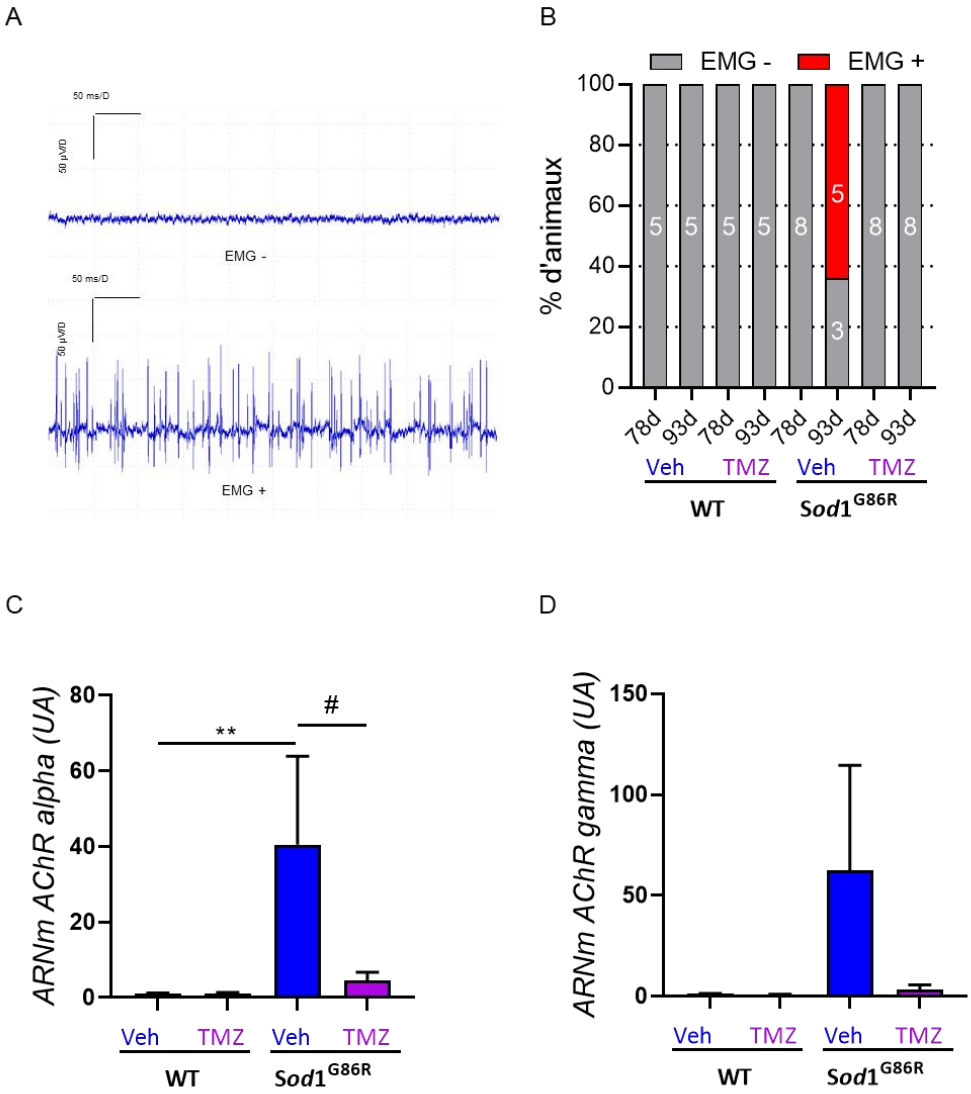


Figure 2 : Dénervation musculaire évitée et surexpression des marqueurs de dénervation limitée dans le muscle tibial antérieur (TA) après un traitement à la TMZ.

(A) *Représentations graphiques des tracés obtenus lors d'un EMG – et d'un EMG + (n=5 pour les souris non-transgéniques et n=8 pour les souris transgéniques).* ***(B)*** *Enregistrements électromyographiques (EMG) réalisés à 78 jours et à 93 jours, soit avant et après traitement. Un EMG qualifié de "positif" représente une activité électrique spontanée mesurée lorsque les pics sont supérieurs à 50µV. Le pourcentage d'animaux développant de l'activité électrique spontanée (EMG +) est représenté pour chaque âge (avant et après traitement). Expression relative des niveaux d'ARNm des marqueurs de dénervation comme la sous-unité α du récepteur à l'acétylcholine (AChRα)* ***(C)*** *et la sous-unité γ du récepteur nicotinique à l'acétylcholine (AChRγ)* ***(D)*** *évaluée par RT-qPCR dans le muscle tibial antérieur âgé de 95 jours. Les valeurs de cette figure sont exprimées en moyenne ± ESM ; n= 5 pour les souris nTg et 8 pour les souris Tg. **p<0,01: p-value nTg vs Tg Veh et #p<0,05 : p-value Tg Veh vs Tg TMZ ; Anova à un facteur.*

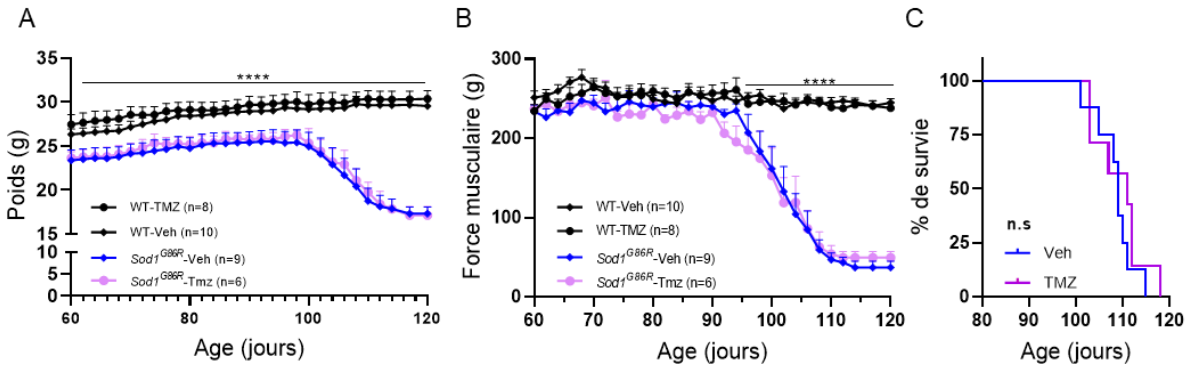


Figure 3 : La trimétazidine n'affecte pas la survie du modèle murin *Sod1^{G86R}*.
(A) *Evolution pondérale et de la force musculaire* ***(B)*** *des souris non-transgéniques et des souris Sod1^{G86R} avec ou sans traitement à la TMZ (non significatif entre les deux groupes de souris Tg ; n=6-9/groupe).* ***(C)*** *Analyse Kaplan-Meier du pourcentage de survie des souris Sod1^{G86R} avec ou sans traitement à la TMZ (non significatif ; n=6-9/groupe).*

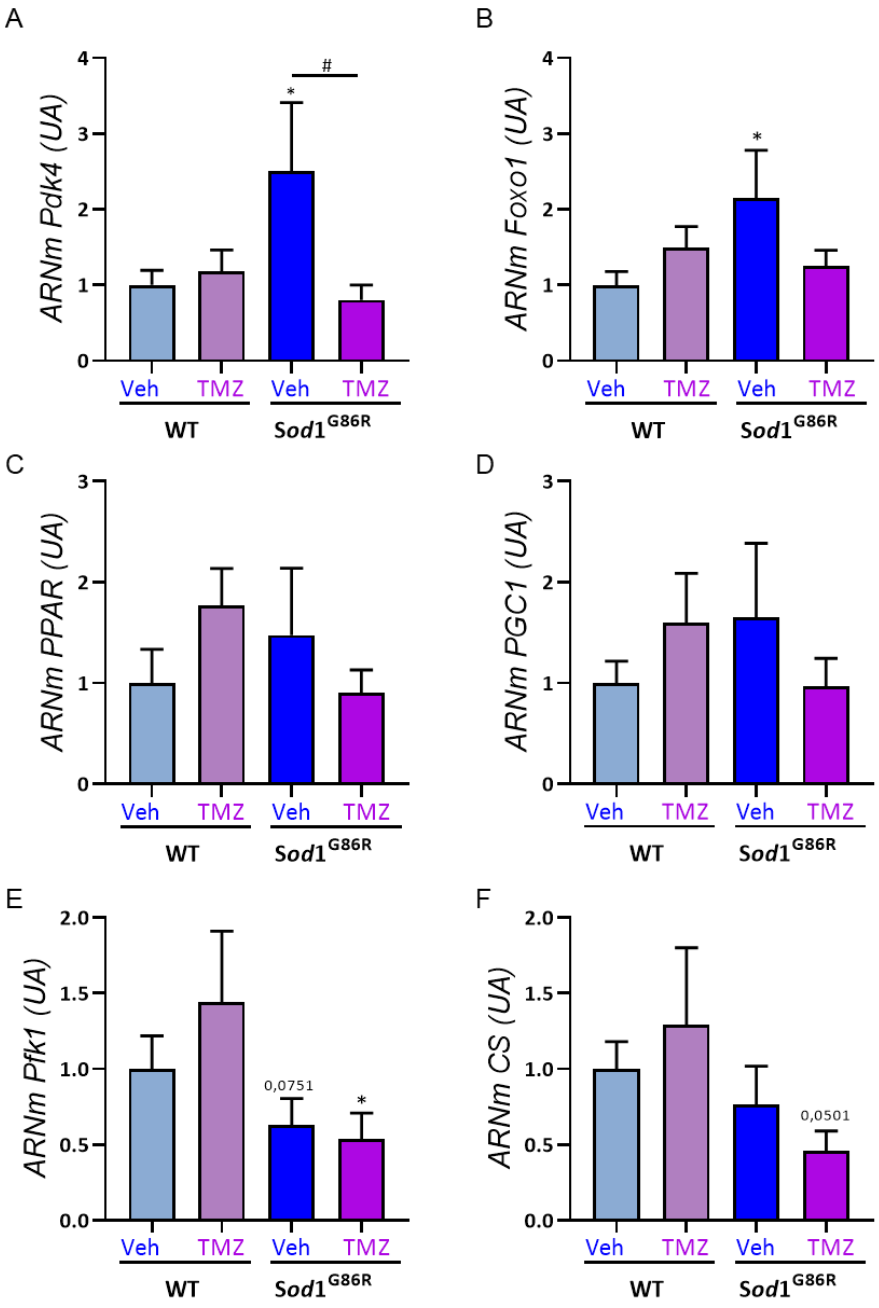


Figure 4 : Altération de l'expression des gènes de la balance énergétique dans le muscle glycolytique *TA* de 95 jours des souris *Sod1*^{G86R}.

Expression relative des niveaux d'ARNm par RT-qPCR des marqueurs métaboliques Pdk4 ***(A)****, Foxo1* ***(B)****,* ***(C)*** *PPAR,* ***(D)*** *PGC1,* ***(E)*** *Pfk1 et* ***(F)*** *Citrate synthase dans le muscle TA. Les valeurs de cette figure sont exprimées en moyenne ± ESM ; n= 12 pour les souris nTg et 16 pour les souris Tg. **p<0,01 : p-valeur nTg vs Tg et #p<0,05 : p-valeur Tg Veh vs Tg TMZ; Anova à un facteur.*

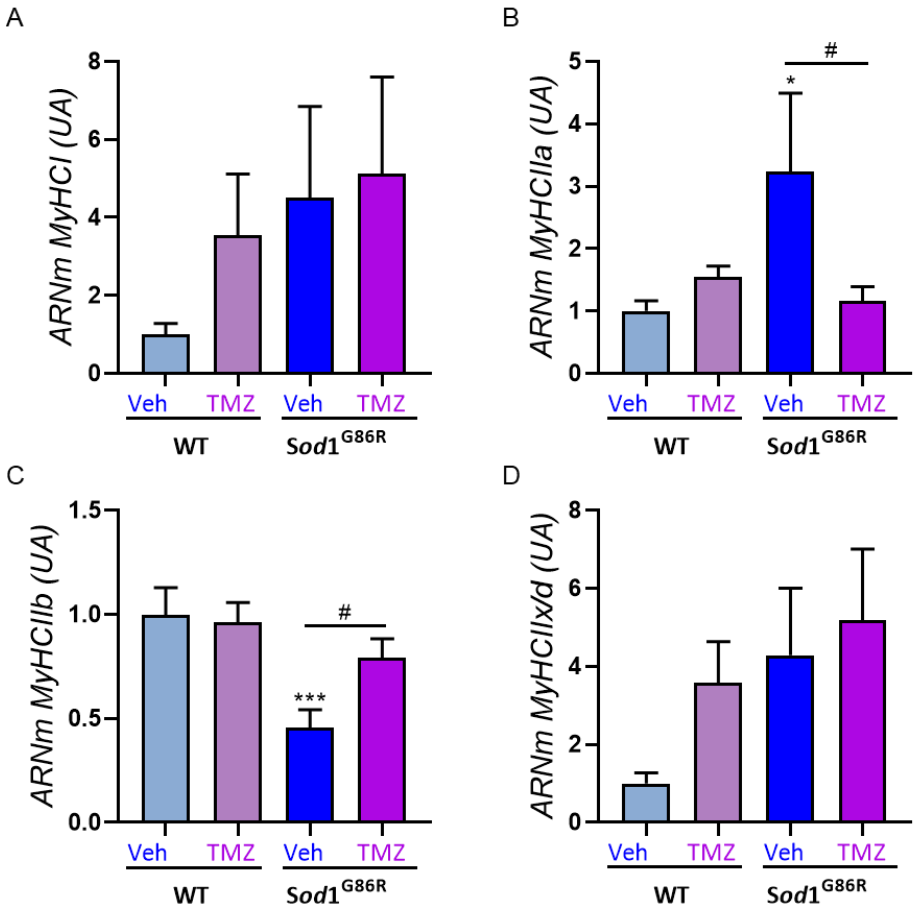


Figure 5 : Modification du profil métabolique des fibres musculaires glycolytiques à oxydatives dans le muscle *TA* de 95 jours des souris *Sod1^{G86R}*.

*Expression relative des niveaux d'ARNm par RT-qPCR des marqueurs de profils énergétiques des fibres musculaires avec les myosines à chaînes lourdes MyHCI **(A)**, MyHCIIa **(B)**, MyHCIIb **(C)** et MyHCIIx/d **(D)** dans le muscle TA. Les valeurs de cette figure sont exprimées en moyenne ± ESM ; n= 12 pour les souris nTg et 16 pour les souris Tg. **p<0,01 : p-valeur nTg vs Tg Veh et #p<0,05 : p-valeur Tg Veh vs Tg TMZ; Anova à un facteur.*

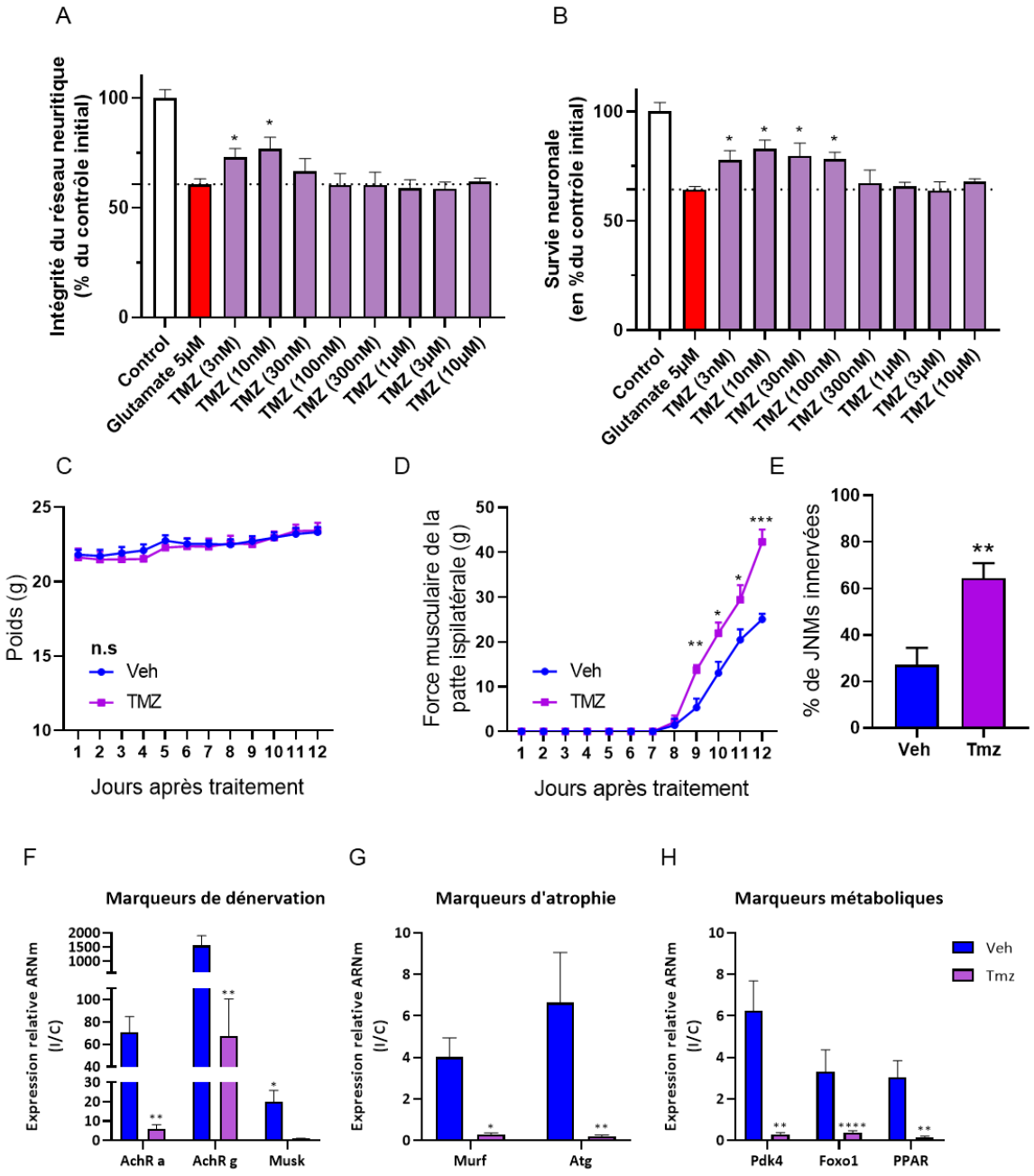


Figure 6 : La TMZ améliore la plasticité axonale et la réinnervation musculaire après lésion du nerf sciatique sur un modèle murin de compression nerveuse.

(A) *Etude in vitro d'une dose-réponse avec la TMZ sur l'intégrité du réseau neuritique et* ***(B)*** *sur la survie neuronale après un stress glutamatergique (n=6 puits/condition ; *p<0,05 ; Anova à un facteur suivi d'un test de Fisher).* ***(C)*** *Evaluation pondérale des animaux non-transgéniques durant la récupération motrice fonctionnelle après lésion du nerf sciatique (non significatif ; n=7/groupe).* ***(D)*** *Evolution temporelle de la récupération motrice de la patte ipsilatérale lésée (n= 7/groupe; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; Anova à deux facteurs).* ***(E)*** *Pourcentage d'innervation des JNM dans le muscle EDL après une compression du nerf sciatique (n= 7/groupe; *p<0,05; Test t de Student). Expression relative des niveaux d'ARNm par RT-qPCR des marqueurs de dénervation (AchRα, AchRγ et Musk)* ***(F)****, d'atrophie (Murf et Atg)* ***(G)*** *et des marqueurs métaboliques (Pdk4, Foxo1 et PPARβ/δ)* ***(H)*** *dans le muscle TA des souris nTg Veh et Tmz (20mg/kg/j). Pour chaque gène, le niveau d'expression dans le muscle ispilatéral (IP) est normalisé sur le niveau d'expression dans le muscle controlatéral (CT) (n= 7/groupe; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001, Test t de Student).*

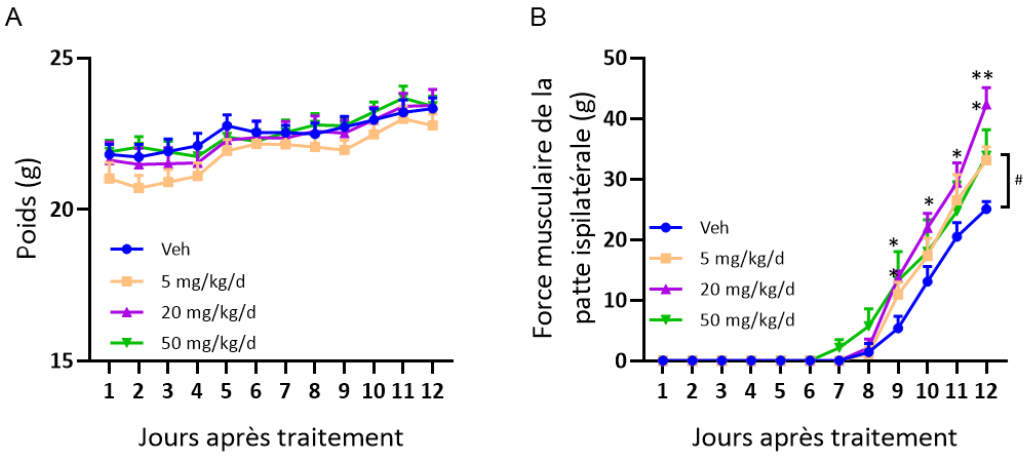


Figure supplémentaire 1 : étude dose-réponse d'un traitement avec la TMZ après une compression nerveuse chez des souris non-transgéniques.
(A) *Evaluation pondérale des animaux non-transgéniques durant la récupération motrice fonctionnelle après lésion du nerf sciatique avec différentes doses de TMZ (non significatif ; n=7/groupe).* ***(B)*** *Evolution temporelle de la récupération motrice de la patte ipsilatérale lésée avec différentes doses de TMZ (n= 7/groupe; Veh vs Tmz (20mg/kg/j) : *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; Veh vs Tmz (5mg/kg/j) : #p<0,05; Anova à deux facteurs).*

Gène	ID	5'-3'	3'-5'
Sous-unité α du récepteur à l'acétylcholine	*AChR α*	*CCA-CAG-ACT-CAG-GGG-AGA-AG*	*AAC-GGT-GGT-GTG-TGT-TGA-TG*
Sous-unité γ du récepteur à l'acétylcholine	*AChR γ*	*GAG-AGC-CAC-CTC-GAA-GAC-AC*	*GAC-CAA-CCT-CAT-CTC-CCT-GA*
Atrogine	*Atg*	*GCC-CTC-CAC-ACT-AGT-TGA-CC*	*GAC-GGA-TTG-ACA-GCC-AGG-AA*
Citrate synthase	*CS*	*TAG-CAA-ATC-AGG-AGG-TGC-TTG-T*	*TCT-GAC-ACG-TCT-TTG-CCA-AC*
"Forkhead box O1"	*Foxo1*	*GTG-AAC-ACC-AAT-GCC-TCA-CAC*	*CAC-ACT-CCA-AGC-GCT-CAA-TA*
Pyruvate déshydrogénase kinase 4 (souris)	*Pdk4*	*GCT-GGA-TGT-TTG-GTG-GTT-CT*	*TGC-TTT-GAT-TCC-TTC-CAT-CC*
"Muscle Ring Finger"	*Murf*	*TTA-GGG-GAA-GGG-ACA-GGA-CT*	*CCT-CGT-GCC-TAC-AAG-ATG-G*
Récepteur tyrosine kinase spécifique du muscle	*Musk*	*TTC-AGC-GGG-ACT-GAG-AAA-CT*	*TGT-CTT-CCA-CGC-TCA-GAA-TG*
Myosine à chaîne lourde de type I	*MyHC I*	*TGC-AGC-AGT-TCT-TCA-ACC-AC*	*TCG-AGG-CTT-CTG-GAA-GTT-GT*
Myosine à chaîne lourde de type IIa	*MyHC IIa*	*AGT-CCC-AGG-TCA-ACA-AGC-TG*	*GCA-TGA-CCA-AAG-GTT-TCA-CA*
Myosine à chaîne lourde de type IIb	*MyHC IIb*	*AGT-CCC-AGG-TCA-ACA-AGC-TG*	*TTT-CTC-CTG-TCA-CCT-CTC-AAC-A*
Myosine à chaîne lourde de type II x/d	*MyHC IIx/d*	*AGT-CCC-AGG-TCA-ACA-AGC-TG*	*CAC-ATT-TGG-CTC-ATC-TCT-TGG*
Phosphofructokinase 1	*Pfk1*	*GCC-AAA-GGT-CAG-ATT-GAG-GA*	*CAG-GTT-CTT-CTT-GGG-GAG-AGT*
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1	*PGC1*	*TGC-TGC-TGT-TCC-TGT-TTT-C*	*CCC-TGC-CAT-TGT-TAA-GAC-C*
Peroxisome proliferator-activated receptor	*PPAR β/δ*	*ATG-GGG-GAC-CAG-AAC-ACA-C*	*GGA-GGA-ATT-CTG-GGA-GAG-GT*

Table S1 : Séquences des amorces utilisées pour les qPCR.

DISCUSSION

DISCUSSION

L'objectif de mon travail de thèse avait pour axe principal l'étude du déséquilibre du métabolisme bioénergétique sur le développement de la SLA dans deux modèles murins et les conséquences des approches pharmacologiques utilisées. L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit justifie l'importance de la contribution majeure du métabolisme énergétique dans la pathogénicité de la SLA. Par ailleurs, les bénéfices sur les plans métabolique et moteur obtenus avec les traitements utilisés encouragent les futures recherches à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la SLA. Durant ce travail, j'ai pu comparer les effets d'une modulation de ces désordres métaboliques à travers deux modèles murins de SLA. Dans cette section, je confronterai mes travaux collaboratifs et ceux réalisés au sein du laboratoire dans le but de comparer les différents résultats obtenus dans ces études.

A. Des modulateurs métaboliques cardiaques préservent l'intégrité de l'axe moteur de deux modèles murins de SLA

Grâce aux nombreuses découvertes, nous savons aujourd'hui que la SLA n'est plus considérée comme une maladie stricte du motoneurone mais bien comme une maladie systémique pluricellulaire extrêmement complexe. En effet, plusieurs études précliniques et cliniques suggèrent que les altérations du métabolisme énergétique retrouvées tels que l'hypermétabolisme et la dyslipidémie participent au processus physiopathologique de la SLA (Bouteloup et al., 2009; Desport et al., 2001, 2005; Dupuis et al., 2004a, 2008, 2011; Fayemendy et al., 2021; Funalot et al., 2009; Jésus et al., 2018; Ngo et al., 2015; Peter et al., 2017; Steyn et al., 2018). Ces perturbations s'installent bien avant le début des symptômes tels que la perte de poids, la faiblesse musculaire, l'amyotrophie et la dénervation musculaire. Une fois les symptômes moteurs développés, la pathologie progresse rapidement et le patient décède généralement 2 à 5 ans après. Ainsi, les scientifiques s'efforcent de retarder au maximum le développement de la maladie en préservant l'axe moteur des patients, en agissant notamment sur le métabolisme énergétique. Nous suggérons qu'une modulation pharmacologique du métabolisme énergétique peut être bénéfique pour retarder l'apparition des symptômes moteurs de la SLA (cf. revue (Quessada et al., 2021)). En 2015, nous identifions un déséquilibre de la balance énergétique dans le muscle des souris *Sod1*^{G86R} qui traduit d'une incapacité à utiliser le glucose (glycolyse) et d'une stimulation anormale de l'oxydation des acides-gras (β-oxydation). L'un des acteurs de ce déséquilibre est la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4) qui est surexprimée dans le muscle de patients mais également de modèles murins SLA (Palamiuc et al., 2015). Pour pallier ce défaut métabolique, nous avons utilisé le dichloroacétate (DCA), agent pharmacologique connu pour inhiber directement l'activité de PDK permettant ainsi l'inhibition de la β-oxydation et la restauration de la glycolyse (McVeigh and Lopaschuk, 1990; Whitehouse and Randle, 1973). Dans cette étude, il est

montré que le DCA maintient le poids et la force musculaire des souris *Sod1*^{G86R} tout en les préservant de la dénervation musculaire. De plus, le DCA permet de rétablir la balance énergétique en restaurant la glycolyse et en diminuant la β-oxydation. Bien que le DCA n'impacte pas le début d'apparition des symptômes, il améliore les performances motrices, réduit l'astrogliose, préserve les motoneurones et les JNM et augmente la survie des souris *SOD1*^{G93A} (Miquel et al., 2012). Ces études démontrent ainsi l'intérêt d'agir directement sur le métabolisme énergétique défaillant avec des agents pharmacologiques comme le DCA dans le but de retarder le développement de la SLA. Cependant, la toxicité à long terme du DCA ne permet pas de l'envisager pour des études cliniques (DeAngelo et al., 1999). Ces études encourageantes renforcent notre hypothèse qui est de moduler le métabolisme énergétique pour tenter de ralentir le développement de la SLA.

Dans cette idée, nous nous sommes intéressés à d'autres composés déjà présents sur le marché et autorisés pour des troubles métaboliques retrouvés chez des patients atteints de cardiomyopathies. Avec nos collaborateurs, nous avons montré les effets positifs de la ranolazine (RAN), une autre molécule aux propriétés métaboliques intéressantes prescrite dans le cadre d'angine de poitrine (Hill and Schofield, 2002; Lionetti et al., 2011; McCormack et al., 1998; Tafreshi and Fisher, 2006). En effet, la RAN améliore le métabolisme glucidique tout en inhibant l'oxydation des acides gras (β-oxydation) (Clarke, 1996; Mourouzis et al., 2014; Stanley, 2002). Outre les nombreux travaux démontrant les effets métaboliques de la RAN, certaines études cliniques soulignent même le potentiel de la RAN sur des désordres musculaires retrouvés chez des patients atteints de myoclonie congénitale. Deux études cliniques pilotes montrent que la RAN améliorerait les signes et symptômes musculaires que présentent ces personnes souffrant de raideur, de faiblesse musculaire et même de douleur faisant suite à ces troubles musculaires (Arnold et al., 2017; Lorusso et al., 2019). Dans notre étude collaborative (cf. annexe, publication 2), nous montrons que la RAN améliore conjointement les fonctions motrices des souris non-transgéniques et des souris *SOD1*^{G93A}. En revanche, l'effet bénéfique transitoire de la RAN sur l'axe moteur ne permet pas d'allonger la survie des souris *SOD1*^{G93A}. A partir de 139 jours, nous observons une perte d'efficacité de la molécule qui s'explique par l'évolution de la pathologie et la sévérité des symptômes à ce stade chez les souris *SOD1*^{G93A}. Malgré la reprogrammation métabolique de la RAN sur ces souris, une des limites de cette étude est l'absence d'information concernant l'impact de la RAN sur l'intégrité des MN et des JNM des souris *SOD1*^{G93A}.

En parallèle de ces travaux sur le modèle *SOD1*^{G93A} (Scaricamazza et al., 2020), nous avons mené une autre étude en collaboration avec l'équipe italienne pour évaluer le potentiel thérapeutique de la trimétazidine (TMZ), un composé analogue à la RAN sur le modèle *SOD1*^{G93A} (publication n°1 : Scaricamazza et al., 2021). Nous avons d'une part réalisé une étude préliminaire à un stade présymptomatique sur des souris *Sod1*^{G86R} dont le but était de comparer les effets de la RAN de ce

second modèle de SLA et d'autre part une étude évaluant les effets de la TMZ sur le développement de la maladie d'une petite cohorte de souris *Sod1*^{G86R}. Les résultats de mon étude préliminaire montrent l'inefficacité de la RAN sur le développement des symptômes moteurs dans le modèle *Sod1*^{G86R} (cf. annexe : données préliminaires). A l'inverse, le TMZ maintient le poids et ralentit significativement la perte de force musculaire des souris *Sod1*^{G86R} (Section résultats, figure 1). Durant cette étude, nous avons réalisé des enregistrements électromyographiques (EMG) avant et après traitement afin de mesurer la dénervation musculaire chez ces souris, autre signe clinique de la SLA. En association avec la perte de force musculaire observée dans les groupes véhicule et RAN, les données indiquent que les souris de ces deux groupes ont des signes de dénervation musculaire accompagnés de la surexpression des marqueurs de dénervation AchR α et γ (Section résultats, figure 2). De manière intéressante, le groupe TMZ ne présente aucune dénervation musculaire témoignant des performances motrices maintenues chez ces souris. De ces résultats, nous apportons la preuve de l'inefficacité de la RAN mais surtout des résultats prometteurs de la TMZ sur le modèle murin *Sod1*^{G86R}. Nous nous sommes ainsi focalisés sur le potentiel thérapeutique du TMZ sur le modèle *Sod1*^{G86R}.

Comme mentionné précédemment, le TMZ est un modulateur métabolique cardiaque autorisé pour traiter les angines de poitrine (Lopaschuk et al., 2010; Wolff et al., 2002), qui est intéressant pour son action inhibitrice de la β-oxydation et stimulatrice de la glycolyse (Fang et al., 2012; Kantor et al., 2000; Stanley, 2002). De plus, le TMZ a également montré des effets bénéfiques sur l'axe moteur où il améliore les performances motrices de souris âgées (Ferraro et al., 2016; Molinari et al., 2017). Un des objectifs de notre étude (cf. résultats) est d'évaluer et de confirmer les effets du TMZ sur le développement de la SLA et sur l'intégrité de l'axe moteur du modèle murin *Sod1*^{G86R}. Lors d'une étude menée à un stade présymptomatique, nous montrons que le TMZ ralentit significativement la perte de force musculaire et empêche le développement de dénervation musculaire chez les souris *Sod1*^{G86R}. Cet effet bénéfique obtenu dans une plus grande cohorte confirme nos résultats préliminaires présentés ci-dessus. De manière très intéressante, Scaricamazza et ses collègues montrent des performances nettement améliorées chez les souris mâles et femelles *SOD1*^{G93A} par rapports aux souris non traitées (Scaricamazza et al., 2021). Ainsi, nous confirmons par ces études que le TMZ retarde la perte de force musculaire dans deux modèles murins de SLA. Dans mon étude (cf. résultats), les tissus collectés à 95 jours ont permis la réalisation d'analyses biochimiques et immunohistochimiques afin d'évaluer le potentiel du TMZ sur l'axe moteur des souris *Sod1*^{G86R}, notamment la survie des MN et l'intégrité des JNM. Nous savons que la perte des MN et des JNM est l'élément phénotypique majeur de tout patient atteint de SLA. Ici, nous allons plus loin en quantifiant le nombre de MN et le pourcentage de JNM innervées des souris *Sod1*^{G86R} traitées ou non. Tout d'abord, nous confirmons que le TMZ n'a pas d'impact négatif sur les MN des souris nTg et ensuite nous révélons que le TMZ préserve

le nombre de MN chez les souris *Sod1*^{G86R}. Dans cette quantification, nous nous sommes concentrés sur les MN dont la surface de leur soma était supérieure à 400µm². Cette considération nous a permis de nous affranchir d'un éventuel biais de comptage puisqu'un immunomarquage ChAT ne permet pas de distinguer les MN α (≥400µm²) des MN γ (<400µm²). Or, nous savons que seuls les MN α dégénèrent dans la SLA (Kanning et al., 2010; Roselli and Caroni, 2014). L'analyse quantitative nous révèle que le nombre de MN est préservé chez les souris *Sod1*^{G86R} traitées avec le TMZ. Dans l'étude de Scaricamazza et al., 2021, la quantification des MN pour les souris *SOD1*^{G93A} s'est basée sur des MN dont la surface du soma était supérieure à ≥200µm². Bien évidemment, la taille des MN n'est pas comparable avec les MN des souris *Sod1*^{G86R} mais cela s'explique par la différence d'âge des tissus dans l'évolution de la maladie (MN de 95 jours pour les *Sod1*^{G86R} et MN de 120 et 150 jours pour les *SOD1*^{G93A}). Toutefois, le TMZ prévient significativement la perte des MN des souris *SOD1*^{G93A} à 120 et 150 jours, deux stades symptomatiques. Le traitement au TMZ permet ainsi de préserver les MN de la dégénérescence des souris *Sod1*^{G86R} et *SOD1*^{G93A}. Dans la continuité de ces analyses, nous avons évalué le potentiel de ce traitement sur l'intégrité des JNM des souris *Sod1*^{G86R} et *SOD1*^{G93A}, un des premiers événements pathologiques de la SLA (Moloney et al., 2014). En effet, le démantèlement des JNM intervient avant la dégénérescence des MN (Frey et al., 2000; Ngo et al., 2012; Pun et al., 2006; Vinsant et al., 2013) aussi bien chez les patients que les modèles murins de SLA (Aggarwal, 2002; Fischer et al., 2004; Gonzalez de Aguilar et al., 2008; Siklós et al., 1996; Tsujihata et al., 1984). Ces preuves suggèrent un mécanisme de dégénérescence rétrograde appelé « dying-back » (Dadon-Nachum et al., 2011) qui s'opposent à la dégénérescence antérograde ou corticofuge appelée « dying-forward » (Brunet et al., 2020). Bien que ces deux hypothèses s'opposent, nous ne pouvons pas exclure leur convergence pour initier la SLA. Du fait de l'absence de dénervation musculaire et du nombre de MN sauvegardé, nous mettons également en évidence que le TMZ préserve l'intégrité des JNM des souris *Sod1*^{G86R}. Chez les souris *SOD1*^{G93A}, le traitement maintient une meilleure innervation, limite le nombre de fragments et améliore la stabilité des JNM aux deux âges (Scaricamazza et al., 2021). Ainsi, le TMZ préserverait du démantèlement des JNM en limitant aux maximum le phénomène de dégénérescence rétrograde, atténuant ainsi la perte des MN dans ces deux modèles murins de SLA. Ces études soulignent le caractère neuroprotecteur du TMZ sur l'axe moteur des souris *Sod1*^{G86R} et *SOD1*^{G93A} et démontrent qu'il est pertinent de prévenir au maximum la perte de l'axe moteur avant que la maladie ne s'installe.

C'est sur ce postulat que nous avons réalisé des études de survie pour tester le potentiel du TMZ sur l'espérance de vie des souris *Sod1*^{G86R} et *SOD1*^{G93A}. De manière étonnante, le traitement au TMZ n'empêche pas la perte de poids ni la perte de force musculaire au cours du temps et n'a aucun impact sur la survie des souris *Sod1*^{G86R}. Le point limitant de cette étude est l'absence d'effet du TMZ sur les performances motrices de souris *Sod1*^{G86R}. En effet, nous avons démontré à multiples reprises sur des

cohortes conséquentes des effets bénéfiques du TMZ sur les performances motrices. Ainsi, nous ne pouvons pas tirer de conclusion sur cette étude de survie avant une nouvelle étude qui doit être menée. En parallèle de notre étude, Scaricamazza et ses collègues démontrent que le TMZ décale le déclenchement des symptômes moteurs, augmente la durée de la maladie et allonge considérablement la survie des souris mâles et femelles *SOD1*^{G93A} (Scaricamazza et al., 2021). Tous les effets bénéfiques du TMZ sur les performances motrices et l'axe moteur de ces deux modèles murins justifient l'intérêt de cette molécule pour des investigations futures en clinique.

Etant donnée les effets bénéfiques du TMZ sur l'axe moteur observés dans ces études, nous nous sommes demandé si la molécule limite le déclenchement des symptômes moteurs ou alors si elle est capable d'induire la réinnervation musculaire pour pallier l'installation de la dégénérescence. Nous avons donc démontré que le TMZ stimule la plasticité axonale et la récupération motrice dans un modèle murin de compression nerveuse. En effet, les animaux traitées récupéraient leur force musculaire plus rapidement et le taux d'innervation des JNM étaient significativement plus élevé. En 2009, Serarslan et ses collègues mettent en avant les effets bénéfiques du TMZ chez des rats ayant subi un écrasement du nerf sciatique. Le TMZ augmente significativement la régénérescence axonale et leur myélinisation (Serarslan et al., 2009). Le TMZ favoriserait également la cicatrisation des nerfs après le même schéma expérimental chez le rat (Karahan et al., 2019). En parallèle de cette étude *in vivo*, nous avons également montré *in vitro* que le TMZ favorise l'allongement du réseau neuritique et protège les MN en culture du stress glutamatergique induit. Ces résultats permettent d'affirmer que le TMZ a la faculté de réinnerver les muscles striés squelettiques en réponse à une lésion ou une dégénérescence due à la SLA. Toutefois, les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore élucidés mais leurs hypothèses seront présentées plus loin.

L'ensemble de ces données souligne le caractère bénéfique du TMZ sur le système nerveux justifiant l'utilisation potentielle que nous pouvons en faire dans la SLA afin de préserver au mieux l'axe moteur des souris et à terme celui des patients atteints de SLA.

B. Correction de la balance énergétique musculaire comme élément clef pour freiner le développement de la SLA ?

Durant la SLA, les MN ne sont pas les seules cellules à être affectées puisque les cellules musculaires subissent également des modifications au fur et à mesure que la pathologie progresse. Les patients SLA et les modèles murins développent très précocement des altérations métaboliques dans le tissu nerveux mais également dans les muscles striés squelettiques. Les MN forment avec les fibres musculaires qu'ils innervent des unités motrices aux propriétés contractiles distinctes. Les MN α qui contactent les unités motrices « Fast twitch Fatigable » (FF) sont les premiers à dégénérer dans la SLA

(Kanning et al., 2010; Roselli and Caroni, 2014). Ces unités motrices FF regroupent des fibres musculaires de type IIb disposant d'un métabolisme glycolytique permettant une forte et rapide contraction mais une fatigabilité importante. Comme nous l'avions vu dans l'introduction (partie 2, B, 3.3), la sensibilité de ces unités motrices FF au processus dégénératif de la SLA est supérieure aux unités motrices « Fast-twitch Resistant » FR et « slow-twitch » S (Atkin et al., 2005; Derave et al., 2003; Frey et al., 2000; Gordon et al., 2010; Hegedus et al., 2007; Kanning et al., 2010; Pun et al., 2006). De plus, le développement progressif de la maladie entraine des changements métaboliques majeurs des fibres musculaires dans les modèles murins. Chez les souris *Sod1^{G86R}* et *SOD1^{G93A}*, le profil métabolique des muscles évolue avec la sévérité de la pathologie. En effet, plus la maladie se développe plus la proportion des fibres musculaires au métabolisme oxydatif augmente par rapport aux fibres glycolytiques (Deforges et al., 2009; Hegedus et al., 2008; Palamiuc et al., 2015; Scaricamazza et al., 2020).

Ainsi, nous nous sommes intéressés tout d'abord au profil métabolique d'un muscle à prédominance glycolytique, le tibial antérieur (TA) des souris *Sod1^{G86R}* et *SOD1^{G93A}* puis aux effets potentiels de la RAN et du TMZ sur ce changement de métabolisme. Dans la publication n°2 en annexe (Scaricamazza et al., 2020), nous avons mis en évidence la dérégulation des fibres musculaires en quantifiant les myosines à chaine lourde *MyHC*. Nous avons montré une induction de la myosine *MyHC IIa* (oxydative) et *MyHC IIx* (oxydative) dans le muscle TA des souris *SOD1^{G93A}*. Or, une répression de la myosine *MyHC IIb* (glycolytique) est notée au cours du temps. Ces résultats montrent une dérégulation progressive du type de fibres musculaires faisant passer le muscle TA d'un métabolisme majoritairement glycolytique à un métabolisme oxydatif avec l'évolution de la SLA. L'administration de RAN limite la surexpression des myosines *MyHC IIa et IIx* alors qu'elle rétablit l'expression de la myosine *MyHC IIb* dans le muscle TA des souris *SOD1^{G93A}*. La conséquence de cet effet est que la RAN freine le changement de profil métabolique du muscle TA de ces souris et ainsi expliquerait le retard du déclin moteur des souris *SOD1^{G93A}*. En effet, cette quantification a été réalisée sur des muscles TA de souris traitées à la RAN âgées de 120 jours (stade symptomatique) qui ont encore à cet âge, des performances motrices significativement plus élevées que les souris non traitées. En revanche, nous ne pouvons affirmer si la RAN peut bloquer ces dérégulations jusqu'au stade final de la maladie. Ainsi, une étude d'analyse transcriptomique à différents stades fournirait la réponse à cette question.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux effets du TMZ sur l'expression des myosines MyHC dans le muscle TA des souris *Sod1^{G86R}* (cf. résultats, Quessada et al., 2021) et des souris *SOD1^{G93A}* (publication n°1, Scaricamazza et al., 2021). Le traitement au TMZ tend à faire augmenter l'expression des myosines *MyHC I et IIx* dans le muscle TA des souris nTg par rapport aux souris nTg véhicule (cf. résultats, Quessada et al., 2021). Bien que cela ne soit pas significatif, cette tendance interroge sur les effets du

TMZ sur le métabolisme énergétique des fibres. Selon plusieurs études, le TMZ aurait la capacité de modifier les propriétés métaboliques et contractiles des fibres musculaires en « mimant » un exercice physique (Ferraro et al., 2014; Gundersen, 2011; Wilson et al., 2012). Il est clairement établi qu'en fonction de l'intensité et de la durée de l'activité physique, des adaptations métaboliques musculaires s'effectuent afin de mieux répondre au type d'exercice engagé (Pette and Staron, 2001; Talanian et al., 2010). Molinari et ses collègues montrent que le TMZ induit un changement phénotypique du type de fibre rapide à lent à la fois dans le muscle de souris sauvages mais aussi d'un modèle murin de carcinome permettant d'augmenter leur force préhension (Molinari et al., 2017). De la même manière, le TMZ augmente la proportion de fibres de type oxydative dans le muscle tout en améliorant les performances motrices et la force musculaire des souris âgées souffrant de sarcopénie (Ferraro et al., 2016). Dans ces études, cet effet mimétique du TMZ suggère qu'un changement des propriétés contractiles de rapide à lent (glycolytique à oxydatif) permettrait d'améliorer l'efficacité énergétique, diminuer la fatigue musculaire conférant ainsi de meilleures performances motrices aux souris. Cela dit, dans notre étude aucune différence de performances motrices n'a été constatée entre les souris nTg traitées ou non avec le TMZ (cf. résultats, Quessada et al., 2021). L'expression de *MyHC I et IIx* tend également à augmenter chez les souris Sod*1*^{G86R} avec ou sans traitement. Dans le muscle TA des souris *Sod1*^{G86R} véhicule, une induction significative de *MyHC IIa* et une répression de *MyHC IIb* sont observées. A l'inverse, le TMZ empêche la surexpression de *MyHC IIa* et restaure la diminution de *MyHC IIb*. Dans Scaricamazza et al., 2021, une induction significative de *MyHC IIa* est observée dans le muscle TA des souris *SOD1*^{G93A} Veh tandis qu'une répression de *MyHC IIb* est constatée à 90, 120 et 150 jours. Or, le TMZ limite de manière significative ces dérégulations de myosines dans le muscle TA des souris *SOD1*^{G93A} à 90, 120 et 150 jours. Le ralentissement du changement de profil énergétique des fibres musculaires d'un muscle particulièrement vulnérable dans la SLA pourrait expliquer également les effets bénéfiques du TMZ chez les souris *Sod1*^{G86R} et *SOD1*^{G93A}. Ainsi, le changement progressif du profil métabolique du muscle des souris *SOD1*^{G93A} et des souris *Sod1*^{G86R} souligne la contribution majeure du muscle squelettique à prédominance glycolytique dans l'évolution de la SLA. Enfin, l'utilisation de modulateurs métaboliques tels que la RAN et le TMZ prouve l'intérêt de prévenir ces changements d'identités métaboliques dans la SLA tout en limitant au maximum le déclin des performances motrices.

Ce basculement d'un phénotype glycolytique à oxydatif dans le muscle squelettique s'accompagne d'une dérégulation de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique. Dans le muscle TA des souris *SOD1*^{G93A}, l'augmentation crescendo de l'expression de *Nor1*, *myoglobine*, *pAMPK/AMPK, pACC/ACC, SLN, CPT1 et Pdk4* montre une voie oxydative favorisée dans ce muscle initialement glycolytique (Scaricamazza et al., 2020). L'administration chronique de RAN a permis une

reprogrammation métabolique considérable en stimulant la glycolyse tout en limitant la voie oxydative. La surexpression des gènes des pompes calciques *SERCA2a* et *SERCA2b* (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases/SERCA iso-enzymes) associés au muscle oxydatif (Anderson et al., 2016) est limitée par la RAN tandis que celle de *SERCA1* (muscle glycolytique) est restaurée à un niveau physiologique. Le niveau d'expression de *SLN*, *pAMPK/AMPK, pACC/ACC* a diminué fortement en réponse à la RAN alors que celui de *Nor1* est revenu à un niveau comparable aux souris nTg. En revanche, l'effet de la RAN n'est que temporaire puisqu'au stade final de la maladie la surexpression de ces marqueurs ne peut être empêchée. Toutefois, la RAN permet de réduire la dépense énergétique des souris $SOD1^{G93A}$ tout au long du traitement, à l'exception du stade final où la RAN n'est plus efficace contre cet hypermétabolisme. En revanche, le traitement au TMZ empêche clairement l'état hypermétabolique des souris $SOD1^{G93A}$ à 120 jours (Scaricamazza et al., 2021). Des données supplémentaires seraient utiles pour évaluer si l'effet du TMZ persiste dans le temps, à un stade très avancée de la maladie. Ceci renforcerait encore un peu plus le spectre d'action bénéfique du TMZ dans la SLA. Même si la RAN n'a pas eu d'effet sur la survie des animaux, son efficacité tant sur le plan musculaire que métabolique sur le modèle murin $SOD1^{G93A}$, nous convint que l'utilisation d'agents pharmacologiques similaires pourrait être pertinent pour contrecarrer les désordres métaboliques retrouvés chez plus de 2/3 des patients atteints de SLA.

Encore aujourd'hui, nous ignorons l'origine de ces défauts métaboliques dans la SLA. Notre laboratoire a donc tenté de comprendre comment se mettait en place ces désordres métaboliques. En 2015, nous identifions un déséquilibre énergétique qui se traduit par une utilisation anarchique d'acides gras comme source principale d'énergie. En effet, une surexpression de *Pdk4* est mesurée dans les muscles TA des souris $Sod1^{G86R}$ dès un stade présymptomatique et au début de la maladie des souris $SOD1^{G93A}$ mais également dans le muscle deltoïde de patients (Palamiuc et al., 2015). Nous pensons qu'un des acteurs principaux responsable de ces changements métaboliques est la PDK4, connue pour inhiber l'activité de la PDH (Bowker-Kinley et al., 1998) bloquera toute la voie glucidique favorisant uniquement l'utilisation massive d'acides gras (Holness and Sugden, 2003). La régulation de l'expression de *Pdk4* est contrôlée par divers facteurs de transcription (*PPARβ/δ, FOXO1, PGC1α*) ou sous l'action d'une entrée massive d'acides gras libres (Kim et al., 2006; Nahlé et al., 2008). En 2015, notre laboratoire démontre qu'en ciblant spécifiquement la PDK4 avec le dichloroacétate (DCA), il est possible d'éviter ce déséquilibre énergétique en restaurant la glycolyse. De plus, le DCA rétablit le niveau d'expression de *PPARβ/δ, FOXO1* et *PGC1α* à un niveau similaire au celui des souris nTg (Palamiuc et al., 2015). Les propriétés bénéfiques de la RAN sur le métabolisme énergétique des souris $SOD1^{G93A}$ (Scaricamazza et al., 2020), nous a conduit à investiguer les effets du TMZ sur le muscle TA des souris $Sod1^{G86R}$. Notre étude révèle qu'un traitement chronique de TMZ empêche l'induction de

l'expression de *PDK4*, *FOXO1, PPARß/δ* et de PGC1 dans le muscle de souris *Sod1*^{G86R}. En revanche, l'expression de *PFK1* et de *citrate synthase* (CS) n'est pas restaurée avec le traitement (publication n°3, Quessada et al., 2021). Parallèlement, le TMZ inhibe la surexpression de *CPT1* dans le muscle TA des souris *SOD1*^{G93A} limitant ainsi l'entrée des acides gras entrainant donc une diminution de la voie oxydative et une restauration de la voie glucidique (Scaricamazza et al., 2021). Toutefois, l'effet du TMZ sur la quantification de l'expression de *PDK4*, *FOXO1, PPARß/δ*, PGC1, *PFK1* et de CS dans le muscle des souris *SOD1*^{G93A} est nécessaire pour compléter cette étude. Ces données indiquent que les défauts de la balance énergétique sont atténués avec le TMZ dans le muscle des souris *Sod1*^{G86R} et *SOD1*^{G93A}. Toutefois, ces informations méritent d'être complétées par des mesures d'activité enzymatique et d'expression protéique de ces gènes afin d'évaluer les effets du TMZ sur la mobilisation des substrats énergétiques dans le muscle de ces souris.

Dans la SLA, la mobilisation du glucose représente un problème majeur chez le patient comme dans les modèles murins (Dupuis et al., 2004a; Palamiuc et al., 2015; Pradat et al., 2010; Reyes et al., 1984) puisqu'une résistance à l'insuline précoce et une intolérance au glucose sont décrites. Une des raisons à cela est l'expression du transporteur au glucose GLUT4 qui est réprimée dans le muscle des patients et des modèles murins diminuant ainsi l'assimilation du glucose au sein du muscle (Desseille et al., 2017; Scaricamazza et al., 2020; Zubiri et al., 2018). Bien qu'une autre expérience de test de tolérance au glucose n'ait pas été faite pour évaluer les effets de la RAN, la molécule a permis de restaurer le niveau d'expression de GLUT4 chez les souris *SOD1*^{G93A} à un niveau similaire à celui de souris nTg (Scaricamazza et al., 2020). Nous pouvons suggérer qu'une expression physiologique de GLUT4 retrouvée permettrait une meilleure assimilation du glucose dans le muscle des souris *SOD1*^{G93A}. Or, des analyses complémentaires sont nécessaires pour confirmer que l'expression protéique de GLUT4 est bien restaurée ainsi que la bonne translocation à la membrane de la cellule musculaire ai été vérifiée. Des études ont montré que le TMZ améliore le métabolisme du glucose en diminuant la glycémie, ce qui permet ainsi d'augmenter l'assimilation du glucose dans les muscles (Fragasso et al., 2003; Kantor et al., 2000; Lopaschuk et al., 2003; Molinari et al., 2017). Chez les souris *SOD1*^{G93A}, le TMZ améliore la clairance au glucose par rapport aux souris non traitées (Scaricamazza et al., 2021). Ainsi, l'effet hypoglycémiant du TMZ permettrait de contrecarrer ce déséquilibre de substrats énergétiques au sein de la cellule musculaire et donc empêcher une transition d'une métabolisme glucidique à oxydatif.

Par la combinaison de ces données encourageantes concernant les effets de ces modulateurs métaboliques, nous suggérons qu'il est indispensable de s'intéresser aux troubles métaboliques recensés dans la SLA afin de retarder le développement des symptômes moteurs. Le tableau ci-dessous

récapitule l'ensemble des effets de la ranolazine et de la trimétazidine sur les deux modèles murins de SLA présentés jusqu'ici.

	Souris *SOD1^{G93A}*	Souris *Sod1^{G86R}*
Ranolazine	Ø effet sur le poids ↗ performances motrices Ø effet sur la survie Rétablit balance énergétique musculaire ↘ l'hypermétabolisme	Ø effet sur le poids Ø effet sur les performances motrices Effet sur la survie : N/E Ø effet sur balance énergétique musculaire Hypermétabolisme : N/E
Trimétazidine	Ø effet sur le poids ↗ performances motrices Préserve les JNM et les MN ↘ démyélinisation ↘ neuroinflammation ↗ survie ↘ l'hypermétabolisme Rétablit balance énergétique musculaire ↗ fonction mitochondriale dans le muscle et la moelle épinière	Ø effet sur le poids ↗ performances motrices Préserve les JNM et les MN N/A N/A Effet sur la survie : N/E Hypermétabolisme : N/E Rétablit balance énergétique musculaire N/A

Figure 22 : Effets pharmacologiques observés de la ranolazine et de la trimétazidine dans deux modèles murins de SLA.
N/E : non étudié ; N/A : non applicable ; JNM : jonctions neuromusculaires ; MN : motoneurones

C. Stimulation du système de réparation au site de lésion favorisée par le spectre d'action élargie de la RAN et du TMZ

Au cours de ma thèse, nous avons eu recours à deux agents pharmacologiques qui ont montré des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique mais également sur l'intégrité de l'axe moteur de souris modèles de SLA. En revanche, nous ne pouvons pas expliquer leurs effets avec un seul mécanisme en particulier mais bien une combinaison de processus qui serait favorable au maintien et/ou à la réparation de l'axe moteur.

Aussi bien chez les patients que dans différents modèles murins de SLA, les anomalies mitochondriales et les conséquences associées (surproduction de ROS, stress oxydant, défaut de la régulation calcique etc.) restent des signes caractéristiques de la pathogenèse de cette maladie (Smith et al., 2019). Dans l'étude de (Scaricamazza et al., 2020), nous avons montré une augmentation de la masse mitochondriale ainsi qu'une défaillance bioénergétique précoce traduit par une diminution de l'ATP et de la chaine respiratoire dans le muscle glycolytique TA des souris *SOD1*^{G93A}. Ces atteintes s'intensifient au fur et à mesure que la pathologie progresse. L'augmentation de la masse mitochondriale signifie un remodelage métabolique des fibres musculaires vers l'utilisation préférentielle d'acides gras comme source d'énergie. Cette adaptation s'observe lors d'un exercice d'endurance où le changement métabolique musculaire est accompagné par une augmentation de la masse mitochondriale (Granata et al., 2018; Widmann et al., 2019). Le traitement RAN a permis de restaurer en partie la quantité d'ATP dans le muscle TA des souris *SOD1*^{G93A} permettant ainsi de limiter le changement métabolique des fibres musculaires (Scaricamazza et al., 2020). De plus, un traitement au TMZ permet également d'améliorer la fonction mitochondriale dans le muscle et la moelle épinière des souris *SOD1*^{G93A} (Scaricamazza et al., 2021). En effet, le TMZ favorise la production d'ATP et améliore l'activité des complexes I-,II/III et IV dans le muscle TA et restaure l'activité des complexes I et II/III dans la moelle épinière de ces souris (Scaricamazza et al., 2021). De plus, la RAN et le TMZ ont la capacité d'améliorer la fonction mitochondriale en réduisant d'une part la surcharge calcique en modulant les pompes SERCA via la sarcolipine (SLN) (Scaricamazza et al., 2020 & 2021) et d'autre part limite le stress oxydant en réduisant la production de ROS (Aldakkak et al., 2011; Terruzzi et al., 2017). Dans les terminaisons nerveuses de patients SLA, une mauvaise manipulation du calcium est observée ce qui engendre une excitotoxicité au calcium engendrant ainsi la mort neuronale (Siklós et al., 1996). C'est pourquoi l'utilisation de la RAN et du TMZ est intéressante puisqu'elles viennent contrôler la libération du calcium des pompes SERCA préservant les cellules musculaires et les MN de cette toxicité au calcium. Nous savons aujourd'hui que le stress oxydant associé à une surproduction de ROS est particulièrement toxique pour la viabilité cellulaire et important dans la SLA (Barber and Shaw, 2010; Barber et al., 2006; Chang et al., 2008; Mahoney et al., 2006; Shaw et al., 1995; Shibata et al., 2001).

Ainsi, nous pensons qu'en plus d'agir sur la balance énergétique (glucose vs acides gras), la RAN et le TMZ préservent les MN et les muscles par leur action sur la fonction mitochondriale et leur effet anti-oxydant. En 2015, Palamiuc et ses collègues montrent également qu'en rétablissant l'équilibre énergétique avec le DCA, le stress oxydant est aussi limité dans le muscle des souris *Sod1*^{G86R} (Palamiuc et al., 2015). Cela pourrait donc aussi justifier les effets bénéfiques du DCA sur l'axe moteur de ces souris. Bien que ces paramètres n'aient pas été mesurées dans notre étude sur le modèle *Sod1*^{G86R}, quelques études discutent des effets du TMZ sur la fonction mitochondriale et le stress oxydant. En effet, en améliorant la biogenèse mitochondriale (Molinari et al., 2017), le TMZ lutterait en plus contre la surproduction de ROS empêchant le stress oxydant connu pour être délétère pour les cellules concernées. Le TMZ réduit les différents marqueurs liés au stress oxydant dans un modèle murin d'infarctus du myocarde (Gong et al., 2018), chez des souris atteintes de glaucome aigu (Wan et al., 2017), dans le foie et les reins de rat atteint d'ischémie (Tetik et al., 1999) mais aussi dans un modèle de compression du nerf sciatique chez le rat (Karahan et al., 2019). En parallèle des propriétés antioxydantes, le TMZ est également connu pour son effet anti-inflammatoire puisqu'il réduit la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires (Kuralay et al., 2006; Wan et al., 2017). Ces preuves renforcent l'idée que les effets bénéfiques du TMZ sur le modèle SLA *Sod1*^{G86R} ne se limitent pas seulement au métabolisme énergétique mais pourraient bien résulter en plus de son action sur le stress oxydant et l'activité mitochondriale.

Les dommages cellulaires engendrés par les maladies neurodégénératives par exemple nécessitent une correction simultanée de plusieurs systèmes comme nous venons de le voir avec le métabolisme énergétique, la fonction mitochondriale et le stress oxydant. Par ailleurs, le processus autophagique est un autre acteur crucial qui contribue au rétablissement de l'homéostasie cellulaire. L'autophagie est un mécanisme physiologique de protection et de recyclage d'éléments cellulaires qui par leur internalisation via le processus endolysosomal permet à la cellule de s'en débarrasser. C'est un mécanisme fondamental puisque l'autophagie élimine les agrégats protéiques dans les maladies neurodégénératives (Rusten and Simonsen, 2008). En revanche, ce processus peut être gravement perturbé au fur et à mesure qu'une pathologie se développe. C'est le cas de la SLA où nous savons que le processus autophagique est altéré engendrant ainsi la mort cellulaire. En effet, les protéines agrégées telles que SOD1, TDP-43, FUS etc. dans les neurones de patients SLA suggèrent un défaut dans le processus autophagique. De plus, plusieurs études ont montré une surexpression des protéines impliquées dans ce mécanisme telles que Beclin-1 et LC3-II chez les patients et les souris *SOD1*^{G93A} (Gong et al., 2018; Li et al., 2008; Nguyen et al., 2019). A l'inverse, les protéines retrouvées mutées dans la SLA telles que TDP-43 et FUS répriment l'expression de protéines responsables de l'induction de l'autophagie (Ling et al., 2013; Soo et al., 2015). Toutefois, les connaissances actuelles ne nous

permettent pas d'établir un lien direct entre l'altération de l'autophagie et la pathogénicité de la SLA. Il convient de préciser ici, que nous n'avons pas dans nos études présentées dans ce manuscrit, d'éléments témoignant d'une altération de l'autophagie. Néanmoins, il existe aujourd'hui des régulateurs pharmacologiques connus pour stimuler l'autophagie qui pourraient ainsi être bénéfiques pour les maladies neurodégénératives, notamment la SLA. C'est le cas de la rapamycine, inhibiteur de la protéine mTOR (Spilman et al., 2010), inducteur de l'autophagie, favorise l'élimination des agrégats d'alpha-synucléine (Crews et al., 2010) et améliore le comportement moteur (Santini et al., 2009) dans des modèles de Parkinson. Cependant, l'efficacité de la rapamycine est controversée dans certains modèles d'Alzheimer et de SLA (Ling et al., 2009; Spilman et al., 2010; Staats et al., 2013; Zhang et al., 2010). De manière intéressante, l'induction de l'autophagie par la rapamycine favorise la régénération du nerf périphérique ainsi que la récupération motrice chez des rats ayant subi une compression du nerf sciatique (Huang et al., 2016). En parallèle, la metformine stimule l'autophagie via l'activation de la protéine AMPK (Thomson, 2018; Zhou et al., 2001). Dans certains modèles de la maladie d'Alzheimer, la metformine améliore la clairance des agrégats et les performances cognitives (Chen et al., 2016) mais provoque une surexpression de ROS entrainant une neurotoxicité (Picone et al., 2015). L'unique étude avec la metformine sur la SLA révèle que la molécule n'a aucun effet sur le développement des symptômes et aggrave l'espérance de vie des souris femelles *SOD1*^{G93A} (Kaneb et al., 2011). Récemment, une équipe chinoise montre une amélioration de la récupération motrice fonctionnelle et une régénération du nerf périphérique dans un modèle de compression nerveuse (Liu et al., 2019). L'ensemble de ces données apporte la preuve qu'une stimulation du processus autophagique est bénéfique pour la régénération de l'axe moteur et peut être particulièrement intéressant pour les maladies neurodégénératives. Dans nos études présentées dans ce manuscrit, nous n'avons pas investigué les effets de la RAN et du TMZ sur le processus autophagique dans les modèles murins *SOD1*^{G93A} et *Sod1*^{G86R}. Actuellement, aucune information n'est disponible dans la littérature évoquant l'effet de la RAN sur l'autophagie des souris SLA. Ainsi, il serait utile de réaliser des analyses complémentaires sur l'autophagie pour essayer d'expliquer en partie les effets positifs de la RAN sur l'axe moteur des souris *SOD1*^{G93A}. A l'inverse, plusieurs études ont souligné la capacité du TMZ à stimuler l'autophagie. En 2013, Ferraro et ses collègues révèlent *in vitro* que le TMZ protège les myotubes C2C12 murins de l'atrophie musculaire (Ferraro et al., 2013). Pour cela, le TMZ limite la surexpression de l'atrogine, de la myostatine et de MurF1, des acteurs moléculaires clefs impliqués dans l'atrophie. En outre, le TMZ induit l'hypertrophie des myotubes et augmente l'expression des myosines à chaine lourde pour lutter contre cette atrophie. Le traitement au TMZ conduit à une augmentation du marquage de la LC3-II et des lysosomes confirmant la formation accrue d'autophagolysosomes. Enfin, le TMZ active l'autophagie en déclenchant la voie AKT (Ferraro et al., 2013). Ainsi, les effets bénéfiques du TMZ sur les myotubes suggèrent que l'autophagie est un

mécanisme protecteur pour l'intégrité du muscle squelettique. De la même manière, le TMZ améliore également le processus autophagique via la voie de signalisation AMPK/mTOR lors d'une cardiotoxicité induite chez des souris (Yang et al., 2019). Comme nous l'avons évoqué précédemment, le TMZ favorise la régénération nerveuse chez des rats ayant subi une compression du nerf sciatique (Karahan et al., 2019). Cependant, les analyses électrophysiologiques et histochimiques de cette étude ne permettent pas d'établir le mécanisme impliqué dans cette réparation tissulaire. En revanche, une guérison nerveuse optimale est possible uniquement, si et seulement si le microenvironnement de la lésion est propice au bon déroulement de la régénération. A la suite d'une lésion, le système immunitaire inné active plusieurs mécanismes dont l'induction des facteurs neurotrophiques et l'élimination des débris cellulaires via l'autophagie notamment dans le but de favoriser la récupération fonctionnelle et favoriser la remyélinisation (Faroni et al., 2015; Rotshenker, 2011). Karahan et ses collègues montrent une augmentation significative du facteur neurotrophique NGF (Nerve growth factor) après un traitement au TMZ (Karahan et al., 2019). Ce résultat nous amène à penser que le TMZ stimule la régénération nerveuse en stimulant la synthèse de NGF et pourrait être à l'origine de la réinnervation axonale dans mon étude de compression nerveuse. De plus, ce facteur de croissance est réputé pour induire une réponse régénérative et une aider à la cicatrisation nerveuse (Boyd and Gordon, 2003; Chunzheng et al., 2008; Johnson et al., 2008). Et de manière intéressante, le NGF améliore la clairance des débris de myéline dégradés au site de lésion en activant l'autophagie dans les cellules de Schwann (Li et al., 2020). De fait, les cellules de Schwann peuvent procéder à la remyélinisation du nerf sciatique et ce qui justifierait l'effet du TMZ sur la récupération motrice des rats (Karahan et al., 2019).

L'ensemble de ces preuves souligne l'importance du microenvironnement dans la régénération nerveuse qui s'effectue en partie par l'action conjointe du processus autophagique et des facteurs neurotrophiques notamment. Bien que des analyses complémentaires soient indispensables, nous suggérons que les effets bénéfiques de la RAN et le TMZ sur les modèles murins *SOD1*^{G93A} et *Sod1*^{G86R} s'expliquent par leurs propriétés conjointes sur le métabolisme énergétique, le stress oxydant, et l'autophagie.

D. Sensibilité différente des modèles murins de SLA vis-à-vis des traitements : vers une thérapie personnalisée ?

L'avènement de la génétique a permis l'identification de plus d'une centaine de mutations dans le gène *SOD1*. La découverte de mutations dans le gène *SOD1* chez des patients atteints de formes familiales (Rosen, 1993) a conduit à la création de plusieurs modèles murins de la SLA (Philips and Rothstein, 2015; Turner and Talbot, 2008). Pour appréhender au mieux la physiopathologie de la SLA et

développer de nouvelles thérapies, le recours à des modèles représentatifs de la maladie est indispensable. Toutefois, il faut garder à l'esprit que ces modèles animaux sont des outils précieux pour la recherche préclinique, qui présentent des avantages et des inconvénients. En effet, nous savons qu'un modèle animal doit remplir 3 critères majeurs pour refléter au maximum la maladie humaine étudiée, à savoir l'homologie, l'isomorphisme et la prédictivité. Or, l'une ou l'autre de ces exigences ne peut être atteinte et modéliser totalement la pathologie humaine (Poindron et al., 2008).

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur deux modèles murins en particulier : le modèle *SOD1*^{G93A} et le modèle *Sod1*^{G86R}. L'utilisation de ces deux modèles au cours de ma thèse avait un double objectif : 1) évaluer le potentiel thérapeutique de deux molécules sur le développement de la pathologie mais également 2) tirer des conclusions sur la sensibilité d'un modèle par rapport à un autre vis-à-vis d'un traitement pharmacologique. Ce sont des souris transgéniques qui expriment de manière constitutive une forme mutée humaine (*SOD1*^{G93A}) ou murine (*Sod1*^{G86R}) de la protéine SOD1. Historiquement, le modèle *SOD1*^{G93A} est le premier modèle généré par l'équipe de Gurney en 1994 mais c'est aussi le mieux décrit et le plus utilisé à travers le monde (Gurney et al., 1994). Pour rappel, ces souris développent des symptômes moteurs, des inclusions protéiques SOD1, une perte de MN, une dénervation musculaire et une paralysie progressive conduisant à leur mort, reflétant la pathologie humaine (Gurney et al., 1994). Les premiers symptômes apparaissent aux alentours de 70 jours et le décès survient vers 150 jours. Les caractéristiques phénotypiques de ce modèle sont très similaires à celles retrouvées chez les patients. Selon les lignées, la durée et l'évolution de la maladie dépendent des mutations, du nombre de copies du gène et de l'activité de la SOD1 mutée. En effet, la sévérité de la maladie est corrélée avec le nombre de copies du transgène. Dans la plupart des cas, c'est le modèle *SOD1*^{G93A} à nombreuses copies (*SOD1*$^{G93A\ high}$) qui est préféré pour sa durée de maladie (phase symptomatique) plus courte que celui à faible copie (*SOD1*$^{G93A\ low}$) qui peut s'étendre jusqu'à 4 mois (Canto and Gurney, 1997; Dal Canto and Gurney, 1995; Deitch et al., 2014). Toutefois, le modèle *SOD1*$^{G93A\ high}$ utilisé pour mes travaux a une phase symptomatique de 80 jours tandis que celle du modèle *Sod1*^{G86R} est d'environ 20 jours. Pour des études pharmacologiques, la durée de la phase symptomatique est donc cruciale. En effet, le modèle *Sod1*^{G86R} qui exprime un nombre élevé de copies du gène *Sod1* murin développe les premiers symptômes vers 90 jours et meurt aux alentours de 110 jours (Dupuis et al., 2000; Halter et al., 2010; Kiaei, 2004; Ripps et al., 1995). Les données présentées dans ce manuscrit démontrent une différence de réceptibilité des deux modèles entre la RAN et le TMZ. Nous mettons en évidence des effets bénéfiques significatifs de la RAN sur les performances motrices des souris *SOD1*^{G93A}, mais pas chez les souris *Sod1*^{G86R}. Une des raisons de ces différences d'efficacité de traitement peut être due à la durée de la maladie qui est 4 fois plus élevée dans le modèle *SOD1*^{G93A} que le modèle *Sod1*^{G86R}. Bien que cela ne soit pas prouvé, la sévérité de progression

de la maladie dans le modèle *Sod1*^{G86R} peut justifier l'absence d'effet de la RAN dans nos études. De plus, nous avons également pu constater des effets bénéfiques semblables du TMZ sur la composante motrice et métabolique dans les deux modèles murins *SOD1*^{G93A} et *Sod1*^{G86R}. Bien que le TMZ n'ait pas eu d'effet sur la survie des souris *Sod1*^{G86R}, la sévérité de progression peut totalement annihiler les effets potentiels du TMZ. Enfin, nous pouvons également envisager qu'une dose plus élevée de TMZ pourrait être favorable à ce modèle sévère de SLA.

En revanche, ces deux modèles partagent les mêmes stigmates de la SLA à savoir la perte de poids, l'hypermétabolisme, la perte sélective et progressive des neurones moteurs (corticospinaux, bulbaires et spinaux), une dénervation musculaire, une paralysie progressive ainsi que des agrégats protéiques (Philips and Rothstein, 2015). Toutefois, le début de la maladie, le phénotype, la vitesse de progression et la durée de vie de chaque lignée diffère selon le type de mutation, le nombre de copies et l'activité enzymatique associée à la mutation. En surexprimant la forme murine du gène *Sod1*, la toxicité induite par la surexpression du gène humain retrouvée dans le modèle *SOD1*^{G93A} est abolie dans le modèle *Sod1*^{G86R}. Dans ce dernier, l'activité enzymatique est inactivée du fait de la mutation G86R qui affecte le site catalytique de l'enzyme. De plus, les agrégats protéiques SOD1 provoquent des altérations morphologiques mitochondriales telles que des phénomènes de vacuolisation et de dilatation décrits à la fois dans les MN et les muscles squelettiques des souris *SOD1*^{G93A} (Jaarsma et al., 2001b; Jung et al., 2002). A l'exception des modèles *SOD1*^{G93A} et *SOD1*^{G37R} (non présenté ici), aucune mitochondriopathie n'a été détectée dans les MN du modèle *Sod1*^{G86R} et des patients atteints de SLA (Higgins et al., 2003; Wong et al., 1995). Cette mitochondriopathie observée dans le modèle *SOD1*^{G93A} pourrait influencer la susceptibilité de réponse face à un traitement en comparaison au modèle *Sod1*^{G86R}, mais est actuellement inexplicable. Enfin, nous ajoutons que l'impact du fond génétique d'un modèle animal sur le développement d'une maladie est non négligeable. L'équipe de Pfohl a montré de meilleures performances motrices mais aussi une survie plus élevée chez les souris *SOD1*^{G93A} de fond génétique C57BL/6 comparées à leurs homologues de fond génétique B6SJL (Pfohl et al., 2015). En outre, il a été montré que le fond génétique altérait le phénotype moteur d'un modèle murin d'atrophie musculaire spinale (SMA). En effet, l'évaluation phénotypique de ces souris a révélé que les performances motrices, l'atrophie musculaire, la perte des MN et des JNM s'observaient à des stades plus précoces chez les souris SMA de fond génétique FVB par rapport aux souris BL6. Enfin, l'étude démontre que la survie est aggravée pour les souris FVB comparée aux souris BL6 (Eshraghi et al., 2016).

Etant donné que j'ai utilisé deux modèles murins de SLA (mutations et fond génétique différents), il est important de souligner que nous ne pouvons pas comparer ces paramètres entre eux dans mes travaux de thèse. En revanche, nous ne pouvons pas exclure l'impact qu'ils peuvent avoir sur le

déclenchement, la durée, la sévérité de la SLA et l'espérance de vie des animaux. De plus, la convergence de l'ensemble de ces points pour un modèle animal fera qu'il sera plus ou moins sensible à un traitement pharmacologique donné. En conclusion, nous suggérons que la différence d'efficacité de traitement observée sur les deux modèles murins de SLA utilisés au cours de ma thèse justifie l'intérêt des thérapies ciblées mais rappelle une fois de plus la complexité de cette pathologie.

E. Intérêt de cibler les atteintes métaboliques par ce type de traitement

Jusqu'ici considérés comme des traitements anti-angineux et anti-ischémiques, nous avons vu que la RAN et le TMZ conféraient des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique de souris modèles de SLA. Déjà sur le marché, ces médicaments pourraient être sollicités pour leurs propriétés métaboliques dans le cas d'un repositionnement thérapeutique pour pallier les altérations métaboliques décrits chez les patients atteints de SLA.

Comme nous le savons, la SLA est une pathologie pluricellulaire et multifactorielle la définissant de maladie complexe. Etant donné l'identification de désordres métaboliques chez les patients et les modèles murins, la SLA n'est plus considérée comme une maladie stricte du motoneurone. Depuis, la recherche de traitements symptomatiques pour traiter la composante métabolique prend tout son sens. De nombreuses données encourageantes révèlent les effets bénéfiques qu'ont certains traitements métaboliques sur le développement de la SLA dans différents modèles murins (Loeffler et al., 2016). Toutefois, la transposition en clinique de la majorité de ces agents thérapeutiques potentiels reste un échec. A l'exception d'un régime alimentaire riche en acides gras qui s'avère être bénéfique tant chez les souris modèles (Dupuis et al., 2004a; Mattson et al., 2007) que chez les patients atteints de SLA (Ludolph et al., 2020) puisqu'il augmente de manière significative leur espérance de vie. Ainsi, nous suggérons qu'une correction de la balance énergétique chez les patients atteints de SLA pourrait ralentir et/ou atténuer la sévérité du phénotype développé. Nous avons vu que les désordres métaboliques sont directement liés à la sévérité de la SLA (Bouteloup et al., 2009; Dupuis et al., 2004a, 2008; Funalot et al., 2009; Jésus et al., 2018; Ngo et al., 2015; Peter et al., 2017; Steyn et al., 2018). Nous avons montré que la correction du déséquilibre de la balance énergétique à l'aide de la RAN (Scaricamazza et al., 2020) et du TMZ (publication n°2 et 3 : Scaricamazza et al., 2021 ; Quessada et al., 2021) retardait le déclin moteur de deux modèles murins de la SLA. En revanche, nous avons également vu une différence de sensibilité de modèles à l'égard de ces molécules. Outre leurs effets sur le métabolisme énergétique (Guarini et al., 2018), la RAN et le TMZ ont également la capacité de préserver l'axe moteur des souris modèles *SOD1*^{G93A} et *Sod1*^{G86R} en agissant sur le stress oxydant et en stimulant l'autophagie. Lors d'études cliniques sur la myotonie congénitale et la sarcopénie, la RAN (Novak et al., 2015) et le TMZ (Ferraro et al., 2016) se sont révélés être efficaces améliorant ainsi les symptômes moteurs. L'intérêt que nous portons sur ces deux molécules réside dans la possibilité d'agir

aussi bien sur le métabolisme énergétique que sur le stress oxydant en améliorant la fonction mitochondriale ou encore sur le processus autophagique. Par cette approche, nous pensons que la RAN et le TMZ feraient de bons candidats pour préserver l'axe moteur et pourraient servir de traitements symptomatiques en plus d'une prescription au riluzole. Bien que la RAN et le TMZ aient des profils de sécurité favorable avec peu d'effets indésirables, il faut tout de même être vigilant sur les modalités de prescription pour le TMZ. En effet, la délivrance de TMZ n'est plus autorisée pour des patients souffrants de la maladie de Parkinson ou même de défaillance rénale grave (Dézsi, 2016; Guarini et al., 2018). Néanmoins, en appliquant ces recommandations, la proposition d'un repositionnement médicamenteux de ces deux molécules n'est pas exclue, au contraire, au vue de leurs nombreux effets bénéfiques sur les souris modèles de SLA.

Malgré les efforts considérables de la recherche, l'établissement de liens directs entre les processus pathologiques décrits et le déclenchement de la SLA reste à ce jour impossible. De nombreux composés visant un mécanisme en particulier se sont avérés efficaces en recherche préclinique mais inefficaces une fois testés en clinique en raison de la nature multifactorielle de la SLA (Petrov et al., 2017 ; Keon et al., 2021). C'est pourquoi, nous proposons une approche thérapeutique dont le but est de cibler simultanément plusieurs voies altérées dans la SLA. Ainsi, le TMZ serait le candidat idéal puisqu'il préserve l'axe moteur, rétablit l'équilibre énergétique, réduit le stress oxydant, améliore la fonction mitochondriale, est antiinflammatoire, élimine les débris cellulaires et les agrégats via l'autophagie et favorise la réinnervation et la myélinisation axonale. Comme nous l'avons vu, tous ces mécanismes sont sévèrement affectés dans la SLA. Par conséquent, le spectre d'action du TMZ ne fait que renforcer l'idée d'un repositionnement thérapeutique qui peut s'avérer prometteur pour le traitement de la SLA.

CONCLUSION

CONCLUSION

Depuis plus de 150 ans, les avancées en recherche préclinique et clinique sur la SLA ont permis la découverte de nombreux mécanismes physiopathologiques sans pour autant fournir de véritables thérapies curatives. Cette contre-performance provient de la sévérité de la SLA et de son caractère pluricellulaire et multifactoriel. En effet, décrit historiquement comme une maladie stricte du motoneurone, la SLA doit être considérée comme une maladie systémique. De la perte sélective et conjointe des neurones moteurs corticospinaux et des motoneurones bulbaires et spinaux aux altérations métaboliques, l'origine de la SLA demeure toujours incomprise. L'ensemble de mes travaux de thèse a mis en évidence les effets bénéfiques d'une correction de la balance énergétique à l'aide de la RAN et du TMZ dans deux modèles murins de SLA, qui étaient jusqu'ici inexplorés dans la SLA.

A travers ce manuscrit, nous avons pu démontrer des modifications métaboliques dans les muscles squelettiques des souris *SOD1*^{G93A} au fur et à mesure que la maladie se développe. En effet, un changement métabolique du muscle glycolytique tibial antérieur est constatée et se traduit par le passage d'un métabolisme glycolytique à oxydatif. Nous montrons aussi que la RAN reprogramme le métabolisme énergétique du muscle glycolytique tout en améliorant les performances motrices des souris *SOD1*^{G93A}. Enfin, le traitement chronique à la RAN a permis de limiter l'hypermétabolisme mais n'a pas impacté la survie de ces souris. En parallèle, nous nous sommes intéressés aux effets du TMZ, un analogue de la RAN, sur le développement de la SLA. Pour la première fois dans la SLA, nous révélons *in vivo* que la TMZ maintient la force musculaire, préserve les motoneurones de la dégénérescence, et protège les jonctions neuromusculaires de la dénervation chez les souris *Sod1*^{G86R} et les souris *SOD1*^{G93A}. Ces effets bénéfiques nous ont amené à nous intéresser à son mode d'action potentiel. Pour comprendre ces effets bénéfiques, nous avons montré que le TMZ accélère la récupération motrice fonctionnelle et favorise la réinnervation musculaire chez des souris nTg ayant subi une compression du nerf sciatique. En association avec ces résultats, nous montrons *in vitro* que le TMZ protège les motoneurones en culture d'une excitotoxicité au glutamate et un réseau neuritique préservé. Enfin, le TMZ permet également de préserver le muscle glycolytique tibial antérieur, vulnérable dans la SLA, d'un changement de statut métabolique. L'ensemble des effets bénéfiques de ces molécules sur l'axe moteur pourrait résulter de leurs propriétés métaboliques et antioxydantes mais qui elles doivent être approfondies. Mes travaux de thèse soulignent d'une part l'importance d'une modulation de la balance énergétique sur le développement de la SLA et d'autre part révèlent les propriétés neuroprotectrices du TMZ par ses actions combinées via différentes voies moléculaires sur l'axe moteur des souris modèles de SLA. Cette molécule prometteuse pourrait s'inscrire dans un programme de repositionnement médicamenteux pour le traitement de la SLA.

ANNEXES

A. Données préliminaires de l'étude comparative des deux composés dans le modèle *Sod1^{G86R}*

En parallèle de l'étude précédente sur le modèle murin *SOD1^{G93A}*, j'ai mené au début de ma thèse une étude visant à comparer les effets de la RAN et du TMZ sur le développement de la SLA dans le modèle murin *Sod1^{G86R}*. Ces deux agents pharmacologiques sont connus pour présenter des propriétés intéressantes sur la balance énergétique qui est mise à mal dans la SLA. L'intérêt d'utiliser ces composés est qu'ils permettent de stimuler la glycolyse et d'inhiber la β-oxydation afin de rétablir une balance énergétique physiologique. De même, nous suggérons que la correction de cette balance énergétique ralentirait le développement de la SLA.

Pour évaluer les potentiels effets de ces composés, j'ai réalisé une étude préliminaire à un stade présymptomatique de la maladie durant laquelle le poids corporel et la force musculaire ont été mesurés. Avant le début du suivi longitudinal (60 jours), les animaux ont été répartis sur la base de leur poids et leur force musculaire pour l'établissement de groupes homogènes. A partir de 80 jours (stade présymptomatique), les traitements à la RAN ou à la TMZ sont instaurés dans l'eau de boisson à raison de 80mg/kg/jour et 20mg/kg/jour respectivement. Avant et après traitement, j'ai effectué des enregistrements électromyographiques dans le muscle tibial antérieur à prédominance glycolytique, un des premiers muscles à être particulièrement atteint dans la SLA. Ces mesures permettent d'identifier de l'activité électrique spontanée révélant une dénervation musculaire, caractéristique de la SLA. A 95 jours, les tissus ont été collectés pour des analyses biochimiques.

Tout d'abord, la **figure 1A** ne montre aucune perte de poids pour les souris transgéniques (Tg) traitées au TMZ tandis qu'on note une perte de poids de 7% et 10% pour les souris transgéniques non traitées ou traitées à la RAN respectivement. A partir de 88 jours, les souris Tg veh et RAN perdent significativement en force musculaire. La force musculaire des animaux Tg TMZ est significativement maintenue et plus élevée que les deux autres groupes dans le temps (**figure 1B**). Enfin, les symptômes moteurs se développent chez certains animaux dès 75 jours (**figure 1C**). Bien que les analyses statistiques ne révèlent pas de significativité, le début de la maladie tend à être ralentit chez les animaux Tg traitées à la TMZ.

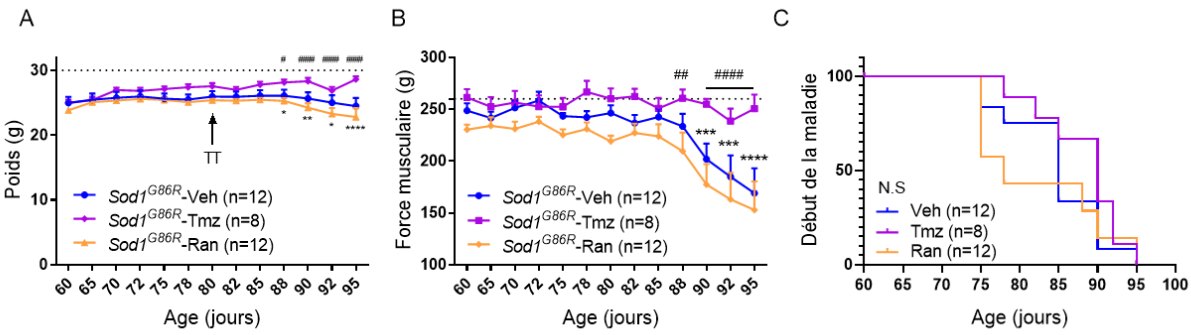


Figure 1: La TMZ prévient la perte de poids et maintient les fonctions motrices au cours du temps. ***(A)*** *Evolution pondérale des souris Sod1^{G86R} avec ou sans traitement à la RAN ou TMZ.* ***(B)*** *Evolution de la force musculaire et* ***(C)*** *du point de départ de la maladie des souris Sod1^{G86R} avec ou sans traitement à la RAN ou la TMZ. Les traitements non pas eu d'effets sur les souris non-transgéniques (non représenté). (TMZ vs Veh: #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001; ####p<0,0001 ; TMZ vs RAN: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001, Anova à 2 facteurs).*

La **figure 2** présente les enregistrements électrophysiologiques (EMG) et la quantification des marqueurs de dénervation associés. Avant traitement (78 jours), aucun groupe ne présente de dénervation musculaire (**figure 2A**). En revanche, après 13 jours de traitement, ~60% de souris Tg Veh et ~50% de souris Tg RAN montrent de l'activité électrique spontanée. Seul le groupe de souris Tg TMZ ne présente aucune dénervation musculaire. En association avec ces enregistrements EMG, l'expression des ARNm des sous-unités α et γ du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (AchR) est mesurée (**figure 2B**). Une induction significative de l'expression des ARNm des sous-unités α est notée dans le muscle des souris Tg veh et Ran. Aucune augmentation de l'expression de ce marqueur n'est observée dans le groupe TMZ. L'expression du marqueur AchRγ est significativement augmentée dans le groupe veh et une forte tendance à l'augmentation dans le groupe Ran. Aucun induction de l'expression d'AchRγ n'est observée dans le groupe TMZ.

Ces résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence les effets bénéfiques potentiels de la TMZ par rapport à la RAN sur les performances motrices et la dénervation musculaire du modèle *Sod1^{G86R}*. Nous pouvons ainsi conclure que la TMZ semble plus efficace que la RAN sur le modèle *Sod1^{G86R}*. Toutefois, ces données méritent d'être confirmées et donc une investigation plus poussée des effets positifs de la TMZ sur ce modèle est nécessaire. Ainsi, j'ai étudié plus largement le potentiel de la TMZ sur le modèle *Sod1^{G86R}* afin de déterminer si la TMZ peut s'avérer être un candidat médicament pour la SLA (cf. partie C : publication 3).

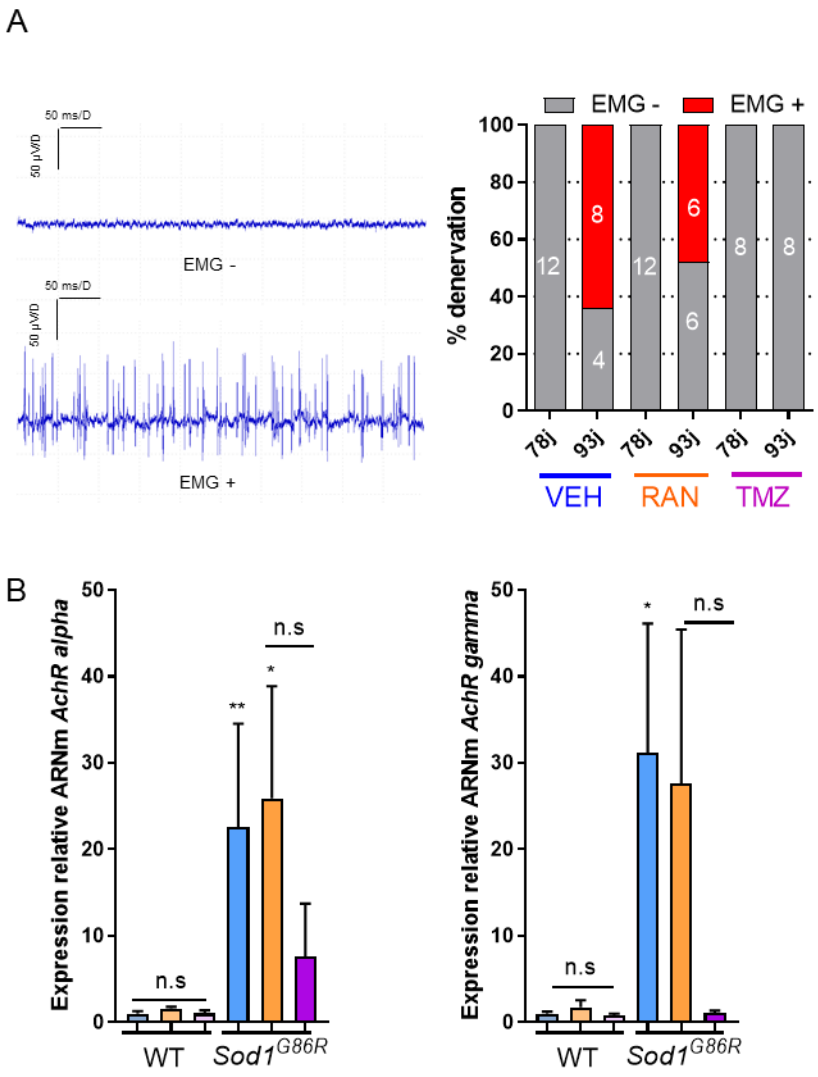


Figure 2 : La TMZ prévient de la dénervation musculaire et surexpression des marqueurs de dénervation limitée dans le muscle tibial antérieur.

(A) *Enregistrements électromyographiques (EMG) réalisés avant et après traitement lors du développement de la maladie. Un EMG qualifié de "positif" représente une activité électrique spontanée mesurée lorsque les pics sont supérieurs à 50µV. Le pourcentage d'animaux développant de l'activité électrique spontanée (EMG +) est représenté pour chaque âge (avant et après traitement). Représentations graphiques des tracés obtenus lors d'un EMG – et d'un EMG + (n=8-12 pour les souris transgéniques, à 78 et 93 jours respectivement).* ***(B)*** *Expression relative des niveaux d'ARNm des marqueurs de dénervation comme la sous-unité α du récepteur nicotinique à l'acétylcholine (AChRα) et la sous-unité γ du récepteur à l'acétylcholine (AChRγ) évaluée par qPCR dans le muscle tibial antérieur de 95 jours. Les valeurs de cette figure sont exprimées en moyenne ± ESM ; n= 5 pour les souris nTg et 8 pour les souris Tg. **p<0,01: p-value nTg vs Tg Veh et #p<0,05 : p-value Tg Veh vs Tg TMZ ; Anova à un facteur).*

B. Publication 1: Repurposing of Trimetazidine for Amyotrophic Lateral Sclerosis: a study in *SOD1^{G93A}* mice.

Depuis peu, le métabolisme énergétique fait l'objet de plus en plus de recherches dans le domaine de la SLA. En effet, les différentes études ont souligné l'importance du métabolisme énergétique dans la physiopathologie chez les patients atteints de SLA mais aussi les animaux modèles. Il a été montré à multiples reprises que l'hypermétabolisme et la dyslipidémie impacte sévèrement la progression de la SLA (Dupuis et al., 2008, 2011; Jésus et al., 2018; Steyn et al., 2018) et sont systématiquement retrouvés chez les patients SLA (Bouteloup et al., 2009; Funalot et al., 2009; Peter et al., 2017) et les modèles murins (Dupuis et al., 2004a). L'altération du métabolisme énergétique se caractérise par l'incapacité pour le muscle d'utiliser le glucose comme source d'énergie alors que l'utilisation des acides gras est significativement augmentée (Palamiuc et al., 2015). Faisant suite à l'étude de Scaricamazza et al., 2020, un nouvel article de nos collaborateurs italiens auquel j'ai pu participer a été soumis révélant les effets bénéfiques sur la progression de la maladie chez les souris *SOD1^{G93A}* d'un autre modulateur métabolique, la trimétazidine (TMZ).

Cette étude s'est intéressée à différents mécanismes décrits dans la SLA comme la dégénérescence des MN, le démantèlement des JNM, l'hypermétabolisme, le métabolisme énergétique musculaire et la neuroinflammation. Tout d'abord, ce travail met en avant les effets bénéfiques du TMZ sur l'évolution de la maladie des souris *SOD1^{G93A}* ainsi que l'intégrité de leur axe moteur. De manière significative, le TMZ retarde la perte de force musculaire et augmente considérablement la durée de la maladie des souris mâles et femelles *SOD1^{G93A}*. De plus, le traitement allonge significativement la survie des souris mâles et femelles *SOD1^{G93A}* en comparaison aux souris *SOD1^{G93A}* non traitées. Ces résultats nous ont donc amené à évaluer les effets du traitement sur l'intégrité des JNM et la survie des MN. Nous montrons que le TMZ préserve l'intégrité des JNM et protège les MN de la dénervation. En effet, le TMZ limite la fragmentation et la déstabilisation de la JNM. De plus, le TMZ réduit les marqueurs de la neuroinflammation ainsi que la démyélinisation et l'infiltration de cellules immunitaires. De part son action antiinflammatoire, le TMZ préserverait l'axe moteur des souris *SOD1^{G93A}* en leur conférant de meilleures performances motrices que leurs homologues non traitées. En plus de la composante motrice, nous avons évalué les effets du TMZ sur le métabolisme énergétique des souris *SOD1^{G93A}*. Nous montrons tout d'abord que le TMZ prévient l'hypermétabolisme classiquement mesuré chez les souris *SOD1^{G93A}*. En parallèle, nous avons également souligné l'action hypoglycémiante du TMZ sur les souris *SOD1^{G93A}* atténuant leur intolérance au glucose. Nous nous sommes ensuite concentrés sur le métabolisme énergétique musculaire dans le muscle tibial antérieur à prédominance glycolytique, particulièrement vulnérable dans la SLA. Il est connu qu'au cours de la maladie, le profil métabolique des fibres musculaires tend à changer d'un métabolisme glycolytique à

un métabolisme plus oxydatif impactant sévèrement les performances motrices. Nous montrons ici que le TMZ restaure partiellement ce changement d'état métabolique des fibres du muscle tibial antérieur des souris *SOD1^{G93A}* à trois âges différents. Enfin, nous rapportons également que le TMZ améliore la fonction mitochondriale dans le muscle tibial antérieur et la moelle épinière des souris *SOD1^{G93A}*. Le traitement chronique au TMZ a permis de corriger les atteintes métaboliques générales en contrecarrant l'hypermétabolisme mais également en restaurant la glycolyse et diminuant la β-oxydation dans le muscle squelettique.

L'ensemble de ce travail renforce l'intérêt crucial d'agir sur le métabolisme énergétique du muscle strié squelettique des souris *SOD1^{G93A}* par l'intermédiaire de molécules comme le TMZ qui présente des effets majeurs sur la composante motrice et métabolique de la SLA. De plus, les effets neuroprotecteurs du TMZ sur les différents mécanismes pathologiques retrouvés dans la SLA font de cette molécule un candidat sérieux pour le traitement de la SLA.

Contribution personnelle :

Pour cette publication, j'ai mis en place l'administration du TMZ par voie orale en eau de boisson par une étude de prise hydrique afin de s'assurer d'une part que les animaux consommaient la même quantité d'eau que leurs homologues non traité et d'autre part que le traitement était bien assimilé. A l'issue de cette étude, j'ai prélevé le sang et le plasma dans le but de mesurer les concentrations plasmatiques de TMZ afin de valider le mode d'administration. Là aussi, j'ai pu participer aux discussions des expériences du papier.

Repurposing of Trimetazidine for Amyotrophic Lateral Sclerosis: a study in *SOD1^{G93A}* mice.

Silvia Scaricamazza[1,2§], Illari Salvatori[1,3§], Susanna Amadio[1], Valentina Nesci[1], Alessio Torcinaro[4], Giacomo Giacovazzo[1,2], Aniello Primiano[5,6], Michela Gloriani[1], Niccolò Candelise[1,7], Luisa Pieroni[1], Jean-Philippe Loeffler[8,9], Frederique Renè[8,9], Cyril Quessada[8,9], Tesfaye W. Tefera[10], Hao Wang[10], Frederik J. Steyn[11,12], Shyuan T. Ngo[10,12], Gabriella Dobrowolny[13], Elisa Lepore[13], Andrea Urbani[6,7], Antonio Musarò[13], Cinzia Volonté[1,14], Elisabetta Ferraro[15], Roberto Coccurello[1,16], Cristiana Valle[1,7], Alberto Ferri[1,7]

1 IRCCS Fondazione Santa Lucia, Rome, Italy
2 University of Rome "Tor Vergata", Department of Biology, Rome, Italy
3 University of Roma "La Sapienza", Department of Experimental Medicine, Rome, Italy
4 National Council of Research (CNR), Institute of Cell Biology and Neurology (IBCN), Rome, Italy
5 Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy
6 Fondazione Policlinico Universitario "Agostino Gemelli" IRCCS, Rome, Italy
7 National Research Council (CNR), Institute of Translational Pharmacology (IFT), Rome, Italy
8 Université de Strasbourg, UMR_S 1118, Strasbourg, France
9 INSERM, U1118, Central and Peripheral Mechanisms of Neurodegeneration, Strasbourg, France
10 Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia
11 School of Biomedical Sciences, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia
12 Centre for Clinical Research, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia
13 University of Rome "La Sapienza", DAHFMO-Unit of Histology and Medical Embryology, Rome, Italy
14 National Research Council (CNR), Institute for Systems Analysis and Computer Science (IASI), Rome, Italy
15 University of Pisa, Department of Biology, Pisa, Italy
16 National Research Council (CNR), Institute for Complex System (ISC), Rome Italy.

§ These authors have equally contributed to this work.

Correspondence to:

Alberto Ferri, National Research Council, Institute of Translational Pharmacology (IFT), Rome, Italy. Fax: +39 06 501703323, Tel. +39 06 501703070 Email: alberto.ferri@cnr.it

Cristiana Valle, National Research Council, Institute of Translational Pharmacology (IFT), Rome, Italy. Fax: +39 06 501703323, Tel. +39 06 501703087 Email: c.valle@hsantalucia.it

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis, Trimetazidine, Hypermetabolism, Neurodegeneration, Mitochondria, *SOD1^{G93A}* mice.

ABSTRACT

Background and Purpose

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a neurodegenerative disease characterized by the degeneration of upper and lower motor neurons, progressive wasting and paralysis of voluntary muscles is currently incurable despite intense research and numerous unsuccessful clinical trials. Although considered as a pure motor neuron disease, increasing evidence indicates that the sole protection of motor neurons by a single target drug is not sufficient to improve the pathological phenotype. We therefore evaluated the therapeutic potential of the multi-target drug, trimetazidine, in *SOD1*^{G93A} ALS mice.

Experimental Approach

Trimetazidine is an anti-ischemic drug that is widely used for the treatment of coronary artery disease. As a metabolic modulator, Trimetazidine improves glucose metabolism. Furthermore, Trimetazidine enhances mitochondrial metabolism and promotes nerve regeneration, exerting an anti-inflammatory and antioxidant effect. Here, we orally treated *SOD1*^{G93A} mice with Trimetazidine, solubilized in drinking water at a dose of 20 mg/kg, from disease onset. We assessed the impact of Trimetazidine on disease progression by studying metabolic parameters and grip strength, as well as histological alterations in skeletal muscle, peripheral nerve and spinal cord.

Key Results

Oral administration of Trimetazidine delays motor function decline, improves muscle performance and metabolism, and significantly extends overall survival of *SOD1*^{G93A} mice. Moreover, Trimetazidine prevents the dismantlement of neuromuscular junctions, attenuates spinal motor neuron loss and reduces neuroinflammation in the spinal cord and in peripheral nerves.

Conclusion and Implications

In *SOD1*^{G93A} mice, the therapeutic effect of Trimetazidine is underpinned by its action in improving mitochondrial function in both skeletal muscle and spinal cord.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder that is clinically characterized by the loss of upper and lower motor neurons. Despite intense research studies and numerous clinical trials, ALS currently remains an incurable disease (Wobst et al., 2020).

Metabolic dysfunction has been linked to ALS pathogenesis since the 1970s (Van den Bergh et al., 1978; Reyes et al., 1984). In humans, a decrease in premorbid body mass index (BMI) increases the risk of ALS (O'reilly et al., 2013), while weight loss and hypermetabolism are associated with poor prognosis (Steyn et al., 2018; MR et al., 2020). Accordingly, both ALS patients and animal models share features such as weight loss, energy store depletion, hypermetabolism and alterations in glucose and lipid metabolism (Ferri and Coccurello, 2017; Peggion et al., 2017; Steyn et al., 2018). Overall, these metabolic derangements are likely to promote the use of fat as the main energy source to protect from protein catabolism (Ngo et al., 2014). However, constant lipid consumption results in the exhaustion of energy stores, loss of body fat mass (Tremblay et al., 1990; Dolezalova et al., 2007; Ngo et al., 2014) and a reduction in BMI (Ngo et al., 2014; Kirk et al., 2019).

Despite a growing body of evidence linking metabolic alterations to disease outcome in ALS, interest in targeting metabolic dysfunction as a therapeutic approach has only grown in recent times (Ngo and Steyn, 2015; Ferri and Coccurello, 2017; Fayemendy et al., 2021). In this context, we aimed to evaluate the therapeutic potential of Trimetazidine (TMZ) in the *SOD1^{G93A}* mouse model of ALS. TMZ is an anti-ischemic drug used for the treatment of coronary artery disease. This drug is classified as a metabolic modulator that inhibits the long-chain mitochondrial 3-ketoacyl coenzyme A thiolase (ACAA2), an enzyme that catalyzes the oxidation of long-chain fatty acids (Kantor et al., 2000; Kalucka et al., 2018). Because of its ability to inhibit β-oxidation and fatty acid uptake, TMZ improves glucose metabolism (Kantor et al., 2000; Fragasso et al., 2003). Additionally, TMZ is known to increase mitochondrial protein levels and stimulate myogenesis, muscle strength and oxidative metabolism in aged and cachectic muscles, improving muscle quality and neuromuscular communication (Molinari et al., 2017; Belli et al., 2019).

Here, we report that when administered orally at disease onset, TMZ improves muscle performance and energy metabolism, whilst also extending survival of *SOD1^{G93A}* mice. Moreover, we show that TMZ protects neuromuscular junctions (NMJs), preserves spinal motor neurons and reduces neuroinflammation. In this framework, TMZ exerts therapeutic benefit by improving mitochondrial function and, ultimately, the production of adenosine triphosphate (ATP).

RESULTS

TMZ improves physical performance and extends lifespan of *SOD1^{G93A}* mice

Treatment with TMZ in *SOD1^{G93A}* mice was initiated at symptom onset, which corresponded to 70 days of age and 20% decrease in grip strength (Fig. S1). TMZ was administered orally in drinking water at 20mg/kg based on plasma bioavailability (Fig. S2). This dose achieves a TMZ plasma concentration of 70 ng/ml in *SOD1^{G93A}* mice, which is similar to that obtained in humans (Jiao et al., 2007). TMZ-treated *SOD1^{G93A}* mice have a net improvement in grip strength when compared to untreated *SOD1^{G93A}* mice (Fig. 1A, B). The beneficial effect of TMZ treatment on grip strength appears to last longer in males than females. However, after 154 days (for females) and 161 days (for males) data are not statistically significant due to the low number of remaining animals still able to perform the test. Most importantly, the administration of TMZ delays the time to reach disease midpoint and endpoint (Fig. 1C, D). This is

mirrored by a consistent increase of disease duration (Fig. 1E, F) and an overall marked extension in the lifespan of *SOD1^{G93A}* mice (Fig. 1G, H).

TMZ prevents hypermetabolism in symptomatic *SOD1^{G93A}* mice

We evaluated the impact of TMZ treatment on whole-body metabolism in 120-day old animals by indirect calorimetry. The increase in energy expenditure (i.e. hypermetabolism), typical of *SOD1^{G93A}* mice (Scaricamazza et al., 2020; Steyn et al., 2020), is not observed in TMZ-treated male and female mice (Fig. 2A, B, C, D). In agreement with previous findings, TMZ appears to improve glucose metabolism (Marzilli et al., 2019), as glucose intolerance in 120-day old *SOD1^{G93A}* mice was abrogated by TMZ (Fig. 2E). Despite the beneficial effects induced by TMZ on hypermetabolic *SOD1^{G93A}* mice, TMZ does not impact body weight; weight loss in *SOD1^{G93A}* mice treated with TMZ is comparable to non-treated *SOD1^{G93A}* mice (Fig. S3).

TMZ partially reverses the glycolytic-to-oxidative switch in muscle from *SOD1^{G93A}* mice

A progressive switch in skeletal muscle metabolism from a glycolytic phenotype towards an oxidative phenotype has been described in ALS (Ferri and Coccurello, 2017; Scaricamazza et al., 2020; Steyn et al., 2020). One key mechanism by which muscle increases its energy expenditure and promotes lipid oxidation depends on the muscle-restricted activity of sarcolipin (SLN) and carnitine palmitoyl-transferase I (CPT1) (Scaricamazza et al., 2020). SLN, upon binding to the sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase (SERCA), inhibits calcium transport to favor ATP hydrolysis (Bal et al., 2012), whereas CPT1 allows fatty acids to enter mitochondria. In agreement with this, at 120 days of age, SLN and CPT1 are significantly upregulated in the tibialis anterior (TA) muscle of *SOD1^{G93A}* mice when compared to WT mice, while TMZ treatment partially attenuates this increase in protein expression (Fig. 3A).

Next, we evaluated whether TMZ treatment affects the mRNA expression levels of myosin heavy chain IIa (MyHCIIa) and IIb (MyCHIIb) isoforms, which are typically expressed by fast-twitch oxidative and glycolytic myofibers, respectively. We observe a significant reduction in the expression of MyHCIIa (Fig. 3B upper panels) and a concomitant upregulation of MyCHIIb (Fig. 3B lower panels) in TMZ-treated *SOD1^{G93A}* mice at 90, 120 and 150 days of age when compared to non-treated *SOD1^{G93A}* mice. Accordingly, the oxygen storage protein Myoglobin, normally abundant in oxidative myofibers and highly expressed in *SOD1^{G93A}* mice, is downregulated by TMZ treatment (Fig. 3C). Assessment of oxidative fiber composition in TA muscle via the in situ nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase-tetrazolium reductase activity assay (NADH-TR) reveals a larger oxidative region in *SOD1^{G93A}* mice vs WT mice (Fig. 3D). Treatment with TMZ significantly reduces the proportion of oxidative fibers in 90- (Fig. S4) and 120-day old (Fig. 3D) *SOD1^{G93A}* mice, without having any effects in WT animals. Finally, TMZ reduces the expression of the atrophy marker Atrogin as well as the fibrosis marker Collagen type III alpha 1 chain (Col3a1) in skeletal muscle (Fig. 3E).

TMZ preserves the integrity of neuromuscular junctions in *SOD1^{G93A}* mice

Since TMZ improves grip strength and skeletal muscle metabolic phenotypes in *SOD1^{G93A}* mice, we next considered if these changes were due to a protective action of TMZ on NMJ integrity. Comprehensive morphological analysis of NMJs in the glycolytic extensor digitorum longus (EDL) muscle highlights marked alterations in NMJ integrity and innervation in 120 and 150 day-old *SOD1^{G93A}* mice when compared to WT littermates (Fig. 4A). In particular, we observe a decrease in the NMJ complexity, as evidenced by the limited level of branching areas (Fig.4B, C), and the tendency for greater neuromuscular endplate fragmentation in *SOD1^{G93A}* mice (Fig. 4D). In addition, in 150 day-old *SOD1^{G93A}* mice, we detect a significant decrease in NMJ area (Fig. 4E). Moreover, quantitative analysis of colocalization between AChR clusters and synaptophysin reveals a significant decrease in the spatial

overlap between the two fluorescent signals in *SOD1^{G93A}* mice at both 120 and 150 days of age (Fig. 4F). Crucially, TMZ improves NMJ complexity (Fig.4B, C), attenuates NMJ fragmentation (Fig. 4D), increases NMJ area (Fig. E) and enhances the percentage of AChR-synaptophysin colocalization (Fig. 4F) in the EDL muscles of *SOD1^{G93A}* mice

Finally, we analyzed selected markers of NMJ stability. Dystrophin, low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4), and agrin are critical for maintaining NMJ stability, whereas the phosphorylated form of Protein Kinase C theta (pPKCθ) is typically associated with the destabilization of NMJs (Dobrowolny et al., 2018b). In line with the reduction in NMJ dismantlement in *SOD1^{G93A}* mice treated with TMZ, we show that pPKCθ levels are reduced in TMZ-treated *SOD1^{G93A}* mice (Fig. 4G, H). While levels of dystrophin, LRP4, and agrin are higher in *SOD1^{G93A}* mice when compared to WT littermates, TMZ treatment normalizes the expression of these proteins in 120- and 150-day old *SOD1^{G93A}* mice towards WT levels (Fig. 4G, H).

TMZ reduces demyelination and immune cell infiltration in sciatic nerves from *SOD1^{G93A}* mice

Next, we explored whether TMZ treatment might exert a beneficial effect on demyelination, inflammation and axonal loss in the peripheral nervous system of *SOD1^{G93A}* mice. Cross sections of sciatic nerve from WT and treated and untreated *SOD1^{G93A}* were assessed for myelin, neurofilament heavy chain and macrophages. As shown in Figure 5, *SOD1^{G93A}* mice display a Wallerian-like degeneration characterized by myelin degradation (MBP), axonal cytoskeleton loss (NFH), and immune cell infiltration (CD68). TMZ treatment reduces axonal demyelination, preserves the ordered distribution of axonal fibers, and reduces the infiltration of inflammatory CD68+ cells in 120-day old *SOD1^{G93A}* mice (Fig. 5A). Comparable TMZ effects are also observed in 150-day old *SOD1^{G93A}* mice, with the exception of the demyelination process (Fig. 5B). Consistent with the removal of myelin debris by an increase in phagocytic GFAP+ Schwan cells (Yang and Wang, 2015) during Wallerian degeneration, we observe a strong decrease in GFAP expression in TMZ-treated *SOD1^{G93A}* mice when compared with their untreated transgenic littermates at both in 120- and 150-days of age (Fig. 5C, D).

TMZ protects the spinal cord of *SOD1^{G93A}* mice from motor neurons loss and neuroinflammation

Upstream of NMJ damage, the loss of ventral horn motor neurons is a major pathological feature of ALS and, in particular, of the *SOD1^{G93A}* mouse. Here we show that the reduction in the number of lower motor neurons in *SOD1^{G93A}* mice is particularly evident at 120 days of age and that this becomes significantly worse by 150 days of age (43% and 67% of spinal motor neurons loss respectively; Fig. 6A, B). Notably, TMZ treatment significantly improves motor neuron survival by completely or partially preserving motor neurons from death at 120 days of age (Fig. 6A) and 150 days of age (Fig. 6B), respectively.

Motor neuron degeneration is generally accompanied by a strong neuroinflammatory response, which involves, among other factors, the activation of reactive astrocytes and microglia (Volonté et al., 2019). To evaluate the potential effect of the TMZ on neuroinflammation, spinal cord sections from untreated and treated mice were probed with antibodies recognizing typical pro-inflammatory proteins. Reactive GFAP-positive astrocytes, which are not detectable in WT spinal cords, are evident in *SOD1^{G93A}* mice at 120 days of age and this becomes more pronounced at 150 days (Fig. 6C). TMZ treatment appears to inhibit the activation of reactive astrocytes at both ages, as evidenced by a decrease in GFAP immunoreactivity (Fig. 6C). Spinal cord sections from 120- and 150-day old *SOD1^{G93A}* mice also show increased immunoreactivity for CD68 (a marker of activated microglia) in parallel with a decrease in immunoreactivity for P2Y12 (a marker of resting microglia) when compared to WT mice. Treatment with TMZ reduces CD68 immunoreactivity in 120- and 150-day old *SOD1^{G93A}* mice, and increases P2Y12 immunoreactivity in 120-day old *SOD1^{G93A}* mice (Fig. 6D, E).

TMZ improves mitochondrial function in skeletal muscle and spinal cord of *SOD1^{G93A}* mice

To uncover the potential mechanism(s) through which TMZ exerts beneficial effects in *SOD1^{G93A}* mice, we performed in-depth analysis of the bioenergetic profiles of mitochondria isolated from the skeletal muscle and spinal cord of TMZ-treated and TMZ-untreated *SOD1^{G93A}* and WT littermate mice at 120 days of age.

Analysis of Oxygen Consumption Rate (OCR) coupled to ATP production performed through the "coupling assay" shows that TMZ improves the functional state of mitochondria (Fig. 7A, B). Indeed, basal respiration (Basal), maximal ATP-coupled respiration obtained by the addition of ADP (State 3), basal ATP synthesis-uncoupled respiration obtained through the addition of oligomycin (State 4o) and maximal ATP synthesis-uncoupled respiration obtained by the addition of FCCP (State 3u) are all significantly increased in mitochondria purified from skeletal muscle (Fig. 7C) and spinal cord (Fig. 7D) of TMZ treated *SOD1^{G93A}* mice when compared to untreated mice. Notably, rescue of State 3 OCR by TMZ indirectly highlights an improved ability of mitochondria to produce ATP. Consistent with this, analysis of the Electron Transport Chain (ETC) through the "electron flow assay" reveals improved ETC complex activities in response to TMZ treatment (Fig. 8A, B). The OCR values obtained by the sequential addition of rotenone, succinate, antimycin A and ascorbate/TMDP show that TMZ improves Complex I-, Complex II/III- and Complex IV-dependent respiration in mitochondria isolated from the TA (Fig. 8C). In isolated spinal cord mitochondria, TMZ restores the activity of Complex I and Complex II/III (Fig 8D).

DISCUSSION

To date, a lack of understanding of the biological processes that trigger the onset and progression of ALS has impeded efforts to develop effective therapies for the disease. Of the 52 compounds that significantly attenuate disease pathology and improve disease phenotype and survival in mouse models of ALS, none have proven to be effective in clinical trials (Petrov et al., 2017). Due to the multifactorial nature of ALS, previous therapeutic strategies that target a single disease mechanism are likely to be inappropriate for slowing disease progression (Keon et al., 2021). By contrast, a more effective approach could be the use of a compound that acts simultaneously on various disease-relevant pathways (Gontijo et al., 2019). TMZ is a metabolic modulator that is used to treat cardiomyopathies; it improves metabolic performance of cardiac fibers by targeting a range of molecular pathways (Shu et al., 2021). By inhibiting fatty acid oxidation, TMZ is able to enhance glucose metabolism (Marzilli et al., 2019). Moreover, TMZ is known to improve mitochondrial function and calcium handling (Argaud et al., 2005; Meng et al., 2006; Dedkova et al., 2013), increase cellular antioxidant capacity (Dhote and Balaraman, 2008) and suppress inflammatory responses (Kuralay et al., 2006; Martins et al., 2012). Given that all of these pathways are affected in ALS, we aimed to assess the therapeutic potential of TMZ in the *SOD1^{G93A}* mouse model of ALS.

Oral administration of TMZ from disease onset significantly improved grip strength and the life span of *SOD1^{G93A}* mice. The beneficial effects of TMZ on grip strength, and hence skeletal muscle performance, appear to be due to a partial reversal in the glycolytic-to-oxidative switch that has been shown to occur in the skeletal muscle of *SOD1^{G93A}* mice (Dobrowolny et al., 2018a; Scaricamazza et al., 2020; Steyn et al., 2020). In line with this, TMZ is known to inhibit fatty acid oxidation by targeting 3-ketoacyl-CoA thiolase activity (Amoedo et al., 2021), which would have a net effect of driving muscle towards glucose use, and thus more efficient utilization of the available oxygen (Lopaschuk et al., 2003). This notion is further supported by our data demonstrating that TMZ was able to downregulate the expression of CPT1 in skeletal muscle, and abrogate glucose intolerance in *SOD1^{G93A}* mice. Of note,

genetic ablation or pharmacological inhibition of CPT1 has previously been shown improve disease outcome in *SOD1^{G93A}* mice (Trabjerg et al., 2021). Thus, the improvement in life span in TMZ treated *SOD1^{G93A}* mice could be due, in part, to the effect of TMZ on modulating CPT1 expression and glucose-fatty acid-flux in ALS skeletal muscle.

Since skeletal muscle is the major determinant of whole-body energy expenditure (Zurlo et al., 1990), it is conceivable that TMZ-induced improvements in skeletal muscle energy metabolism might also decrease the characteristic hypermetabolism (i.e. increased metabolic rate) seen in *SOD1^{G93A}* mice (Scaricamazza et al., 2020; Steyn et al., 2020). This is of clinical importance as hypermetabolism is associated with poor outcomes in mouse models of ALS and in human ALS (Dupuis et al., 2004; Doshi et al., 2017; Jésus et al., 2018; Steyn et al., 2018; Scaricamazza et al., 2020; Fayemendy et al., 2021). In 2020, we demonstrated that treatment of *SOD1^{G93A}* mice with the metabolic modulator ranolazine was able to improve locomotor function, decrease metabolic rate and partially rescue the dysfunction of muscle metabolism in *SOD1^{G93A}* mice (Scaricamazza et al., 2020). A caveat of our 2020 study was that we did not assess the impact of ranolazine on survival. Building on this work, we now show that TMZ is able to prevent the emergence of hypermetabolism whilst also improving survival in *SOD1^{G93A}* mice. These data highlight that the beneficial effects of TMZ are likely to be due to a combination of its metabolic actions of skeletal muscle and whole-body energy metabolism.

The effect that TMZ exerts on skeletal muscle metabolism occurs because of the “metabolic flexibility” of this organ. However, neurons are thought to exhibit a characteristic “metabolic inflexibility” since they use glucose as a primary energy source. Therefore, it could be argued that the action of TMZ as a metabolic modulator cannot solely explain the beneficial effects on grip strength and survival that we observed in response to TMZ treatment in *SOD1^{G93A}* mice. Yet, we describe for the first time, a strong positive impact of TMZ on the bioenergetics of purified mitochondria from the spinal cords of TMZ treated *SOD1^{G93A}* mice. When considered alongside observations of decreased glucose use (Browne et al., 2006), and increased markers of oxidative stress and lipid peroxidation in brain and spinal cord tissue (Simpson et al., 2004; Miana-Mena et al., 2011) in ALS, we cannot discount the modulation of lipid metabolism (Tracey et al., 2018) or modulation of cellular metabolism as a whole as a potential therapeutic mechanism of TMZ.

In addition to the metabolic effects of TMZ, we provide evidence to show that TMZ can exert neuroprotection through other mechanisms. We note that TMZ protects against the dismantlement of NMJs, an event that typically occurs in the early phase of disease in *SOD1^{G93A}* mice (Fischer et al., 2004; Moloney et al., 2014; Dobrowolny et al., 2018b). It has been proposed that NMJ abnormalities predict the degeneration of both distal axons and spinal motor neurons in *SOD1^{G93A}* mice (Gurney et al., 1994; Fischer et al., 2004; Clark et al., 2016). The beneficial effects of TMZ might therefore originate from a delay in NMJ dismantlement, which is considered as the first event of the dying back phenomenon underlying motor neuron degeneration in ALS (Fischer et al., 2004; Dupuis et al., 2009; Bruneteau et al., 2015). Consistent with this, TMZ exerted a protective effect on peripheral nerves of *SOD1^{G93A}* mice, leading to the inhibition of the Wallerian-like neuronal degeneration, and an attenuation in spinal motor neuron loss. In our experimental paradigm, the neuroprotective effect of TMZ on spinal cord motor neurons and peripheral nerves was mirrored by a parallel decrease in neuroinflammation. The state of activation of astrocytes and microglia in the spinal cord and the infiltration of CD68+ macrophages in the sciatic nerve, which increases during the course of disease in *SOD1^{G93A}* mice (Serrano et al., 2019; Chiot et al., 2020), were mitigated by TMZ treatment. Overall, our results are in accordance with reports showing that TMZ induces axonal regeneration and myelination in a rodent model of sciatic nerve crush injury (Serarslan et al., 2009), and that it provides anti-inflammatory effects in various tissues (Wan et al., 2017).

In conclusion, our results describe the efficacy of TMZ in counteracting key cellular ALS pathologies and systemic changes in metabolism in *SOD1^{G93A}* mice. Critically, these changes were observed alongside TMZ-induced improvements in grip strength and survival. Notably, TMZ is currently approved for the management of cardiac diseases, and it has very limited side effects. For this reason, our results provide evidence to progress the repurposing of TMZ for ALS. Although further research will better circumstantiate this therapeutic approach, the ability for TMZ to improve grip strength in ALS mice could be rapidly translated to patients to improve skeletal muscle function and quality of life in primis (Scaricamazza et al., 2021). The beneficial effect of TMZ on energy metabolism in spinal cord mitochondria also highlights the ability of TMZ to target mitochondrial dysfunction as a therapeutic intervention (Mehta et al., 2019) to enhance the chance of success in ALS. Finally, given that TMZ prevents hypermetabolism in *SOD1^{G93A}* mice, our data further substantiate the precedent to target hypermetabolism as a therapeutic approach in ALS.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All procedures in Rome were performed in accordance with European Guidelines for the use of animals in research (2010/63/EU) and the requirements of Italian laws (D.L. 26/2014) and were approved by the Animal welfare office, Department of Public Health and Veterinary, Nutrition and Food Safety, General Management of Animal Care and Veterinary Drugs of the Italian Ministry of Health (protocol number 931/2017/PR). Procedures at the University of Queensland were approved by the University of Queensland Animal Ethics Committee and conducted in accordance with the Queensland Government Animal Care and Protection Act 2001, associated Animal Care and Protection Regulations (2002 and 2008) and the Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes (2004).

SOD1^{G93A} mice (B6.Cg-Tg(SOD1 G93A)1Gur/J) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred and housed in a virus/antigen-free facility with a light/dark cycle of 12 hours at constant temperature and humidity. Food and water were provided ad libitum. Transgenic hemizygous *SOD1^{G93A}* males were crossbred with C57BL/6 females and transgenic progeny were genotyped by PCR through hSOD1 oligos and IL2 as housekeeping (sequences in Table 3, see below). Disease onset was defined at 70days of age by dynamometric evaluation of grip strength, which provides an index of neuromuscular function expressed as maximal muscle strength (Ge et al., 2016). The peak paw grip strength of *SOD1^{G93A}* mice and wild-type (WT) control littermates was assessed starting from 49 days of age. The test consisted of three attempts for each mouse, with intervals of 1 minute for rest; the mean of the three examinations was normalized to the weight of each respective mouse. The onset of the disease was defined as the age when the peak paw grip strength of *SOD1^{G93A}* mice was 20% less than that of their wild-type littermates. To monitor disease progression, behavioral scores and body weight were recorded from 49 days of age (Apolloni et al., 2019; Migliarini et al., 2021). We assigned disease onset, early symptomatic, symptomatic and late symptomatic at 70, 90, 120 and 150 days of age, respectively. Mice were anaesthetized with Rompum (xylazine, 20 mg/ml, 0.5 ml/kg Bayer, Milan, Italy) plus Zoletil (tiletamine and zolazepam,100 mg/ml, 0.5 ml/kg; Virbac, Milan, Italy), and following loss of the pedal-withdrawal reflex, they were sacrificed for tissue dissection.

LC-MS evaluation of TMZ concentration in plasma

Different doses of TMZ (Trimetazidine dihydrochloride, Selleckchem), 0 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg, were dissolved in drinking water and administered to WT mice (at least n=3 for each

dose). After one week of treatment, mouse blood was collected in EDTA-treated tubes and the plasma was obtained by a 10 minute centrifugation at 1000-2000 x g. 100 µl of sample and calibrators were mixed in 300 µl of internal standard working solution containing 25 ng/mL Trimetazidine-d8 Dihydrochloride (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) and methanol (LC-MS grade, Biosolve Chimie, France). After centrifugation at 2000 rcf for 5 minutes, 2 µl of sample was injected into a UPLC-MS/MS, and analysed. Chromatographic separation was performed by ACQUITY H-Class using a BEH C18 1.7 µm, 2.1 × 50 mm column (Waters Corporation, Milford, MA, USA) eluted at a flow rate of 200 µL/minute with a linear gradient from 95 to 5 water (LC-MS grade, Merck KGaA, Darmstadt, German) 0.05% formic acid in methanol 0.05% formic acid (98%, LC-MS grade, Mallinckrodt Baker Italia, Milano, Italia). The detection of TMZ and Trimetazidine-d8 was conducted over multiple reaction monitoring experiments (MRM conditions in Table 2) upon direct infusion of a standard solution (1 µg/mL) using a triple quadrupole Xevo TQ-S micro Mass Spectrometer (Waters Corporation) equipped with an ESI source operating in positive mode, with a capillary voltage of 3.15 kV and a desolvation tem-perature of 600 ◦C. The source of the gas was set as follows: Desolvation at 500 L/h and cone at 1 L/h. The UPLC-MS/MS system was controlled by MassLynx Mass Spectrometry Software (Waters Corporation). Data analysis was performed by software TargetLynx (Waters Corporation).

Analyte	Precursor Ion Mass (m/z)	Product Ion Mass (m/z)	Collision (V)	Cone (V)
Trimetazidine	267.16	181.00	11.0	18.0
Trimetazidine-d8	275.10	181.00	11.0	18.0

Table 2. Conditions for the detection of Trimetazidine and Trimetazidine-d8.

TMZ treatment

TMZ 20 mg/kg was dissolved in drinking water and administered to male and female *SOD1^{G93A}* and WT littermate mice starting from disease onset. Treated and untreated mice from each experimental group/sex (n≥12) were weighed and assessed for grip strength once a week starting from 70 days of age. Assigning 100% performance to each mouse at 70 days of age, we monitored disease progression and considered the midpoint and endpoint as a decrease in grip strength of 25% and 50%, respectively. Groups of 120 (n≥8) and 150 (n≥8) day-old mice were euthanized for the evaluation of the effects at mid- and long-term TMZ treatment respectively. For *SOD1^{G93A}* mice, disease end stage was defined by full paralysis of hind limbs and loss of the ability to turn within 30 seconds of being positioned on their back. At this stage mice were euthanized according to guidelines for preclinical testing in ALS (Poppe et al., 2014). Disease duration was defined as the number of days elapsed between disease onset, and thus the beginning of the treatment, and disease end stage.

Energy metabolism by indirect calorimetry system

Total energy expenditure of treated and untreated 120 day-old *SOD1^{G93A}* and WT littermate mice (n≥6 for each experimental group) was measured through an indirect calorimetry system (TSE PhenoMaster/LabMaster System, Germany) at constant air flow of 0.35 L/minute. Measures were carried out at intervals of 20 minutes for each mouse, starting at 7:00 PM and ending automatically after 48h or 72h (12h dark-light phase comparison). Mice were assessed under standard nutritional conditions (i.e., standard diet-fed) and food and water intake were continuously monitored (Giacovazzo et al., 2018; Scaricamazza et al., 2020; Steyn et al., 2020).

Glucose tolerance test (GTT)

GTTs was performed on treated and untreated 120 day-old *SOD1^{G93A}* and WT littermate mice (n≥4 for each experimental group). Glucose was measured in tail tip blood samples using a Multicare Test Strip apparatus (Biochemical Systems International, Italy). Plasma glucose was assessed at 0, 20, 40 and 60 minutes after i.p. glucose administration (2g/kg), which was delivered after a 16h overnight fast. The area under the curve was calculated using the trapezoidal rule.

Electrophoresis and western blotting

Protein obtained from the TA muscle of treated and untreated 120 day-old *SOD1^{G93A}* and WT littermate mice (n≥6 for each experimental group) were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes (Perkin Elmer, Cat# NBA085B). After blocking with Tris-buffered saline solution with 0.1% Tween-20 (TBS-T) containing 5% BSA, the membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS-T containing 2% BSA. Primary antibodies were detected using the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody, incubated at room temperature for 1 hour, diluted in TBS-T containing 1% BSA. Immunoblots were visualized using enhanced chemiluminescence (BIO-RAD ClarityTM Western ECL substrate Cat# 170-5061). The apparent molecular weight of proteins was determined by calibrating the immunoblots with pre-stained molecular weight markers (Bio-Rad Laboratories, Cat# 161-0394). Densitometric analyses were performed using ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2016). The relative expression of proteins of interest was normalized to GAPDH expression levels.

RNA isolation and Real-Time qPCR

Total RNA was extracted from TA muscles of treated and untreated 90, 120 and 150 day-old *SOD1^{G93A}* and WT littermate mice (n≥4 for each experimental group) with TRIzol® Reagent (Ambion, Life Technologies) and reverse-transcribed with the ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Cat.# A3800). Levels of mRNA expression were measured by Real-Time qPCR using a Light Cycler 480 SYBR Green System (Roche ETC). Cp values were calculated using the 'second derivative max' algorithm of the Lightcycler software. TATA box binding protein was used as the housekeeping gene for normalization. Primers sequences are presented in Table 3.

Target	Forward sequence	Reverse sequence
MyHCIIa	5'-AGTCCCAGGTCAACAAGCTG-3'	3'-GCATGACCAAAGGTTTCACA-5'
MyHCIIb	5'-AGTCCCAGGTCAACAAGCTG-3'	3'-TTTCTCCTGTCACCTCTCAACA-5'
Myoglobin	5'-CTGTTTAAGACTCACCCTGAGAC-3'	5'-GGTGCAACCATGCTTCTTCA-3'
Atrogin1	5'-TGAGCGACCTCAGCAGTTAC-3'	5'-GCGCTCCTTCGTACTTCCTT-3'
Col3a1	5'-CCCAACCCAGAGATCCCATT-3'	5'-GGTCACCATTTCTCCCAGGA-3'
SOD1	5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA-3'	5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA-3'
IL-2	5'-TAG GCC ACA GAA TTG AAA GAT CT-3'	5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3'
TATA box binding protein	5'-CCAATGACTCCTATGACCCCTA-3'	3'-CAGCCAAGATTCACGGTAGAT-5'

Table 3. Target genes and primer sequences.

Antibodies

The antibodies used in this study are summarized in Table 1.

	Antibodies	Species	Product	Dilution
Primary	CPT1A	Mouse monoclonal	Abcam	WB: 1:1000
	SLN	Rabbit polyclonal	Millipore	WB 1:1000
	GAPDH	Mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	WB 1:5000
	AGRIN	Mouse monoclonal	Millipore	WB: 1:1000
	PKCθ	Rabbit polyclonal	Cell Signaling Technology	WB 1:1000
	pPKCθ (Thr538)	Rabbit polyclonal	Cell Signaling Technology	WB 1:1000
	LRP4	Mouse monoclonal	BioLegend	WB 1:1000
	CD68	Rat monoclonal	Bio-Rad/AbD Serotec	IF 1:200
	GFAP	Mouse monoclonal	Cell Signaling Technology	IF 1:500
	NFH	Mouse monoclonal	BioLegend	IF 1:1000
	P2Y12	Rabbit polyclonal	AnaSpec	IF 1:200
	MBP	Rabbit monoclonal	Cell Signaling Technology	IF 1:200
	SMI 312	Mouse monoclonal	Biolegend	IF 1:200
	Synaptophysin	Rabbit monoclonal	Thermo Fisher Scientific)	IF 1:200
Secondary	HRP Conjugate	Goat anti-rabbit	Bio-Rad Laboratories	WB 1:2500
	HRP Conjugate	Goat anti-mouse	Bio-Rad Laboratories	WB 1:2500
	Alexa Fluor 488	Donkey anti-rat	ThermoFisher Scientific	IF 1:200
	Alexa Fluor 488	Donkey anti-mouse	ThermoFisher Scientific	IF 1:200
	Cy™3	Donkey anti-mouse	Jackson ImmunoResearch Laboratories	IF 1:100
	Cy™3	Donkey anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch Laboratories	IF 1:100
	Cy™5	Donkey anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch Laboratories	IF 1:200
	TRITC	Donkey anti-mouse	Jackson ImmunoResearch Laboratories	IF 1:400

Table 1. Antibodies used for Western blot (WB) and immunofluorescence (IF).

Skeletal muscle immunofluorescence and histochemistry

TA muscles were embedded in Tissue-Tek OCT compound and sectioned at 8 µm using a Leica Cryostat. Muscle cryosections were then used for NADH-tetrazolium reductase activity staining (NADH-TR). Briefly, muscle cryosections were hydrated in 0.1 M TRIS-HCl, pH 7.5 for 10 minutes and then incubated in NADH-TR solution (0.4 mg/ml NADH, 0.8 mg/ml NTB and 1 M TRIS-HCl, pH 7.5) for 40 minutes at 37 °C in a humidified chamber. Afterwards, exceeding reagent was removed and slides were dehydrated in increasing concentrations of ethanol. Slides were then cleared in Xylene and mounted in Eukitt mounting medium. Whole muscle section images were acquired using an Olympus BX-41, using a SPOT

RT 220-3 camera (Diagnostic Instrument, Inc.) and SPOT advanced software. The percentage of NADH-positive area was quantified using ImageJ software.

For NMJ analysis, the EDL muscle was processed as previously described (De Paola et al., 2020). Briefly muscles were dissected and fixed in 4% PFA at 4°C for 3 hours. Small bundles of muscle fibers were isolated under a dissecting microscope and immunostained with anti-neurofilament and anti-synaptophysin antibodies. TRITC and Cy5 were used as secondary antibodies to visualize neurofilament and synaptophysin primary antibodies respectively. AChRs were labelled with Alexa Fluor 488–conjugated α-bungarotoxin (10 nM; Molecular Probes). Z-stack images were obtained at sequential focal planes (2 µm apart) using a confocal microscope (Laser Scanning TCS SP2; Leica). NMJs was analyzed in terms of postsynaptic primary and secondary gutters, number of fragments, and area of AChR clusters. The z-stacked fluorescence (n= 15-30 NMJs/genotype and treatment) were analyzed using ImageJ1 software. The colocalization of synaptophysin and AChRs was evaluated using the Fiji ImageJ1 plug-in. Representative images are flattened projections of Z-stack images.

Spinal cord and sciatic nerve immunofluorescence and histochemistry

For immunofluorescence and histochemistry analysis, spinal cords and sciatic nerves of treated and untreated 120 and 150 day-old *SOD1^{G93A}* and WT mice (n≥4 for each experimental group) were dissected, post-fixed in 4% paraformaldehyde and cryoprotected in 30% sucrose in PB. Spinal cord (L3-L5) sections were cut at 30 µm-thickness using a cryostat. For motor neurons count, Nissl with cresyl violet staining was performed as previously described (Mirra et al., 2017). Briefly the sections were stained with 1% Cresyl Violet and dehydrated in 50-100% alcohol, cleared in xylene and cover-slipped with Eukitt mounting medium (Sigma-Aldrich). The ventral horns were photographed at 10× magnification with a Zeiss Axioskop 2 microscope and large neurons, with a cell body area ≥200 µm2 and a definable cytoplasm with a nucleus and nucleolus, were counted using Neurolucida software (MBF Bioscience, USA). For immunofluorescence, the sections were blocked in PBS, 0.3% TitonX-100 and 10% normal donkey serum (NDS) for 1 hour at room temperature. They were then incubated for 48 hours at 4°C with the primary antibody in PBS, 0.3% TitonX-100 and 2% NDS, followed by the appropriate secondary antibody for 3 hours at room temperature in the same solution, as previously described (Amadio et al., 2014). To analyze sciatic nerves, transverse 15 µm-thick sections were cut using cryostat, and blocked with PBS, 0.2% TitonX-100 and 10% NDS for 1 hour at room temperature. Sections were incubated for 24 hours at 4°C with the primary antibody in PBS, 0.2% TitonX-100 and 2% NDS, followed by the appropriate secondary antibody for 3 hours at room temperature. Immunofluorescence on spinal cord and sciatic nerve sections were visualized at 20× or 40× magnification with a Zeiss LSM 800 Confocal Laser Scanning Microscope and processed by ZEN 2.6 (Blue Edition) (Carl Zeiss, Milan, Italy) and Adobe Photoshop software (Adobe, San Jose, CA, USA). Densitometric analyses were performed using ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2016).

Bioenergetic analysis of isolated mitochondria

Mitochondria were isolated from the TA muscles and spinal cords of treated and untreated 120 day-old *SOD1^{G93A}* and WT littermate mice (n≥6 per group). Tissues were homogenized in 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EDTA and 10 mM HEPES KOH (pH 7.5) with a Glass/Teflon Potter Elvehjem homogenizer (Salvatori et al., 2017, 2018). The total concentration of mitochondria was determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Cat# 5000006).

Isolated mitochondria, resuspended in a minimum volume of Respiration Buffer (250 mM Sucrose, 15 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl2, 30 mM K2HPO4), were used to study mitochondrial function/dysfunction through the Coupling assay, and the study of the sequential flow of electrons

through the complexes of the electron transport chain. Briefly, in the Coupling assay, 4 ug of mitochondria were loaded into a seahorse XFe96 microplate and centrifuged for 20 minutes at 2000 x g. After centrifugation, 180 µl of Respiration Buffer [containing substrates: pyruvate (5 mM), malate (2.5 mM), glutamate (5 mM)] was added to each well and the microplate was incubated at 37°C for 8 minutes. During plate incubation, the XFe96 cartridge was loaded with drugs at a final concentration of: ADP 1 mM, Oligomycin 3 µM, FCCP (2-[2-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]hydrazinylidene]-propanedinitrile) 12 µM, and Antimycin A 2 µM. For the Electron Flow Assay, 6 ug of mitochondria were loaded into a seahorse XFe96 microplate and centrifuged for 20 minutes at 2000 x g. After centrifugation, 180 µl of Respiration Buffer [containing substrates: pyruvate (10 mM), malate (2 mM), FCCP (4 uM)] was added to each well and the microplate was incubated at 37°C for 8 minutes. During plate incubation, the XFe96 cartridge was loaded with drugs at a final concentration of: rotenone 2 µm, succinate 10 mM, antimycin A 4 µm, ascorbate and TMPD 10 mM and 100 µm, respectively. The microplates containing mitochondria were then loaded into the Seahorse XFe96 Extracellular Flow Analyzer (Seahorse Bioscience-Agilent) and the test was completed according to the protocol developed by Seahorse Agilent. All data were analyzed with XFe Wave software and displayed as either point-to-point oxygen consumption rates (pmol/minute/well), or absolute oxygen tension in mm Hg O2 versus time.

Data analysis

Data are presented as mean ± SEM. Data were analyzed using Kaplan-Meier, Student's t-test (two group comparison), one-way or two-way ANOVA as appropriate. Post-hoc analysis was carried out using Bonferroni or Tukey tests. Statistical analysis was carried out using Graphpad Prism 5 software.

REFERENCES

Amadio, S., Parisi, C., Montilli, C., Carrubba, A.S., Apolloni, S., and Volonté, C. (2014). P2Yreceptor on the verge of a neuroinflammatory breakdown. Mediators Inflamm. 2014:.

Amoedo, N.D., Sarlak, S., Obre, E., Esteves, P., Bégueret, H., Kieffer, Y., et al. (2021). Targeting the mitochondrial trifunctional protein restrains tumor growth in oxidative lung carcinomas. J. Clin. Invest. 131:.

Apolloni, S., Caputi, F., Pignataro, A., Amadio, S., Fabbrizio, P., Ammassari-Teule, M., et al. (2019). Histamine Is an Inducer of the Heat Shock Response in SOD1-G93A Models of ALS. Int. J. Mol. Sci. 20:.

Argaud, L., Gomez, L., Gateau-Roesch, O., Couture-Lepetit, E., Loufouat, J., Robert, D., et al. (2005). Trimetazidine inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and prevents lethal ischemia-reperfusion injury. J. Mol. Cell. Cardiol. 39: 893–899.

Belli, R., Bonato, A., Angelis, L. De, Mirabilii, S., Ricciardi, M.R., Tafuri, A., et al. (2019). Metabolic reprogramming promotes myogenesis during aging. Front. Physiol. 10:.

Bergh, R. Van den, Swerts, L., Hendrikx, A., Boni, L., and Meulepas, E. (1978). Adipose tissue cellularity in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Clin. Neurol. Neurosurg. 80: 226–240.

Browne, S.E., Yang, L., DiMauro, J.P., Fuller, S.W., Licata, S.C., and Beal, M.F. (2006). Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. Neurobiol. Dis. 22: 599–610.

Bruneteau, G., Bauché, S., Gonzalez de Aguilar, J.L., Brochier, G., Mandjee, N., Tanguy, M.-L., et al. (2015). Endplate denervation correlates with Nogo-A muscle expression in amyotrophic lateral sclerosis patients. Ann. Clin. Transl. Neurol. 2: 362–372.

Chiot, A., Zaïdi, S., Iltis, C., Ribon, M., Berriat, F., Schiaffino, L., et al. (2020). Modifying macrophages at the periphery has the capacity to change microglial reactivity and to extend ALS survival. Nat. Neurosci. 23: 1339–1351.

Clark, J.A., Southam, K.A., Blizzard, C.A., King, A.E., and Dickson, T.C. (2016). Axonal degeneration, distal collateral branching and neuromuscular junction architecture alterations occur prior to symptom onset in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J. Chem. Neuroanat. 76: 35–47.

Dedkova, E.N., Seidlmayer, L.K., and Blatter, L.A. (2013). Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure. J. Mol. Cell. Cardiol. 59: 41–54.

Dhote, V., and Balaraman, R. (2008). Anti-oxidant activity mediated neuroprotective potential of trimetazidine on focal cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 35: 630–637.

Dobrowolny, G., Lepore, E., Martini, M., Barberi, L., Nunn, A., Scicchitano, B.M., et al. (2018a). Metabolic Changes Associated With Muscle Expression of SOD1 G93A. 9: 1–9.

Dobrowolny, G., Martini, M., Scicchitano, B.M., Romanello, V., Boncompagni, S., Nicoletti, C., et al. (2018b). Muscle Expression of SOD1 G93A Triggers the Dismantlement of Neuromuscular Junction via PKC-Theta. Antioxidants Redox Signal. 28: 1105–1119.

Dolezalova, R., Lacinova, Z., Dolinkova, M., Kleiblova, P., Haluzikova, D., Housa, D., et al. (2007). Changes of endocrine function of adipose tissue in anorexia nervosa: Comparison of circulating levels versus subcutaneous mRNA expression. Clin. Endocrinol. (Oxf). 67: 674–678.

Doshi, S., Gupta, P., and Kalb, R.G. (2017). Genetic induction of hypometabolism by ablation of MC4R does not suppress ALS-like phenotypes in the G93A mutant SOD1 mouse model. Sci. Rep. 7: 13150.

Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.L., Echaniz-Laguna, A., Eschbach, J., Rene, F., Oudart, H., et al. (2009). Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. PLoS One 4:.

Dupuis, L., Oudart, H., René, F., Gonzalez De Aguilar, J.L., and 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.

Fayemendy, P., Marin, B., Labrunie, A., Boirie, Y., Walrand, S., Achamrah, N., et al. (2021). Hypermetabolism is a reality in amyotrophic lateral sclerosis compared to healthy subjects. J. Neurol. Sci. 420:.

Ferri, A., and Coccurello, R. (2017). What is 'hyper' in the ALS Hypermetabolism? Mediators Inflamm. 2017:.

Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-sanchez, A., et al. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy : evidence in mice and man. 185: 232–240.

Fragasso, G., Piatti Md, P.M., Monti, L., Palloshi, A., Setola, E., Puccetti, P., et al. (2003). Short- and long-term beneficial effects of trimetazidine in patients with diabetes and ischemic cardiomyopathy. Am. Heart J. 146: 854.

Ge, X., Cho, A., Ciol, M.A., Pettan-Brewer, C., Snyder, J., Rabinovitch, P., et al. (2016). Grip strength is potentially an early indicator of age-related decline in mice. Pathobiol. Aging Age-Related Dis. 6: 32981.

Giacovazzo, G., Apolloni, S., and Coccurello, R. (2018). Loss of P2X7 receptor function dampens whole body energy expenditure and fatty acid oxidation. Purinergic Signal. 14: 299–305.

Gontijo, V.S., Viegas, F.P.D., Ortiz, C.J.C., Freitas Silva, M. de, Damasio, C.M., Rosa, M.C., et al. (2019). Molecular Hybridization as a Tool in the Design of Multi-target Directed Drug Candidates for Neurodegenerative Diseases. Curr. Neuropharmacol. 18: 348–407.

Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Canto, M.C.D., Cynthia, Y., Alexander, D.D., et al. (1994). Motor Neuron Degeneration in Mice That Express a Human Cu , Zn Superoxide Dismutase Mutation Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : http://www.jstor.org/stable/2883932. Science (80-.). 264: 1772–1775.

Jésus, P., Fayemendy, P., Nicol, M., Lautrette, G., Sourisseau, H., Preux, P.-M., et al. (2018). Hypermetabolism is a deleterious prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Eur. J. Neurol. 25: 97–104.

Jiao, Y., Su, M., Chen, M., Jia, W., Chou, Y., Huang, Z., et al. (2007). LC/ESI-MS method for the determination of trimetazidine in human plasma: Application to a bioequivalence study on Chinese volunteers. J. Pharm. Biomed. Anal. 43: 1804–1807.

Kalucka, J., Bierhansl, L., Conchinha, N.V., Missiaen, R., Elia, I., Brüning, U., et al. (2018). Quiescent Endothelial Cells Upregulate Fatty Acid β-Oxidation for Vasculoprotection via Redox Homeostasis. Cell Metab. 28: 881-894.e13.

Kantor, P.F., Lucien, A., Kozak, R., and Lopaschuk, G.D. (2000). The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long- chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. Circ. Res. 86: 580–588.

Keon, M., Musrie, B., Dinger, M., Brennan, S.E., Santos, J., and Saksena, N.K. (2021). Destination Amyotrophic Lateral Sclerosis. Front. Neurol. 12:.

Kirk, S.E., Tracey, T.J., Steyn, F.J., and Ngo, S.T. (2019). Biomarkers of Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. 10:.

Kuralay, F., Altekin, E., Yazlar, A.S., Onvural, B., and Goldeli, O. (2006). Suppression of angioplasty-related inflammation by pre-procedural treatment with trimetazidine. Tohoku J. Exp. Med. 208: 203–212.

Lopaschuk, G.D., Barr, R., Thomas, P.D., and Dyck, J.R.B. (2003). Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase. Circ. Res. 93:.

Martins, G.F., Filho, A.G. de S., Santos, J.B. de F., Assunção, C.R.C., Vieira, F.B., Valência, A., et al. (2012). Trimetazidine and inflammatory response in coronary artery bypass grafting. Arq. Bras. Cardiol. 99: 688–696.

Marzilli, M., Vinereanu, D., Lopaschuk, G., Chen, Y., Dalal, J.J., Danchin, N., et al. (2019). Trimetazidine in cardiovascular medicine. Int. J. Cardiol. 293: 39–44.

Mehta, P.R., Jones, A.R., Opie-Martin, S., Shatunov, A., Iacoangeli, A., Khleifat, A. Al, et al. (2019). Younger age of onset in familial amyotrophic lateral sclerosis is a result of pathogenic gene variants, rather than ascertainment bias. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 90: 268–271.

Meng, D., Feng, L., Chen, X.J., Yang, D., and Zhang, J.N. (2006). Trimetazidine improved Ca2+ handling in isoprenaline-mediated myocardial injury of rats. Exp. Physiol. 91: 591–601.

Miana-Mena, F.J., Piedrafita, E., González-Mingot, C., Larrodé, P., Muñoz, M.J., Martínez-Ballarín, E., et al. (2011). Levels of membrane fluidity in the spinal cord and the brain in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. J. Bioenerg. Biomembr. 43: 181–186.

Migliarini, S., Scaricamazza, S., Valle, C., Ferri, A., Pasqualetti, M., and Ferraro, E. (2021). Microglia Morphological Changes in the Motor Cortex of hSOD1 G93A Transgenic ALS Mice.

Mirra, A., Rossi, S., Scaricamazza, S., Salvio, M. DI, Salvatori, I., Valle, C., et al. (2017). Functional interaction between FUS and SMN underlies SMA-like splicing changes in wild-type hFUS mice. Sci. Rep. 7:.

Molinari, F., Pin, F., Gorini, S., Chiandotto, S., Pontecorvo, L., Penna, F., et al. (2017). The mitochondrial metabolic reprogramming agent trimetazidine as an 'exercise mimetic' in cachectic C26-bearing mice. J. Cachexia. Sarcopenia Muscle 8: 954–973.

Moloney, E.B., Winter, F. De, Verhaagen, J., and Kane, C.J.O. (2014). ALS as a distal axonopathy : molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. 8: 1–18.

MR, J. van M., RPA, van E., HK, van der B., HHG, T., HJ, W., MA, van E., et al. (2020). Prognostic value of weight loss in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 91: 867–875.

Ngo, S.T., and Steyn, F.J. (2015). The interplay between metabolic homeostasis and neurodegeneration : insights into the neurometabolic nature of amyotrophic lateral sclerosis. Cell Regen. 1–14.

Ngo, S.T., Steyn, F.J., and Mccombe, P.A. (2014). Journal of the Neurological Sciences Body mass index and dietary intervention : Implications for prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. Sci. 340: 5–12.

O'reilly, É.J., Wang, H., Weisskopf, M.G., Fitzgerald, K.C., Falcone, G., Mccullough, M.L., et al. (2013). Premorbid Body Mass Index and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Front. Degener 14: 205–211.

Paola, E. De, Forcina, L., Pelosi, L., Pisu, S., Rosa, P. La, Cesari, E., et al. (2020). Sam68 splicing regulation contributes to motor unit establishment in the postnatal skeletal muscle. Life Sci. Alliance 3:.

Peggion, C., Massimino, M.L., Biancotto, G., Angeletti, R., Reggiani, C., Sorgato, M.C., et al. (2017). Absolute quantification of myosin heavy chain isoforms by selected reaction monitoring can underscore skeletal muscle changes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Anal. Bioanal. Chem.

Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., and Hermine, O. (2017). ALS clinical trials review: 20 years of failure. Are we any closer to registering a new treatment? Front. Aging Neurosci. 9: 1–11.

Poppe, L., Rué, L., Robberecht, W., and Bosch, L. Van Den (2014). Translating biological findings into new treatment strategies for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Exp. Neurol. 262: 138–151.

Reyes, E.T., Perurena, O.H., Festoff, B.W., Jorgensen, R., and Moore, W. V. (1984). Insulin resistance in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. Sci. 63: 317–324.

Scaricamazza, S., Salvatori, I., Ferri, A., and Valle, C. (2021). Skeletal Muscle in ALS: An Unappreciated Therapeutic Opportunity? Cells 10:.

Scaricamazza, S., Salvatori, I., Giacovazzo, G., Loeffler, J.P., Renè, F., Rosina, M., et al. (2020). Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-SOD1G93A Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target. IScience 23:.

Serarslan, Y., Bal, R., Altug, M.E., Kontaş, T., Keleş, O.N., Unal, D., et al. (2009). Effects of trimetazidine on crush injury of the sciatic nerve in rats: A biochemical and stereological study. Brain Res. 1247: 11–20.

Serrano, A., Apolloni, S., Rossi, S., Lattante, S., Sabatelli, M., Peric, M., et al. (2019). The S100A4 Transcriptional Inhibitor Niclosamide Reduces Pro-Inflammatory and Migratory Phenotypes of Microglia: Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis. Cells 8:.

Shu, H., Peng, Y., Hang, W., Zhou, N., and Wang, D.W. (2021). Trimetazidine in Heart Failure. Front. Pharmacol. 11:.

Simpson, E.P., Henry, Y.K., Henkel, J.S., Smith, R.G., and Appel, S.H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: A potential biomarker of disease burden. Neurology 62: 1758–1765.

Steyn, F.J., Ioannides, Z.A., Eijk, R.P.A. Van, Heggie, S., Thorpe, K.A., Ceslis, A., et al. (2018). Hypermetabolism in ALS is associated with greater functional decline and shorter survival. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 89: 1016–1023.

Steyn, F.J., Li, R., Kirk, S.E., Tefera, T.W., Xie, T.Y., Tracey, T.J., et al. (2020). Altered skeletal muscle glucose-fatty acid flux in amyotrophic lateral sclerosis. Brain Commun. 1–17.

Trabjerg, M.S., Andersen, D.C., Huntjens, P., Oklinski, K.E., Bolther, L., Hald, J.L., et al. (2021). Downregulating carnitine palmitoyl transferase 1 affects disease progression in the SOD1 G93A mouse model of ALS. Commun. Biol. 4: 509.

Tracey, T.J., Steyn, F.J., Wolvetang, E.J., and Ngo, S.T. (2018). Neuronal lipid metabolism: Multiple pathways driving functional outcomes in health and disease. Front. Mol. Neurosci. 11: 1–25.

Tremblay, A., Després, J.P., Leblanc, C., Craig, C.L., Ferris, B., Stephens, T., et al. (1990). Effect of intensity of physical activity on body fatness and fat distribution. Am. J. Clin. Nutr. 51: 153–7.

Volonté, C., Amadio, S., Fabbrizio, P., and Apolloni, S. (2019). Functional microglia neurotransmitters in amyotrophic lateral sclerosis. Semin. Cell Dev. Biol. 94: 121–128.

Wan, P., Su, W., Zhang, Y., Li, Z., Deng, C., and Zhuo, Y. (2017). Trimetazidine protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/Ho-1 pathway. Clin. Sci. 131: 2363–2375.

Wobst, H.J., Mack, K.L., Brown, D.G., Brandon, N.J., and Shorter, J. (2020). The clinical trial landscape in amyotrophic lateral sclerosis—Past, present, and future. Med. Res. Rev.

Yang, Z., and Wang, K.K.W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. Trends Neurosci. 38: 364–374.

Zurlo, F., Larson, K., Bogardus, C., and Ravussin, E. (1990). Skeletal Muscle Metabolism Is a Major Determinant of Resting Energy Expenditure. 86: 1423–1427.

LEGENDS

Figure 1

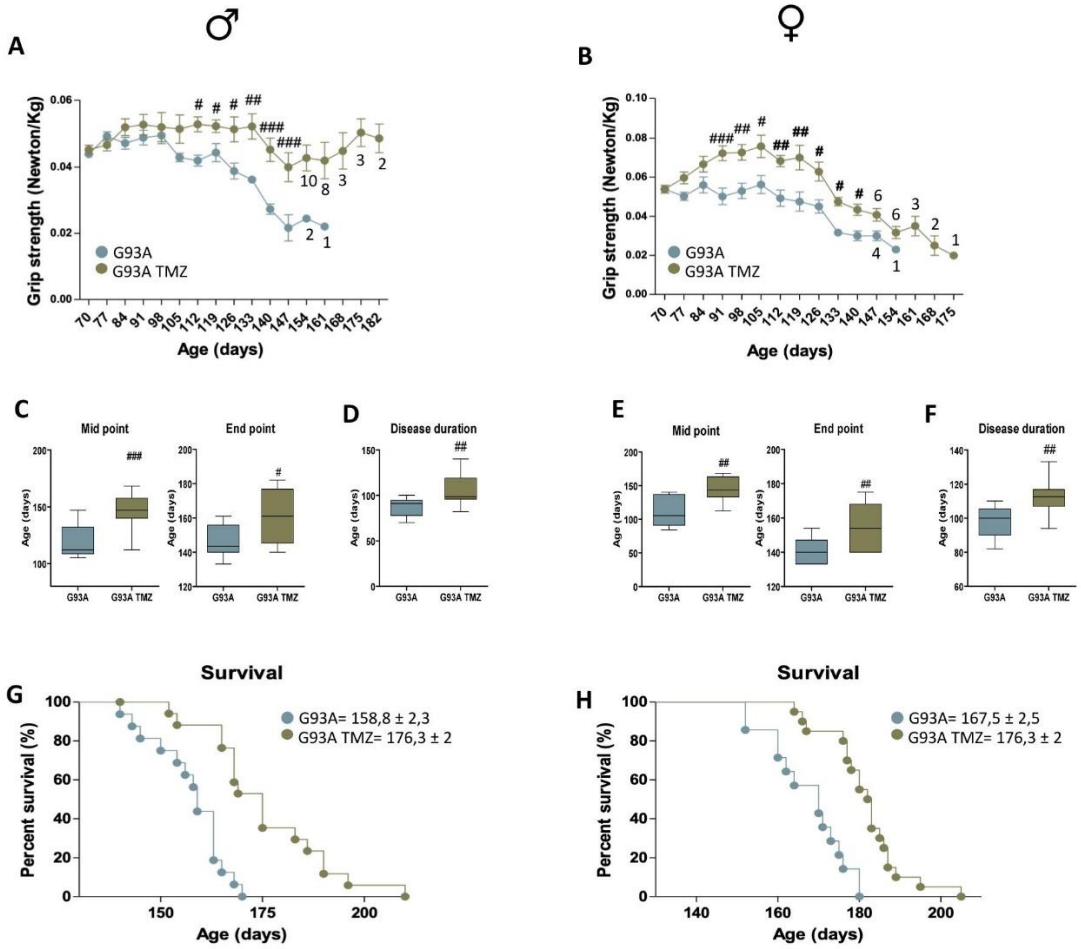


Figure 1. Trimetazidine (TMZ) improves muscle strength and extends lifespan of *SOD1^{G93A}* mice.
A-B) *Maximal grip strength of SOD1^{G93A} mice (males in (A) and females in (B)) treated with (G93A TMZ) or without (G93A) TMZ (20 mg/kg in drinking water) from the onset of the disease (70 days of age) through to disease end point (when mice were no longer able to perform the test). Data presented as means ± SEM, #p < 0.05 ##p < 0.01 ### p < 0.0001 when compared with untreated littermates SOD1^{G93A} mice, n ≥ 12 per group. Numbers under data points indicate the number of animals remaining in the study from 154 days for males and 147 days for females.* ***C-E)*** *The midpoint (left panels) and the endpoint (middle panels) of disease in TMZ treated (G93A TMZ) and littermates untreated SOD1^{G93A} mice (G93A) as defined by a 25% and 50% decrease in grip strength respectively, starting from the onset of disease; males in (E) and females in (F). Data are presented as means ± SEM, #p < 0.05 ##p < 0.01 when compared with untreated age-matched SOD1^{G93A} mice, n ≥ 12 per group.* ***D-F)*** *Disease duration in TMZ treated (G93A TMZ) and untreated (G93A) littermates SOD1^{G93A} mice; males in (G) and females in (H). Data are presented as means ± SEM. #p < 0,05, n ≥ 12 per group.* ***G-H)*** *Kaplan-Meier survival curves of treated (G93A TMZ) and untreated (G93A) littermates SOD1^{G93A} mice; males in (C) and females in (D), n ≥ 12 per group. p values were obtained using parametric two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test (A, B) or t test (E-H).*

Figure 2

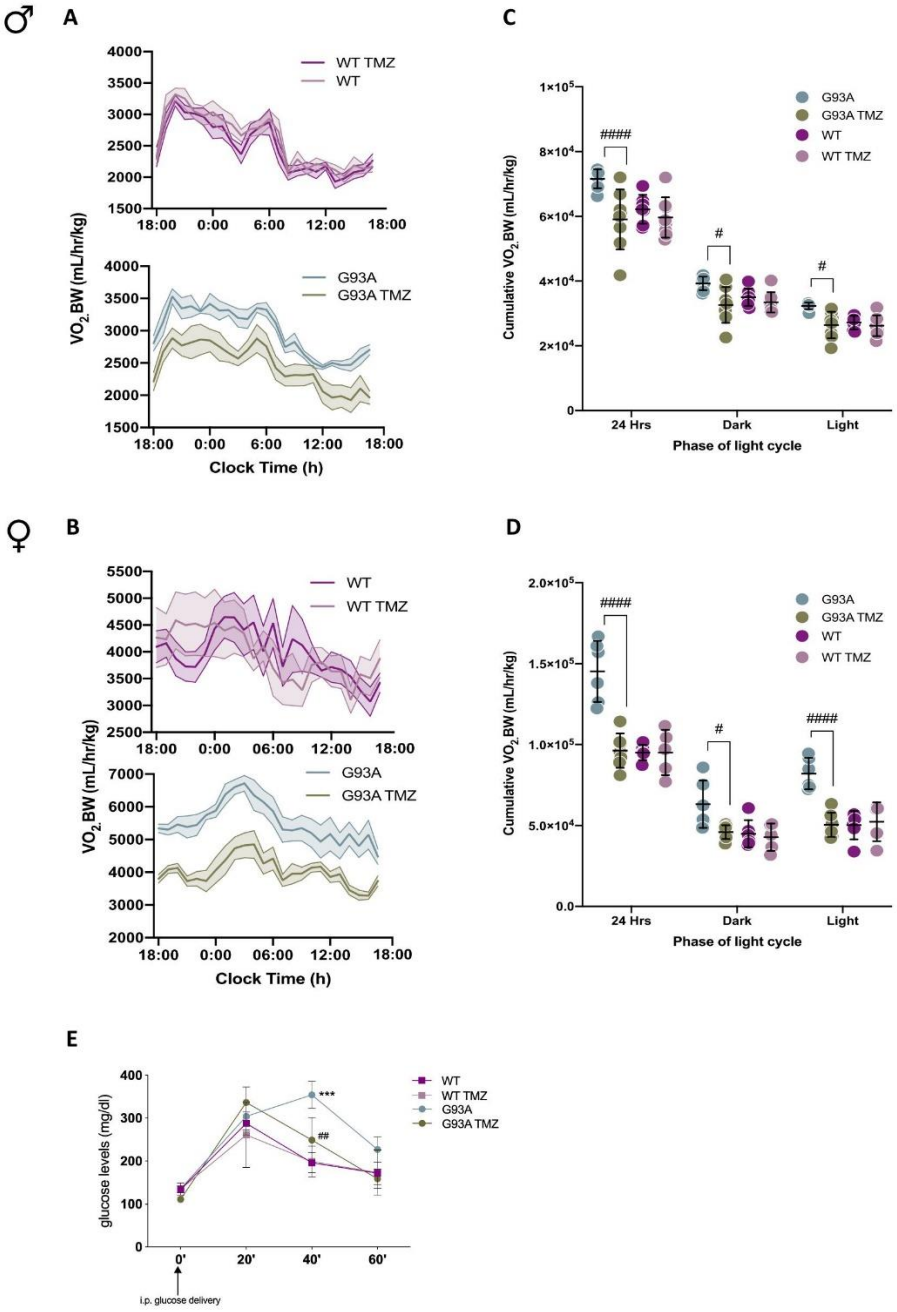


Figure 2. Trimetazidine (TMZ) prevents metabolic alterations in *SOD1^{G93A}* mice.

A) *Data traces representing mean oxygen consumption (a proxy for energy expenditure) over 24 hours in 120-day old male* ***(A)*** *and female* ***(B)*** *wild-type and SOD1^{G93A} mice untreated (WT and G93A) and treated with TMZ (WT TMZ and G93A TMZ) from 70 days of age (disease onset). Dotted lines represent SEM.* ***C-D)*** *Cumulative oxygen consumption in mice over a 24-hour period and during the light and dark cycle.* ***E)*** *Glucose tolerance test in 120-day old wild-type and SOD1^{G93A} mice untreated (WT and G93A) and treated with TMZ (WT TMZ and G93A TMZ) from 70 days of age (disease onset). Blood glucose was assessed before glucose injection (0 minutes), and 20, 40 and 60 minutes following glucose injection. Data are presented as means ± SEM #p < 0.05, ####p < 0.0001 compared with untreated G93A, n≥ 6 per group. p values were obtained using one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.*

Figure 3

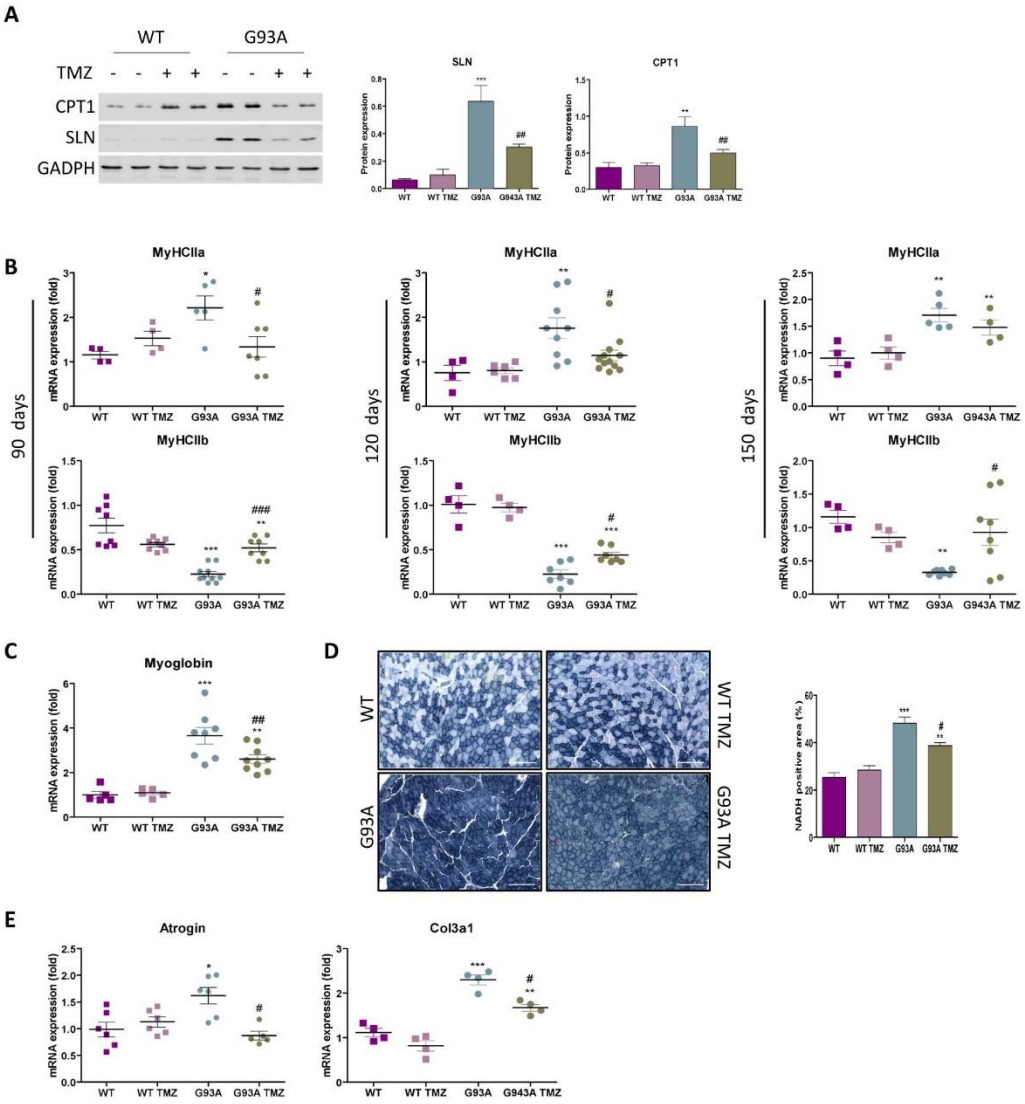


Figure 3. Trimetazidine (TMZ) restores the glycolytic phenotype and reduces atrophic/fibrotic markers in the tibialis anterior (TA) muscle of *SOD1^{G93A}* mice.

A) *Representative western blots (left) and quantification (right) of sarcolipin (SLN) and CPT1 protein expression in the TA of 120-day old wild-type (WT) and SOD1^{G93A} (G93A) mice untreated (-) and treated (+) with TMZ. Data are presented as means ± SEM, **p < 0.01, ***p < 0.0001 compared with WT, ##p < 0.01 compared with G93A, n ≥ 4 per group.* ***B)*** *Expression level of mRNAs encoding Myosin Heavy Chain isoforms MyHCIIa (top row) and MyHCIIb (bottom row) in TA obtained from 90-, 120-, and 150-day old wild-type and SOD1^{G93A} and WT mice untreated (WT and G93A) and treated with TMZ (WT TMZ and G93A TMZ). Data are presented as means ± SEM, * p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0001 compared with WT (arbitrarily set at 1), #p < 0.05, ###p < 0.0001 compared with G93A, n ≥ 4 per group.* ***C)*** *Expression level of mRNAs encoding Myoglobin in TA obtained from 120-day old wild-type and SOD1^{G93A} mice untreated (WT and G93A) and treated with TMZ (WT TMZ and G93A TMZ). Data are presented as means ± SEM, **p < 0.01, ***p < 0.0001 compared with WT (arbitrarily set at 1), ##p < 0.01 compared with G93A, n ≥ 4 per group.* ***D)*** *Representative images (left) of in situ NADH-tetrazolium reductase activity staining in cross sections of TA muscle obtained from 120-day old wild-type and SOD1^{G93A}*

*littermates untreated (WT and G93A) and treated with TMZ (WT TMZ and G93A TMZ). Scale bar, 200 µm. Graphical representation (right) of the percentage NADH-positive area of whole transverse sections of TA muscle. Data are presented as means ± SEM, **p < 0.01, ***p < 0.0001 compared with WT, #p < 0.05 compared with G93A, n ≥ 4 per group.* ***E)*** *Expression level of mRNAs encoding Atrogin and Col3a1 in TA obtained from 120-day old wild-type and SOD1^{G93A} mice untreated (WT and G93A) and treated with TMZ (WT TMZ and G93A TMZ. Data are presented as means ± SEM, *p < 0.05, ***p < 0.0001 compared with WT, #p < 0.05 compared with G93A, n ≥ 4 per group. p values were obtained using parametric one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.*

Figure 4

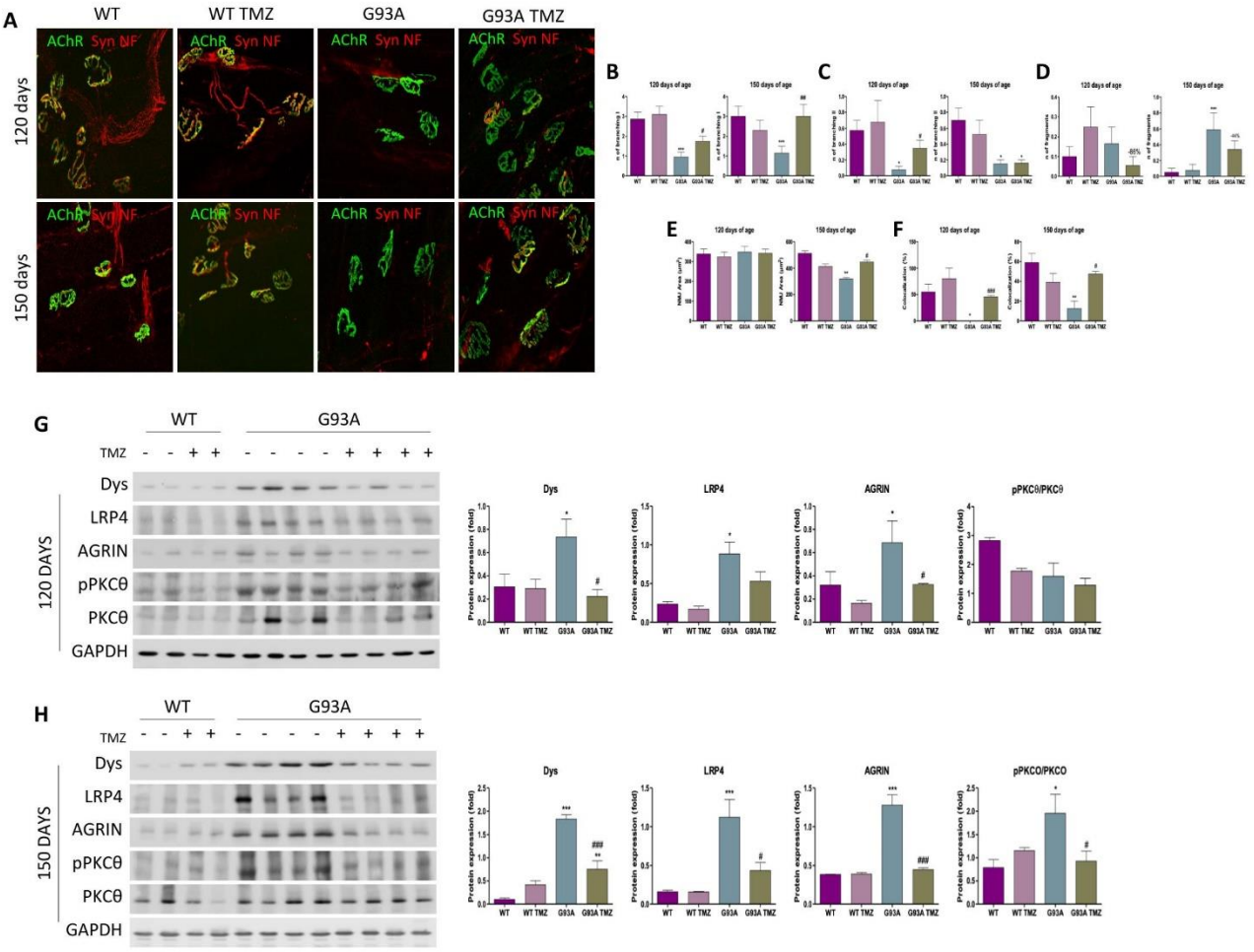


Figure 4. Trimetazidine (TMZ) preserves the integrity of neuromuscular junctions (NMJs).
A) *Representative maximum projection images of EDL NMJs from 120- and 150-day old wild-type and SOD1^{G93A} mice untreated (WT and G93A) and treated with TMZ (WT TMZ and G93A TMZ), stained with synaptophysin (Syn), α-bungarotoxin (AChR), and Neurofilament (NF).* ***B-F)*** *Quantitation of NMJ morphometry in EDL muscles of WT, WT TMZ, G93A and G93A TMZ mice at 120 and 150 days of age, highlighting the number of primary (B) and secondary (C) ramifications, the number of fragments per NMJ (D), the area of the AChR clusters (E), and the percentage of colocalized voxels (F). Data are presented as means ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0001 compared with WT mice and #p < 0.05, ##p < 0.001, ###p < 0.0001 compared to SOD1^{G93A} mice, n ≥ 4 per group.* ***G-H)*** *Representative western blots (left) and quantification (right) of Dystrophin (Dys), lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4), agrin, and phosphorylated Protein Kinase C theta/ Protein Kinase C theta (pPKCϑ/PKCϑ)*

*protein expression in the tibialis anterior of 120-day old (G) and 150-day old (H) wild-type (WT) and SOD1^{G93A} (G93A) mice untreated (-) and treated (+) with TMZ from disease onset (70 days of age). Data are presented as means ± SEM, *p < 0.05, **p< 0.01, ***p < 0.0001 compared with WT mice and #p < 0.05, ##p < 0.001, ###p < 0.0001 compared with G93A mice, n ≥ 4 per group. p value was obtained using parametric one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.*

Figure 5

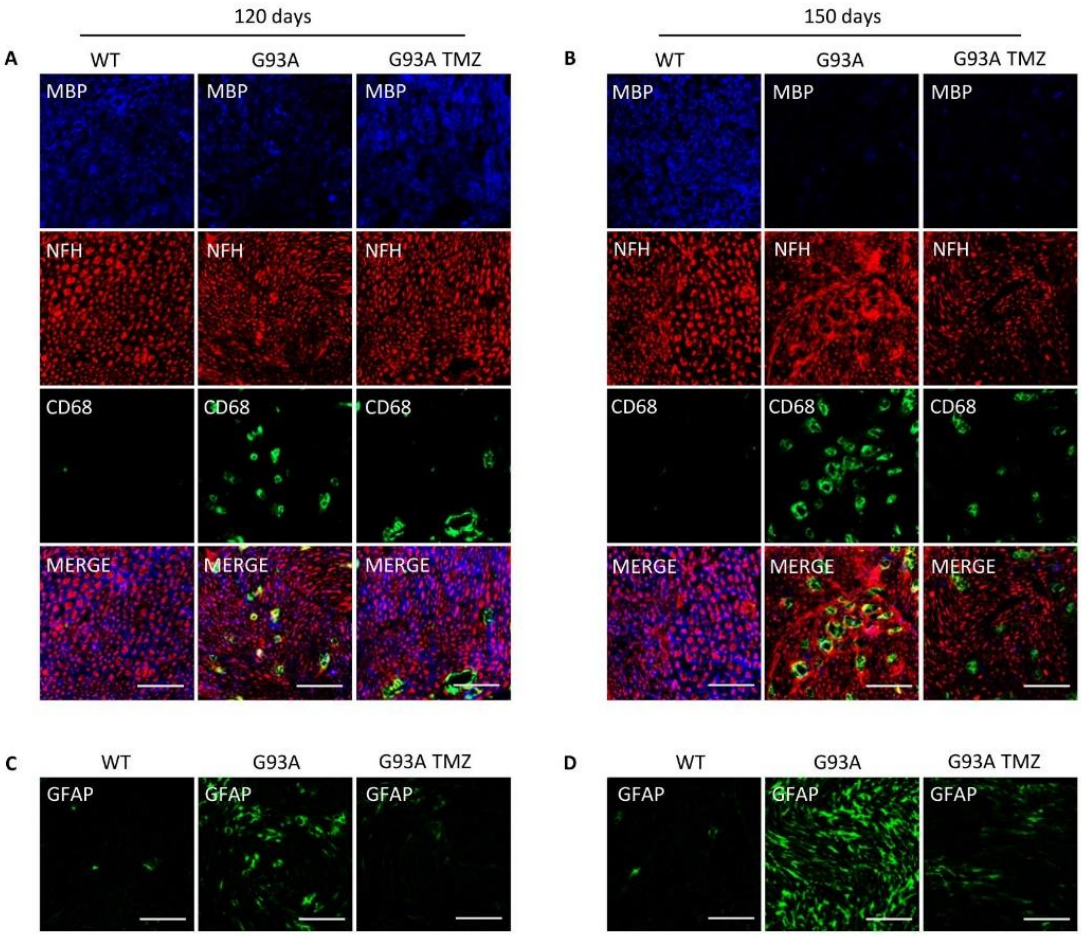


Figure 5. Trimetazidine (TMZ) preserves sciatic nerve integrity.
A-B) *Representative images of sciatic nerve sections from 120- and 150-day old wild-type mice and SOD1^{G93A} treated without (WT and G93A) or with TMZ (WT TMZ and G93A TMZ) from disease onset (70 days of age). Anti-MBP stains myelin, anti-NFH stains the axonal cytoskeleton (neurofilament heavy), anti-CD68 stains activated macrophages.* ***C-D)*** *Representative images of sciatic nerve sections from 120- and 150-day old wild-type mice and SOD1^{G93A} treated without (WT and G93A) or with TMZ (WT TMZ and G93A TMZ) from disease onset (70 days of age). Anti-GFAP stains astrocytes. n ≥ 4 per group. Scale bar 50µm.*

Figure 6

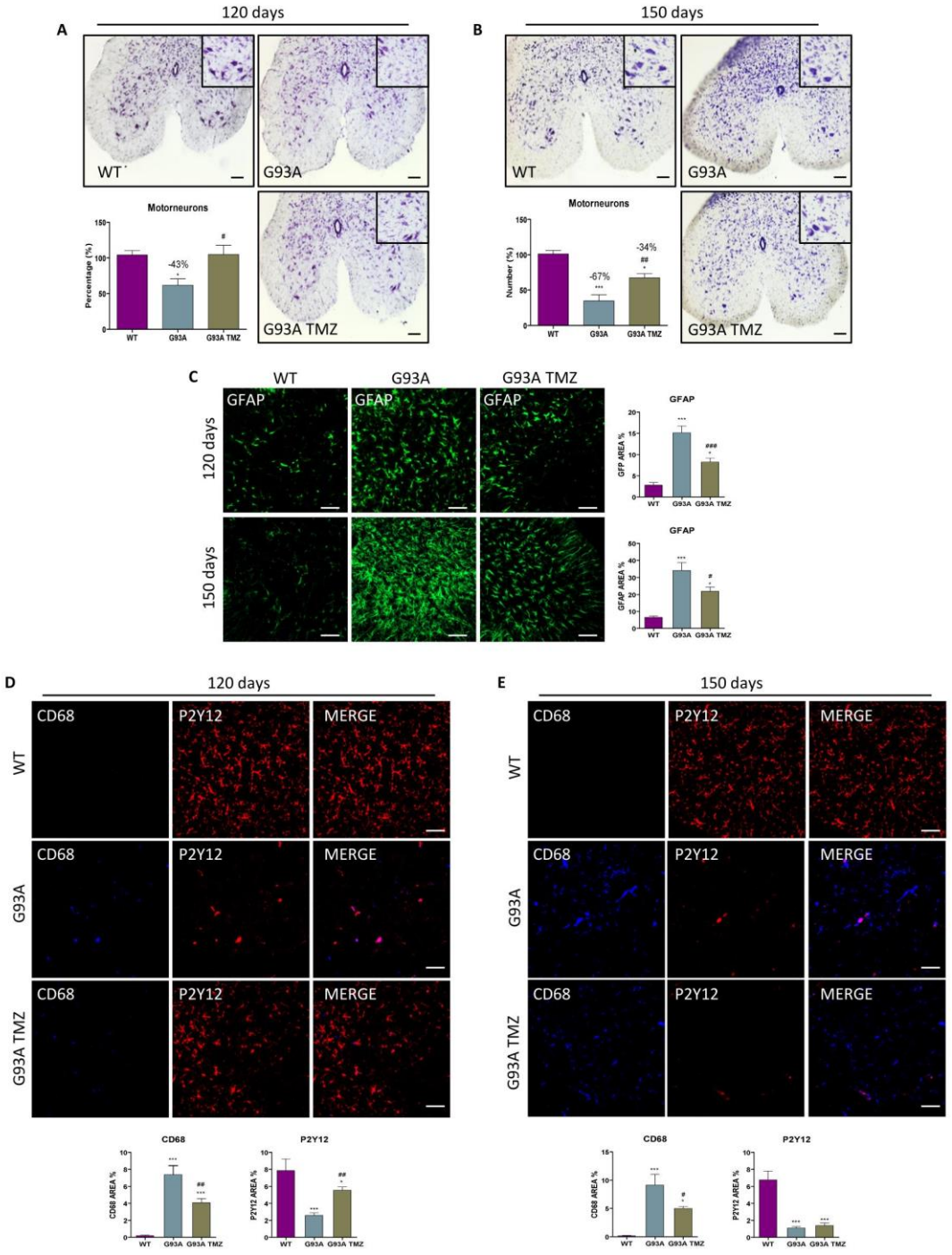


Figure 6. Trimetazidine (TMZ) protects from motor neuron loss and neuroinflammation.
A-B) *Representative lumbar spinal cord sections (L3-L5) stained with cresyl violet (scale bar 100 µm) and quantification of motor neuron number (histograms) in 120- (A) and 150-day old (B) wild-type mice treated without TMZ (WT) and SOD1^{G93A} mice treated without (G93A) or with TMZ (G93A TMZ) from disease onset (70 days of age). Data are presented as means and ± SEM, *p < 0.05, ***p < 0.0001 compared with wild-type; #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with untreated G93A, n ≥ 4 per group.* ***C)*** *Representative immunofluorescence images and analysis of astrocytes (GFAP) in lumbar spinal cord sections (L3-L5) of 120- and 150-day old wild-type mice treated without TMZ (WT) and SOD1^{G93A} mice treated without (G93A) or with TMZ (G93A TMZ) from disease onset (70 days of age).* ***D-E)***

*Representative immunofluorescence images and analysis of activated microglia (CD68) and resting microglia (P2T12) in lumbar spinal cord sections (L3-L5) of 120- and 150-day old wild-type mice treated without TMZ (WT) and SOD1^{G93A} mice treated without (G93A) or with TMZ (G93A TMZ) from disease onset (70 days of age). Scale bar 100 µm. Data are presented as means and ± SEM, *p < 0.05, ***p < 0.0001 compared with wild-type; #p < 0.05, ###p < 0.0001 compared with untreated G93A, n ≥ 4 per group. p values were obtained using parametric one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test (A-E).*

Figure 7

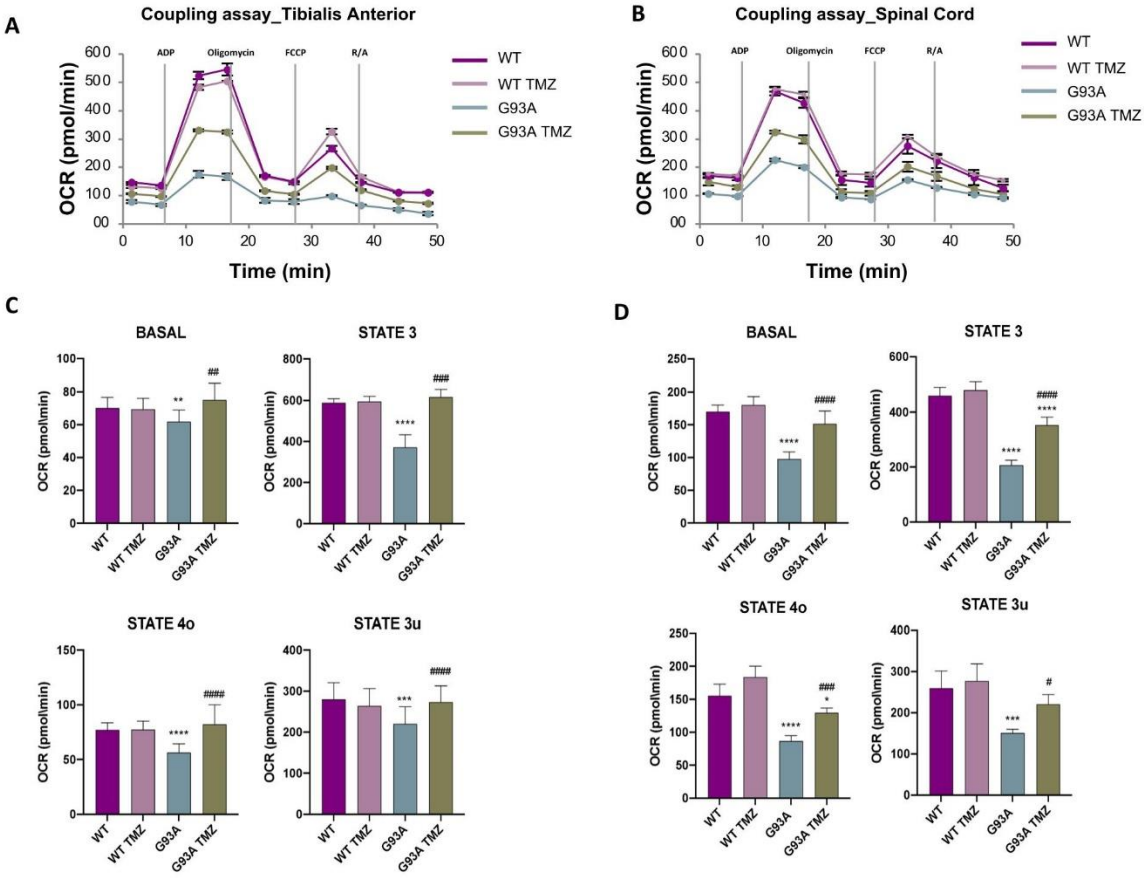


Figure 7. Trimetazidine (TMZ) improves mitochondrial coupling state.
A-B) *Representative data traces of oxygen consumption rate (OCR) during a coupling assay on isolated mitochondria purified from the tibialis anterior and spinal cord.* ***C-D)*** *Mitochondrial respiration states (as OCR) are reported as basal respiration (state 2), maximal coupled respiration (state 3), respiration due to proton leak (state 4o) and maximal uncoupled respiration (state 3u). Data are presented as means ± SEM, *p < 0.05, ***p < 0.0001 compared with wild-type; #p < 0.05, ###p < 0.0001 compared with untreated G93A, n ≥ 6 per group. p values were obtained using parametric one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.*

Figure 8

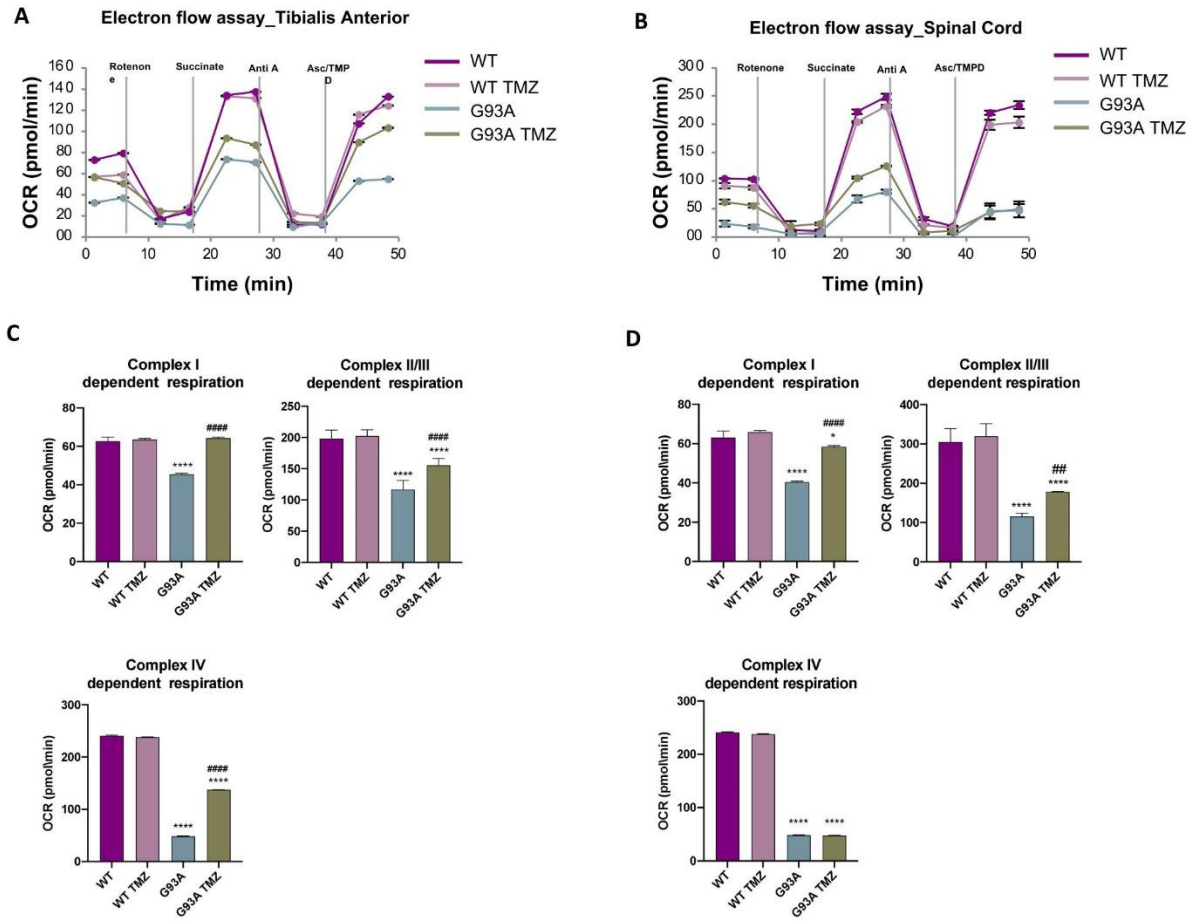
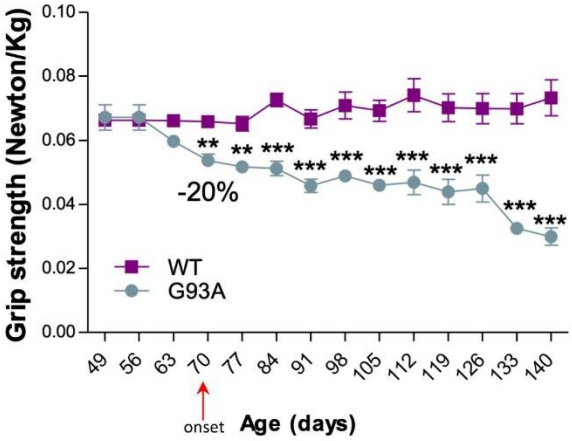


Figure 8. Trimetazidine (TMZ) improves electron transport chain complex activity.

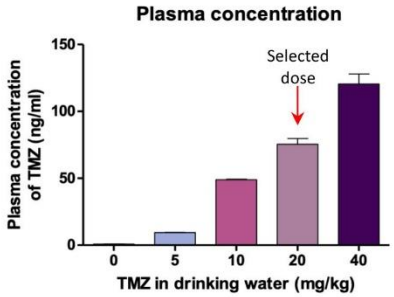
A-B) *Representative data traces of oxygen consumption rate (OCR) during an electron flow assay on isolated mitochondria purified from tibialis anterior and spinal cord.* ***C-D)*** *Quantification of respiration (OCR) activity of complex I, complex II/III and Complex IV in the presence of rotenone, succinate, antimycin A and ascorbate/N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine (ASC/TMPD) respectively. Data are presented as means ± SEM, *p < 0.05, ***p < 0.0001 compared with wild-type; #p < 0.05, ###p < 0.0001 compared with untreated G93A, n = ≥ 6 per group. p values were obtained using parametric one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.*

S.1



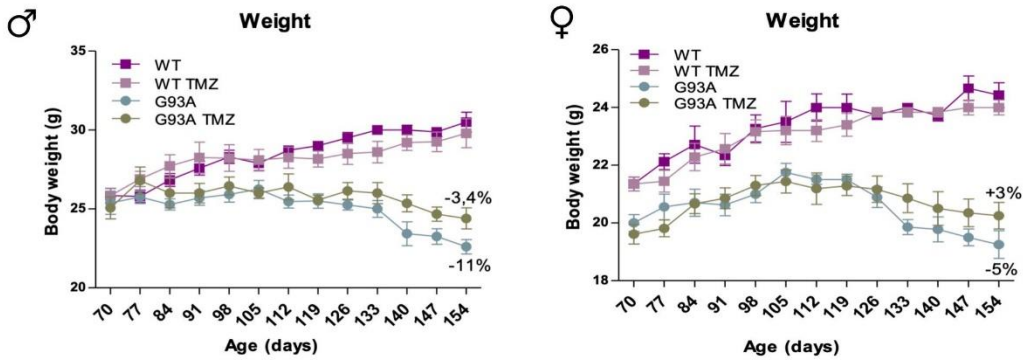
S.1 Dinamometric evaluation of grip strength in wild-type (WT) and SOD1G93A mice littermate mice. Data shows that disease onset occurs at 70 days of age in SOD1G93A mice. At this age, SOD1G93A mice exhibit a 20% decrease in grip strength when compared to their wild-type (WT) littermates.

S.2



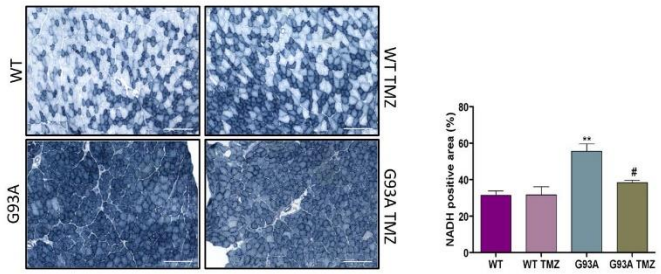
S.2 Bio-availability of Trimetazidine (TMZ) in the plasma of wild-type mice. Mice were treated for one week with the indicated doses of TMZ (0, 5, 10, 20, 40 mg/mg), n ≥ 4/group.

S.3



S3. Effect of Trimetazidine (TMZ) treatment on weight loss in SOD1G93A mice. Body mass evolution of SOD1G93A and wild-type littermate mice (males left panel, females right panel) with (G93A TMZ and WT TMZ) or without (G93A and WT) daily administration of 20mg/kg TMZ in drinking water. Starting body weight at 70 days was assigned as 100%, and the decline in body weight over time was calculated as percentage loss relative to the starting body weight.

S.4



S.4. Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase-tetrazolium reductase (NADH-TR) activity in tibialis anterior (TA) muscle. (A) Representative in situ NADH-TR activity staining in cross sections of TA muscle obtained from 90-day old untreated (WT and G93A) and treated (WT TMZ and G93A TMZ) littermate mice. Scale bar, 200um. (B) Quantification of the percentage of NADH positive areas in cross-sections of TA muscle from untreated (WT and G93A) and treated (WT TMZ and G93A TMZ) littermate mice. Data are presented as mean +/- SEM, n ≥ 4/group, **p < 0.01 compared to WT and WT TMZ, # p < 0.05 compared to G93A, parametric one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test.

C. Publication 2: Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-*SOD1^{G93A}* Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target

Comme nous l'avions vu précédemment, la SLA n'est plus considérée comme une maladie stricte du motoneurone, mais bien comme une maladie systémique. Il est maintenant clairement accepté que le métabolisme énergétique joue un rôle important dans la pathogénicité de la SLA. En effet, l'hypermétabolisme et la dyslipidémie sont des facteurs de risques majeurs qui impactent sévèrement la progression de la pathologie (Dupuis et al., 2008, 2011; Jésus et al., 2018; Steyn et al., 2018). Ces altérations métaboliques sont également mises en évidence dans les modèles murins de SLA (Dupuis et al., 2004a). De plus, nous montrons qu'une induction expérimentale d'un hypermétabolisme musculaire reproduit les caractéristiques clefs d'une SLA et raccourcie la survie des animaux transgéniques SLA (Dupuis et al., 2009). Ainsi, la compréhension de l'hypermétabolisme est essentielle puisqu'il est retrouvé chez 2/3 des patients SLA (Bouteloup et al., 2009; Funalot et al., 2009; Peter et al., 2017) et systématiquement dans les modèles murins *SOD1^{G93A}* et *Sod1^{G86R}* (Dupuis et al., 2004a). En 2015, notre laboratoire révèle une altération de la balance énergétique dès un stade asymptomatique dans le muscle des souris *Sod1^{G86R}*. Cela se traduit par l'incapacité du muscle squelettique à utiliser le glucose (glycolyse) comme source principale d'énergie dans une condition d'exercice court et intense (Palamiuc et al., 2015). A l'inverse, l'oxydation des acides gras (β-oxydation) est préférée. On parle alors de perte de la flexibilité métabolique. Nous savons également que dans la SLA, les muscles striés squelettiques à prédominance de fibres glycolytiques sont les premiers à dégénérer tant chez le patient que dans les modèles murins (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Kanning et al., 2010; Palamiuc et al., 2015; Pun et al., 2006). De ce fait, une correction de la balance énergétique pourrait être une stratégie pertinente pour ralentir le développement de la SLA.

Le modèle murin *SOD1^{G93A}* est le modèle transgénique le plus utilisé et par conséquent le mieux caractérisé. Il récapitule l'ensemble des symptômes de la SLA et en particulier les atteintes bioénergétiques comme l'hypermétabolisme ou encore les défaillances mitochondriales. La première partie de l'étude ci-dessous met en avant le statut métabolique systémique des souris ainsi que l'évolution progressive bioénergétique des muscles striés squelettiques au cours de la maladie. Cela a permis de démontrer que le déséquilibre de la balance énergétique s'installe bien avant que l'hypermétabolisme ne se mette en place. Du fait de la vulnérabilité des muscles squelettiques à prédominance glycolytique dans la SLA, un séquençage ARN a été réalisé et révèle que de nombreux gènes intervenant dans la voie glycolytique sont dérégulés. De plus, une analyse des fibres musculaires a été faite dans le muscle glycolytique tibial antérieur pour évaluer les changements énergétiques au

cours du temps. Cette étude révèle que les muscles glycolytiques changent de statut métabolique puisque la proportion de fibres oxydatives augmente avec la progression de la SLA. Il est connu qu'un exercice d'endurance engendre des modifications métaboliques dans les muscles squelettiques se caractérisant par un passage d'un métabolisme glycolytique à oxydatif qui s'accompagne d'un remodelage du volume mitochondrial (Granata et al., 2018; Widmann et al., 2019), ce qui pourrait expliquer ce phénomène chez les souris *SOD1*^{G93A}. Nous montrons ici que le volume mitochondrial augmente significativement au cours de la pathologie mais que des altérations fonctionnelles mitochondriales apparaissent dans le muscle dès un stade présymptomatique. Fait intéressant, ces défauts mitochondriaux sont détectables dans la moelle épinière uniquement au début de la maladie. Enfin, cette étude révèle une dérégulation de marqueurs métaboliques soulignant ce changement précoce de statut métabolique dans le muscle des souris *SOD1*^{G93A}.

Dans la seconde partie de l'étude, nous montrons tout l'intérêt de corriger ces défauts métaboliques dans la SLA. Le recours à un agent pharmacologique tel que la ranolazine (RAN) est intéressant puisqu'elle est connue pour rétablir la glycolyse tout en inhibant la β-oxydation. Bien que la RAN n'affecte pas la survie des animaux, nous montrons des effets considérables de la RAN sur les performances motrices des souris *SOD1*^{G93A}. Enfin, le traitement chronique à la RAN permet également de contrecarrer certaines atteintes métaboliques notamment de freiner l'hypermétabolisme mais aussi de rétablir l'homéostasie métabolique dans le muscle squelettique.

L'ensemble de ce travail souligne l'intérêt crucial d'agir sur le métabolisme énergétique du muscle strié squelettique des souris *SOD1*^{G93A} par l'intermédiaire de molécules comme la RAN qui présente des effets majeurs sur la composante motrice et métabolique de la SLA.

Contribution personnelle :

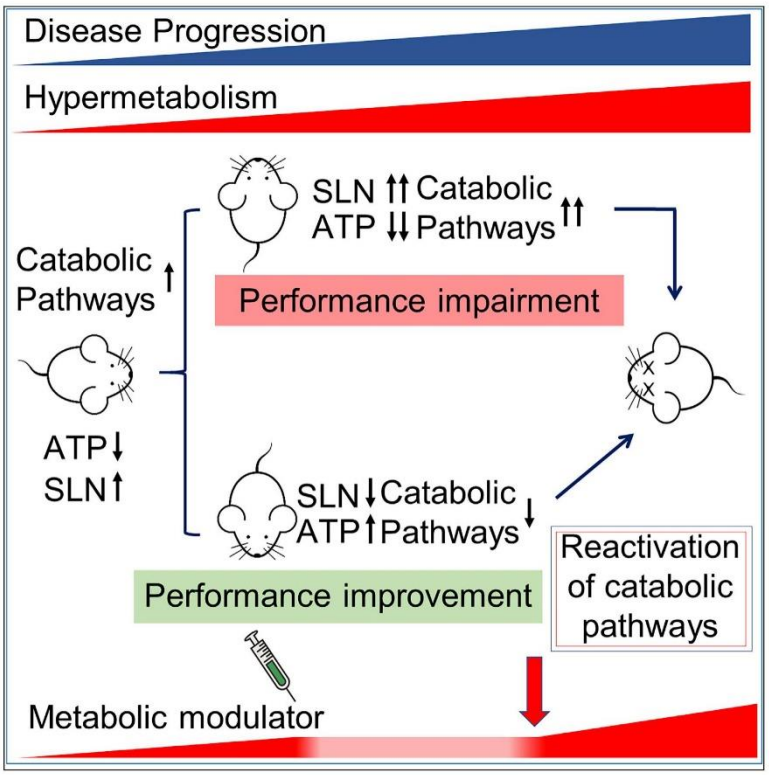
Pour cette publication, j'ai effectué les analyses histologiques (fig 2) et participé aux discussions de réflexions sur les expériences et l'écriture du papier.

iScience

CellPress
OPEN ACCESS

Article

Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-SOD1^{G93A} Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target



Silvia Scaricamazza, Illari Salvatori, Giacomo Giacovazzo, ..., Roberto Coccurello, Cristiana Valle, Alberto Ferri

c.valle@hsantalucia.it (C.V.)
alberto.ferri@cnr.it (A.F.)

HIGHLIGHTS

Metabolic switch use occurs early in the skeletal muscle of SOD1^{G93A} mice

Mitochondrial impairment precedes locomotor deficits and evokes catabolic pathways

Sarcolipin upregulation in presymptomatic SOD1^{G93A} mice precedes hypermetabolism

Pharmacological modulation of hypermetabolism improves locomotor performance

Scaricamazza et al., iScience 23, 101087
May 22, 2020 © 2020 The Author(s).
https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101087

iScience

CellPress
OPEN ACCESS

Article

Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-SOD1^{G93A} Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target

Silvia Scaricamazza,[1,2,14] Illari Salvatori,[2,14] Giacomo Giacovazzo,[2] Jean Philippe Loeffler,[3,4] Frederique Renè,[3,4] Marco Rosina,[1] Cyril Quessada,[3,4] Daisy Proietti,[2] Constantin Heil,[2] Simona Rossi,[1,5] Stefania Battistini,[6] Fabio Giannini,[6] Nila Volpi,[6] Frederik J. Steyn,[7,8] Shyuan T. Ngo,[8,9,10] Elisabetta Ferraro,[11] Luca Madaro,[2,12] Roberto Coccurello,[2,13] Cristiana Valle,[2,5,*] and Alberto Ferri[2,5,15,*]

SUMMARY

Patients with ALS show, in addition to the loss of motor neurons in the spinal cord, brainstem, and cerebral cortex, an abnormal depletion of energy stores alongside hypermetabolism. In this study, we show that bioenergetic defects and muscle remodeling occur in skeletal muscle of the SOD1^{G93A} mouse model of ALS mice prior to disease onset and before the activation of muscle denervation markers, respectively. These changes in muscle physiology were followed by an increase in energy expenditure unrelated to physical activity. Finally, chronic treatment of SOD1^{G93A} mice with Ranolazine, an FDA-approved inhibitor of fatty acid β-oxidation, led to a decrease in energy expenditure in symptomatic SOD1^{G93A} mice, and this occurred in parallel with a robust, albeit temporary, recovery of the pathological phenotype.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is characterized by the progressive loss of upper and lower motor neurons. The loss of these neurons leads to the concomitant development of skeletal muscle atrophy (Rossi et al., 2015). ALS is a disease of obscure etiology, for which neither a cure nor a therapeutic option is available. ALS is a multifactorial disease and a number of mechanisms have been proposed to underpin disease pathology, including alterations in RNA metabolism, oxidative stress, axonal transport defects, neuroinflammation, impaired protein homeostasis, alterations in autophagic flux, aberrant cytoplasmic-nuclear shuttling, failure in DNA repair, excitotoxicity, mitochondrial dysfunction, and vesicular transport defects (Mejzini et al., 2019).

In spite of its elusive etiology, some well-described clinical signs in patients with ALS highlight promising lines of investigation to improve our understanding of disease. Notably, hypermetabolism (Steyn et al., 2018) and weight loss (Moglia et al., 2019) are associated with worse prognosis. However, weight loss, undernutrition, muscle atrophy, weakness, and reduced physical activity (Ioannides et al., 2016) appear incompatible with clinical studies reporting increased energy expenditure (EE) in patients with ALS (Bouteloup et al., 2009; Desport et al., 2005; Funalot et al., 2009; Kasarskis et al., 2014). The paradox may be reconciled by assuming that skeletal muscle plays a pathological role in ALS, contributing to defective energy metabolism and a derangement of basal metabolic rate. Indeed, skeletal muscle is a key determinant of whole-body metabolic rate (Zurlo et al., 1990).

In this context, the early events underlying defective muscle metabolism in ALS as well as the major molecular mechanisms that cause ALS-associated hypermetabolism are still unknown. We therefore undertook this investigation to provide insights into the early pathological events involved in ALS by examining the mechanisms responsible for maladaptive muscle oxidative metabolism and disease progression. Finally, in this study, we provided evidences to show that pharmacological modulation of metabolism can curtail excessive EE and improve ALS pathology, thereby demonstrating that limiting hypermetabolism could be a promising therapeutic target in ALS.

[1]University of Rome Tor Vergata, Department of Biology, Rome, Italy

[2]IRCCS Fondazione Santa Lucia, Rome, Italy

[3]Université de Strasbourg, UMR_S 1118, Strasbourg, France

[4]INSERM, U1118, Central and Peripheral Mechanisms of Neurodegeneration, Strasbourg, France

[5]National Research Council, Institute of Translational Pharmacology (IFT), Rome, Italy

[6]University of Siena, Department of Medical, Surgical and Neurological Science, Siena, Italy

[7]School of Biomedical Sciences, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia

[8]Centre for Clinical Research, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia

[9]Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia

[10]Queensland Brain Institute, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia

[11]Department of Biology, University of Pisa, Pisa, Italy

[12]DAHFMO-Unit of Histology and Medical Embryology, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

[13]National Research Council, Institute for Complex System (ISC), Rome, Italy

[14]These authors contributed equally

[15]Lead Contact

*Correspondence: c.valle@hsantalucia.it (C.V.), alberto.ferri@cnr.it (A.F.)

https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101087

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

RESULTS

An Increase in Fatty Acid Oxidation and Glucose Intolerance Precedes Hypermetabolism in SOD1^{G93A} Mice

To investigate the whole-body metabolic status and fuel oxidation in SOD1^{G93A} mice, we conducted indirect calorimetry over 2 or 3 continuous days. Measures were obtained from animals at the early presymptomatic (55 days of age) and symptomatic (120 days of age) stages of disease. Hypermetabolism, defined as an increase in total EE or resting energy expenditure (REE), was not detectable in early presymptomatic mice (Figures 1A–1C) but was strongly evident in symptomatic mice (Figures 1D–1F). Analysis of the respiratory exchange ratio (RER) revealed a significant genotype effect, with RER being reduced in both early presymptomatic and symptomatic SOD1^{G93A} mice when compared with wild-type control mice (Figures 1G and 1H). These results are indicative of enhanced fatty acid oxidation and predominant use of fatty acids as fuel source in ALS mice.

After confirmed metabolic alteration in presymptomatic SOD1^{G93A} mice and since skeletal muscle is the major factor affecting EE also at rest (Zurlo et al., 1990) we carried out RNA sequencing to assay gene expression changes in the *tibialis anterior* (TA) of SOD1^{G93A} mice at the onset stage of disease, when compared with their wild-type littermate controls. Gene enrichment analysis, using Reactome categories, highlighted that the gene sets most significantly enriched among downregulated genes were associated with glucose metabolism (Figure 1I). In particular, we observed downregulation of key glycolysis pathway genes (Figures 1J and 1K). The decrease in the expression of glycolytic pathway genes was further supported through our assessment of glucose tolerance in SOD1^{G93A} mice. At the early presymptomatic stage, SOD1^{G93A} mice already show a marked decrease in blood glucose clearance with respect to wild-type control littermates (Figure 1L, upper panel). This metabolic alteration dramatically worsened with disease progression in SOD1^{G93A} mice (Figure 1L, middle and lower panels).

ALS Skeletal Muscles Undergo Metabolic Reprogramming

Based on results obtained through indirect calorimetry and transcriptome analysis, we aimed to define the timing of the onset of metabolic changes in skeletal muscle of SOD1^{G93A} mice by analyzing the oxidative capacity of the glycolytic TA at different time points. We found that *in situ* NADH-TR and SDH activities were dramatically increased in SOD1^{G93A} mice at the early presymptomatic stage (55 days) and to a higher degree at the later stages of the disease (Figures 2A, 2B, S1A, and S1B).

In line with the rise in muscle oxidative capacity, we detected, by immunofluorescence analysis, a consistent increase in the intensity of ATPB, a known mitochondrial marker, in the TA muscle of SOD1^{G93A} mice (Figures 2C and S1C). Accordingly, a striking increase in mitochondrial mass was observed, defined by an increase in the amount (μg) of mitochondria per milligram of tissue as well as an increase in the content of mitochondrial DNA, in different muscles of SOD1^{G93A} mice during the course of the disease (Figures S2A–S2C). Interestingly, this phenomenon occurred mainly in glycolytic muscles and not in the oxidative *soleus* muscle.

The switching of skeletal muscle metabolism toward an oxidative phenotype in SOD1^{G93A} mice was further corroborated by the upregulation in neuron-derived orphan nuclear receptor (Nor1) mRNA in the TA (Figure 2D). This transcription factor is known to promote muscle remodeling toward oxidative metabolism by activating pathways critical for adaptation to exercise or energy deficit (Goode et al., 2016). The upregulation of Nor1 in SOD1^{G93A} mice occurred alongside an upregulation in mRNA encoding for myoglobin (Figure 2D) (Pearen et al., 2013). Moreover, we found significant alterations in the expression of mRNAs encoding myosin heavy chain isoforms. Specifically, we observed a reduction in the expression of the glycolytic isoform MyCHIIb and an increase in the expression of the oxidative/intermediate isoforms MyHCIIa and MyHCIIx (Figure 2E). No significant alterations were observed in the expression of the oxidative isoform MyHCI (Figure 2E). Overall, these data show that, in SOD1^{G93A} mice, glycolytic muscles undergo a profound rearrangement in their physiology throughout the course of disease.

Mitochondrial Bioenergetics Are Perturbed in Skeletal Muscle of Early Presymptomatic SOD1^{G93A} Mice

The metabolic modifications of skeletal muscle observed in SOD1^{G93A} animals mirror adaptations to endurance training, wherein a switch from glycolytic to oxidative metabolism occurs (Granata et al.,

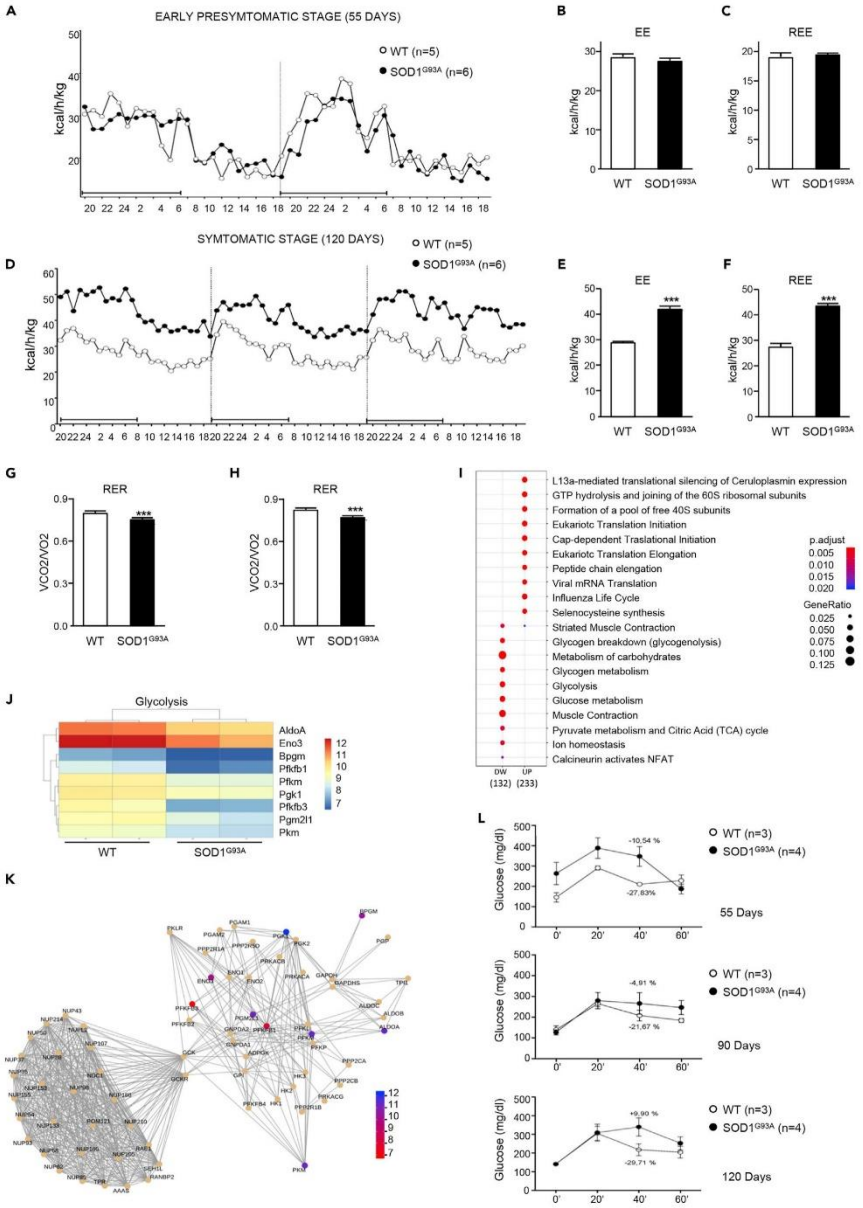

A
EARLY PRESYMTOMATIC STAGE (55 DAYS)
WT (n=5)
SOD1G93A (n=6)
kcal/h/kg
B
EE
C
REE
D
SYMTOMATIC STAGE (120 DAYS)
E
F
***
G
RER
VCO2/VO2
H
I
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunits
Formation of a pool of free 40S subunits
Eukariotc Translation Initiation
Cap-dependent Trasnlational Initiation
Eukariotc Translation Elongation
Peptide chain elongation
Viral mRNA Translation
Influenza Life Cycle
Selenocysteine synthesis
Striated Muscle Contraction
Glycogen breakdown (glycogenolysis)
Metabolism of carbohydrates
Glycogen metabolism
Glycolysis
Glucose metabolism
Muscle Contraction
Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle
Ion homeostasis
Calcineurin activates NFAT
p.adjust
GeneRatio
DW (132)
UP (233)
J
Glycolysis
AldoA
Eno3
Bpgm
Pfkfb1
Pfkm
Pgk1
Pfkfb3
Pgm2l1
Pkm
K
L
Glucose (mg/dl)
55 Days
90 Days
120 Days
-10,54 %
-27,83%
-4,91 %
-21,67 %
+9,90 %
-29,71 %

Figure 1. Energy Expenditure and Metabolic Profile of WT and SOD1^{G93A} Mice

(A–L) (A) Energy expenditure profiles of early presymptomatic SOD1^{G93A} mice (55 days) and their wild-type control littermates (WT). Black bar indicates dark cycle period. Mean (B) energy expenditure (EE) and (C) resting energy expenditure (REE) calculated from (A). (D) Energy expenditure profiles of symptomatic SOD1^{G93A} mice (120 days) and their wild-type control littermates (WT). Mean (E) EE and (F) REE calculated from (D). (G and H) Mean RER from (A) and (D), respectively. (I) Gene expression changes in the tibialis anterior (TA) muscle from SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates. (J) Heatmap depicting expression of genes from the Reactome category "Glycolysis." Shown genes are differentially expressed with adjusted $p < 0.05$. (K) Network plot of the "Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle" pathways. Nodes are genes colored based on log2FC, edges are knowledge-based interactions annotated by Reactome. (L) Glucose tolerance test performed in SOD1^{G93A} and in their wild-type control littermates (WT) at 55, 90, and 120 days of age, respectively. Data in (B), (C), (E), (F), (G), and (H) are presented as mean ± SEM, ***$p < 0.0001$, unpaired Student's t test.

2018; Widmann et al., 2019). During endurance training, this metabolic switch is accompanied by an increase in mitochondrial mass alongside significant remodeling of myofibers and a preferential use of fatty acids as fuel (Granata et al., 2018; Widmann et al., 2019). Although we found that mitochondrial mass in glycolytic TA muscle of SOD1^{G93A} mice increased during the disease course, we also noted an early mitochondrial bioenergetic defect. In this regard, we found that total ATP was significantly lower in the TA of SOD1^{G93A} mice at the early symptomatic through to the mid-stage of disease when compared with age-matched wild-type control mice (Figure 3A). Moreover, we observed a marked reduction in all mitochondrial functionalities in the TA of SOD1^{G93A} mice at the early presymptomatic phase of the disease. Similarly, early reductions in mitochondrial function were also observed in other glycolytic muscles, *gastrocnemius* (GNM) and *extensor digitorum longus* (EDL) (Figures S3A and S3B). Interestingly, bioenergetic defects only become detectable in the spinal cord at onset of the pathology (Figures 3C and S3B).

To further investigate the mitochondrial bioenergetic deficit in SOD1^{G93A} mice, we assessed respiration states of mitochondria isolated from skeletal muscle and spinal cord of SOD1^{G93A} mice and wild-type litter matched controls. We observed a decrease in maximally coupled respiration (state 2), thereby confirming the impairment in ATP production. Moreover, maximal respiration (state 4), determined through the addition of the uncoupling agent FCCP, appeared to be significantly compromised in mitochondria obtained from glycolytic TA, GNM, and EDL of presymptomatic SOD1^{G93A} mice (Figures 3B, S3A, and S3B). Interestingly, mitochondria purified from a purely oxidative muscle, the *soleus*, were not affected (Figures S3A and S3B). With the aim of characterizing the alterations in the electron transport chain, we performed a spectrophotometric analysis of the functional activities of the mitochondrial complexes and observed a specific impairment in Complex I in mitochondria purified from the TA (Figure 3D) and GNM (not shown) of early presymptomatic SOD1^{G93A} mice. Again, this dysfunction was evident in skeletal muscle from early presymptomatic SOD1^{G93A} mice, whereas defects in Complex I activity were only observed in the spinal cords of SOD1^{G93A} mice at the symptomatic and end stage of disease (Figure 3E).

Next, we performed Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) analysis of digitonin-extracted mitochondrial membranes obtained from the TA of SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates at different ages (Figure S3C). We found no difference in the assembly of electron transport chain complexes or supercomplexes in mitochondria obtained from SOD1^{G93A} mice when compared with age-matched controls. Finally, bioenergetic assessment of primary cultures of skeletal muscle satellite cells isolated from early presymptomatic SOD1^{G93A} mice (55 days of age) revealed significant decreases in basal respiration, ATP production, maximal respiration, and spare respiratory capacity when compared with those isolated from their wild-type control littermates (Figures 4A and 4B). The decline in maximal respiration and spare respiratory capacity suggests that ALS may inhibit the rapid adaptation of skeletal muscle satellite cells to metabolic changes. Thus, although the number of mitochondria in the whole muscle appears to increase in SOD1^{G93A} mice, mitochondrial metabolism is compromised early in the course of the disease, leading to ATP deficit and impairments in OXPHOS functionality.

Muscle Mitochondrial Deficit in SOD1^{G93A} Mice Occurs in Parallel with an Activation of Molecular Pathways that Compensate for Energy Failure

In normal physiology, a decrease in ATP production (mitochondrial alterations) leads to an enhancement in AMPK activity to promote the binding of AMP (and ADP) to the kinase subunit. This in turn induces the phosphorylation of a wide range of downstream proteins that eventually lead to the activation of catabolic pathways (Hardie et al., 2016). In particular, pharmacological or genetic inhibition of Complex I is sufficient to activate AMPK (Hardie et al., 2016; Thomas et al., 2018). Therefore, in light of the bioenergetic defects

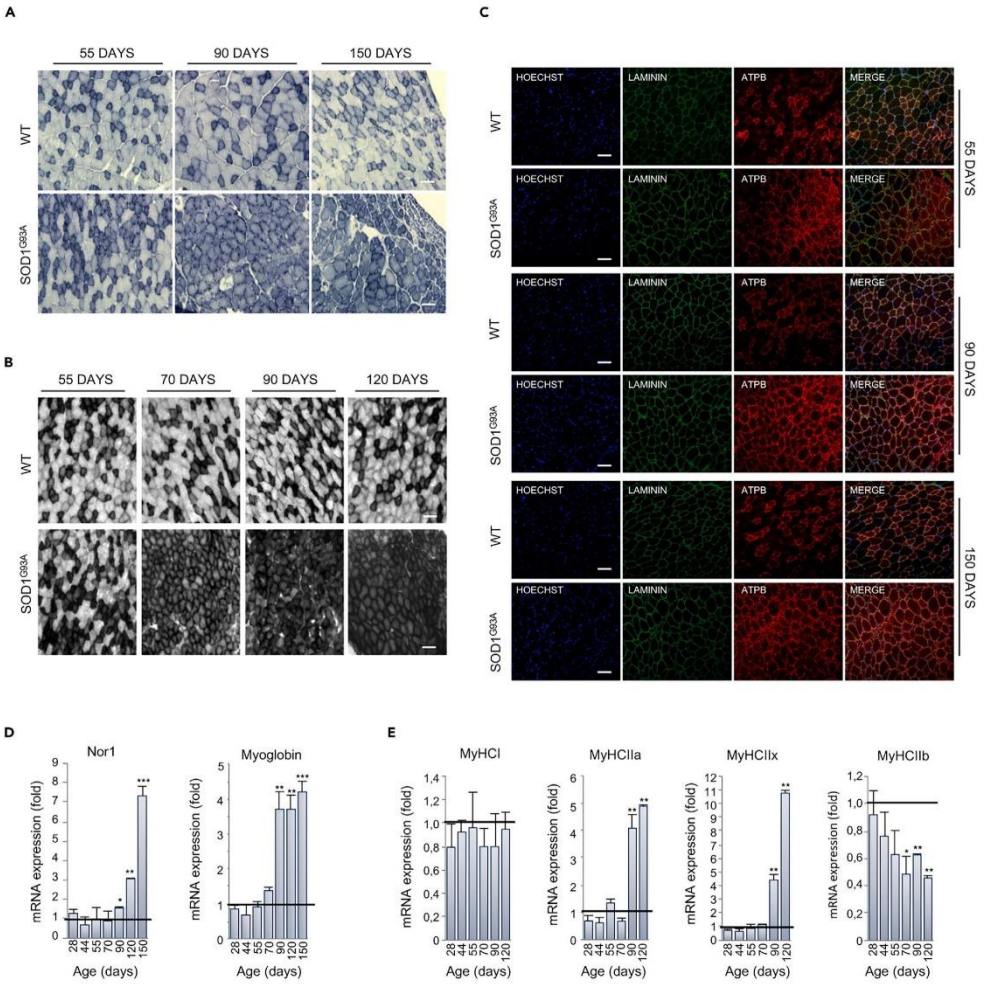


Figure 2. Muscle Metabolism Switches from Glycolytic to Oxidative in SOD1^{G93A} Mice

(A) Representative NADH-tetrazolium reductase activity staining on tibialis anterior (TA) cross sections obtained from 55-, 90-, and 150-day-old SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates (WT). Scale bar, 100 μm, $n = 3$.

(B) Representative SDH activity staining on TA cross sections of 55-, 70-, 90-, and 120-day-old SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates (WT). The darker color indicates the site of SDH activity. Scale bar, 100 μm, $n = 3$.

(C–E) (C) Representative images of TA sections from 55-, 90-, and 150-day-old SOD1^{G93A} and wild-type (WT) mice, immunostained with laminin (green) and the mitochondrial marker ATPB (red); nuclei were detected with Hoechst 33342 (blue). Scale bar, 100 μm, $n = 3$. Expression level of mRNAs coding for (D) Nor1 and Myoglobin and (E) MyHCI, MyHCIIa, MyHCIIIx, and MyHCIIb in TA sections obtained from SOD1^{G93A} at the indicated ages (at least $n = 4$). Data are presented as mean ± SEM, *$p < 0.05$, **$p < 0.001$, ***$p < 0.0001$, compared with wild-type control littermates at the same age (arbitrarily set at 1), unpaired Student's t test.

Also see Figures S1A–S1C.

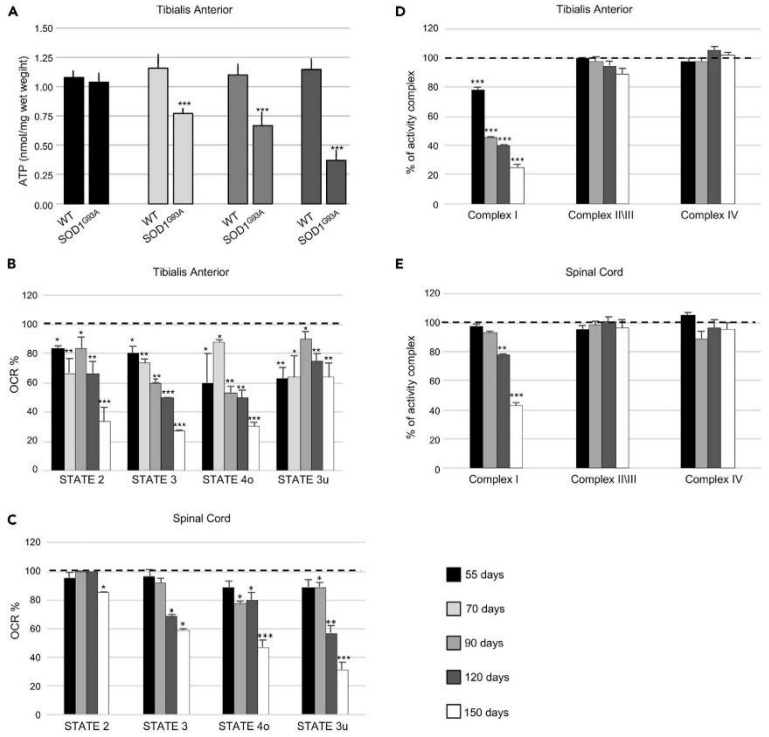


Figure 3. Mitochondrial Bioenergetic Failure Occurs in Skeletal Muscle of Early Presymptomatic SOD1^{G93A} Mice

(A) Fluorometric measurements of total ATP in the tibialis anterior (TA) muscle from SOD1^{G93A} and wild-type age-matched control mice (WT) at different ages. Data were analyzed by unpaired t test and presented as mean ± SEM, ***p < 0.0001 compared with age-matched WT mice (n = 4 independent experiments).

(B) Coupling assay on isolated mitochondria purified from TA.

(C) Spinal Cord of SOD1^{G93A} mice at the indicated ages. Mitochondrial respiration stages are reported as basal respiration (state 2), maximal coupled respiration (state 3), respiration due to proton leak (state 4o), and maximal uncoupled respiration (state 3u). Data are expressed as % Oxygen Consumption Rate (OCR), and 100% was arbitrarily assigned to values obtained from age-matched wild-type mice, *p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001, unpaired Student's t test (n = 5 independent experiments).

(D) Activity of electron transport chain complexes I, II\III, and IV of mitochondria obtained from TA.

(E) Spinal Cord of SOD1^{G93A} and wild-type (WT) mice at the indicated ages. Values were normalized to citrate synthase activity and presented as mean ± SEM, **p < 0.001, ***p < 0.0001 compared with age-matched WT mice (arbitrarily set at 100%), unpaired Student's t test (n = 5 independent experiments).

Also see Figures S2A–S2C and S3A–S3C.

observed in early presymptomatic mice and the specific impairment of Complex I activity, we analyzed the extent of AMPK activation in ALS mice.

Glycolytic skeletal muscles from SOD1^{G93A} mice displayed a robust activation of AMPK, long before the appearance of locomotor symptoms (Figures 5A and S4). AMPK activation occurred in parallel with the phosphorylation/inactivation of the AMPK downstream target Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), which catalyzes the first step of fatty acid synthesis (Figures 5A and S4). Moreover, we found an upregulation in carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) in the skeletal muscle of presymptomatic SOD1^{G93A} mice (Figures 5A

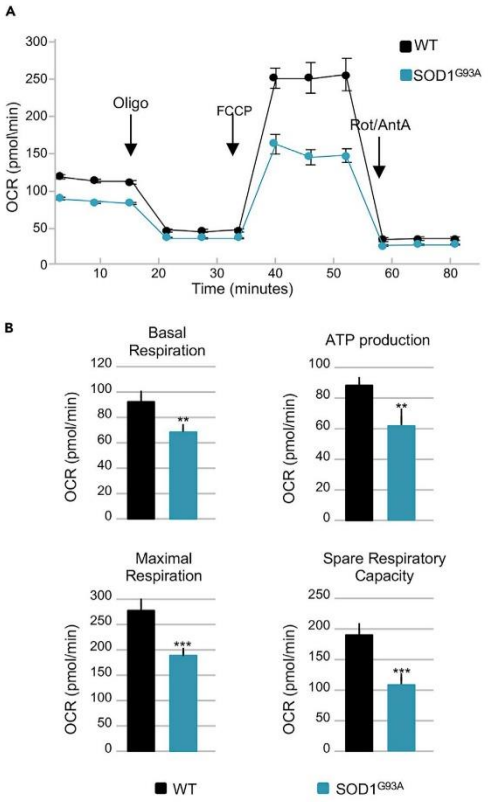


Figure 4. Mitochondrial Bioenergetics Failure Occurs in Skeletal Muscle Satellite Cells Isolated from Early Presymptomatic SOD1^{G93A} Mice

(A) Representative trace of oxygen consumption rate (OCR) in skeletal muscle satellite cells isolated from early presymptomatic SOD1^{G93A} mice (55 days) and their wild-type control littermates (WT).

(B) Individual parameters obtained for basal respiration, ATP production, maximal respiration, and spare respiratory capacity. Each data point represents an OCR measurement. Data are presented as mean ± SEM, **p < 0.001, ***p < 0.0001 relative to WT control, p values obtained from unpaired Student's t test. Data from four independent experiments, with each sample tested in quadruplicate.

and S4). Finally, in support of a metabolic shift toward lipid use, we observed a decrease in the expression of Glucose Transporter type 4 (Glut4) mRNA and the concomitant increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4) mRNA in skeletal muscle of presymptomatic mice (Figure 5B).

Sarcolipin Is an Early Player in ALS Metabolic Alterations

Recent studies have outlined the pivotal role of sarcolipin (SLN) in orchestrating the transition toward oxidative metabolism in skeletal muscle (Maurya et al., 2018). In line with the literature (Babu et al., 2007), we found that SLN is highly expressed in the TA of wild-type control mice until 14 days of age, after which it gradually declines (Figure 6A). By contrast, in SOD1^{G93A} mice, the expression level of SLN remained detectable in TA beyond 14 days of age, increasing during the course of the disease (Figure 6A). Indeed, in SOD1^{G93A} mice, SLN overexpression was strongly upregulated through to the end stage of disease in all glycolytic and oxidative muscles assessed. This is in contrast to the expression profile of SLN in

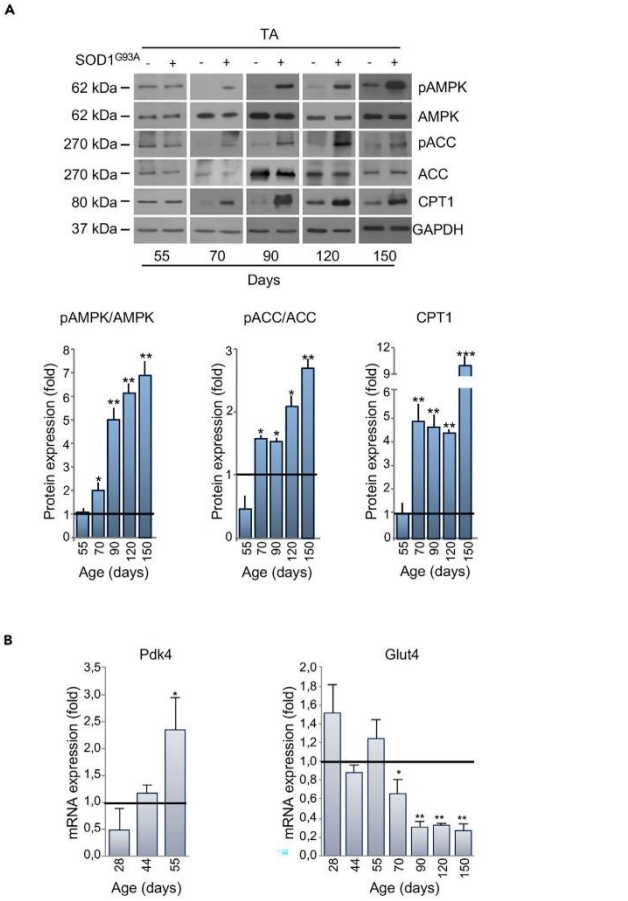


Figure 5. Alterations in Expression of Metabolic Targets Occurs Early in the *tibialis anterior (TA)* of SOD1^{G93A} Mice

(A) Representative western blot images of pAMPK, AMPK, pACC, ACC, and CPT1 (upper panel) in the TA of SOD1^{G93A} and wild-type mice at 55 days of age. GAPDH was used as loading control. Densitometric analysis of pAMPK/AMPK and pACC/ACC ratios and CPT1 expression (lower panel) from $n = 4$ independent experiments.

(B) Expression of mRNAs coding for Pdk4 and Glut4 in the TA of SOD1^{G93A} mice relative to wild-type litter-matched controls. Data presented as mean ± SEM, *$p < 0.05$, **$p < 0.001$, ***$p < 0.0001$ when compared with control littermates at the same age (arbitrarily set at 1), unpaired Student's t test.

Also see Figures S4 and S5A–S5C.

age-matched wild-type control mice, where SLN was only detectable in the oxidative *soleus* (Figure 6B). Of note, we did not observe any significant variation in mRNA expression of phospholamban (PLN) or myoregulin (MLN) (Figure S5A), muscular micropeptides that function similarly to SLN. Thus, our data suggest that SLN is the only SERCA-regulatory micropeptide involved in ALS.

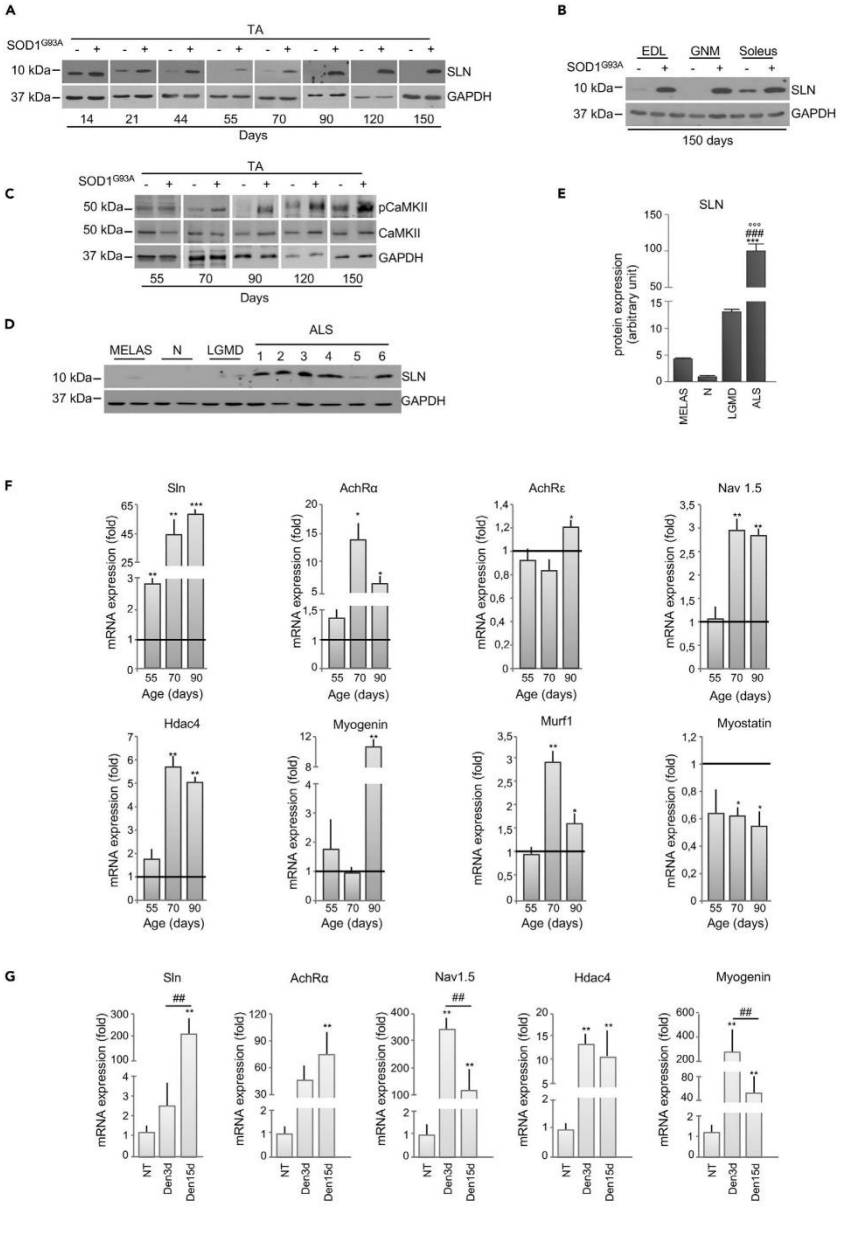

A
TA
SOD1G93A
10 kDa
37 kDa
SLN
GAPDH
14 21 44 55 70 90 120 150
Days
B
EDL GNM Soleus
SOD1G93A
10 kDa
37 kDa
SLN
GAPDH
150 days
C
TA
SOD1G93A
50 kDa
50 kDa
37 kDa
pCaMKII
CaMKII
GAPDH
55 70 90 120 150
Days
D
MELAS N LGMD ALS
1 2 3 4 5 6
10 kDa
37 kDa
SLN
GAPDH
E
SLN
protein expression (arbitrary unit)
MELAS N LGMD ALS
F
Sln
AchRα
AchRε
Nav 1.5
Hdac4
Myogenin
Murf1
Myostatin
mRNA expression (fold)
Age (days)
55 70 90
G
Sln
AchRα
Nav1.5
Hdac4
Myogenin
mRNA expression (fold)
NT Den3d Den15d

Figure 6. Upregulation of Sarcolipin in ALS Occurs before Denervation in SOD1^{G93A} Mice

(A and B) Representative western blots of sarcolipin (SLN) protein expression in the (A) tibialis anterior (TA) or (B) Extensor *digitorum longus* (EDL), *gastrocnemius* (GNM), and *soleus* muscle of SOD1^{G93A} (+) and wild-type mice (–) at the indicated ages.

(C) Western blot of pCaMKII and CaMKII in the TA of SOD1^{G93A} (+) and wild type mice (–) at the indicated ages; GAPDH was used as loading control in (A–C).

(D) SLN protein expression in different muscle biopsies derived from MELAS, neuropathy (N), not Limb Girdle Muscle Dystrophy (LGMD) and patients with ALS (1 = SOD1^{D90A} mutation, *soleus*; 2 = sporadic, *vastus lateralis*; 3 = Valosin Containing Protein (VCP) mutation, *vastus lateralis*; 4 = *C9ORF72* repeat expansions, *soleus*; 5 = sporadic, *vastus lateralis*; 6 = sporadic, *rectus femoralis*).

(E) Densitometric analysis of (D) normalized to GAPDH protein expression. Data are presented as a percentage, where an arbitrary value of 100% was assigned to patients with ALS, ***$p < 0.0001$, one-way parametric ANOVA and Tukey's post hoc test.

(F) Expression of mRNAs coding for Sarcolipin (Sln), Acetylcholine Receptor α subunit (Achrα), Acetylcholine Receptor ϵ subunit (Achrϵ), Voltage-gated Na channels 1.5 (Nav1.5), Histone Deacetylase 4 (Hdac4), Myogenin, MuscleRING Finger-1 (Murf1), and Myostatin in the TA of SOD1^{G93A} mice relative to their wild-type control littermates, *$p < 0.05$, **$p < 0.001$ ***$p < 0.0001$ when compared with age control littermates (arbitrarily set at 1).

(G) Expression of mRNAs coding for Sln and denervation markers (Achrα, Nav1.5, Hdac4, and Myogenin) in the TA of wild-type mice 3 and 15 days after sciatic nerve axotomy. Data are expressed as the ratio between the average of values from not axotomized and axotomized mice, *$p < 0.05$, **$p < 0.001$ when compared with control not axotomized mice (arbitrarily set on at 1), and $^{\#\#}p < 0.001$ between mice after 3 and 15 days from axotomy. All data are presented as mean ± SEM, unpaired Student's t test (E) and parametric ANOVA and a Bonferroni post hoc test (F), $n = 3$ or 4 independent experiments.

See also Table 1.

An upregulation in SLN is known to trigger an increase in cytosolic calcium concentration in skeletal muscle (Maurya and Periasamy, 2015). To this end, we found a significant activation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in skeletal muscle of SOD1^{G93A} at the presymptomatic stage of the disease, when the glycolytic muscle was highly oxidative (Figure 6C). Moreover, we observed a significant increase in PGC-1α protein expression in the TA of SOD1^{G93A} mice at the presymptomatic phase of disease (70 days of age) as well as throughout the course of the disease (Figure S5B).

The expression pattern of mRNAs coding for different isoforms of SERCA pumps reflects the metabolic profile of muscle. SERCA2a and SERCA2b isoforms that are normally associated with oxidative muscle, were more highly expressed in the TA from SOD1^{G93A} mice, whereas the glycolytic muscle-associated SERCA1 isoform was downregulated at the presymptomatic stage (Figure S5C). It is noteworthy that SLN selectively binds SERCA2 isoforms, interacting with these to trigger the transition of skeletal muscle from glycolytic to oxidative metabolism (Anderson et al., 2016). Finally, highly relevant was the finding that SLN expression was upregulated in muscle biopsies obtained from six patients affected by different forms of ALS (for details see Table 1). Indeed, all ALS biopsies showed higher expression levels of SLN when compared with control patients affected by other muscular disorders (Figures 6D and 6E).

Sarcolipin Overexpression in SOD1^{G93A} Mice Is Not Related to Muscle Denervation

Several pathological conditions that lead to skeletal muscle disuse and subsequent atrophy affect not only muscle mass but also muscle metabolism (Tintignac et al., 2015). SLN has been described to be a key mediator of metabolic modifications occurring in unloaded/disused muscle (Fajardo et al., 2017). Thus, to discriminate whether SLN upregulation is causally linked to the altered metabolic state observed in ALS mice, or whether it is merely a consequence of early denervation, we analyzed the expression levels of several denervation/atrophy markers. Our results demonstrate that, in TA from SOD1^{G93A} mice, SLN is upregulated at the early presymptomatic stage, whereas mRNAs coding for Hdac4, Nav1.5, Myogenin, AchRϵ, AchRα, Murf1, and Myostatin, all associated with the denervation process, are only increased at the later stages of disease (Figure 6F).

In order to further decipher the relationship between denervation and metabolic alterations in skeletal muscle from ALS mice, we used an experimental paradigm of acute denervation. As shown in Figure 6G, sciatic nerve axotomy in control mice evoked an upregulation in denervation markers after 3 days, whereas SLN was only found to increase after 15 days. Overall, our data strongly suggest that, in ALS, muscle metabolic reprogramming is orchestrated by SLN and this occurs independent of denervation.

Altered Muscle Performance in SOD1^{G93A} Mice Is Related to Hypermetabolism

Given the altered bioenergetic profiles observed in SOD1^{G93A} mice, we next tested whether pharmacological targeting of altered energy metabolism could be a beneficial therapeutic approach in ALS. To address this aim, we chronically administered ranolazine (RAN) to SOD1^{G93A} mice. RAN is a US Food and Drug Administration (FDA)-approved drug that is used to treat ventricular hypertrophy, and it has been shown to exert cardioprotective effects by facilitating higher energy production under conditions of lower oxygen

Patient	Age (years)	Sex	ALS Mutation	Months from Diagnosis	Muscle (Biopsies Were Done on Limb Muscle where the Disease Began)	Patient Information
1	47	F	$SOD1^{D90A}$	12	*soleus dx*	Spinal onset
2	72	F	Sporadic	42	*vastus lateralis dx*	Spinal onset
3	50	M	VCP mutation	54	*vastus lateralis dx*	Spinal onset with IBM (inclusion body myositis) and Paget's disease
4	62	F	C9ORF72 (58 repeats)	33	*soleus dx*	Spinal onset with progressive muscle atrophy
5	77	F	Sporadic	19	*vastus lateralis dx*	Spinal onset
6	71	F	Sporadic	14	*rectus femoris dx*	N/A

Table 1. Demographics of Patients with ALS

supply (Stanley, 2002). This drug decreases β-oxidation, thereby restoring the use of glucose as fuel (McCormack et al., 1998).

In a preliminary dose-response study, a small cohort of $SOD1^{G93A}$ mice and age-matched wild-type control mice received daily intraperitoneal (i.p.) injections, for seven consecutive days, of three different doses of RAN (25, 50, 100 mg/kg). Treatment commenced at an age that corresponds to the symptomatic stage of the disease in $SOD1^{G93A}$ mice (110 days). Bioavailability of RAN in plasma was assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC), and results confirmed a dose-dependent increase (Table 2). RAN concentration values were consistent with those registered in more extended pharmacokinetics and pharmacodynamics studies reported by others (Patel and Hasumati, 2015). Analysis of grip strength and SLN expression were used as readouts to determine the efficacy of RAN treatment. Strikingly, $SOD1^{G93A}$ mice receiving 50 and 100 mg/kg of RAN showed a marked increase in muscular strength after 2 days of treatment. This improvement was maintained throughout the 7-day treatment period (Figure S6A). Similar results were obtained with a lower dose of RAN (25 mg/kg), which showed a significant, although delayed, efficacy. Furthermore, in the TA muscle of $SOD1^{G93A}$ mice, SLN expression was reduced after 7 days of treatment. This was most evident at a RAN dose of 50 mg/kg (Figure S6B). As such, 50 mg/kg of RAN was selected as the most effective dose.

A second, larger cohort of $SOD1^{G93A}$ mice received 50 mg/kg RAN from the onset stage of disease (90 days) through the end stage of disease. As shown in Figure 7A, RAN treatment improved hanging grid performance in $SOD1^{G93A}$ mice up until the fully symptomatic stage of the disease (132 days). However, this improvement was not sustained; hanging grid performance in RAN-treated $SOD1^{G93A}$ mice was comparable with that of non-treated $SOD1^{G93A}$ mice by the end stage of disease (Figure 7A). Interestingly, RAN exerted similar effects on wild-type mice (Figure S7). Despite improving hanging grid performance in $SOD1^{G93A}$ mice, RAN failed to improve survival (Figure 7B) and it did not provide weight changes (data not shown). Interestingly, RAN treatment improves glycemia and reverses glucose intolerance in murine models of metabolic alterations without modifying body weight development (Batran et al., 2019; Ning et al., 2011).

It is noteworthy that treatment efficacy followed the trend of expression/activation of muscle metabolic markers. Indeed, after 30 days of treatment with RAN, SLN was markedly downregulated and CaMKII and AMPK were inactivated by dephosphorylation, whereas the AMPK target, ACC, was dephosphorylated and hence reactivated (Figures 8A and 8B). Similarly, expression levels of mRNAs encoding myosin subtypes and SERCA pumps were decreased in response to RAN (Figure 8C), whereas mRNAs encoding Nor1 and Glut4 returned to levels similar to that observed in wild-type control mice (Figure 8C). In line

RAN Dose (mg/kg)	WT (μM)	SOD1^{G93A} (μM)
25	0.63 ± 0.16	0.79 ± 0.11
50	1.22 ± 0.20	1.30 ± 0.18
100	3.33 ± 0.21	2.87 ± 0.17

Table 2. HPLC Determination of Ranolazine (RAN) Plasma Concentrations 12 h after i.p. Administration of Ranolazine at 25, 50, or 100 mg/kg
Data are expressed as mean ± SD, n = 5 per group.

with RAN's known mechanism of action in improving glucose metabolism, fluorometric determination of total ATP content showed a net increase in ATP concentration in the TA from symptomatic, 120-day-old SOD1^{G93A} mice when compared with their wild-type control littermates (Figure 8D).

Given that progressive changes in muscle metabolic markers in SOD1^{G93A} mice occurred alongside the presentation of hypermetabolism, we next aimed to determine whether RAN would attenuate hypermetabolism in SOD1^{G93A} mice. Indeed, indirect calorimetry analysis showed that hypermetabolism was partially abrogated after treatment with RAN (Figures 8E and 8F). RAN restored EE (Figure 8G) and REE (Figure 8H) but had no effect on RER (Figure 8I). Surprisingly, the weakening of RAN effects during the end stage of the disease was paralleled with an increase in the expression of SLN, the reactivation of CaMKII and AMPK, and thus ACC inactivation (Figures 8, 8J, and 8K). Overall, these results show that decreasing EE is linked to an improvement in grip strength in SOD1^{G93A} mice. Our data highlight the potential relevance of pharmacological interventions aimed at counteracting hypermetabolism in ALS.

DISCUSSION

In this study, we detail the existence of early events responsible for the remodeling of myofiber-type composition and defective energy metabolism in the SOD1^{G93A} mouse model of ALS. Our observations are in agreement with previous work demonstrating a shift in fast-to-slow muscle fiber type composition (Peggion et al., 2017), as well as aberrant mitochondrial metabolism (Salvatori et al., 2017) and alterations in muscle glucose metabolism in response to muscle-restricted overexpression of SOD1^{G93A} (Dobrowolny et al., 2008, 2018). Moreover, in line with the derangement in whole-body EE that we identified in symptomatic SOD1^{G93A} mice, hypermetabolism has been described in many patients with ALS (Bouteloup et al., 2009; Desport et al., 2005; Funalot et al., 2009; Jésus et al., 2018; Steyn et al., 2018) and often associated with dyslipidemia (Dupuis et al., 2008). Notably, prognosis is less favorable in hypermetabolic patients (Steyn et al., 2018), whereas dyslipidemia/hyperlipidemia may confer protection and increase survival (Dupuis et al., 2008).

Given that skeletal muscle is a major determinant of whole-body energy metabolism (Zurlo et al., 1990), we focused our investigation on the contribution of skeletal muscle to SOD1^{G93A} metabolic dysfunction. Indeed, we found some prodromal molecular signatures of oxidative metabolism at 55 days of age, including an initial increase in NADH-TR and SDH activities and an increase in mitochondrial mass in fast-twitch glycolytic muscles. Thus, we identified a fast-to-slow skeletal muscle fiber transition in the early presymptomatic stage; this pathological rearrangement of muscle phenotype might partially account for the marked increase of fatty acid β-oxidation observed before disease onset. However, according to previous evidence (Doshi et al., 2017), hypermetabolism occurs in SOD1 G93A mice only at a symptomatic stage of the disease, whereas it is undetectable at 55 days of age. It should be considered that, around 55 days of postnatal life, the skeletal muscle of SOD1 G93A mice are not yet fully oxidative.

Skeletal muscle is a dynamic tissue that is highly adaptable to environmental changes and to alterations in energy need. Physical exercise is a key modulator of muscle plasticity, as enduring contractile activity, it is a powerful stimulus for enhancing mitochondrial biogenesis (Hood, 2009). This condition upregulates mitochondrial enzymes involved in fatty acid β-oxidation (Lundsgaard et al., 2018) to promote myofiber switching from fast (glycolytic) to slow (oxidative) fiber types (Flück, 2006). In this view, the muscle alterations that we have observed in SOD1^{G93A} mice appear to mimic a state of long-lasting endurance exercise. Indeed, Palamiuc et al. (2015) have previously reported increased endurance capacity in SOD1^{G86R} mice at an advanced phase of disease. Although it remains unknown as to why

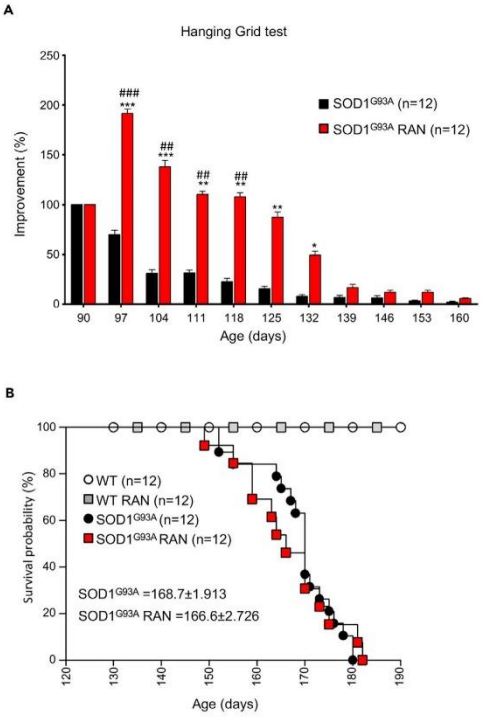


Figure 7. Ranolazine Improves Locomotor Abilities but Does Not Affect Survival

(A) Locomotor abilities of SOD1^{G93A} mice receiving daily intraperitoneal injections of Ranolazine 50 mg/kg (SOD1^{G93A} RAN) or physiological solution (SOD1^{G93A}) evaluated by hanging grid test at the indicated days. Performance was evaluated from 90 days of age (start of treatment) to the end stage of disease. Data are presented as mean ± SEM, $^{*}p < 0.05$ $^{**}p < 0.001$ $^{***}p < 0.0001$ when compared with age-matched SOD1^{G93A} untreated mice, and $^{\#}p < 0.05$ $^{\#\#}p < 0.01$ $^{\#\#\#}p < 0.0001$ when compared with SOD1^{G93A} mice at the beginning of treatment. (n = 12 SOD1^{G93A}, n = 12 SOD1^{G93A} + RAN).

(B) Kaplan-Meier survival curve of SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates (WT) receiving daily intraperitoneal injections of Ranolazine 50 mg/kg (SOD1^{G93A} RAN and WT RAN) or physiological solution (SOD1^{G93A} and WT). p Values were obtained using parametric two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test (A) or one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test (B).

Also Figure S7.

there is a shift in muscle fiber type, and enhanced fatty acid utilization in the absence of environmental pressure and/or physical exercise in SOD1^{G93A} mice, this exercise-mimetic phenotype may be associated with aberrant energy needs that may be associated with early mitochondrial dysfunction and/or SLN overexpression.

Mitochondrial Dysfunction

In light of the critical role that mitochondria play in muscle metabolism and plasticity, it is conceivable that early alterations in muscle mitochondria might contribute to altered energy homeostasis in ALS. In agreement with this hypothesis, we report mitochondrial impairments in skeletal muscle in early presymptomatic SOD1^{G93A} mice, which occur prior to the presentation of motor symptoms. Recently, an association between myopathy and defective mitochondrial function has been described in a different ALS mouse model

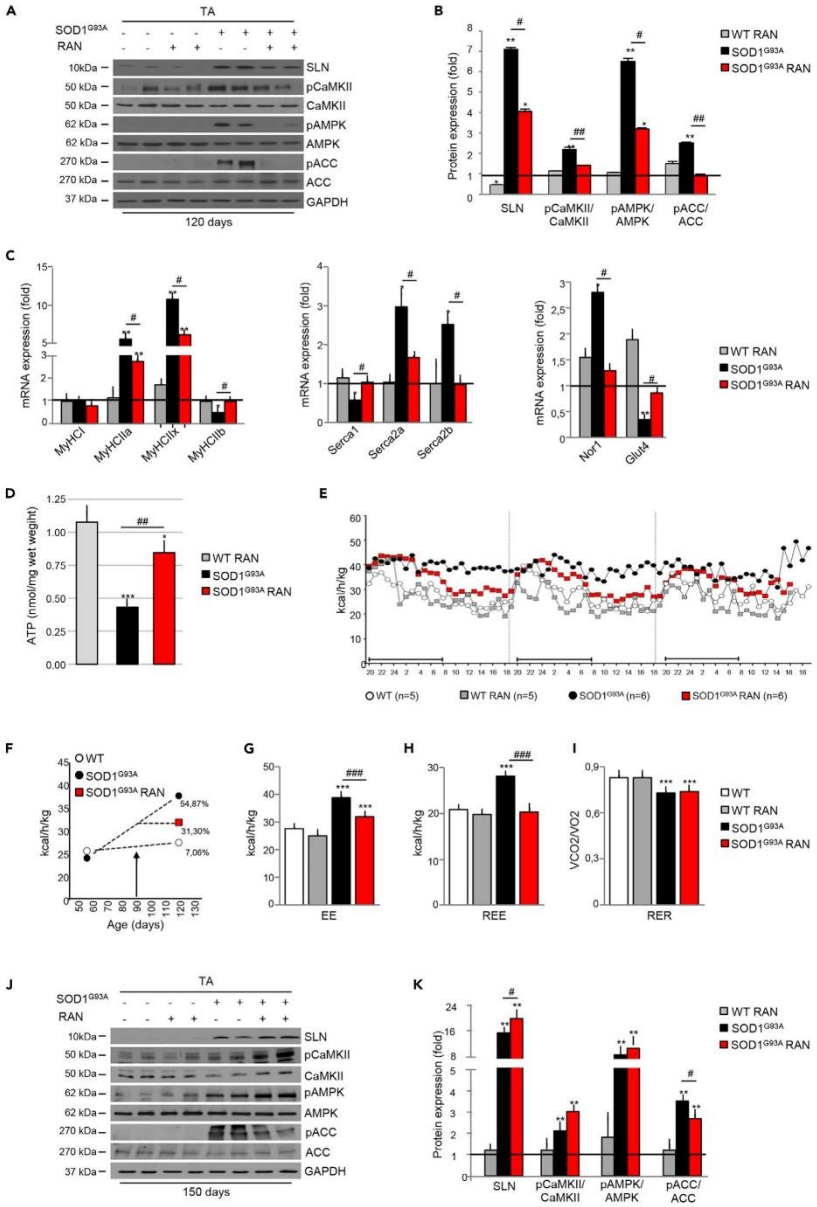

A
TA
SOD1G93A
RAN
10kDa
50 kDa
50 kDa
62 kDa
62 kDa
270 kDa
270 kDa
37 kDa
SLN
pCaMKII
CaMKII
pAMPK
AMPK
pACC
ACC
GAPDH
120 days
B
Protein expression (fold)
SLN
pCaMKII/ CaMKII
pAMPK/ AMPK
pACC/ ACC
WT RAN
SOD1G93A
SOD1G93A RAN
C
mRNA expression (fold)
MyHCI
MyHCIIa
MyHCIIx
MyHCIIb
Serca1
Serca2a
Serca2b
Nor1
Glut4
WT RAN
SOD1G93A
SOD1G93A RAN
D
ATP (nmol/mg wet weight)
WT RAN
SOD1G93A
SOD1G93A RAN
E
kcal/h/kg
WT (n=5)
WT RAN (n=5)
SOD1G93A (n=6)
SOD1G93A RAN (n=6)
F
WT
SOD1G93A
SOD1G93A RAN
54,87%
31,30%
7,06%
kcal/h/kg
Age (days)
G
kcal/h/kg
EE
H
kcal/h/kg
REE
I
VCO2/VO2
RER
WT
WT RAN
SOD1G93A
SOD1G93A RAN
J
TA
SOD1G93A
RAN
10kDa
50 kDa
50 kDa
62 kDa
62 kDa
270 kDa
270 kDa
37 kDa
SLN
pCaMKII
CaMKII
pAMPK
AMPK
pACC
ACC
GAPDH
150 days
K
Protein expression (fold)
SLN
pCaMKII/ CaMKII
pAMPK/ AMPK
pACC/ ACC
WT RAN
SOD1G93A
SOD1G93A RAN

Figure 8. Chronic Ranolazine (RAN) Administration Restores Metabolic Homeostasis

Mid-term evaluation (120 days) of SOD1^{G93A} mice receiving daily RAN (50 mg/kg i.p.) from 90 days of age.

(A) Western blot analysis of SLN, pCaMKII, CaMKII, pAMPK, AMPK, pACC, and ACC in the tibialis anterior (TA) of SOD1^{G93A} mice (+) and wild-type control littermates (−) receiving daily RAN (+) or vehicle (−) at 120 days of age. GAPDH was used as loading control.

(B) Densitometric analysis of data obtained in (A). Data are presented as mean ± SEM, *p < 0.05, **p < 0.001 when compared with wild-type untreated mice (arbitrarily set on at 1) and $^{\#}$p < 0.05 $^{\#\#}$p < 0.001 when compared with SOD1^{G93A} untreated mice (n = 6 independent experiments), parametric one-way ANOVA and a Bonferroni post hoc test.

(C) Expression of mRNAs coding for Nor1, Glut4, Serca1, Serca2a, Serca2b, MyHCI, MyHCIIa, MyHCIIx, MyHCIIb in the TA of SOD1^{G93A} mice and wild-type control littermates treated with RAN (SOD1^{G93A} RAN and WT RAN) or not treated with RAN (SOD1^{G93A} and WT) at 120 days of age (n = 4 for each genotype/treatment). Data are presented as mean ± SEM, **p < 0.001 when compared with wild-type untreated mice (arbitrarily set on at 1) and $^{\#}$p < 0.05 when compared with SOD1^{G93A} untreated mice (n = 6 independent experiments), parametric one-way ANOVA and a Bonferroni post hoc test.

(D) Fluorometric measurement of total ATP in the TA of SOD1^{G93A} mice and wild-type control littermates receiving daily RAN (+) or vehicle (−) at 120 days of age. Data were analyzed by one-way ANOVA with multiple comparisons using Dunnet's t test and Tukey's HSD (Honestly Significantly Different) post hoc test. Data presented as mean ± SEM, ***p < 0.0001 when compared with WT untreated mice and $^{\#\#}$p < 0.001 when compared with SOD1^{G93A} untreated mice (n = 4 independent experiments).

(E) Energy expenditure profile (EE) of WT and SOD1^{G93A} treated with RAN or vehicle at 120 days of age. Black bar indicates the dark cycle period.

(F–H) (F) Percentage of increase in EE between 55 and 120days of age, and effects of RAN treatment (initiation of treatment marked with an arrow) from day 90 onward. Mean of (G) EE and (H) Resting EE (REE) obtained from WT and SOD1^{G93A} mice in (E). Data are presented as mean ± SEM, ***p < 0.0001 when compared with WT mice; $^{\#\#\#}$p < 0.0001 when compared with SOD1^{G93A} mice (at least n = 4 animals), two-way ANOVA with Tukey post hoc test.

(I–K) (I) Respiratory exchange ratio (RER) demonstrating the extent of lipid versus carbohydrate oxidation. Data are presented as mean ± SEM, ***p < 0.0001 when compared with WT mice; (at least n = 4 animals), two-way ANOVA with Tukey post hoc test. Long-term evaluation (150 days) of RAN treatment started at 90 days of age: (J) western blot analysis of SLN, pCaMKII, CaMKII, pAMPK, AMPK, pACC, and ACC in the TA of SOD1^{G93A} (+) and wild-type (−) RAN-treated (+) or untreated (−) mice. GAPDH was used as loading control. (K) Densitometric analysis of data in (I). Data are presented as mean ± SEM, **p < 0.001 when compared with WT untreated mice (arbitrarily set on at 1) and $^{\#}$p < 0.05 when compared with SOD1^{G93A} untreated (n = 6 independent experiments), parametric one-way ANOVA and a Bonferroni post hoc test.

(Genin et al., 2019), thus underlining the importance of muscle bioenergetics in neuron motor disease. In line with premature atrophy and loss of function of fast-twitch fibers (Hegedus et al., 2008; Palamiuc et al., 2015; Peggion et al., 2017), we detected early mitochondrial metabolic alterations in glycolytic EDL, TA, and GNM but not in oxidative *soleus*. Interestingly, skeletal muscle satellite cells isolated from early pre-symptomatic SOD1^{G93A} mice also exhibited defective bioenergetic profiles. The drop in energy production in these skeletal muscle stem cells and their inability to respond to metabolic changes might affect muscle regeneration in response to denervation as previously described in ALS pathology (Tsitkanou et al., 2016; Yin et al., 2013).

We found an early impairment of Complex I activity in skeletal muscle of SOD1^{G93A} mice. An impairment of Complex I activity has previously been described in muscle biopsies from patients with sporadic ALS (Wiedemann et al., 1998). Moreover, functional alterations of the Complex I has been observed in GNM isolated from SOD1^{G93A} mice at 7 weeks of age (Capitanio et al., 2012). Collectively, these observations corroborate the hypothesis that, in patients with ALS (Ghiasi et al., 2012) and in preclinical models (Salvatori et al., 2018; Wang et al., 2016), Complex I activity is a selective target of different ALS-related proteins. Complex I can be considered as an energy-transducing enzyme whose activity regulates cell energy request and activates catabolic pathways following the failure of its activity (Hunter et al., 2018; Leonard et al., 2017). Accordingly, pharmacological inhibition or a failure in Complex I activity triggers the activation of the AMPK (Hu et al., 2017; Hunter et al., 2018). AMPK activation promotes catabolic pathways, such as lipid oxidation in skeletal muscle (Merrill et al., 1997; O'Neill et al., 2013). This known action of AMPK is in line with the increase in lipid oxidation and inhibition of glucose utilization that we observed here in early presymptomatic mice. In the context of ALS, mitochondrial failure could drive an increase in the use of lipids as primary fuel substrate to compensate for energy deficit and a decline in ATP synthesis. Subsequent to this, excess ROS generation as a result of excessive mitochondrial lipid oxidation may further aggravate mitochondrial dysfunction (Quijano et al., 2016; Rosca et al., 2012).

SLN Overexpression

SLN is a micropeptide inhibitor of SERCA activity that uncouples Ca^{2+} transport from ATP hydrolysis (Bal et al., 2012; Smith et al., 2002). Thus, SLN has a critical role in determining metabolic rate, EE, and muscle-derived thermogenesis (Bal et al., 2012; Maurya and Periasamy, 2015; Maurya et al., 2018). Notably, selective SLN overexpression in fast-twitch glycolytic muscle has been shown to reprogram mitochondria and induce an oxidative phenotype (Maurya et al., 2018). The expression of SLN is tightly regulated during development, and in rodents, its expression is detectable in skeletal muscle during late embryonic

development and early neonatal life (Babu et al., 2007). Accordingly, in control mice SLN expression was downregulated in glycolytic muscle by postnatal day 15, whereas its expression was highly upregulated in the same muscle during the entire life course of SOD1^{G93A} mice. More interestingly, we found marked SLN overexpression in muscle biopsies from patients affected by genetic and sporadic forms of ALS. Although SLN has already been viewed as a feasible prognostic or early diagnostic biomarker in ALS, its upregulation has been associated with disease-specific denervation (Calvo et al., 2012) rather than specific metabolic signatures. In contrast to this, our results indicate that SLN is overexpressed before the upregulation of any denervation markers. Although our data do not pinpoint SLN upregulation as being the primary "source" of hypermetabolism in ALS, early mitochondrial failure and energy deficit could underlie SLN overexpression and activate compensatory oxidative metabolism. Indeed, SLN plays a central role in the adaptive mechanisms that couple increased energy request (e.g., diet-induced obesity), cold acclimatization, and exercise with mitochondrial ATP and energy production (Maurya et al., 2018). Thus, the increase of SLN expression in ALS might represent a classical adaptation to increased energy demand, leading to a shift in substrate utilization, mitochondrial biogenesis, and oxidative metabolism in glycolytic muscle.

RAN Treatment

To determine whether decreasing energy demand and re-balancing substrate utilization might be of benefit in ALS, we aimed to assess the potential therapeutic role of RAN, an FDA-approved fatty acid oxidation inhibitor that is used for the management of cardiac dysfunction (Bhandari and Subramanian, 2007; Stanley, 2002). We demonstrate that chronic RAN treatment in SOD1^{G93A} mice significantly improves motor function in SOD1^{G93A} by slowing the decline in muscle strength over a 6-week treatment period. Moreover, during mid-term treatment evaluation (120 days of age), we found that RAN attenuated excessive whole-body EE in SOD1^{G93A} mice, and although it did not offset increased fatty acid β-oxidation, RAN treatment improved energy metabolism by increasing muscle ATP content.

Interestingly, we found that, by the end stage of disease (at 150 days), RAN had lost its efficacy and there was a re-emergence of hypermetabolism. It should be noted that, in patients with stable angina pectoris, the recommended posology includes the escalation of drug dosage during therapy (www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000805/human_med_001009.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). This suggests that the re-emergence of pathology at the end stage of disease in SOD1^{G93A} mice may be attributed to the loss of RAN efficacy rather than disease exacerbation. Of interest, RAN also acts as an inhibitor of late inward sodium currents (INa) during cardiac repolarization (Belardinelli et al., 2013). Hence, we cannot rule out that sodium channel facilitation of membrane repolarization might decrease cell energy demand to compensate for mitochondrial failure in skeletal muscle and neurons of SOD1^{G93A} mice.

Conclusions

Our study provides compelling evidence to demonstrate specific metabolic dysfunction and mitochondrial failure as early pathophysiological events in ALS. Here, we may consider that a slight drop in ATP production via mitochondrial impairment or SLN overexpression may become pathologically relevant when energy demand increases as a result of lifestyle changes or during aging. In this scenario, a timely pharmacological intervention impinging on hypermetabolism may be a promising therapeutic option to improve quality of life.

Limitations of the Study

In this study we use an FDA-approved drug, Ranolazine, to counteract hypermetabolism in an ALS mouse model. In our hands, Ranolazine ameliorates locomotor symptoms of fully symptomatic ALS mice, but its effect is temporary. In this regard, RAN does not improve life span in SOD1^{G93A} mice. Given that we have observed temporary restoration and recovery of metabolic indicators, the loss of effectiveness of Ranolazine requires further investigation through extended pharmacokinetics and pharmacodynamics studies. From our study, we provide proof of concept that hypermetabolism appears to be considered a viable therapeutic target in ALS. As such, alternate drugs that are known to modulate metabolism should also be considered.

METHODS

All methods can be found in the accompanying Transparent Methods supplemental file.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101087.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by AriSLA through HyperALS project (A.F.); AFM-Telethon project n. 2018; AFM-Telethon project n. 21021 (J.P.L. and A.F.); the National Health and Medical Research Council (1101085 and 1185427 to F.J.S. and S.T.N.); Scott Sullivan MND Research Fellowship (Queensland Brain Institute, the Royal Brisbane & Women's Hospital Foundation, The MND and Me Foundation) (S.T.N.); and Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology (S.T.N.).

This work is dedicated to the memory of our dear Mentor and Friend Maria Teresa Carrì.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.S. and I.S. designed and performed experiments. R.C. designed and G.G. performed the indirect calorimetry experiments. E.F., L.M., C.Q., and D.P. performed histological analysis. C.H. performed bioinformatics analyses, M.R. performed experiments on cells. S.R., E.F., and L.M. expanded and completed the study. S.B., N.V., and F.G. provided clinical samples. J.P.L., F.R., F.J.S., R.C., E.F., L.M., and S.T.N. designed the experiments and critically revised the manuscript. A.F. and C.V. designed the study and wrote the paper.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interest.

Received: October 22, 2019
Revised: March 13, 2020
Accepted: April 15, 2020
Published: May 22, 2020

REFERENCES

Anderson, D.M., Makarewich, C.A., Anderson, K.M., Shelton, J.M., Bezprozvannaya, S., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2016). Widespread control of calcium signaling by a family of SERCA-inhibiting micropeptides. Sci. Signal. *9*, ra119.

Babu, G.J., Bhupathy, P., Carnes, C.A., Billman, G.E., and Periasamy, M. (2007). Differential expression of sarcolipin protein during muscle development and cardiac pathophysiology. J. Mol. Cell. Cardiol. *43*, 215–222.

Bal, N.C., Maurya, S.K., Sopariwala, D.H., Sahoo, S.K., Gupta, S.C., Shaikh, S.A., Pant, M., Rowland, L.A., Goonasekera, S.A., Molkentin, J.D., et al. (2012). Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. Nat. Med. *18*, 1575–1579.

Batran, R. Al, Gopal, K., Aburasayn, H., Eshreif, A., Almutairi, M., Greenwell, A.A., Campbell, S.A., Saleme, B., Court, E.A., Eaton, F., et al. (2019). The antianginal ranolazine mitigates obesity-induced nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic pyruvate dehydrogenase activity. JCI Insight *4*, e124643.

Belardinelli, Liu, Smith-Maxwell, Wang, El-Bizri, Hirakawa, Karpinski, Li, Hu, Li, Crumb, Wu, Koltun, Zablocki, Yao, Dhalla, Rajamani, and Shryock. (2013). J. Pharmacol. Exp Ther. https://doi.org/10.1124/jpet.112.198887.

Bhandari, B., and Subramanian, L. (2007). Ranolazine, a partial fatty acid oxidation inhibitor, its potential benefit in angina and other cardiovascular disorders. Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov. *2*, 35–39.

Bouteloup, C., Desport, J.-C., Clavelou, P., Guy, N., Derumeaux-Burel, H., Ferrier, A., and Couratier, P. (2009). Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. J. Neurol. *256*, 1236–1242.

Calvo, A.C., Manzano, R., Atencia-Cibreiro, G., Oliván, S., Muñoz, M.J., Zaragoza, P., Cordero-Vázquez, P., Esteban-Pérez, J., García-Redondo, A., and Osta, R. (2012). Genetic biomarkers for ALS disease in transgenic SOD1(G93A) mice. PLoS One *7*, e32632.

Capitanio, D., Vasso, M., Ratti, A., Grignaschi, G., Volta, M., Moriggi, M., Daleno, C., Bendotti, C., Silani, V., and Gelfi, C. (2012). Molecular signatures of amyotrophic lateral sclerosis disease progression in hind and forelimb muscles of an SOD1G93A mouse model. Antioxid. Redox Signal. *17*, 1333–1350.

Desport, J.-C., Torny, F., Lacoste, M., Preux, P.-M., and Couratier, P. (2005). Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. Neurodegener. Dis. *2*, 202–207.

Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., Bonconpagni, S., Belia, S., Wannenes, F., Nicoletti, C., et al. (2008). Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. Cell Metab. *8*, 425–436.

Dobrowolny, G., Lepore, E., Martini, M., Barberi, L., Nunn, A., Scicchitano, B.M., and Musarò, A. (2018). Metabolic changes associated with muscle expression of SOD1 (G93A). Front. Physiol. *9*, 831.

Doshi, S., Gupta, P., and Kalb, R.G. (2017). Genetic induction of hypometabolism by ablation of MC4R does not suppress ALS-like phenotypes in the G93A mutant SOD1 mouse model. Sci. Rep. *7*, 13150.

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., et al. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis symbol. Neurology *70*, 1004–1009.

Fajardo, V.A., Rietze, B.A., Chambers, P.J., Bellissimo, C., Bombardier, E., Quadrilatero, J., and Tupling, A.R. (2017). Effects of sarcolipin deletion on skeletal muscle adaptive responses to functional overload and unload. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *313*, C154–C161.

Flück, M. (2006). Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. J. Exp. Biol. *209*, 2239–2248.

Funalot, B., Desport, J.-C., Sturtz, F., Camu, W., and Couratier, P. (2009). High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph. Lateral Scler. *10*, 113–117.

Genin, E.C., Madji Hounoum, B., Bannwarth, S., Fragaki, K., Lacas-Gervais, S., Mauri-Crouzet, A., Lespinasse, F., Neveu, J., Ropert, B., Augé, G., et al. (2019). Mitochondrial defect in muscle precedes neuromuscular junction degeneration and motor neuron death in CHCHD10 S59L/+ mouse. Acta Neuropathol. *138*, 123–145.

Ghiasi, P., Hosseinkhani, S., Noori, A., Nafissi, S., and Khajeh, K. (2012). Mitochondrial complex I deficiency and ATP/ADP ratio in lymphocytes of amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurol. Res. *34*, 297–303.

Goode, J.M., Pearen, M.A., Tuong, Z.K., Wang, S.C.M., Oh, T.G., Shao, E.X., and Muscat, G.E.O. (2016). The nuclear receptor, Nor-1, induces the physiological responses associated with exercise. Mol. Endocrinol. *30*, 660–676.

Granata, C., Jamnick, N.A., and Bishop, D.J. (2018). Training-induced changes in mitochondrial content and respiratory function in human skeletal muscle. Sports Med. *48*, 1809–1828.

Hardie, D.G., Schaffer, B.E., and Brunet, A. (2016). AMPK: an energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs. Trends Cell Biol. *26*, 190–201.

Hegedus, J., Putman, C.T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J. Physiol. *586*, 3337–3351.

Hood, D.A. (2009). Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. Appl. Physiol. Nutr. Metab. *34*, 465–472.

Hu, R., Yan, H., Fei, X., Liu, H., and Wu, J. (2017). Modulation of glucose metabolism by a natural compound from Chloranthus japonicus via activation of AMP-activated protein kinase. Sci. Rep. *7*, 778.

Hunter, R.W., Hughey, C.C., Lantier, L., Sundelin, E.I., Peggie, M., Zeqiraj, E., Sicheri, F., Jessen, N., Wasserman, D.H., and Sakamoto, K. (2018). Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase. Nat. Med. *24*, 1395–1406.

Ioannides, Z.A., Ngo, T., and Henderson, D. (2016). Altered metabolic homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms of energy imbalance and contribution to disease progression. Neurodegener. Dis. *16*, 382–397.

Jésus, P., Fayemendy, P., Nicol, M., Lautrette, G., Sourisseau, H., Preux, P.-M., Desport, J.-C., Marin, B., and Couratier, P. (2018). Hypermetabolism is a deleterious prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Eur. J. Neurol. *25*, 97–104.

Kasarskis, E.J., Mendiondo, M.S., Matthews, D.E., Mitsumoto, H., Tandan, R., Simmons, Z., Bromberg, M.B., and Kryscio, R.J. (2014). Estimating daily energy expenditure in individuals with amyotrophic lateral sclerosis. Am. J. Clin. Nutr. *99*, 792–803.

Leonard, S., Tobin, L.M., and Findlay, J.B.C. (2017). The signalling mechanisms of a novel mitochondrial complex I inhibitor prevent lipid accumulation and attenuate TNF-α-induced insulin resistance in vitro. Eur. J. Pharmacol. *800*, 1–8.

Lundsgaard, A.-M., Fritzen, A.M., and Kiens, B. (2018). Molecular regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle during aerobic exercise. Trends Endocrinol. Metab. *29*, 18–30.

Maurya, S.K., and Periasamy, M. (2015). Sarcolipin is a novel regulator of muscle metabolism and obesity. Pharmacol. Res. *102*, 270–275.

Maurya, S.K., Herrera, J.L., Sahoo, S.K., Reis, F.C.G., Vega, R.B., Kelly, D.P., and Periasamy, M. (2018). Sarcolipin signaling promotes mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in skeletal muscle. Cell Rep. *24*, 2919–2931.

McCormack, J.G., Stanley, W.C., and Wolff, A.A. (1998). Ranolazine: a novel metabolic modulator for the treatment of angina. Gen. Pharmacol. *30*, 639–645.

Mejzini, R., Flynn, L.L., Pitout, I.L., Fletcher, S., Wilton, S.D., and Akkari, P.A. (2019). ALS genetics, mechanisms, and therapeutics: where are we now? Front. Neurosci. *13*, 1310.

Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., and Winder, W.W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *273*, E1107–E1112.

Moglia, C., Calvo, A., Grassano, M., Canosa, A., Manera, U., D'ovidio, F., Bombaci, A., Bersano, E., Mazzini, L., Mora, G., et al. (2019). Early weight loss in amyotrophic lateral sclerosis: outcome relevance and clinical correlates in a population-based cohort. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *90*, 666–673.

Ning, Y., Zhen, W., Fu, Z., Jiang, J., Liu, D., Belardinelli, L., and Dhalla, A.K. (2011). Ranolazine increases β-cell survival and improves glucose homeostasis in low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. *337*, 50–58.

O'Neill, H.M., Holloway, G.P., and Steinberg, G.R. (2013). AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity. Mol. Cell. Endocrinol. *366*, 135–151.

Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S.T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A.-L., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J.-P., et al. (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.

Patel, V.D., and Hasumati, R. (2015). Ranolazine: a review on analytical method and its determination in synthetic mixture. Asian J. Pharm. Anal. *5*, 214.

Pearen, M.A., Goode, J.M., Fitzsimmons, R.L., Eriksson, N.A., Thomas, G.P., Cowin, G.J., Mary Wang, S.C., Tuong, Z.K., and Muscat, G.E.O. (2013). Transgenic muscle-specific Nor-1 expression regulates multiple pathways that effect adiposity, metabolism, and endurance. Mol. Endocrinol. *27*, 1897–1917.

Peggion, C., Massimino, M.L., Biancotto, G., Angeletti, R., Reggiani, C., Sorgato, M.C., Bertoli, A., Stella, R., and Stella, R. (2017). Absolute quantification of myosin heavy chain isoforms by selected reaction monitoring can underscore skeletal muscle changes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Anal. Bioanal. Chem. *409*, 2143–2153.

Quijano, C., Trujillo, M., Castro, L., and Trostchansky, A. (2016). Interplay between oxidant species and energy metabolism. Redox Biol. *8*, 28–42.

Rosca, M.G., Vazquez, E.J., Chen, Q., Kerner, J., Kern, T.S., and Hoppel, C.L. (2012). Oxidation of fatty acids is the source of increased mitochondrial reactive oxygen species production in kidney cortical tubules in early diabetes. Diabetes *61*, 2074–2083.

Rossi, S., Serrano, A., Gerbino, V., Giorgi, A., Di Francesco, L., Nencini, M., Bozzo, F., Schininà, M.E., Bagni, C., Cestra, G., et al. (2015). Nuclear accumulation of mRNAs underlies G4C2-repeat-induced translational repression in a cellular model of C9orf72 ALS. J. Cell Sci. *128*, 1787–1799.

Salvatori, I., Valle, C., Ferri, A., and Carrì, M.T. (2017). SIRT3 and mitochondrial metabolism in neurodegenerative diseases. Neurochem. Int. *109*, 184–192.

Salvatori, I., Ferri, A., Scaricamazza, S., Giovannelli, I., Serrano, A., Rossi, S., D'Ambrosi, N., Cozzolino, M., Di Giulio, A., Moreno, S., et al. (2018). Differential toxicity of TAR DNA-binding protein 43 isoforms depends on their submitochondrial localization in neuronal cells. J. Neurochem. *146*, 585–597.

Smith, W.S., Broadbridge, R., East, J.M., and Lee, A.G. (2002). Sarcolipin uncouples hydrolysis of ATP from accumulation of Ca2+ by the Ca2+-ATPase of skeletal-muscle sarcoplasmic reticulum. Biochem. J. *361*, 277–286.

Stanley, W.C. (2002). Partial fatty acid oxidation inhibitors for stable angina. Expert Opin. Investig. Drugs *11*, 615–629.

Steyn, F.J., Ioannides, Z.A., Van Eijk, R.P.A., Heggie, S., Thorpe, K.A., Ceslis, A., Heshmat, S., Henders, A.K., Wray, N.R., Van Den Berg, L.H., et al. (2018). Hypermetabolism in ALS is associated with greater functional decline and shorter survival. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *89*, 1016–1023.

Thomas, H.E., Zhang, Y., Stefely, J.A., Veiga, S.R., Thomas, G., Kozma, S.C., and Mercer, C.A. (2018). Mitochondrial complex I activity is required for maximal autophagy. Cell Rep. *24*, 2404–2417.e8.

Tintignac, L.A., Brenner, H.R., and Rüegg, M.A. (2015). Mechanisms regulating neuromuscular

junction development and function and causes of muscle wasting. Physiol. Rev. *95*, 809–852.

Tsitkanou, S., Gatta, P.A.D., and Russell, A.P. (2016). Skeletal muscle satellite cells, mitochondria, and MicroRNAs: their involvement in the pathogenesis of ALS. Front. Physiol. *7*, 403.

Wang, W., Wang, L., Lu, J., Siedlak, S.L., Fujioka, H., Liang, J., Jiang, S., Ma, X., Jiang, Z., Da Rocha, E.L., et al. (2016). The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. Nat. Med. *22*, 869–878.

Widmann, M., Nieß, A.M., and Munz, B. (2019). Physical exercise and epigenetic modifications in skeletal muscle. Sports Med. *49*, 509–523.

Wiedemann, F.R., Winkler, K., Kuznetsov, A.V., Bartels, C., Vielhaber, S., Feistner, H., and Kunz, W.S. (1998). Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. Sci. *156*, 65–72.

Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. Physiol. Rev. *93*, 23–67.

Zurlo, F., Larson, K., Bogardus, C., and Ravussin, E. (1990). Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. J. Clin. Invest. *86*, 1423–1427.

iScience, Volume *23*

Supplemental Information

Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-SOD1^{G93A} Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target

Silvia Scaricamazza, Illari Salvatori, Giacomo Giacovazzo, Jean Philippe Loeffler, Frederique Renè, Marco Rosina, Cyril Quessada, Daisy Proietti, Constantin Heil, Simona Rossi, Stefania Battistini, Fabio Giannini, Nila Volpi, Frederik J. Steyn, Shyuan T. Ngo, Elisabetta Ferraro, Luca Madaro, Roberto Coccurello, Cristiana Valle, and Alberto Ferri

Figure S1

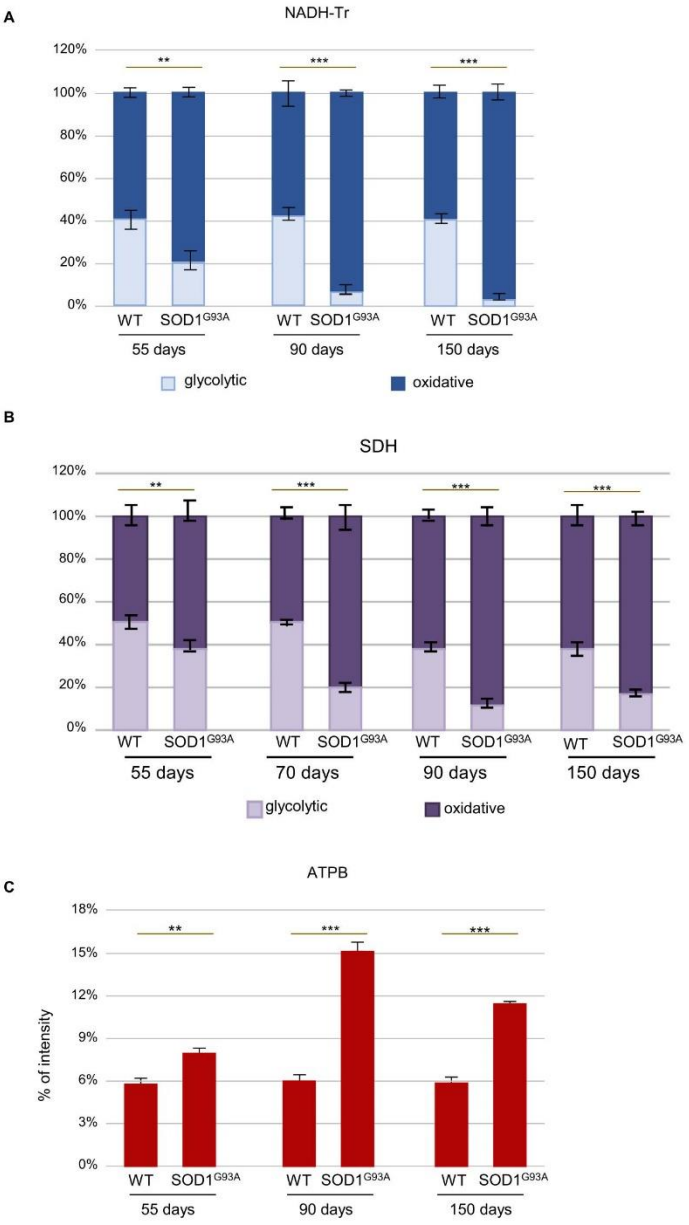


Figure S1. Quantification of muscle oxidative markers, Related to Figure 2. (A-B) Percentages of the dark areas (Blue for NADH-Tr activity and Purple for SDH activity, respectively) measured using ImageJ and normalized against total area. **(C)** Percentages of the red areas (ATBP fluorescent signal) measured using ImageJ and normalized against total area. Calculations were performed on tibialis anterior (TA) cryosections (3 for each mouse) from 3 to 4 different mice at each age. Data presented as means ± SEM, ***P*<0,001, ****P*<0,0001 with respect to wild-type control littermates at the same age, unpaired Student's *t* tes.

Figure S2

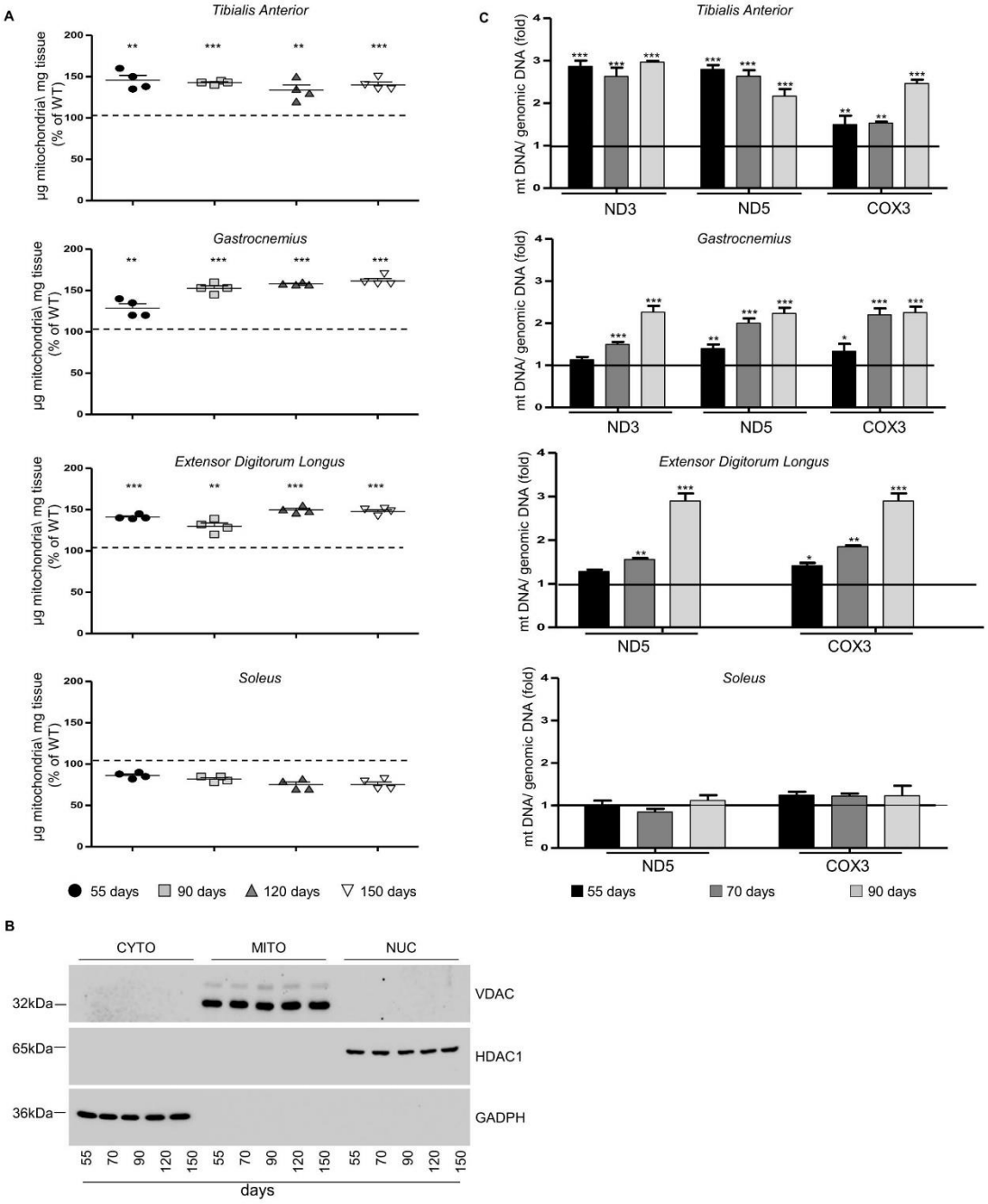


Figure S2. The mass of mitochondria increases during disease course, Related to Figure 2. Mitochondrial amount was determined at 55, 90, 120 and 150 days of age by assessing: **(A)** The ratio between ug of purified mitochondria and mg of tissue used for purification; *tibialis anterior* (TA), *gastrocnemius* (GNM), *extensor digitorum longus* (EDL) and *soleus.* Data are reported as percentage, with 100% being assigned to values obtained from age-matched wild-type control mice (WT), $n = 4$ independent experiments. **(B)** Western blot analysis of cytosolic (CYTO), mitochondrial (MITO) and nuclear (NUC) subcellular fractions obtained from the TA of WT mice from 55 to 150 days of age. Fractions were verified for the presence of specific markers using antibodies against GADPH for the cytosolic fraction, VDAC for the mitochondrial fraction and HDAC1 for the nuclear fraction. A representative immunoblot is shown. **(C)** RT-qPCR quantification of ND3, ND5 and COX3 genes encoded by mitochondrial DNA in the TA, GNM, EDL and soleus muscle. Genomic DNA was used as internal standard and values of age-matched wild-type control mice was arbitrary set at 1. Data are presented as mean ± SEM, *P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001, unpaired Student's t test, n=4 different mice for each age.

Figure S3

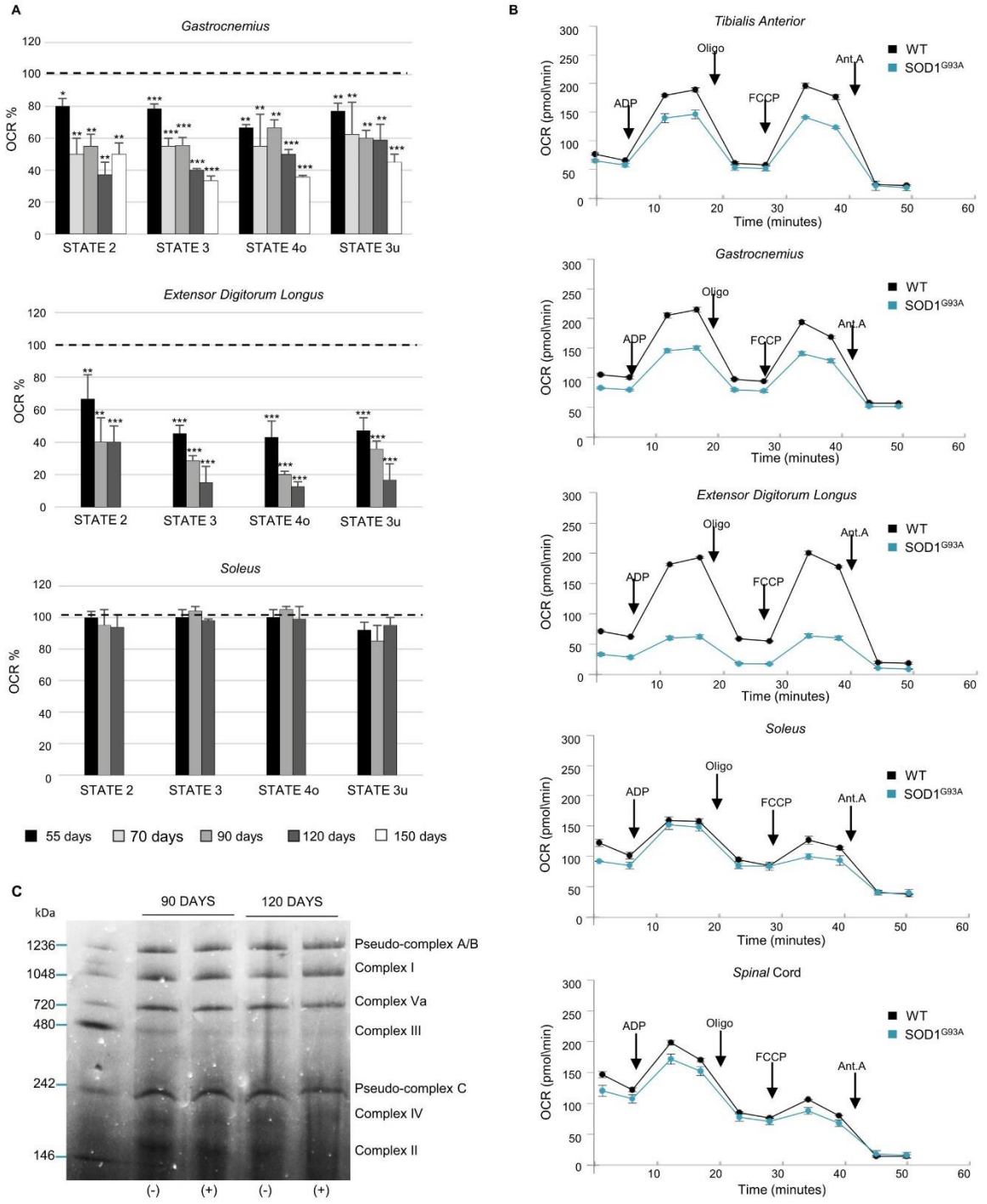


Figure S3. Mitochondrial bioenergetic failure occurs in skeletal muscle of early presymptomatic SOD1 G93A mice, Related to Figure 3. (A) Coupling assay on isolated mitochondria purified from different tissues of SOD1^{G93A} mice at the indicated ages. Mitochondrial respiration stages are reported: basal respiration (State 2), maximally coupled respiration (State 3), respiration due to proton leak (State 4o) and maximal uncoupled respiration (State 3u). Data are expressed as % of Oxygen Consumption Rate (OCR) and 100% was arbitrarily assigned to values obtained from age-matched wild-type mice. *P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001, unpaired Student's t test. **(B)** Representative Coupling Assay profiles performed on mitochondria isolated from the indicated tissues of 55 day old SOD1^{G93A}mice and their wild-type control littermates. The injection of ADP, Oligomycin, FCCP and Antimycin A (Ant. A) are indicated with arrows. **(C)** Blue Native Gel mitochondrial extracts isolated from the TA of WT (-) and SOD1^{G93A} (+) mice at the indicated ages. A representative gel is shown (n=3 experiments).

Figure S4

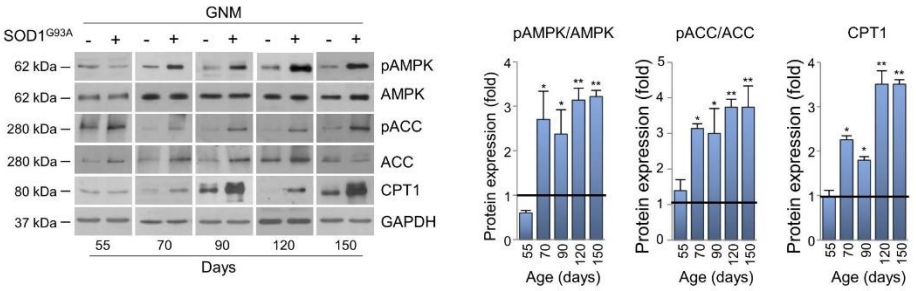


Figure S4. Alterations in metabolic targets occur early in the *gastrocnemius* of SOD1^{G93A} mice, Related to Figure 5. Western blot analysis of pAMPK, AMPK, pACC, ACC and CPT1 in the *gastrocnemius* (GMN) of SOD1^{G93A} (+) and wild type mice (-) from 55 days of age to end-stage (150 days) of disease. GAPDH was used as loading control (left panel). Densitometric analysis of pAMPK/AMPK and pACC/ACC ratios, and CPT1 expression (right panel). Data are presented as mean ± SEM, **P*<0,05, ***P*<0,001 when compared with wild-type mice at the same age (arbitrarily set at 1), *n* = 4 independent experiments, unpaired Student's *t* test.

Figure S5

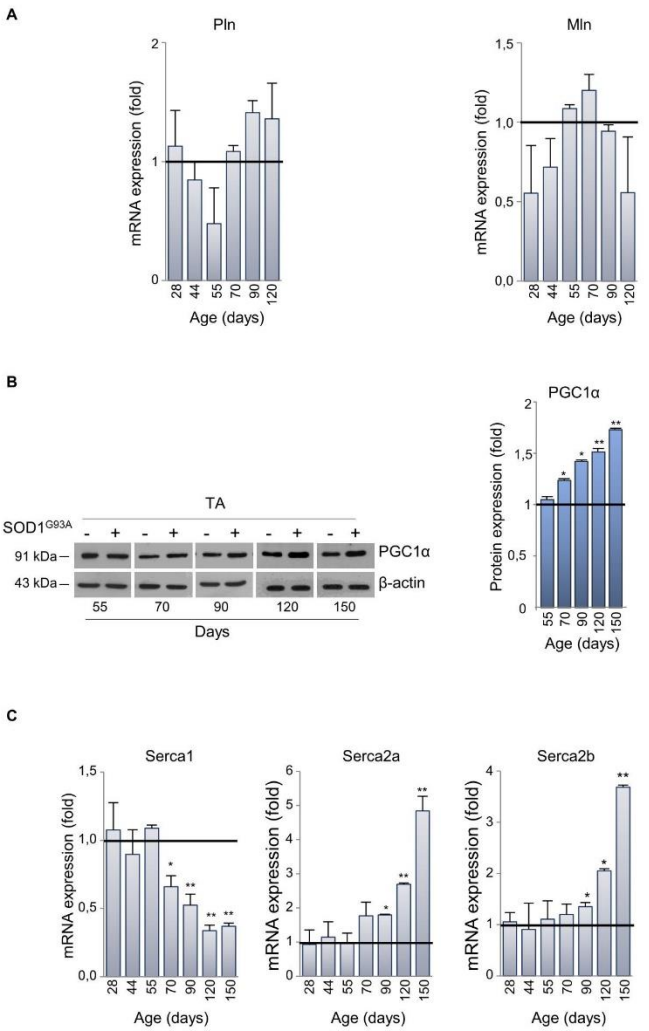


Figure S5. Expression of other SERCA regulating micropeptides, Related to Figure 6. (A) Expression of mRNAs coding for phospholamban (PLN) and myoregulin (MLN) in *tibialis anterior* of SOD1^{G93A} mice. RT-qPCR analysis was performed at different stages of disease in SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates. **(B)** PGC1α expression in skeletal muscle of SOD1^{G93A} mice. PGC1α protein expression in *tibialis anterior* (TA) of SOD1^{G93A} (+) and wild type mice (-) at the indicated ages (left panel). β-Actin was used as loading control. Densitometric analysis of data (right panel), presented as mean ± SEM, **P*<0,05, ***P*<0,001, when compared with wild-type mice at the same age (arbitrarily set ~~on~~ at 1), $n = 4$ independent experiments, unpaired Student's *t* test. **(C)** Expression of mRNAs coding for Serca1, Serca2a, Serca2b in the TA of SOD1^{G93A} mice. RT-qPCR analysis was performed at different stages of disease in SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates (at least n=3 for each stage). Results in **A** and **C** (at least n=3 for each stage) are expressed as the ratio between the average of values from wild-type control and transgenic mice, normalized to the average values of TATA box housekeeping gene. Data are presented as mean ± SEM when compared with control littermates at the same age (arbitrarily set ~~on~~ at 1), unpaired Student's *t* test.

Figure S6

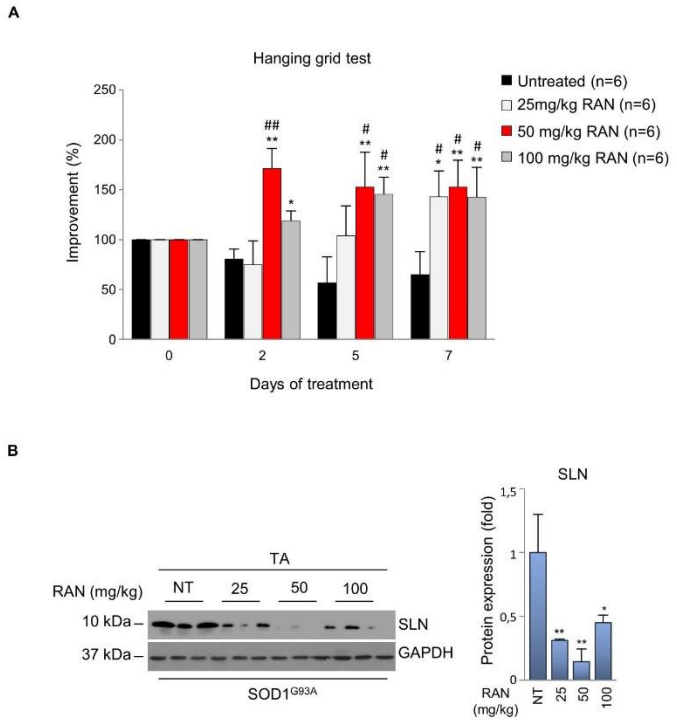


Figure S6. Dose response study of Ranolazine treatment, Related to Figure 7. (A) Locomotor abilities of SOD1^{G93A} mice receiving daily intraperitoneal injection of different doses of Ranolazine (RAN) (25, 50 and 100 mg/kg) or physiological solution (untreated) for seven days (from 110 to 117 days of age) evaluated by hanging grid test at the indicated days. Performance at day 0 of treatment was considered as 100% and performance, at days 2, 5 and 7$_T$ were considered relative to time 0. **P*<0,05, ***P*<0,001 when compared with untreated SOD1^{G93A} and $^{\#}$*P*<0,05, $^{\#\#}$*P*<0,001 when compared with SOD1^{G93A} performance at the beginning of treatment. **(B)** Western blot analysis of Sarcolipin (SLN) in the *tibialis anterior* (TA) of SOD1^{G93A} receiving daily intraperitoneal injection of RAN 25 mg/kg (25), 50 mg/kg (50), 100 mg/kg (100) or physiological solution (NT) for seven days (left panel). GAPDH antibody was used as loading control. Densitometric analysis of data (right panel). **P*<0,05, ***P*<0,001 when compared with untreated mice (arbitrarily set at 1). Data are presented as mean ± SEM of $n = 6$ independent experiments, parametric two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test (A) and one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test (A).

Figure S7

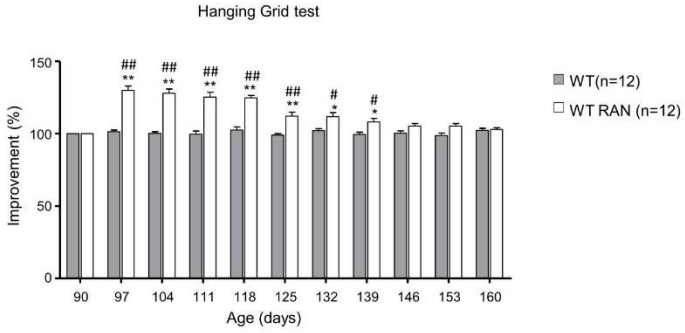


Figure S7. Ranolazine (RAN) treatment effect in wild-type (WT) mice, Related to Figure 7. Locomotor abilities of WT mice receiving daily intraperitoneal injection of Ranolazine 50 mg/kg (WT RAN) or physiological solution (WT) evaluated by hanging grid test at the indicated days. Performance was evaluated from 90 days of age (start of treatment) to an age that equates to the end-stage of disease for $SOD1^{G93A}$ mice. Data are presented as mean ± SEM, $^{*}P<0,05$ $^{**}P<0,001$ when compared with age-matched WT untreated mice and $^{\#}P<0,05$ $^{\#\#}P<0,01$ when compared with WT mice at the beginning of treatment, n=11 WT, n = 11 WT RAN, parametric two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test.

METHODS

Antibodies

The antibodies used in this study were: AMPKα rabbit polyclonal (Cell Signaling, Cat#2532 WB:1:1000), Phospho-AMPKα (Thr172) (40H9) rabbit monoclonal (Cell Signaling, Cat#2535 WB:1:1000), Acetyl-CoA Carboxylase (c83b10) rabbit monoclonal (Cell Signaling, Cat#3676 WB:1:1000), Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) rabbit polyclonal (Cell Signaling, Cat#3661 WB:1:1000), anti-CPT1A (8F6AE9) mouse monoclonal (Abcam 128568 WB:1:1000), anti-Sarcolipin rabbit polyclonal (Millipore Cat#ABT13 WB 1:1000), CaMKIIα (A-1) mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc,. Cat# sc-13141 WB 1:1000), Phospho-CaMKIIα (22B1) mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc., Cat# sc-32289 WB 1:1000), PGC1alpha (H-300) Rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc., Cat# sc-13067 WB 1:1000), anti-Laminin rabbit polyclonal (Cat#L9393, Sigma, IF 1:400), Anti- ATPB (3D5) mouse monoclonal (Abcam Cat#ab14730 IF 1:400), anti-HDAC1 rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc., Cat# sc-7872, RRID:AB_2279709, WB 1 : 1000), anti-VDAC mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc., Cat# sc-8829, RRID:AB_2214801, WB 1 : 5000), anti-GAPDH mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc., Cat# sc-166545, RRID:AB_2107299 WB 1:5000), anti-β-Actin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Cat# sc-47778, WB 1:5000). Anti-rabbit (Cat# 1706515, WB: 1:1000) and anti-mouse (Cat# 1706516, WB: 1:1000) IgG peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA and Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Cat# A11017, 1: 300) anti-rabbit goat antibodies and Cy3 anti-mouse antibody from Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, PA, USA, Cat# 65119, 1: 300).

Animals

All animal procedures were carried out in accordance with the European Guidelines for the use of animals in research (2010/63/EU) and the requirements of Italian laws (D.L. 26/2014). All procedures were approved by the Animal welfare office, Department of Public Health and Veterinary, Nutrition and Food Safety, General Management of Animal Care and Veterinary Drugs of the Italian Ministry of Health (protocol number 931/2017/PR). Animals were kept in a virus/antigen-free facility with a light/dark cycle of 12 h at constant temperature and humidity. Food and water were provided *ad libitum*.

SOD1^{G93A} mice (B6.Cg-Tg(SOD1 G93A)1Gur/J) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred in our animal facility. Transgenic hemizygous SOD1^{G93A} males were crossbred with C57BL/6 females and transgenic progeny were genotyped by PCR. Disease onset was evaluated by hanging grid test; tests were conducted once per week starting at 55 days of age. The final measurement for each mouse was determined by calculating the mean of three different hanging grid test trials on each given day. A performance baseline of 100% was assigned to the first mean performance for each mouse at 55 days of age. Age of symptom onset was classified as being the time at which mouse performance deteriorated by 20% from the baseline. In our animal house, and using this approach, disease onset in male mice was classified as being 91.7 ± 2.9 days, and survival was 168.7 ± 1.9 days.

To follow disease progression, behavioural scores and body weight were monitored starting at 55 days according to Apolloni et al. (Apolloni et al., 2019). In brief, we assigned the following age (in days) to the following disease stages: 55 days as “early presymptomatic”, 70 days as “presymptomatic”, 90 days as “symptoms onset”, 120 days as “symptomatic”, 150 days as “end stage”. Mice were anaesthetized with Rompum (xylazine, 20 mg/ml, 0.5 ml/kg Bayer, Milan, Italy) plus Zoletil (tiletamine and zolazepam, 100 mg/ml, 0.5 ml/kg; Virbac, Milan, Italy), and then sacrificed for tissue dissection.

Energy metabolism by indirect calorimetry

Total Energy Expenditure (EE), Resting Energy Expenditure (REE) and Respiratory Exchange Ratio (RER) were measured using an indirect calorimeter system (TSE PhenoMaster/LabMaster System, Germany) with a constant air flow of 0.35 L/min. Mice were adapted for 12 hours to the metabolic chamber, and parameters were measured at 20 minute intervals for each mouse, starting at 7:00 PM and ending automatically after 48h or 72h (12h dark-light phase comparison). Room temperature was kept constant (22˚±1˚C) and locomotor activity was assessed in parallel to discriminate between EE and REE. REE was analyzed by considering each animal's resting conditions, which was defined as an activity count between 0 and 3. RER was calculated as: RER = volume of CO_2 produced/volume of O_2 consumed (an index of substrate utilization). Mice were assessed under standard nutritional conditions (i.e., standard diet-fed) and food intake was continuously monitored (Giacovazzo et al., 2018).

Glucose tolerance test (GTT)

GTT was performed in SOD1^{G93A} and WT mice at 55 days, 90 days and 120 days of age. Blood glucose was measured in tail tip blood samples using a Multicare Test Strip apparatus (Biochemical Systems International, Italy). Plasma glucose was assessed at 0, 20', 40' and 60 min after i.p. glucose administration (2gr/kg), which was administered following an overnight fast (16h). The area under the curve was calculated using the trapezoidal rule.

RNAseq

Total RNA from the *tibialis anterior* (TA) muscles of 90 day old SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates was extracted using TRI Reagent (Sigma) following the manufacturer's protocol. RNA was shipped to the sequencing IGA of Udine (https://appliedgenomics.org/it/). The libraries for sequencing were prepared using NuGEN Ovation System V2 RNA–Seq. For each biological sample two independent experiments were carried out for the isolation of RNA.

Read quality control was asserted through FastQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), and quality/adapter trimming was carried out using Trim Galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/), which itself is a wrapper for cutadapt. Subsequently, reads were pseudo aligned to transcriptome GRCm38 (mm10) using Kallisto version 0.43.1. Count tables were generated in R using the package tximport together with DESeq2. Differential expression of genes was conducted using DESeq2 with default options. Genes were considered differentially expressed if the adjusted *P*-value was<0.05.

RNA-seq data of this study have been deposited in the Sequence Read Archive (SRA) under the accession code: PRJNA623256 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?acc=PRJNA623256)

Histochemistry and Immunofluorescence

For histochemistry and immunofluorescence analysis, 10 µm muscle cryosections were obtained from SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates at different stages of the disease.

For NADH-tetrazolium reductase activity staining (NADH-TR), muscle cryosections were incubated for 15 min with a solution containing NADH and nitrotetra-zolium blue (# N8129 and #N6876, Sigma-Aldrich) in Tris-HCl (pH 7.4) at 37°C (Madaro et al., 2013). Enzymatic staining for succinate dehydrogenase (SDH) activity was performed according to Molinari et al. (Molinari et al., 2017). Briefly, TA cross-sections were incubated for 20′ at 37 °C in PBS containing 1 mg/ml of nitrotetrazolium blue chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 27 mg/ml of Na-succinate. After staining, sections were fixed with 4% PFA and images from three serial sections per animal were acquired using an Olympus BX53 (Olympus). Images were processed using Image analysis IAS software (Delta Sistemi).

For immunofluorescence, cryosections were fixed in 4% PFA for 10 min, permeabilized with 0.25% Triton for 15 min at room temperature, and blocked for 1 h with a solution containing 4% BSA in PBS. Samples were then incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies followed by Alexa 488- or Cy5- conjugated secondary antibodies. After rinsing in PBS, cryosections were counterstained with 1 μg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) in PBS and visualized with a Zeiss LSM 800 Confocal Laser Scanning Microscope. Fluorescence images were processed using ZEN 2.6 (Blue Edition) (Carl Zeiss, Milan, Italy) and Adobe Photoshop software (Adobe, San Jose, CA, USA). Densitometric analyses were performed using ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2016).

Isolation, quantification and bioenergetic analysis of isolated mitochondria

Mitochondria were isolated from the TA, gastrocnemius (GNM), extensor digitorum longus (EDL), soleus and spinal cord of SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates, at different stages of the disease. According to Salvatori et al., tissues were homogenized in 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EDTA and 10 mM HEPES KOH (pH 7.5) through a Glass/Teflon Potter Elvehjem homogenizer (Salvatori et al., 2017, 2018). The total concentration of mitochondria was determined using a Bradford assay (Bio-Rad, Cat# 5000006) and the obtained quantity was normalized to the weight of the starting material to determine µg of mitochondria per mg of tissue. Tissue mitochondrial content was also assayed by quantitative real-time PCR in which the quantity of mitochondrial DNA / genomic DNA was evaluated (see also below in “DNA-RNA isolation and Real Time PCR”).

Isolated mitochondria were resuspended in a minimum volume of Respiration Buffer (250 mM Sucrose, 15 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 30 mM K_2HPO_4), loaded (4 µg for skeletal muscles and 12 µg for spinal cord) onto a Seahorse XFe96 microplate, and centrifuged for 20 minutes at 2000 x g. After centrifugation 180 µl of Respiration Buffer [containing substrates: pyruvate (5 mM), malate (2.5 mM), glutamate (5 mM)] were added to each well, and the microplate was incubated at 37°C for 8 min to equilibrate the plate temperature. During plate incubation, the XFe96 cartridge was loaded with drugs to a final concentration of: ADP 1 mM, oligomycin 3 µM , FCCP 12 µM and Antimycin A 2 µM. Microplates containing mitochondria were then loaded into Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience-Agilent) and the assay was completed according to the protocol developed by Seahorse Agilent. Coupling assays were performed across 6 technical replicates per plate, for 3 experiments. This assay allows for the assessment of electron transport chain functionality and oxidative phosphorylation flow tracing O_2 Consumption Rates (OCR) in basal conditions (mitochondrial State 2 respiration) and in response to the administration of ADP (maximal coupled respiration, or mitochondrial State 3 respiration), Oligomycin A (respiration due to proton leak, or mitochondrial State 4o

respiration), FCCP (maximal uncoupled respiration, or mitochondrial State 3u respiration) and Antimycin A (inhibition of oxidative respiration).

Blue Native PAGE (BN-PAGE)
BN-PAGE was performed on mitochondria purified from the TA of SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates using a NativePAGE™ Sample Prep Kit (Invitrogen™, Cat # BN2008). Specifically, 20ug of mitochondrial protein was loaded into 4-16% gradient gels (Bio-Rad), electrophoresed at 150 V for 120 minutes, and stained with 10% acetic acid, 25% isopropanol and Coomassie blue G250. The apparent molecular weight was determined using NativeMark™ Unstained Protein Standard molecular weight markers (Invitrogen™, Cat # LC0725).

Total ATP evaluation
Total ATP concentration was measured in the TA of SOD1^{G93A} mice and their wild-type control littermates using an ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision, Inc., Milpitas, CA). Samples were loaded in 96-well microtiter plates and the fluorometric measurement of tissue ATP concentration was determined at Ex / Em = 535/587 nm using a plate reader (Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter Victor3V).

Biochemical assays
The activity of respiratory chain complexes (Complex I, II/III, IV) was evaluated in isolated mitochondria obtained from ALS mice and their wild-type control littermates at different stages of the disease according to Salvatori et al. (Salvatori et al., 2018), with some modifications. Briefly, tissues were sonicated (UP200S Ultrasound Technology, Hielscher, Teltow, Germany, 20% Amplitude, 0.5 cycles for 30 s) and the reduction or oxidation of specific substrates was recorded by spectrophotometric measures. Complex I activity was performed by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm at 30°C in a 1 mL quartz cuvette containing 25 mM potassium phosphate pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 5 mg/mL bovine serum albumin, 1 mg/mL Antimycin A, 65 µM decylubiquinone, 130 µM NADH and 80 µg of total mitochondrial protein. Complex II/III activity was performed by monitoring the reduction of ferricytochrome c at 540 nm in a 1-ml cuvette at 30°C containing 20mM succinate, 0.5 mM EDTA, 2 mM KCN, and 25 µg total mitochondria protein. Complex IV activity was assayed following the oxidation of ferricytochrome c at 540 nm in a 1 ml cuvette at 30°C. Spectrophotometric determination of citrate synthase activity was measured according to Ferri et al. (Ferri et al., 2006) and values were used as standard internal controls.

Bioenergetic analysis of isolated skeletal muscle satellite cells
Skeletal muscle satellite cells were isolated from 55 day old SOD1^{G93A} mice and age-matched wild-type controls through magnetic beads-associated cells sorting according to Reggio et al. (Reggio et al., 2020). Mice were euthanized via cervical dislocation, and hindlimbs were carefully skinned, dissected and placed in HBSS supplemented with 2% BSA and 1% Pen/Strep (SupHBSS). Muscles were dissociated from bones in a sterile hood and minced into small pieces. Minced tissue was separated at 700 x g for 10 min at 4°C and digested with 2 µg/µl collagenase A (Roche), 2.4 U/ml dispase II (Roche), and 10 µg/ml DNase I (Roche) in DPBS w/calcium and magnesium, for 1h under agitation in a water bath at 37°C. Digested tissue was separated at 700 x g for 10 min at 4°C, resuspended in SupHBSS and sequentially filtered through 100 µm, 70 µm and 40 µm nylon cell strainers previously hydrated with SupHBSS. After each filtration step, the cell suspension was separated and resuspended. Red blood cells were lysed with RBC buffer (ChemCruz) between the 70 µm and 40 µm filtration steps by incubating the cell pellet in 1

ml of 1X RBC for 2.5 min on ice, and inactivated with SupHBSS. The final cell suspension was separated and resuspended in magnetic beads buffer (MBB) consisting of DPBS w/o calcium and magnesium supplemented with 0.5% BSA and 2 mM EDTA, and filtered through 30 µm cell strainer. Cell sorting was carried out by incubating the cell pellet with anti-CD45 and anti-CD31 antibody to eliminate immune/hematopoietic and endothelial cells. Incubation with anti-7-integrin antibody yielded the satellite cell fraction. To precipitate contaminating fibroblasts, the 7-integrin positive fraction was pre-plated for 2h in growth medium consisting of DMEM high-glucose Glutamax (Gibco), supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 1% pen/strep, 20% FBS, 10% horse serum, and 2% chicken embryo extract. Unattached cells were recovered and plated for proliferation in CytoGROW medium (Resnova) at a density of 200000 cells/100 mm dish. After 4 days of proliferation, cells were trypsinized and counted for analysis using a Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyser (Seahorse Bioscience-Agilent, USA). Bioenergetic profiles of skeletal muscle satellite cells isolated from $SOD1^{G93A}$ mice and wild-type age-matched controls were performed using a Mito Stress Test Kit (Seahorse Bioscience), following the manufacturer's instructions and according to Salvatori and collaborators (Salvatori et al., 2018).

Human samples and ethics statement

Muscle biopsies from ALS patients were obtained for diagnostic purposes in the Department of Medical, Surgical and Neurological Sciences of the University of Siena, Siena, Italy. All patients signed informed consent to permit the use of their samples for research. Our study complies with the ethical standards established in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

Electrophoresis and western blotting

Protein samples were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Perkin Elmer, Cat# NBA085B). Membranes were blocked for 1 h in Tris-buffered saline solution with 0.1% Tween-20 (TBS-T) containing 5% BSA, and then incubated for 2 h at room temperature or overnight at 4°C with indicated primary antibodies, diluted in TBS-T containing 2% BSA. After rinsing with TBS-T solution, membranes were incubated for 1 h with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody diluted in TBS-T containing 1% BSA, then washed and developed using the enhanced chemiluminescence detection system (Roche Molecular Diagnostics, CA, USA, Cat# n11500694001 or BIO-RAD Clarity™ Western ECL substrate Cat# 170-5061). Densitometric analyses were performed using ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2016). Protein relative expression values were normalized to GAPDH or β-Actin. The apparent molecular weight of proteins was determined by calibrating the blots with pre-stained molecular weight markers (Bio-Rad Laboratories, Cat# 161-0394).

DNA-RNA isolation and Real Time qPCR

Mitochondrial and genomic DNA were isolated according to Miller (Miller, 2003), whereas total RNA was extracted with Trizol and retro-transcribed with a SensiFASTtm cDNA synthesis kit (Bioline Cat# BIO-65054). Mitochondrial DNA content and mRNA expression levels were determined by Real Time qPCR reactions using a Light Cycler 480 SYBR Green System (Roche ETC). Cp values were calculated using the 'second derivative max' algorithm of the Lightcycler software. Relative mitochondrial DNA content was normalized to the genomic genes TNF-alfa and Interleukin 2 (IL2), whereas mRNA relative expression values were normalized to the housekeeping gene TATA box binding protein. Results, where not specifically expressed, were reported as the ratio between the average of

values from wild-type control mice and SOD1^{G93A} mice, normalized to the average values of genomic genes or the housekeeping gene. Primers sequences are listed in Table 3.

Treatment and assessment of motor function

In order to evaluate the best effective dose of drug, 110 day old SOD1^{G93A} transgenic mice and their wild-type control littermates (n=6 for each dose) were treated for seven days with or without Ranolazine (Selleckchem, catalog #S1425) (0 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg) by daily intraperitoneal injection. Motor ability were monitored as described in Ferraro et al., and in detail elaborated here, using the hanging grid test at days 0, 2, 5 and 7 of treatment; the average value from three trials (recorded from each mouse) was averaged to determine the final test score (Ferraro et al., 2016). Improvements in performance was expressed as a percentage of the starting value obtained at day 0, which was designated as 100%. After seven days of treatment, animals were euthanized by cervical dislocation and the TA and GNM muscles were rapidly excised for subsequent analyses.

The selected dose of Ranolazine (50 mg/kg) was then administered to SOD1^{G93A} transgenic mice at the onset of the disease (90 days old) and wild-type age-matched control mice. A control group of SOD1^{G93A} transgenic and wild-type age-matched control mice were treated with physiological solution. Mice were weighed and assessed by the hanging grid test once per week starting at beginning of treatment. The final weekly hanging grid score per mouse per week was determined as above. Groups of 120 day (n=12) and 150 day old mice (n=11/12) were sacrificed for evaluation of mid- and long-term treatment effects respectively. Survival was determined by noting the day at which animals achieved full paralysis of hind limbs and were not able to right within 30 s after being turned on the back. At this stage animals were sacrificed according to guidelines for preclinical testing (Poppe et al., 2014). In order to minimize sex related differences, we used male mice for both pilot and long-term treatments.

HPLC analysis of plasma ranolazine concentration

Plasma (100 ul) obtained from treated and untreated mice was added to 200 ul of acetonitrile, vortexed, and kept on ice for 5 min. The samples were then centrifuged for 10 min at 19000 RCF at room temperature, and the supernatants were subsequently diluted in solvent A (0,3% H_3PO_4) at a 1:1 (v:v) ration. 20 ul of each sample was injected into a HPLC system (series 200, Perkin Elmer) equipped with a Supelcosil LC-318 column (5um particle size, 25 cmx4.6mm). The isocratic HPLC elution mobile phase was composed of solvent A and solvent B (35% acetonitrile, 0,3% H_3PO_4) 10:90 (v:v). The flow rate was 0.8 ml/min and the column was maintained at room temperature. Total run time was 31 min and the retention time of ranolazine was 15.75 min. The UV/Vis detector was set at a wavelength of 223 nm.

Data analysis

Data are presented as mean ± SEM. Data were analysed using Kaplan-Meier, Student's t-test (two group comparison), one-way or two-way ANOVA. Post-hoc analysis was carried out using Bonferroni or Tukey tests. Statistical analysis was carried out using Graphpad Prism 5 software.

REFERENCES

Apolloni, S., Caputi, F., Pignataro, A., Amadio, S., Fabbrizio, P., Ammassari-Teule, M., and Volonté, C. (2019). Histamine Is an Inducer of the Heat Shock Response in SOD1-G93A Models of ALS. Int. J. Mol. Sci. 20.

Ferraro, E., Pin, F., Gorini, S., Pontecorvo, L., Ferri, A., Mollace, V., Costelli, P., and Rosano, G. (2016). Improvement of skeletal muscle performance in ageing by the metabolic modulator Trimetazidine. J. Cachexia. Sarcopenia Muscle 7, 449–457.
Ferri, A., Cozzolino, M., Crosio, C., Nencini, M., Casciati, A., Gralla, E.B., Rotilio, G., Valentine, J.S., and Carri, M.T. (2006). Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 13860–13865.
Giacovazzo, G., Apolloni, S., and Coccurello, R. (2018). Loss of P2X7 receptor function dampens whole body energy expenditure and fatty acid oxidation. Purinergic Signal. 14, 299–305.
Madaro, L., Marrocco, V., Carnio, S., Sandri, M., and Bouché, M. (2013). Intracellular signaling in ER stress-induced autophagy in skeletal muscle cells. FASEB J. 27, 1990–2000.
Miller, F.J. (2003). Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. Nucleic Acids Res. 31, 61e – 61.
Molinari, F., Pin, F., Gorini, S., Chiandotto, S., Pontecorvo, L., Penna, F., Rizzuto, E., Pisu, S., Musarò, A., Costelli, P., et al. (2017). The mitochondrial metabolic reprogramming agent trimetazidine as an 'exercise mimetic' in cachectic C26-bearing mice. J. Cachexia. Sarcopenia Muscle 8, 954–973.
Poppe, L., Rué, L., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2014). Translating biological findings into new treatment strategies for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Exp. Neurol. 262, 138–151.
Reggio, A., Rosina, M., Krahmer, N., Palma, A., Petrilli, L.L., Maiolatesi, G., Massacci, G., Salvatori, I., Valle, C., Testa, S., et al. (2020). Metabolic reprogramming of fibro/adipogenic progenitors facilitates muscle regeneration. Life Sci. Alliance 3.
Salvatori, I., Valle, C., Ferri, A., and Carrì, M.T. (2017). SIRT3 and mitochondrial metabolism in neurodegenerative diseases. Neurochem. Int. 109, 184–192.
Salvatori, I., Ferri, A., Scaricamazza, S., Giovannelli, I., Serrano, A., Rossi, S., D'Ambrosi, N., Cozzolino, M., Giulio, A. Di, Moreno, S., et al. (2018). Differential toxicity of TAR DNA-binding protein 43 isoforms depends on their submitochondrial localization in neuronal cells. J. Neurochem. 146, 585–597.

TABLE S1. Target genes and oligonucleotide sequences, Related to Figure 2, Figure 5, Figure 6, Figure 8, Figure S2, Figure S5.

Target	Forward sequence	Reverse sequence
TNF-alpha	5'-CTGTGAAGGGAATGGGTGTT-3'	3'-CCCAGCATCTTGTGTTTCTG-5'
IL2	5'TAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'	3'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-5'
ND3	5'-CCCTTACGAGTGCGGCTTC-3'	3'-AGTGGCAGGTTAGTTGTTTGTAGG-5'
ND5	5'-AGCATTCGGAAGCATCTTTG-3'	3'-TCGGATGTCTTGTTCGTCTG-5'
COX3	5'-CACTAAATCAAGCCCTACTA-3'	3'-GAAATGGAGAATGATGTTTCA-5'
MyHCI	5'-TGCAGCAGTTCTTCAACCAC-3'	3'-TCGAGGCTTCTGGAAGTTGT-5'
MyHCIIa	5'-AGTCCCAGGTCAACAAGCTG-3'	3'-GCATGACCAAAGGTTTCACA-5'
MyHCIIx/d	5'-AGTCCCAGGTCAACAAGCTG-3'	3'-CACATTTGGCTCATCTCTTGG-5'
MyHCIIb	5'-AGTCCCAGGTCAACAAGCTG-3'	3'-TTTCTCCTGTCACCTCTCAACA-5'
Pgc1α	5'-GTCAACAGCAAAAGCCACAA-3'	3'-TCTGGGGTCAGAGGAAGAGA-5'
Glut-4	5'-GGCATGGGTTTCCAGTATGT-3'	3'-GCCCCTCAGTCATTCTCATG-5'
Nor1	5'-TACGCCACGCAGACTTATGG-3'	3'-TGGTCAGCTTGGTGTAGTCG-5'
Pdk4	5'-AAAGAGGCGGTCAGTAATCC-3'	3'-TCCTTCCACACCTTCACCACA-5'
Serca1	5'-CACCACCAACCAGATGTCAG-3'	3'-TCAAGACCTCTCCCTCAGGA-5'
Serca2a	5'-TCTCCTTGCCTGTGATCCTC-3'	3'-GCACCCGAACACCCTTATATT-5'
Serca2b	5'-AGTTGAGCCAGCAGACATTG-3'	3'-CCAGAGAATCATGCAAAAGACA-5'
Phospholamban (Pln)	5'-CACGTCAGAATCTCCAGAACC-3'	3'-GCTCTTCACAGAAGCATCACA-5'
Myoregulin (Mln)	5'-CAACGTTGCTAGGAGAACAC-3'	3'-GCTCTTGCCACTCATGTTCA-5'

Sarcolipin (Sln)	5’-TGAGGTCCTTGGTAGCCTGA-3’	3’-CACACCAAGGCTTGTCTTCA-5’
AchRα	5’-GGCTTTCACTCTCCGCTGAT-3’	3-’TCAGCGGCGTTATTGGACTC-5’
AchRε	5’-CTCTGCCAGAACCTGGGTG-3’	3’-GACAGTTCCTCTCCAGTGGC-5’
Nav1.5	5’-AGATGTCTCCCCCAGTAACCA-3’	3’-CTTGGGGAGCCTGTCTCTC-5’
Hdac4	5’-TGTACGACGCCAAAGATGAC-3’	3’-CGGTTCAGAAGCTGTTTTCC-5’
Myogenin	5’-TCAGACAGGGTCCATCCCAT-3’	3’-GCTGACTGTGAGCATCCACT-5’
MuRF-1	5’-GACAGTCGCATTTCAAAGCA-3’	3’-AACGACCTCCAGACATGGAC-5’
Myostatin	5’-CTGTAACCTTCCCAGGACCA-3’	3’-TCTTTTGGGTGCGATAATCC-5’
Myoglobin	5’-CTGTTTAAGACTCACCCTGAGAC-3’	5’-GGTGCAACCATGCTTCTTCA-3’
TATA box binding protein	5’-CCAATGACTCCTATGACCCCTA-3’	3’-CAGCCAAGATTCACGGTAGAT-5’

D. Publication 3: Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Functions and Extends Survival in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis

Contribution personnelle :

Pour cette publication, j'ai participé aux expériences des figures supplémentaires S2 et S4 en apportant mon aide technique dans le prélèvement des tissus. J'ai également pu participer aux discussions finales sur la version manuscrite du papier.

frontiers in Pharmacology

BRIEF RESEARCH REPORT
published: 07 August 2019
doi: 10.3389/fphar.2019.00883

Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Functions and Extends Survival in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis

Alexandra Bouscary[1,2], Cyril Quessada[1,2], Althéa Mosbach[1,2], Noëlle Callizot[3], Michael Spedding[4], Jean-Philippe Loeffler[1,2]* and Alexandre Henriques[1,2,4]†*

[1] Université de Strasbourg, UMR_S 1118, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France, [2] INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Strasbourg, France, [3] Neuro-sys SAS, Gardanne, France, [4] Spedding Research Solutions SAS, Le Vesinet, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Mario Eduardo Guido, Center for Research in Biological Chemistry Córdoba (CIQUIBIC), Argentina

Reviewed by:
Alberto Ferri, Institute of Traslational Pharmacology (CNR), Italy
Mariano Soiza-Reilly, CONICET Instituto de Fisiología, Argentina

***Correspondence:**
Michael Spedding
michael@speddingresearchsolutions.fr
Jean-Philippe Loeffler
loeffler@unistra.fr
Alexandre Henriques
alexandre.henriques@neuro-sys.com

†Present address:
Alexandre Henriques
Neuro-sys SAS, Gardanne, France

Specialty section:
This article was submitted to Neuropharmacology, a section of the journal Frontiers in Pharmacology

Received: *21 February 2019*
Accepted: *15 July 2019*
Published: *07 August 2019*

Citation:
Bouscary A, Quessada C, Mosbach A, Callizot N, Spedding M, Loeffler J-P and Henriques A (2019) Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Functions and Extends Survival in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. Front. Pharmacol. 10:883. doi: 10.3389/fphar.2019.00883

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a multifactorial and fatal neurodegenerative disease. Growing evidence connects sphingolipid metabolism to the pathophysiology of ALS. In particular, levels of ceramides, glucosylceramides, and gangliosides are dysregulated in the central nervous system and at the neuromuscular junctions of both animal models and patients. Glucosylceramide is the main precursor of complex glycosphingolipids that is degraded by lysosomal (GBA1) or non-lysosomal (GBA2) glucocerebrosidase. Here, we report that GBA2, but not GBA1, activity is markedly increased in the spinal cord, of SOD1^{G86R} mice, an animal model of familial ALS, even before disease onset. We therefore investigated the effects of ambroxol hydrochloride, a known GBA2 inhibitor, in SOD1^{G86R} mice. A presymptomatic administration of ambroxol hydrochloride, in the drinking water, delayed disease onset, protecting neuromuscular junctions, and the number of functional spinal motor neurons. When administered at disease onset, ambroxol hydrochloride delayed motor function decline, protected neuromuscular junctions, and extended overall survival of the SOD1^{G86R} mice. In addition, ambroxol hydrochloride improved motor recovery and muscle re-innervation after transient sciatic nerve injury in non-transgenic mice and promoted axonal elongation in an *in vitro* model of motor unit. Our study suggests that ambroxol hydrochloride promotes and protects motor units and improves axonal plasticity, and that this generic compound is a promising drug candidate for ALS.

Keywords: ambroxol, GBA2, glucocerebrosidase, ALS, neuromuscular junction, glucosylceramide

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by a loss of cortical motor neurons in the motor cortex and spinal motor neurons located in the brainstem and in the spinal cord with denervation. Considered to be the most common motor neuron disease in adults, ALS leads to progressive paralysis, muscle atrophy, fasciculation, and spasticity and affects the central nervous system and peripheral organs (Schmitt et al., 2014). ALS is associated with sporadic forms (90%) and familial form (10%). Mutations on genes encoding superoxide dismutase 1 (SOD1), TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) and fused in sarcoma (FUS), and repeat expansions in chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72) (Lattante et al., 2015) are now documented. It is

reported that lipid metabolism in ALS patient has a major impact on the disease severity. A high incidence of dyslipidemia and hypermetabolism is present in ALS patients (Desport et al., 2001; Funalot et al., 2009) and hypermetabolism and high low-density lipoprotein (LDL)/high-density lipoprotein (HDL) ratios or high body mass index are associated with better prognosis and slower disease progression (Dupuis et al., 2008; Paganoni et al., 2011; Jésus et al., 2018). The causes of the metabolic dysfunctions in ALS remain unknown and could result from central pathologies combined with peripheral alterations.

Metabolomic studies have now shown that recent human evolution has marked changes in lipid metabolism in muscle and brain to support increased metabolic activity (Noakes and Spedding, 2012; Bozek et al., 2014). Beyond their role in energy metabolism, lipids and particularly sphingolipids are modulators of cellular signaling pathways and participate in the maintenance and repair of the various components of the motor axis such as neurons and muscles. Our transcriptomic studies on muscle biopsies in ALS patients showed a significant increase in the expression of the UGCG gene (UDP-glucose ceramide glucosyltransferase), encoding the sphingolipid metabolism enzyme that synthesizes glucosylceramide (GlcCer) (Henriques et al., 2015; Dodge, 2017; Henriques et al., 2017). It has been shown in ALS that GlcCer and ceramide levels are deregulated (Cutler et al., 2002; Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2015; Henriques et al., 2018). These data suggest that GlcCer plays a key role in the pathophysiology of ALS. We performed a lipidomic analysis of different tissues of SOD1^{G86R} mice, an animal model of ALS, and we observed a complete rearrangement of the main lipid classes, including sphingolipids like GlcCer and ceramides in the muscles and spinal cords of SOD1^{G86R} mice, before the onset of the disease. Inhibition of GlcCer synthesis by administration of a UGCG inhibitor (AMP-DMN) significantly delays functional recovery after sciatic nerve injury (Henriques et al., 2015; Henriques et al., 2018). GlcCer is the precursor of gangliosides, and this hydrolysis is performed by GBA1 and GBA2, two beta-glucocerebrosidases (GCases).

Our previous results have shown a beneficial effect for SOD1^{G86R} mice after inhibition of GlcCer degradation (Henriques et al., 2017). Partial inhibition of GlcCer degradation with a low dose of conduritol B epoxide (CBE) (10 mg/kg/d) delays disease onset and improves motor functions in presymptomatic and in symptomatic SOD1^{G86R} mice. Pharmacological inhibition of GCase by CBE preserves motor neuron number and the neuromuscular junctions (NMJs) in SOD1^{G86R} mice. Furthermore, CBE promotes recovery after sciatic nerve injury *in vivo* (Henriques et al., 2017). Conversely, a high dose CBE (100 mg/kg/d) induced neuronal toxicity and can be used to inhibit the lysosomal GCase to induce a chemical model of Gaucher's diseases (Kanfer et al., 1975; Vardi et al., 2016). Indeed, CBE is an inhibitor of lysosomal GCase (GBA1) and, less potently, of the non-lysosomal GCase (GBA2) (Ridley et al., 2013). Moreover, loss-of-function mutations of GBA1 are a major cause of hereditary Parkinson's Disease (PD), while the activation of beta-GCase increases alpha-synuclein clearance and lysosomal function in dopaminergic neurons (Schapira, 2015; Mazzulli et al., 2016; Stojkovska et al., 2018); thus, there may be a risk of PD with GBA1 inhibitors.

GBA2 is localized at the plasma membrane and as a membrane-associated protein at the Golgi apparatus and at the endoplasmic reticulum (Woeste and Wachten, 2017). Loss of function of GBA2 is associated with hereditary spastic paraplegia suggesting that the regulation of GlcCer at the plasma membrane and/or at intracellular organelles is important for the maintenance of motor functions, even if the role of GBA2 in the central nervous system remains poorly understood.

Our approach was therefore to inhibit the non-lysosomal GBA2 without inhibiting GBA1. Among the safe molecules able to cross the blood–brain barrier (BBB), ambroxol hydrochloride (AMB) has been extensively studied (Albin and Dauer, 2014; McNeill et al., 2014; Ambrosi et al., 2015; Migdalska-Richards et al., 2016b; Migdalska-Richards et al., 2017; O'Regan et al., 2017). In our study, we confirmed that AMB inhibited GBA2 activity. We have then investigated the effects of AMB *in vivo*, in a transgenic model of ALS and on non-transgenic mice to determine whether it could improve the lifespan of SOD1^{G86R} mice and stimulate the plasticity of the neuromuscular junctions (NMJs).

RESULTS

GBA2 Activity Is Increased in Pre-Symptomatic SOD1^{G86R} Mice

GlcCer is a precursor of complex glycosphingolipids. It is synthetized from ceramide by the GlcCer synthase and degraded by GBA1 or GBA2, two GCases. We previously reported that inhibition of GCase activity by a low dose of CBE is neuroprotective in the SOD1^{G86R} mice (Henriques et al., 2017). CBE has inhibitory activities on lysosomal and GBA2 activity (Ridley et al., 2013).

Here, we sought to measure GCase activities at specific pH, and in presence or absence of detergent, to determine whether GBA1 (pH = 4.6, with detergent) and GBA2 (pH = 5.8, no detergent) activities are dysregulated in tissues of SOD1^{G86R} mice (Witte et al., 2010). At a symptomatic disease stage, characterized by moderate motor dysfunctions, GBA1 activity was not significantly altered in SOD1^{G86R} when compared to control non-transgenic mice (**Figure 1A**). However, GBA2 activity was strongly increased in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice at 105d (symptomatic) but not in muscle or in liver. This increase in GBA2 activity was also observed in presymptomatic SOD1^{G86R} mice (**Supplementary Figure 1A**). The GBA1 activity was not changed at either time point. GBA1 and GBA2 share common enzymatic activity but differ in structure, thus allowing the use of specific inhibitors. The effects of AMB on GCase activities *in vitro* have been compared to those of CBE. As previously reported (Ridley et al., 2013), CBE had a strong inhibitory effect on the GBA1 activity being 10-fold less potent on GBA2 activity (**Figure 1B**). AMB has been reported to inhibit the GBA2 activity (Maegawa et al., 2009), which was confirmed in a dose-dependent manner (**Figure 1C**). Taken together, these results show that GBA2 activity is increased in SOD1^{G86R} mice, already

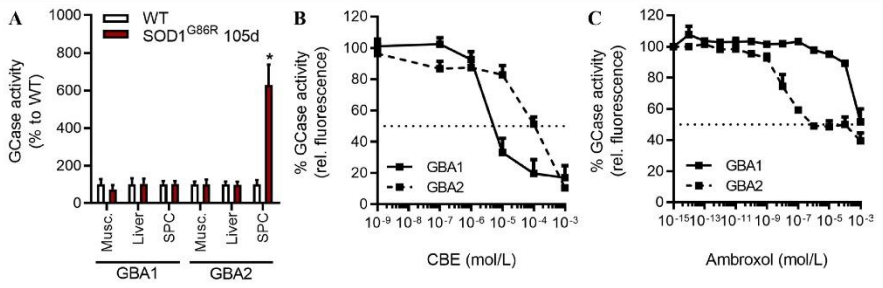


FIGURE 1 | GCase activities in symptomatic SOD1^{G86R} mice. **(A)** GCase activity in different tissues of SOD1^{G86R} and wild type (WT) mice at 105d (n = 5–9/tissues, *$p < 0.05$). **(B)** GCase [glucocerebrosidase (GBA)] activity after conduritol B epoxide (CBE) dose-response (n = 6/group). **(C)** GCase (GBA) activity after ambroxol hydrochloride (AMB) dose-response in liver tissue (n = 4/group).

at pre-symptomatic disease stage, and that AMB can inhibit its activity.

Ambroxol Hydrochloride Delays Disease Onset, Preserve the Integrity of Motor Units, and Increases Survival of SOD1^{G86R} Mice

AMB was administrated to presymptomatic SOD1^{G86R} mice, to determine whether it could influence disease onset and loss of motor functions in a preventive manner. Grip strength was used as an indicator of muscle strength. SOD1^{G86R} mice were treated from 75 days to 95 days of age, and body mass and muscle strength were evaluated every other day (**Figure 2**). In the first cohort of presymptomatic SOD1^{G86R} mice, AMB had no significant effects on the body mass of treated mice (**Figure 2A**); however, it strongly improved the muscle strength of SOD1^{G86R} mice and significantly delayed of disease onset, defined as a drop of more than 20% of the mouse maximal strength (**Figure 2B**). These results were replicated in a separate cohort of SOD1^{G86R} mice, using the same experimental conditions (**Supplementary Figure 2**). Indeed, an improved muscle strength and a delayed disease onset were observed after AMB administration in the second cohort.

At 95 days of age, neurodegeneration of motor neurons is detected in the lumbar region of the spinal cord of SOD1^{G86R} mice (Henriques et al., 2017). As compared to the WT mice, 40% of motor neurons (MNs) are lost at this time point. The number of MNs in the lumbar region of the spinal cord was significantly higher in SOD1^{G86R} mice treated with AMB (**Figures 2C, D**), suggesting that presymptomatic administration of AMB delays neurodegeneration. In order to determine whether the spared MNs have axonal projection to hind limb muscles, fluorogold, a retrograde tracer, has been injected in gastrocnemius and tibialis anterior muscles. SOD1^{G86R} mice treated with AMB had more MNs-positive for fluorogold (**Figures 2E, F**).

Muscle strength is dependent on the innervation status of muscles. The integrity of NMJs was assessed by immunohistochemistry with the overlapping of post-synaptic cluster of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) and the axonal markers neurofilament and synaptophysin. AMB has significantly protected muscle innervation in SOD1^{G86R} mice, as they had almost two times more NMJs than the vehicle group, at 95 days of age (**Figure 2G, H**). These results suggest that presymptomatic administration of AMB delays disease onset by improving the integrity of the motor units.

Next, we sought to determine whether a later administration of AMB, at disease onset, could slow down disease progression and improve survival of SOD1^{G86R} mice. AMB was administrated to SOD1^{G86R} mice and wild-type littermates, starting at 95 days of age. From 95 days of age, motor symptoms progress rapidly in SOD1^{G86R} mice, and they reach disease end stage around 110 days of age. Body mass, muscle strength, and overall survival were monitored to follow the progression of ALS symptoms (**Figure 3**). After administration of AMB, the decline in body mass was limited, and SOD1^{G86R} mice were heavier, although this effect was transient (**Figure 3A**). A clear improvement of muscle strength was observed, starting from day 101, in SOD1^{G86R} mice treated with AMB when compared to the SOD1^{G86R} vehicle group (**Figure 3B**). Most importantly, survival of SOD1^{G86R} mice was significantly increased by 6 days after administration of AMB (**Figure 3C**).

Altogether, these results show that AMB delays disease progression when the treatment is initiated at disease onset.

Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Recovery After Sciatic Nerve Injury in Non-Transgenic Mice

We have previously demonstrated that partial inhibition of GCase activity with CBE improves axonal elongation *in vitro* and *in vivo* recoveries after sciatic nerve injury (Henriques et al., 2017).

We hypothesized that AMB could exert similar pro-regenerative effects. First, we investigated whether AMB could enhance axonal elongation and the formation of NMJs, in an *in vitro* model of motor units, based on a co-culture of myoblasts and spinal cord explants (Combes et al., 2015). This *in vitro* model allows the maturation of axons and the formation of NMJs, as

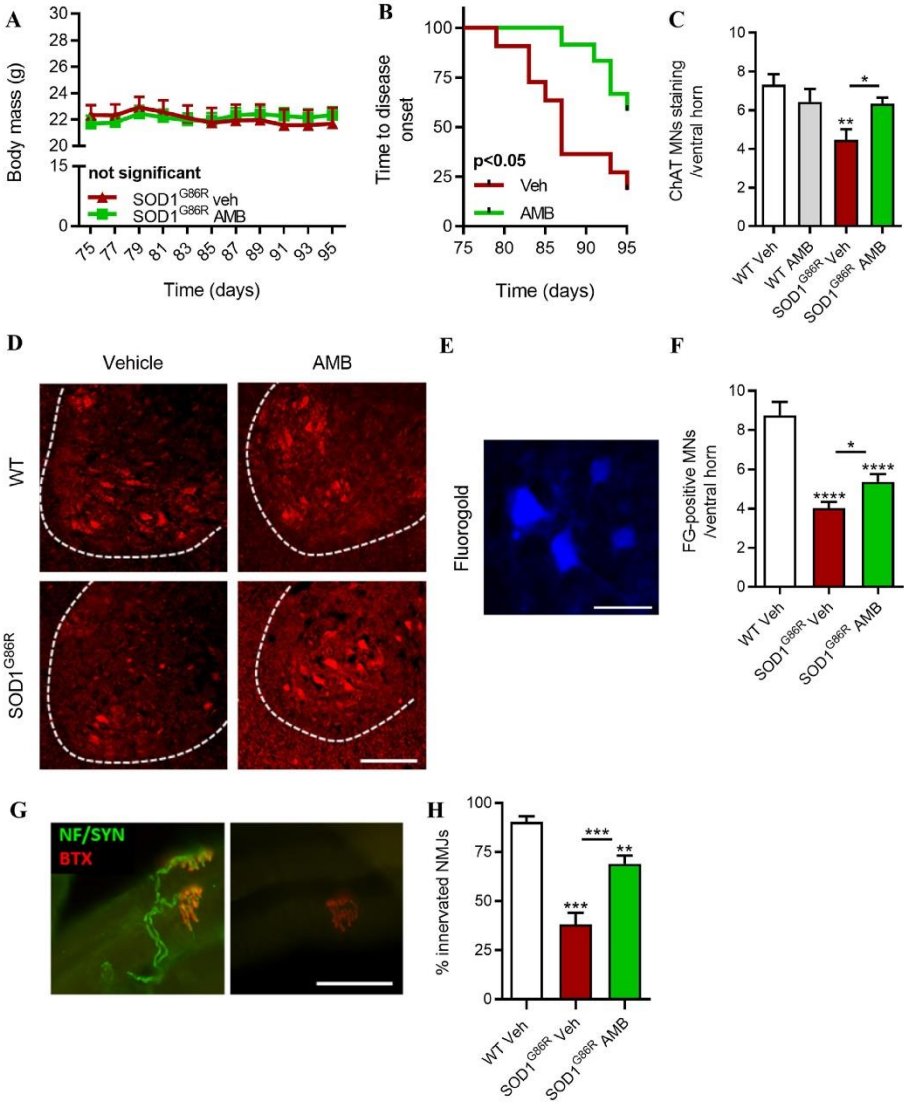


FIGURE 2 | AMB improves motor functions and preserves neuromuscular junction and the functional motor neurons (MNs) in pre-symptomatic SOD1^{G86R} mice. **(A)** Body mass evolution in SOD1^{G86R} mice after AMB treatment (not significant, n = 11–12/group). **(B)** Kaplan–Meier showing time to onset of muscle strength loss in SOD1^{G86R} mice ($p < 0.05$, n = 11–12/group). **(C)** Quantification of choline acetyl transferase (ChAT)-positive cells located in the ventral horn of the spinal cord and having a size bigger than 400 µm² (n = 5/group). **(D)** Representative pictures of the ventral horn of the L1–L3 lumbar area, after immunostaining with ChAT (red), a marker specific for spinal motor neurons. Ventral horns are delimited by dashed lines. Scale bar = 100 µm. **(E)** Representative picture of retrogradely labeled spinal MNs after fluorogold (FG) injection in hindlimb muscles. Scale bar = 50 µm. **(F)** Quantification of FG-positive MNs in ventral horn of the spinal cord (n = 10/group, $^{*}p < 0.05$; $^{****}p < 0.00001$, one-way ANOVA test). **(G)** Representative pictures of innervated (left panel) and denervated (right panel) of neuromuscular junctions in SOD1^{G86R} mice (bungarotoxin, BTX, red; neurofilament and synaptophysin, green). Scale bar = 50 µm. **(H)** Neuromuscular junctions (NMJ) integrity in tibialis anterior muscle ($^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$).

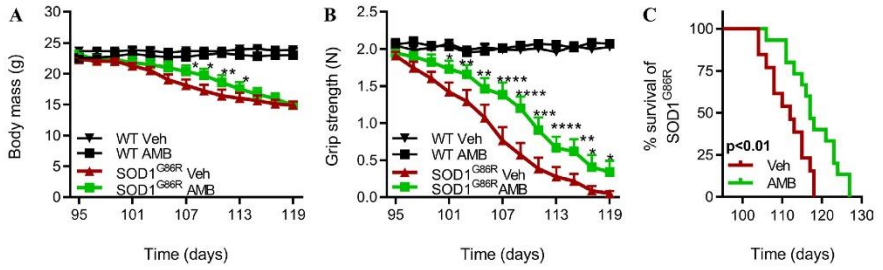


FIGURE 3 | AMB delays disease onset and improves motor functions in symptomatic SOD1^{G86R} mice. **(A)** Body mass evolution in SOD1^{G86R} and WT mice (n = 12–15/group). **(B)** Muscle strength evolution in SOD1^{G86R} and WT (n = 12–15/group). **(C)** Kaplan–Meier analysis of SOD1^{G86R} mice survival (n = 13–15/group, $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; $^{****}p < 0.0001$).

observed by muscle contraction triggered by the application of acetylcholine. The presence of NMJs was confirmed by the colocalization of the axonal neurofilament and the presence of post-synaptic nicotinic acetylcholine receptors (**Figure 4A**, **Supplementary Figure 3**).

The neurite network was significantly longer in presence of the highest dose of AMB (100 μM) (**Figure 4B**). This effect corresponds to a +45% increase when compared to the vehicle group. Lower doses of AMB did not promote neurite elongation.

AMB was able to significantly increase the number of *in vitro* NMJs, determined by the number clusterized nAChRs, in a linear dose-dependent manner, at doses ranging from 10 to 100 μM. The effect of AMB was therefore stronger on the formation of NMJs than on the elongation of axons, in this model (**Figure 4C**).

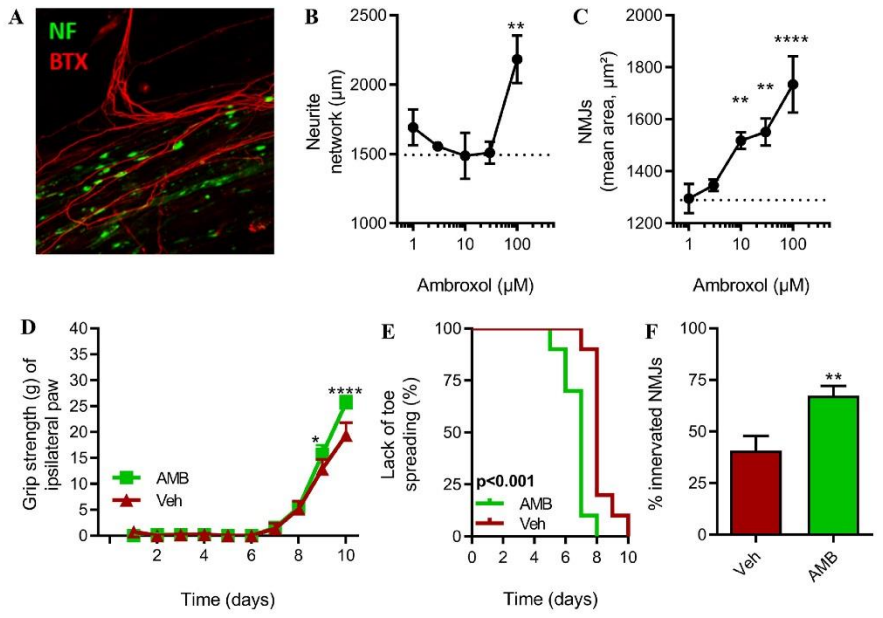


FIGURE 4 | Inhibition of GlcCer degradation by AMB improves *in vivo* axonal plasticity and nerve regeneration after sciatic nerve crush study in non-transgenic mice. **(A)** Representative picture of *in vitro* neuromuscular junctions (NMJs). **(B)** Total length of neurofilament-positive neurites and **(C)** total area NMJs (n = 5/group). **(D)** Muscle strength of ipsilateral hind paws (n = 10/group, $^{*}p < 0.05$; $^{****}p < 0.0001$). **(E)** Kaplan–Meier showing time to observable toe spreading after sciatic nerve injury (n = 10/group, $p < 0.001$). **(F)** NMJ integrity in tibialis anterior muscle (n = 10/group, $^{**}p < 0.01$).

To further evaluate the pro-regenerative effect of AMB on the motor units, we have subjected non-transgenic mice to peripheral nerve injury, to follow-up functional recovery, such as muscle strength and toe spreading, and the number of functional NMJs after treatment with AMB. Upon treatment, mice recovered significantly faster when compared to the control group. Indeed, on days 9 and 10, muscle strength of the injured hindlimb was statistically higher after application of AMB (**Figure 4D**). In a second and independent cohort, we have confirmed the beneficial effect of AMB (3 mM) on functional recovery after sciatic injury. The regenerative effect of AMB was also observed at a dose of 1 mM in this model (**Supplementary Figure 4**). Spontaneous toe spreading is lost after hindlimb muscle denervation. The recovery of toe spreading is a proxy for early sign of reinnervation and was monitored every day. AMB caused a modest but significant effect, as the mice recovered between 1 to 2 days earlier as compared to the control group (**Figure 4E**). Most importantly, 10 days after injury, the number of innervated neuromuscular junctions was 70% greater after application of AMB, suggesting that AMB promotes the formation of new NMJs, which may strongly participate in the pro-regenerative effect of this compound (**Figure 4F**).

DISCUSSION

Glycosphingolipids and Motor Axis

Dysregulation of GlcCer and other glycosphingolipids (e.g., GM1a) was previously reported by us and others in ALS patients and in animal models (Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2015; Dodge, 2017; Henriques et al., 2017; Henriques et al., 2018).

GlcCer is degraded by GBA1 or GBA2 beta-GCases. Growing evidence suggests a tight connection between GBA2 activity and motor functions, as full loss of function of GBA2 is a cause of hereditary spastic paraplegia type 46 (SPG46) (Woeste and Wachten, 2017; Woeste et al., 2019). Conversely, pharmacological inhibition of GBA2 activity has been shown to improve the motor phenotype (e.g., motor coordination) of an animal model of Niemann's Pick disease (Marques et al., 2015). Moreover, GM1a, a downstream metabolite of GlcCer, is detected on the cell surface of motor axons and at nerve endings in NMJs. The presence of anti-GM1 autoantibodies has been associated with multifocal motor neuropathy and the acute motor axonal form of Guillain-Barré, suggesting a key role for glycosphingolipids in the maintenance of motor axons and possibly NMJs.

We have shown that inhibition of GCase by CBE causes a concentration-dependent increase in GlcCer, and in the downstream glycosphingolipid GM1a, which was associated with pro-survival and pro-regenerative effects. Treatment with CBE fully prevented loss of GM1a/CTB staining at NMJs in tibialis anterior muscle of SOD1^{G86R} mice, associated with delayed loss in grip strength (Henriques et al., 2017). Interestingly, the inhibition of GlcCer synthase (GCS) accelerates functional decline. Inhibition of GCS also delays the recovery to spinal crush in non-transgenic mice. Thus, a coherent picture emerges in ALS where inhibiting GCase activity and increasing the pool of glycosphingolipids, presumably at the NMJs, are beneficial.

Ambroxol Improved Motor Function in SOD1^{G86R} Mice

Our results showed that GBA2 activity is increased in the spinal cord of SOD1^{G86R} mice, even at the presymptomatic disease stage, which could impair the metabolism of glycosphingolipids and later contribute to the development of motor dysfunctions. Here, we propose ambroxol as a drug candidate for ALS. Ambroxol is known to inhibit of GBA2 activity, mainly catalyzed by GBA2. By inhibiting GBA2, we aimed to prevent the hydrolysis of GlcCer located outside the lysosome, mainly at the plasma membrane, the endoplasmic reticulum, and/or at the Golgi apparatus (Maegawa et al., 2009; Shanmuganathan and Britz-McKibbin, 2011). Our study showed that ambroxol delayed the decline of motor functions and protected motor neurons from degeneration in a transgenic animal model of ALS. Most importantly, ambroxol was able to maintain the functionality of spinal motor neurons in the SOD1^{G86R} mice. For these promising pre-clinical effects, ambroxol has recently been given orphan drug status for ALS by the European Medical Agency.

Clinical Relevance of Ambroxol for ALS

Ambroxol is marketed as an expectorant and mucolytic for lung diseases and for sore throat, with local anesthetic effects. In the CNS, ambroxol is potentially an inhibitor of sodium (Nav1.8) and calcium channels, with claimed anti-glutamatergic properties. Evidence suggests that ambroxol has direct anti-oxidative properties which could translate into beneficial effects in ALS (reviewed by Weiser, 2008).

In addition to its effects on GBA2, ambroxol is also known to bind the enzyme GBA1 in the cytosol and to correct enzyme folding and to improve its addressing to the acidic environment of the lysosome where the drug dissociates, thereby increasing GBA1 activity. The chaperone effect on ambroxol on GBA1 is combined with a positive modulation of GBA1 expression level (Magalhaes et al., 2018). It cannot be excluded that ambroxol could stimulate lysosomal-dependent pathway of protein clearance in ALS (Boland et al., 2018), as ambroxol reduces the alpha-synucleinopathy in an *in vivo* model of PD (Migdalska-Richards et al., 2016b).

Gaucher's disease is caused by genetic mutations of GBA1, resulting in the loss of GBA1 activity (Kanfer et al., 1975; Vardi et al., 2016). In addition, mutations on GBA1 and/or reduced expression of the protein are an important risk factor of PD (Barrett et al., 2013).

Recently, high dose of ambroxol was able to decrease the severity of neurological symptoms of patients with the neuropathic form of Gaucher's disease, suggesting that oral administration of ambroxol successfully target the metabolism of glycosphingolipids in the central nervous system (Narita et al., 2016). Two other clinical trials are currently investigating the effects of ambroxol in PD (NCT02941822; NCT02914366).

Ambroxol Improved the Plasticity of Motor Units

We have also shown that ambroxol hastened functional recovery in a non-transgenic animal model of sciatic nerve injury. Given the modest effect on the kinetic of recovery, the effects of ambroxol are most likely due to an increased ability to rebuilt NMJs. Indeed, in presence of ambroxol, the percentage of re-innervated NMJs was twice higher than that in the vehicle group. Moreover, the *in vitro* co-culture model of motor units provided similar results as ambroxol strongly increased the formation of NMJs but modestly promoted axonal elongation. It indicates that ambroxol was able to stimulate the formation of NMJs. This effect could explain the beneficial outcomes in the SOD1^{G86R} mice through motor axonal sprouting and muscle re-innervation.

Altogether, our results further connected the glycosphingolipid metabolism to the pathophysiology of ALS and indicated that inhibition of GBA2 may be a novel target for ALS.

METHODS

Animal Care and Maintenance

FVB/N non-transgenic female mice derived from Charles River were used to perform nerve sciatic injury experiment.

For others' experiments, FVB/N female mice, overexpressing the SOD1^{G86R} (Ripps et al., 1995), were generated and maintained in our animal facility at 23°C with 12-h light/dark cycle. They had water and regular A04 rodent chow *ad libitum*. AMB (3 mM, Sigma-Aldrich) was given by drinking water for mice treated, and vehicle mice was treated with animal facility water. For the presymptomatic stage study, the treatment started at 75 days of age and stopped at 95 days of age. For the symptomatic stage study (survival experiment), the treatment started to 95 days of age and stopped when mice were euthanized. Mice showing strong motor dysfunction at 93 days of age were not included in the symptomatic cohort. Mice were euthanized when animals were paralyzed and unable to roll over within 5 s after being pushed on their back. For euthanasia, mice were intracardially perfused with PBS 1X at 4°C after intraperitoneal injection with Dolethal (120 mg/kg).

Motor Assessment

Body mass was analyzed on a daily basis. Muscle strength (mean of three tests, grip test, Bioseb, Chaville, France) and the inverted grid test to assess the motor performance and coordination of mice were analyzed every 2 days. Onset of muscle strength loss was defined as a drop of more than 10% of the mouse maximal strength.

Sciatic Nerve Injury

Peripheral nerve injury was performed in order to induce muscle denervation and axonal regeneration. Wild-type mice were anesthetized with ketamine chlorohydrate (100 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). The sciatic nerve was exposed at mid-thigh level and lesioned with fine forceps for 30 s. The skin incision was sutured, and mice were allowed to recover. The hind limb, contralateral to the lesion, served as control. Mice were treated with AMB (3 mM) for 13 days, starting the day before surgery. Mice were followed on a daily basis. Mice were sacrificed by intraperitoneal injection with Doléthal (120 mg/kg) and intracardially perfused with PBS at 4°C.

Retrograde Labeling

Mice were treated with AMB (3 mM in drinking water) or with the vehicle solution (regular drinking water) from 75d of age at 95d of age. Mice were anesthetized at 94 days of age with ketamine chlorohydrate (100 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), and their hind limb muscles were injected with fluorogold (hydroxystilbamidine bis[methanesulfonate], Sigma-Aldrich; 10 mg/ml in PBS, 10% DMSO) FG with Hamilton seringue (26 gauge, 10 µl), and tissues were collected 24 h after injection.

Motor Neurons Counting

Tissues were fixed paraformaldehyde 4% and stored in PBS at 4°C until further use. Lumbar segments L1–L3 fixed in paraformaldehyde 4% were used for studying the number of motor neurons innervating hind limb muscle. After cryoprotection in 30% sucrose, coronal sections 16 µm thick from L1–L3 spinal segment were realized with a cryostat and were either stained with an anti-choline acetylcholine transferase (1/100, Millipore, France) and an alexa594-conjugated goat (1/200, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) antibodies, either mount on slides for Fluorogold counting. All neurons located in the ventral horn, which were >400 µm^2 in size and ChAT-positive, were considered as alpha motor neurons. 10 sections of spinal cord were counted, and cell area of motor neurons was measured with ApoTome 2 (Zeiss) microscope.

Neuromuscular Junction Labeling

Tissues were fixed paraformaldehyde 4% and stored in PBS at 4°C until further use. Under a binocular microscope, tibialis anterior muscle fibers were prepared into thin bundles. Neuromuscular junction morphology was studied by labeling of the acetylcholine receptors with rhodamine-conjugated α-bungarotoxin (1/400, Sigma-Aldrich), and labeling of nerve terminals was performed with a rabbit polyclonal anti-synaptophysin antibody diluted 1/50 (Abcam, Cambridge, UK), and anti-neurofilament diluted 1/50. For immunofluorescence of terminal nerve, Alexa-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1/500 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) was used. Muscle bundles were mounted into slides, prior to fluorescence microscopy (ApoTome 2, Zeiss). NMJs were considered as denervated when the presynaptic nerve terminal was absent from the postsynaptic region.

Beta-Glucosidase Activity

Tissues were snap frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C until further use. Frozen tissues were lysed with a TissuLyser (Qiagen, CA) and suspended in phosphate potassium (pH7) buffer extraction. After centrifugation (12,000 rpm for 15 min at 4°C), the supernatants were transferred to new tubes and stored at −80°C. The bicinchoninic acid assay (BCA) method, a colorimetric assay method, was used to measured protein level with a BCA range (Interchim). A GBA buffer was used and adapted according

to the enzymatic activity desired (McIlvaine buffer, 150 mM). For GBA1, enzymatic reaction was carried out with the GBA buffer pH4.6 and adding 0.1% triton and 0.1% BSA. For GBA2, enzymatic reaction was carried out with the GBA buffer pH5.8 and adding 0.1% BSA. After inhibitor addition and fluorescent agent 4-methylumbelliferone addition (4-MU, Sigma-Aldrich), samples were incubated 2 h at 37°C. For reading results, excitation was carried out at 360-nm excitation, and absorbance was measured at 445 nm emission (TriStar LB 941, Berthold Technologies).

Co-Culture of Spinal Cord Explants and Myoblasts

The rat spinal cord–human muscle co-culture was performed as described previously (Combes et al., 2015). Human myoblast was grown on 96-well plate in a mix of MEM and M199 medium, supplemented with glutamine 2 mM, insulin, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, fetal bovine serum 10%, and penicillin/streptomycin. Spinal cord explants with dorsal roots of 13-day-old Wistar rat embryos (Janvier, Le Genest-St-IsIe, France) were dissected and grown on the muscle monolayer. The co-cultures were maintained in a mix medium (MEM/M199), with 5% fetal calf serum, insulin, glutamine, and penicillin streptomycin. Ambroxol treatment was initiated when the spinal cord explants were added to the muscle monolayer and lasted 27 days. The treatment was renewed every other day during medium change. A total of 10 wells per conditions have been initiated. *In vitro* NMJs and neurite network were identified by immunostaining with alpha-bungarotoxin coupled with Alexa 488 and with a primary antibody against neurofilament 200 kD from mouse revealed with an anti-mouse Alexa 568. Sixty pictures have been automatically taken using same acquisition parameter with ImageXpress (Molecular Device) at 10× magnification and were analyzed with MetaXpress (Molecular Device). After segmentation of the pictures (**Supplementary Figure 3**), the total length of the neurite network and the total area of clustered nAChR were measured.

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean ± SEM and were analyzed with GraphPad Prism version 6.0 software. Student's *t* test was used to compare two groups, and ANOVA followed by Fisher's LSD test was applied to compare more than two groups. Grip strength curves were analyzed with two-way ANOVA, and survival curves were analyzed with log-rank test. Differences with *p*-values of <0.05 were considered significant.

DATA AVAILABILITY

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

Experiments were performed by authorized investigator after approval by the ethic committee of the University of Strasbourg and by the ministry of higher education and research (APAFIS #4555; #7146; #8828; #17157). They followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: AB, J-PL, AH; Performed the experiments: AB, CQ, AM, AH; Analysis and interpretation of the data: AB, NC, MS, J-PL, AH; Contributed reagents/materials/analysis tools: MS, J-PL; Wrote, discussed and approved the final version of the manuscript: AB, CQ, AM, NC, MS, J-PL, AH.

FUNDING

The work was funded by "Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives" (AREMANE, J.P.L.), the "Association française contre les myopathies" (AFM, JPL). SRS contributed with salary and reagents. J-PL and MS are currently receiving funds from Fight MND foundation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Annie Picchinenna for her help in the project.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00883/full#supplementary-material

REFERENCES

Albin, R. L., and Dauer, W. T. (2014). Magic shotgun for Parkinson's disease? *Brain* 137, 1274–1275. doi: 10.1093/brain/awu076

Ambrosi, G., Ghezzi, C., Zangaglia, R., Levandis, G., Pacchetti, C., and Blandini, F. (2015). Ambroxol-induced rescue of defective glucocerebrosidase is associated with increased LIMP-2 and saposin C levels in GBA1 mutant Parkinson's disease cells. *Neurobiol. Dis.* 82, 235–242. doi: 10.1016/j.nbd.2015.06.008

Barrett, M. J., Giraldo, P., Capablo, J. L., Alfonso, P., Irun, P., Garcia-Rodriguez, B., et al. (2013). Greater risk of parkinsonism associated with non-N370S GBA1 mutations. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 575–580. doi: 10.1007/s10545-012-9527-5

Boland, B., Yu, W. H., Corti, O., Mollereau, B., Henriques, A., Bezard, E., et al. (2018). Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 660–688. doi: 10.1038/nrd.2018.109

Bozek, K., Wei, Y., Yan, Z., Liu, X., Xiong, J., Sugimoto, M., et al. (2014). Exceptional evolutionary divergence of human muscle and brain metabolomes parallels human cognitive and physical uniqueness. *PLoS Biol.* 12, e1001871. doi: 10.1371/journal.pbio.1001871

Combes, M., Poindron, P., and Callizot, N. (2015). Glutamate protects neuromuscular junctions from deleterious effects of β-amyloid peptide and conversely: an in vitro study in a nerve-muscle coculture. *J. Neurosci. Res.* 93, 633–643. doi: 10.1002/jnr.23524

Cutler, R. G., Pedersen, W. A., Camandola, S., Rothstein, J. D., and Mattson, M. P. (2002). Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress–induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 52, 448–457. doi: 10.1002/ana.10312

Desport, J. C., Preux, P. M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J. M., Beaufrère, B., et al. (2001). Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 328–334. doi: 10.1093/ajcn/74.3.328

Dodge, J. C. (2017). Lipid involvement in neurodegenerative diseases of the motor system: insights from lysosomal storage diseases. *Front. Mol. Neurosci.* 10 (356), 1–14. doi: 10.3389/fnmol.2017.00356

Dodge, J. C., Treleaven, C. M., Pacheco, J., Cooper, S., Bao, C., Abraham, M., et al. (2015). Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 8100–8105. doi: 10.1073/pnas.1508767112

Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J. L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., et al. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70 (13), 1004–1009. doi: 10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27

Funalot, B., Desport, J.-C., Sturtz, F., Camu, W., and Couratier, P. (2009). High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10, 113–117. doi: 10.1080/17482960802295192

Henriques, A., Croixmarie, V., Bouscary, A., Mosbach, A., Keime, C., Boursier-Neyret, C., et al. (2018). Sphingolipid metabolism is dysregulated at transcriptomic and metabolic levels in the spinal cord of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 10 (433), 1–14. doi: 10.3389/fnmol.2017.00433

Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D. A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., D'Ambra, E., et al. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. *Hum. Mol. Genet.* 24, 7390–7405. doi: 10.1093/hmg/ddv439

Henriques, A., Huebecker, M., Blasco, H., Keime, C., Andres, C. R., Corcia, P., et al. (2017). Inhibition of β-glucocerebrosidase activity preserves motor unit integrity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* 7 (5235), 1–15. doi: 10.1038/s41598-017-05313-0

Jésus, P., Fayemendy, P., Nicol, M., Lautrette, G., Sourisseau, H., Preux, P.-M., et al. (2018). Hypermetabolism is a deleterious prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 25, 97–104. doi: 10.1111/ene.13468

Kanfer, J. N., Legler, G., Sullivan, J., Raghavan, S. S., and Mumford, R. A. (1975). The Gaucher mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 85–90. doi: 10.1016/0006-291X(75)90286-7

Lattante, S., Ciura, S., Rouleau, G. A., and Kabashi, E. (2015). Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD). *Trends Genet.* 31, 263–273. doi: 10.1016/j.tig.2015.03.005

Maegawa, G. H. B., Tropak, M. B., Buttner, J. D., Rigat, B. A., Fuller, M., Pandit, D., et al. (2009). Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for gaucher disease. *J. Biol. Chem.* 284, 23502–23516. doi: 10.1074/jbc.M109.012393

Magalhaes, J., Gegg, M. E., Migdalska-Richards, A., and Schapira, A. H. (2018). Effects of ambroxol on the autophagy-lysosome pathway and mitochondria in primary cortical neurons. *Sci. Rep.* 8, 1385. doi: 10.1038/s41598-018-19479-8

Marques, A. R. A., Aten, J., Ottenhoff, R., van Roomen, C. P. A. A., Herrera Moro, D., Claessen, N., et al. (2015). Reducing GBA2 activity ameliorates neuropathology in niemann-pick Type C mice. *PLoS One* 10, e0135889. doi: 10.1371/journal.pone.0135889

Mazzulli, J. R., Zunke, F., Tsunemi, T., Toker, N. J., Jeon, S., Burbulla, L. F., et al. (2016). Activation of -glucocerebrosidase reduces pathological -synuclein and restores lysosomal function in parkinson's patient midbrain neurons. *J. Neurosci.* 36, 7693–7706. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0628-16.2016

McNeill, A., Magalhaes, J., Shen, C., Chau, K.-Y., Hughes, D., Mehta, A., et al. (2014). Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain* 137, 1481–1495. doi: 10.1093/brain/awu020

Migdalska-Richards, A., Daly, L., Bezard, E., and Schapira, A. H. V. (2016b). Ambroxol effects in glucocerebrosidase and α-synuclein transgenic mice: ambroxol in transgenic mice. *Ann. Neurol.* 80, 766–775. doi: 10.1002/ana.24790

Migdalska-Richards, A., Ko, W. K. D., Li, Q., Bezard, E., and Schapira, A. H. V. (2017). Oral ambroxol increases brain glucocerebrosidase activity in a nonhuman primate. *Synapse* 71, e21967. doi: 10.1002/syn.21967

Narita, A., Shirai, K., Itamura, S., Matsuda, A., Ishihara, A., Matsushita, K., et al. (2016). Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: a pilot study. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3, 200–215. doi: 10.1002/acn3.292

Noakes, T., and Spedding, M. (2012). Olympics: run for your life. *Nature* 487, 295–296. doi: 10.1038/487295a

O'Regan, G., deSouza, R.-M., Balestrino, R., and Schapira, A. H. (2017). Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *J. Park. Dis.* 7, 411–422. doi: 10.3233/JPD-171092

Paganoni, S., Deng, J., Jaffa, M., Cudkowicz, M. E., and Wills, A.-M. (2011). Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 44, 20–24. doi: 10.1002/mus.22114

Ridley, C. M., Thur, K. E., Shanahan, J., Thillaiappan, N. B., Shen, A., Uhl, K., et al. (2013). β-Glucosidase 2 (GBA2) Activity and Imino Sugar Pharmacology. *J. Biol. Chem.* 288, 26052–26066. doi: 10.1074/jbc.M113.463562

Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H., and Gordon, J. W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 689–693. doi: 10.1073/pnas.92.3.689

Schapira, A. H. V. (2015). Glucocerebrosidase and Parkinson disease: recent advances. *Mol. Cell. Neurosci.* 66, 37–42. doi: 10.1016/j.mcn.2015.03.013

Schmitt, F., Hussain, G., Dupuis, L., Loeffler, J.-P., and Henriques, A. (2014). A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. *Front. Cell. Neurosci.* 8 (52), 1–10. doi: 10.3389/fncel.2014.00025

Shanmuganathan, M., and Britz-McKibbin, P. (2011). Inhibitor screening of pharmacological chaperones for lysosomal β-glucocerebrosidase by capillary electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2843–2853. doi: 10.1007/s00216-011-4671-6

Stojkovska, I., Krainc, D., and Mazzulli, J. R. (2018). Molecular mechanisms of α-synuclein and GBA1 in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* 373, 51–60. doi: 10.1007/s00441-017-2704-y

Vardi, A., Zigdon, H., Meshcheriakova, A., Klein, A. D., Yaacobi, C., Eilam,R., et al. (2016). Delineating pathological pathways in a chemically induced mouse model of Gaucher disease. *J. Pathol.* 239, 496–509. doi: 10.1002/path.4751

Weiser, T. (2008). Ambroxol: a CNS drug? *CNS Neurosci. Ther.* 14, 17–24. doi: 10.1111/j.1527-3458.2007.00032.x

Witte, M. D., Kallemeijn, W. W., Aten, J., Li, K.-Y., Strijland, A., Donker-Koopman, W. E., et al. (2010). Ultrasensitive in situ visualization of active glucocerebrosidase molecules. *Nat. Chem. Biol.* 6, 907–913. doi: 10.1038/nchembio.466

Woeste, M. A., and Wachten, D. (2017). The Enigmatic Role of GBA2 in controlling locomotor function. *Front. Mol. Neurosci.* 10 (386), 1–9. doi: 10.3389/fnmol.2017.00386

Woeste, M. A., Stern, S., Raju, D. N., Grahn, E., Dittmann, D., Gutbrod, K., et al. (2019). Species-specific differences in non-lysosomal glucosylceramidase GBA2 function underlie locomotor dysfunction arising from loss-of-function mutations. *J. Biol. Chem.* 294 (11), 3853–3871. doi: 10.1074/jbc.RA118.006311

Conflict of Interest Statement: MS, J-PL, and AH hold a patent entitled 'Inhibitors of GlcCer degradation in the treatment of diseases of the motor units', and the European Medicines Agency has granted AMB orphan designation for the therapy of amyotrophic lateral sclerosis to Spedding Research Solutions SAS. AH worked for part of the period of this work for Spedding Research Solutions SAS, where MS is president. AH and NC are currently employed by Neuro-sys SAS.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Bouscary, Quessada, Mosbach, Callizot, Spedding, Loeffler and Henriques. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

E. Publication 4: Drug repositioning in neurodegeneration: An overview of the use of ambroxol in neurodegenerative diseases

Contribution personnelle :

Pour cette revue, j'ai réalisé une partie du travail bibliographique et écrit une partie de la revue conjointement avec Alexandra Bouscary. Enfin, j'ai aussi participé à l'analyse critique du manuscrit avant soumission.

European Journal of Pharmacology 884 (2020) 173446

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Drug repositioning in neurodegeneration: An overview of the use of ambroxol in neurodegenerative diseases

Alexandra Bouscary, MSc [a,b], Cyril Quessada, MSc [a,b], Frédérique René, PhD [a,b], Michael Spedding, PhD [c], Alexandre Henriques, PhD [d], Shyuan Ngo, PhD [e,f,g], Jean-Philippe Loeffler, PhD [a,b,*]

[a] INSERM U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Université de Strasbourg, France
[b] Université de Strasbourg, UMR-S 1118, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France
[c] Spedding Research Solutions SAS, Le Vesinet, France
[d] Neuro-sys SAS, Gardanne, France
[e] Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia
[f] Centre for Clinical Research, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia
[g] Queensland Brain Institute, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia

ARTICLE INFO

Keywords:
Ambroxol
ALS
Neurodegenerative disease
GBA2
Glucosylceramide

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common motor neuron disease in adults. While it is primarily characterized by the death of upper and lower motor neurons, there is a significant metabolic component involved in the progression of the disease. Two-thirds of ALS patients have metabolic alterations that are associated with the severity of symptoms. In ALS, as in other neurodegenerative diseases, the metabolism of glycosphingolipids, a class of complex lipids, is strongly dysregulated. We therefore assume that this pathway constitutes an interesting avenue for therapeutic approaches. We have shown that the glucosylceramide degrading enzyme, glucocerebrosidase (GBA) 2 is abnormally increased in the spinal cord of the SOD1^{G86R} mouse model of ALS. Ambroxol, a chaperone molecule that inhibits GBA2, has been shown to have beneficial effects by slowing the development of the disease in SOD1^{G86R} mice. Currently used in clinical trials for Parkinson's and Gaucher disease, ambroxol could be considered as a promising therapeutic treatment for ALS.

1. Sphingolipids in Amyotrophic Lateral Sclerosis

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is the most common motor neuron disease in adults, affecting approximately 30,000 people worldwide (Petrov et al., 2017). It is characterized by the selective death of cortical motor neurons and bulbar and spinal motor neurons, causing progressive paralysis and the death within 2–5 years after diagnosis (van Es et al., 2017). To date, no curative treatment is available and symptomatic treatments have limited effectiveness. Two drugs are currently indicated for the treatment of ALS, Rilutek® and Edaravone. These molecules increase the life expectancy of patients by a few months (Abe et al., 2017; Dorst et al., 2018).

Historically, ALS has been classified as a strict motor neuron disease. However, in recent years, several studies have demonstrated the contribution of metabolic alterations in the development of pathology in ALS patients. Indeed, a high incidence of dyslipidemia and hypermetabolism have been identified in ALS patients (Desport et al., 2001; Dupuis et al., 2011; Pradat et al., 2010). These metabolic presentations are clinically associated with the severity of symptoms (Jésus et al., 2018; Steyn et al., 2018). Therefore, ALS is no longer considered as just a motor neuron disease, but rather, a systemic disease. The identification of characteristic markers allowing for early diagnosis is therefore essential in ALS. Metabolomic studies have focused on the metabolism of sphingolipids. Sphingolipids are complex lipids, involved in several vital functions of neuronal cells, including their maturation, the formation of myelin sheaths or even the transmission of neuronal signals (Olsen and Færgeman, 2017).

In 2002, a seminal study reported that an accumulation of sphingolipids triggers the death of motor neurons in a transgenic mouse model of ALS, as well as in ALS patients (Cutler et al., 2002). This study led the scientific community to focus on possible metabolic signatures in ALS patients. In 2015, Dodge and collaborators showed abnormal levels

* Corresponding author. Faculté de médecine, 11 rue Humann, 67085, Strasbourg, France.
E-mail address: loeffler@unistra.fr (J.-P. Loeffler).

https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173446
Received 14 April 2020; Received in revised form 30 June 2020; Accepted 29 July 2020
Available online 30 July 2020
0014-2999/© 2020 Published by Elsevier B.V.

of glycosphingolipids in the spinal cord of patients with ALS and in the SOD1^{G93A} mouse model of ALS (Dodge et al., 2015). In line with this, combined lipidomic and transcriptomic studies have demonstrated that there is an alteration in the levels of sphingolipids in the spinal cord of the SOD1^{G86R} mouse model of ALS (Henriques et al., 2018, 2015). These data suggest that lipid screening of the cerebrospinal fluid of ALS patients could serve as a means to identify characteristic signatures of the disease, with the view to provide information on its evolution (Blasco et al., 2017). Of interest, the disturbances in lipid metabolism appear to more specifically involve the degradation pathways of glucosylceramide (GlcCer), which are also involved in the pathophysiology of other diseases such as Parkinson's and Gaucher disease (Mullin et al., 2019). As such, deregulation of GlcCer could play a key role in the pathophysiology of ALS, and therefore represent a therapeutic target.

Henriques et al. (2017) showed an improvement in functional recovery in a model of nerve compression and delayed disease onset in SOD1^{G86R} mice, after the administration of Conduritol B Epoxide (CBE), an irreversible inhibitor of the GBA1 and GBA2, two beta-glucocerebrosidase enzymes (GCases). These data suggest that GlcCer strongly contributes to the stability of the motor unit. However, the use of CBE should be avoided because of its long-term toxicity. Thus, to study the contribution of GlcCer disturbances to the neurodegenerative process in ALS, we used pharmacological approaches to regulate the levels of GlcCer by targeting its degradation via GBA1 and GBA2.

2. Ambroxol: a promising drug candidate for therapeutic repositioning

Ambroxol is a generic expectorant and mucolytic drug used in the treatment of respiratory tract diseases (cough, bronchitis, etc.). Ambroxol is one of the synthetic derivatives of vasicine, the active substance in the plant Adhatoda Vasica, a plant used for respiratory indications in ancient India (Malerba and Ragnoli, 2008). Ambroxol is approved for use in 74 countries for the treatment of respiratory diseases, and in particular, for its fluidizing properties of bronchial secretions. Its favorable safety profile, even at high doses, and the low risk of side effects allow for ambroxol to be sold over the counter in most of the European Union. Its safety and tolerance have made it possible to determine the various properties of ambroxol.

Ambroxol limits the production of inflammatory cytokines (Jang et al., 2003; Ottonello et al., 2003), protects against oxidative stress by degrading free radicals which are toxic to cells (Felix et al., 1996; Lee et al., 2002), and has anesthetic properties for the treatment of sore throats (Schutz et al., 2002). The anesthetic and analgesic effects of ambroxol are explained by its action on the voltage-gated sodium channels, and more specifically on the Nav1.8 and Nav1.2 channels (Gaida et al., 2005; Weiser and Wilson, 2002). In addition, ambroxol is also described as being capable of modulating GCase activity (Shanmuganathan and Britz-McKibbin, 2011). Thus, due to the activity of ambroxol on GCase, its possible neuroprotective effects in neurodegenerative or lysosomal overload diseases deserve to be studied.

To counteract an enzymatic defect found in incurable diseases, it is possible to implement *Pharmacological Chaperone Therapy*. This innovative approach uses small molecules capable of entering cells and improving or restoring the activity of a failed enzyme. Limiting lysosomal overload or the formation of toxic aggregates responsible for the death of neurons are favorable arguments for using this therapy (Arakawa et al., 2006; Brooks, 2007; Fan, 2003; Parenti et al., 2015). Ambroxol crosses the blood-brain barrier, with a volume of distribution of 7 L/kg; this ensures widespread tissue distribution (Narita et al., 2016; Yang et al., 2015), thereby allowing for it to be considered in this new therapeutic strategy with the aim of modifying GlcCer and ceramide levels in the central nervous system.

Parkinson's and Gaucher diseases are two pathologies in which a toxic accumulation of lysosomal GlcCer is observed in the nervous system (Table 1). This accumulation occurs due to a deficiency in GBA enzyme activity, which may be due to the multiple mutations described for GBA1 (Migdalska-Richards et al., 2016). Thus, chaperone molecules such as isofagomine, which may bind to the mutant enzyme, were developed to facilitate transport to lysosomes and to restore activity in the acidic environment (Lieberman et al., 2009). The goal of current burgeoning therapeutic strategies is to use ambroxol as a chaperone molecule to restore the enzymatic activity of GBA1 by improving its presentation to the lysosome (Maegawa et al., 2009). This approach has demonstrated benefits in Gaucher disease: ambroxol has been shown to increase the enzymatic activity of GBA1, reduce the myoclonus observed in affected patients, and improve their motor functions (Narita et al., 2016). Ambroxol was recently approved to progress to a phase 2 clinical trial in patients with Parkinson's disease. This trial, once again, highlights the safety of the molecule, even at high doses, and confirms that ambroxol has potential for targeting the sphingolipid pathway, and in particular the activity of GCases in the nervous system (Mullin et al., 2020).

In addition to its chaperone activity on GBA1, ambroxol has the capacity to inhibit the enzymatic activity of a closely related enzyme: GBA2, which is located at the endoplasmic reticulum and the plasma membrane. In the SOD1^{G86R} mouse model of ALS, we have detected an abnormal increase in the GBA2 enzyme activity in the spinal cord (Bouscary et al., 2019). To offset this increase, we used ambroxol to inhibit GBA2 activity in SOD1^{G86R} mice. We have shown that ambroxol slows the time to onset of the first motor symptoms of the disease, and significantly extends the lifespan of transgenic mice. In this model of ALS, ambroxol limits the destruction of the integrity of neuromuscular junctions (NMJs) and also prevents muscular denervation. In addition, we have shown that ambroxol stimulates axonal plasticity and motor

Table 1
Summary of major clinical studies using ambroxol in given neurodegenerative diseases.

Pathology	Impairment	Patients/ mice	Effects of AMB	References
Gaucher disease	Accumulation of GlcCer due to a deficit in GBA1 activity	Patients	Safe; effective; no side effects	Zimran et al. (2013)
		Patients	Improves motor and neurologic function; increases GBA1 activity	Narita et al. (2016)
Parkinson's disease	Accumulation of α-synuclein due to deficit in GBA1 activity	Patients	Reduces alpha-synuclein levels	Mullin et al. (2020)
Amyotrophic Lateral Sclerosis	Dysregulation of sphingolipid metabolism in spinal cord and CSF	Patients	N/A	(Dodge et al., 2015; Henriques et al., 2017, 2015)
	Dysregulation of sphingolipid metabolism in spinal cord	Mice	Slows the onset of motor symptoms; improves motor functions; extends survival; promotes axonal growth and neuritic network	Bouscary et al. (2019)

This table lists some clinical trials carried out in patients with Gaucher or Parkinson's disease and pre-clinical investigations in ALS. The pathophysiological damages of the metabolism of sphingolipids are presented. The effects of ambroxol are shown. Currently, there is no clinical trial assessing the therapeutic benefit of ambroxol in patients with ALS.
AMB: Ambroxol; GBA1: Glucocerebrosidase; CSF: Cerebrospinal fluid; ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis.

recovery in a model of nerve compression. In support of these *in vivo* results, we have also shown that ambroxol promotes the elongation of the neurite network and the formation of NMJs in an *in vitro* model of motor units (Bouscary et al., 2019). Thus, in ALS, we hypothesize that ambroxol can interact indirectly, via gangliosides, with neurotrophic receptors responsible for the growth and survival of neurons. Indeed, studies suggest that certain sphingolipids such as GM1 gangliosides, (an oligosugar GlcCer derivative), have a high affinity for neurotrophin receptors (Ledeen and Wu, 2018) by interacting with Tropomyosin receptor kinase A (TrkA) (Chiricozzi et al., 2019). TrkA is also known as neurotrophic kinase receptor A which is a kinase that binds nerve growth factor and triggers a signalling pathway that leads to cell differentiation (Deinhardt and Chao, 2014). The interaction between GM1 and TrkA improves neuronal migration, dendritic arborisation, and axonal growth (Di Biase et al., 2020).

Interestingly patients producing IgM antibodies to GM1 develop multifocal motor neuropathy, an immunological disease resembling ALS (Harschnitz et al., 2014). We have shown that GM1, as labelled by cholera toxin, is lost at the NMJ of SOD1^{G86R} mice at very early stage of the disease (Henriques et al., 2017). It is therefore possible that the beneficial effects of ambroxol observed in neurodegenerative diseases could be explained by its ability to modify gangliosides critical to neurotrophic/neuroprotective processes.

Overall, our work to date has highlighted the previously unknown neuroprotective properties of ambroxol in a mouse model of ALS. Combined with data from the literature, these promising results make it possible to consider drug repositioning of ambroxol for the treatment of ALS. Ambroxol has obtained orphan drug designation for ALS from the European Medicines Agency. Thus, the rapid establishment of the clinical trials in the field of ALS could be facilitated by the availability of ambroxol, although the key question of human posology must be addressed.

Contribution authors

AB and CQ conducted the literature search and wrote the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript.

Funding

AB salary was supported by funds from «Association pour la recherche et le développement de moyens de lutte contre les maladies neurodégénératives» and CQ salary was supported by funds from «Association pour la recherche et le développement de moyens de lutte contre les maladies neurodégénératives» and from « FightMND (Australia) ». STN is currently supported by a FightMND Mid-Career Research Fellowship.

References

Abe, K., et al., 2017. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Neurol. 16, 505–512. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30115-1.

Arakawa, T., Ejima, D., Kita, Y., Tsumoto, K., 2006. Small molecule pharmacological chaperones: from thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. Biochim. Biophys. Acta Protein Proteonomics 1764, 1677–1687. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.08.012.

Blasco, H., Veyrat-Durebex, C., Bocca, C., Patin, F., Vourc'H, P., Kouassi Nzoughet, J., Lenaers, G., Andres, C.R., Simard, G., Corcia, P., Reynier, P., 2017. Lipidomics reveals cerebrospinal-fluid signatures of ALS. Sci. Rep. 7, 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17389-9.

Bouscary, A., Quessada, C., Mosbach, A., Callizot, N., Spedding, M., Loeffler-Philippe, J., Henriques, A., 2019. Ambroxol hydrochloride improves motor functions and extends survival in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Front. Pharmacol. 10 https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00883.

Brooks, D.A., 2007. Getting into the fold. Nat. Chem. Biol. 3, 84–85. https://doi.org/10.1038/nchembio0207.84.

Chiricozzi, E., Biase, E. Di, Maggioni, M., Lunghi, G., Fazzari, M., Pomè, D.Y., Casellato, R., Loberto, N., Mauri, L., Sonnino, S., 2019. GM1 promotes TrkA-mediated neuroblastoma cell differentiation by occupying a plasma membrane domain different from TrkA. J. Neurochem. 149, 231–241. https://doi.org/10.1111/jnc.14685.

Cutler, R.G., Pedersen, W.A., Camandola, S., Rothstein, J.D., Mattson, M.P., 2002. Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress - induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. 52, 448–457. https://doi.org/10.1002/ana.10312.

Deinhardt, K., Chao, M.V., 2014. Trk receptors. Handb. Exp. Pharmacol. 220, 103–119. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_5, 2014.

Desport, J.C., Preux, P.M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J.M., Beaufrère, B., Couratier, P., 2001. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Am. J. Clin. Nutr. 74, 328–334. https://doi.org/10.1093/ajcn/74.3.328.

Di Biase, E., Lunghi, G., Fazzari, M., Maggioni, M., Pomè, D.Y., Valsecchi, M., Samarani, M., Fato, P., Ciampa, M.G., Prioni, S., Mauri, L., Sonnino, S., Chiricozzi, E., 2020. Gangliosides in the differentiation process of primary neurons: the specific role of GM1-oligosaccharide. Glycoconj. J. 37, 329–343. https://doi.org/10.1007/s10719-020-09919-x.

Dodge, J.C., Treleaven, C.M., Pacheco, J., Cooper, S., Bao, C., Abraham, M., Cromwell, M., Sardi, S.P., Chuang, W.L., Sidman, R.L., Cheng, S.H., Shihabuddin, L. S., 2015. Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 8100–8105. https://doi.org/10.1073/pnas.1508767112.

Dorst, J., Ludolph, A.C., Huebers, A., 2018. Disease-modifying and symptomatic treatment of amyotrophic lateral sclerosis. Ther. Adv. Neurol. Disord. 11 https://doi.org/10.1177/1756285617734734, 175628561773473.

Dupuis, L., Pradat, P.F., Ludolph, A.C., Loeffler, J.P., 2011. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Lancet Neurol. 10, 75–82. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70224-6.

Fan, J.Q., 2003. A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. Trends Pharmacol. Sci. 24, 355–360. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00158-5.

Felix, K., Pairet, M., Zimmermann, R., 1996. The antioxidative activity of the mucoregulatory agents: ambroxol, bromhexine and N-acetyl-L-cysteine. A pulse radiolysis study. Life Sci. 59, 1141–1147. https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00431-6.

Gaida, W., Klinder, K., Arndt, K., Weiser, T., 2005. Ambroxol, a Nav1.8-preferring Na+ channel blocker, effectively suppresses pain symptoms in animal models of chronic, neuropathic and inflammatory pain. Neuropharmacology 49, 1220–1227. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.08.004.

Harschnitz, O., Jongbloed, B.A., Franssen, H., Straver, D.C.G., Van Der Pol, W.L., Van Den Berg, L.H., 2014. MMN: from immunological cross-talk to conduction block. J. Clin. Immunol. 34, 112–119. https://doi.org/10.1007/s10875-014-0026-3.

Henriques, A., Croixmarie, V., Bouscary, A., Mosbach, A., Keime, C., Boursier-Neyret, C., Walter, B., Spedding, M., Loeffler, J.P., 2018. Sphingolipid metabolism is dysregulated at transcriptomic and metabolic levels in the spinal cord of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. Front. Mol. Neurosci. 10, 1–14. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00433.

Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D.A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., D'Ambra, E., Huebecker, M., Hussain, G., Boursier-Neyret, C., Echaniz-Laguna, A., Ludolph, A.C., Platt, F.M., Walther, B., Spedding, M., Loeffler, J.P., De Aguilar, J.L. G., 2015. Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. Hum. Mol. Genet. 24, 7390–7405. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv439. https://search.crossref.org/?q=Henriques%2C+A.%2C+Croixmarie%2C+V.%2C+Priestman%2C+D.A.%2C+Rosenbohm%2C+A.%2C+Dirrig-Grosch%2C+S.%2C+D%27Ambra%2C+E.%2C+Huebecker%2C+M.%2C+Hussain%2C+G.%2C+Boursier-Neyret%2C+C.%2C+Echaniz-Laguna%2C+A.%2C+Ludolph%2C+A.C.%2C+Platt%2C+F.M.%2C+Walther%2C+B.%2C+Spedding%2C+M.%2C+Loeffler%2C+J.P.%2C+De+Aguilar%2C+J.L.G.%2C+2015.+Amyotrophic+lateral+sclerosis+and+denervation+alter+sphingolipids+and+up-regulate+glucosylceramide+synthase.+Hum.+Mol.+Genet.

Henriques, A., Huebecker, M., Blasco, H., Keime, C., Andres, C.R., Corcia, P., Priestman, D.A., Platt, F.M., Spedding, M., Loeffler, J.P., 2017. Inhibition of β-glucocerebrosidase activity preserves motor unit integrity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Sci. Rep. 7, 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05313-0.

Jang, Y.Y., Song, J.H., Shin, Y.K., Han, E.S., Lee, C.S., 2003. Depressant effects of ambroxol and erdosteine on cytokine synthesis, granule enzyme release, and free radical production in rat alveolar macrophages activated by lipopolysaccharide. Pharmacol. Toxicol. 92, 173–179. https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.920407.x.

Jésus, P., Fayemendy, P., Nicol, M., Lautrette, G., Sourisseau, H., Preux, P.M., Desport, J. C., Marin, B., Couratier, P., 2018. Hypermetabolism is a deleterious prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Eur. J. Neurol. 25, 97–104. https://doi.org/10.1111/ene.13468.

Ledeen, R., Wu, G., 2018. Gangliosides of the nervous system. Methods Mol. Biol. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8552-4_2.

Lee, C.S., Jang, Y.Y., Song, J.S., Song, J.H., Han, E.S., 2002. Ambroxol inhibits peroxynitrite-induced damage of α1-antiproteinase and free radical production in activated phagocytic cells. Pharmacol. Toxicol. 91, 140–149. https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2002.910309.x.

Lieberman, R.L., D'Aquino, J.A., Ringe, D., Petsko, G.A., 2009. Effects of pH and iminosugar pharmacological chaperones on lysosomal glycosidase structure and stability. Biochemistry 48, 4816–4827. https://doi.org/10.1021/bi9002265.

Maegawa, G.H.B., Tropak, M.B., Buttner, J.D., Rigat, B.A., Fuller, M., Pandit, D., Tang, L., Kornhaber, G.J., Hamuro, Y., Clarke, J.T.R., Mahuran, D.J., 2009. Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. J. Biol. Chem. 284, 23502–23516. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.012393.

Malerba, M., Ragnoli, B., 2008. Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 4, 1119–1129. https://doi.org/10.1517/17425255.4.8.1119.

Migdalska-Richards, A., Daly, L., Bezard, E., Schapira, A.H.V., 2016. Ambroxol effects in glucocerebrosidase and α-synuclein transgenic mice. Ann. Neurol. 80, 766–775. https://doi.org/10.1002/ana.24790.

Mullin, S., Hughes, D., Mehta, A., Schapira, A.H.V., 2019. Neurological effects of glucocerebrosidase gene mutations. Eur. J. Neurol. 26 https://doi.org/10.1111/ene.13837, 388-e29. https://search.crossref.org/?q=Mullin%2C+S.%2C+Hughes%2C+D.%2C+Mehta%2C+A.%2C+Schapira%2C+A.H.V.%2C+2019.+Neurological+effects+of+glucocerebrosidase+gene+mutations.+Eur.+J.+Neurol.

Mullin, S., Smith, L., Lee, K., D'Souza, G., Woodgate, P., Elflein, J., Hällqvist, J., Toffoli, M., Streeter, A., Hosking, J., Heywood, W.E., Khengar, R., Campbell, P., Hehir, J., Cable, S., Mills, K., Zetterberg, H., Limousin, P., Libri, V., Foltynie, T., Schapira, A.H.V., 2020. Ambroxol for the treatment of patients with Parkinson disease with and without glucocerebrosidase gene mutations: a nonrandomized, noncontrolled trial. JAMA Neurol 1–8. https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.4611.

Narita, A., Shirai, K., Itamura, S., Matsuda, A., Ishihara, A., Matsushita, K., Fukuda, C., Kubota, N., Takayama, R., Shigematsu, H., Hayashi, A., Kumada, T., Yuge, K., Watanabe, Y., Kosugi, S., Nishida, H., Kimura, Y., Endo, Y., Higaki, K., Nanba, E., Nishimura, Y., Tamasaki, A., Togawa, M., Saito, Y., Maegaki, Y., Ohno, K., Suzuki, Y., 2016. Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: a pilot study. Ann. Clin. Transl. Neurol. 3, 200–215. https://doi.org/10.1002/acn3.292.

Olsen, A.S.B., Færgeman, N.J., 2017. Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. Open Biol 7. https://doi.org/10.1098/rsob.170069.

Ottonello, L., Arduino, N., Bertolotto, M., Dapino, P., Mancini, M., Dallegri, F., 2003. In vitro inhibition of human neutrophil histotoxicity by ambroxol: evidence for a multistep mechanism. Br. J. Pharmacol. 140, 736–742. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705497.

Parenti, G., Andria, G., Valenzano, K.J., 2015. Pharmacological chaperone therapy: preclinical development, clinical translation, and prospects for the treatment of lysosomal storage disorders. Mol. Ther. 23, 1138–1148. https://doi.org/10.1038/mt.2015.62. https://search.crossref.org/?q=Parenti%2C+G.%2C+Andria%2C+G.%2C+Valenzano%2C+K.J.%2C+2015.+Pharmacological+chaperone+therapy%3A+preclinical+development%2C+clinical+translation%2C+and+prospects+for+the+treatment+of+lysosomal+storage+disorders.+Mol.+Ther.

Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., Hermine, O., 2017. ALS clinical trials review: 20 years of failure. Are we any closer to registering a new treatment? Front. Aging Neurosci. 9, 1–11. https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00068.

Pradat, P.F., Bruneteau, G., Gordon, P.H., Dupuis, L., Bonnefont-Rousselot, D., Simon, D., Salachas, F., Corcia, P., Frochot, V., Lacorte, J.M., Jardel, C., Coussieu, C., Le Forestier, N., Lacomblez, L., Loeffler, J.P., Meininger, V., 2010. Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler. 11, 166–171. https://doi.org/10.3109/17482960902822960.

Schutz, A., Gund, H.J., Pschorn, U., Aicher, B., Peil, H., Müller, A., De Mey, C., Gillissen, A., 2002. Local anaesthetic properties of ambroxol hydrochloride lozenges in view of sore throat: clinical proof of concept. Arzneimittel-Forschung/Drug Res. 52, 194–199. https://doi.org/10.1055/s-0031-1299879.

Shanmuganathan, M., Britz-McKibbin, P., 2011. Inhibitor screening of pharmacological chaperones for lysosomal β-glucocerebrosidase by capillary electrophoresis. Anal. Bioanal. Chem. 399, 2843–2853. https://doi.org/10.1007/s00216-011-4671-6.

Steyn, F.J., Ioannides, Z.A., Van Eijk, R.P.A., Heggie, S., Thorpe, K.A., Ceslis, A., Heshmat, S., Henders, A.K., Wray, N.R., Van Den Berg, L.H., Henderson, R.D., McCombe, P.A., Ngo, S.T., 2018. Hypermetabolism in ALS is associated with greater functional decline and shorter survival. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 89, 1016–1023. https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317887.

van Es, M.A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R.J., Veldink, J.H., van den Berg, L.H., 2017. Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 390, 2084–2098. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31287-4.

Weiser, T., Wilson, N., 2002. Inhibition of tetrodotoxin (TTX)-resistant and TTX-sensitive neuronal Na+ channels by the secretolytic ambroxol. Mol. Pharmacol. 62, 433–438. https://doi.org/10.1124/mol.62.3.433.

Yang, Y.G., Song, L.X., Jiang, N., Xu, X.T., Di, X.H., Zhang, M., 2015. Pharmacokinetics of ambroxol and clenbuterol tablets in healthy Chinese volunteers. Int. J. Clin. Exp. Med. 8, 18744–18750.

Zimran, A., Altarescu, G., Elstein, D., 2013. Pilot study using ambroxol as a pharmacological chaperone in type 1 Gaucher disease. Blood Cells Mol. Dis. 50, 134–137. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.09.006.

F. Publication 5: Sphingolipids metabolism alteration in the central nervous system: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and other neurodegenerative diseases

Contribution personnelle :

Pour cette revue, j'ai réalisé une partie du travail bibliographique et rédigé la partie 5. J'ai également aidé à la confection des figures de la revue et aux discussions finales avant soumission.

Seminars in Cell and Developmental Biology 112 (2021) 82–91

Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell and Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb

Review

Sphingolipids metabolism alteration in the central nervous system: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and other neurodegenerative diseases

Alexandra Bouscary [a,b,1], Cyril Quessada [a,b], Frédérique René [a,b], Michael Spedding [c], Bradley J. Turner [d], Alexandre Henriques [e], Shyuan T. Ngo [f,g,h], Jean-Philippe Loeffler [a,b,*]

[a] Université de Strasbourg, UMR_S 1118, Fédération de Médecine Translationnelle, CRBS, 1 rue Eugène Boeckel, 67000 Strasbourg, France
[b] INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, CRBS, 1 rue Eugène Boeckel, 67000 Strasbourg, France
[c] Spedding Research Solutions SAS, 6 rue Ampere, 78650 Le Vesinet, France
[d] The Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, University of Melbourne, 30 Royal Parade, Parkville, VIC 3052, Australia
[e] Neuro-sys SAS, 410 chemin Départemental 60, 13120 Gardanne, France
[f] Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, Building 75, Cnr College Rd & Cooper Rd, Brisbane city, QLD 4072, Australia
[g] Centre for Clinical Research, The University of Queensland, Building 71/918, Royal Brisbane & Women's Hospital Campus, Herston, QLD 4029, Australia
[h] Queensland Brain Institute Building 79, The University of Queensland, St Lucia, QLD 4072, Australia

ARTICLE INFO

Keywords:
Amyotrophic lateral sclerosis
Sphingolipids
Glucosylceramide
Glucocerebrosidase
Therapeutic target
Ambroxol

ABSTRACT

Sphingolipids are complex lipids. They play a structural role in neurons, but are also involved in regulating cellular communication, and neuronal differentiation and maturation. There is increasing evidence to suggest that dysregulated metabolism of sphingolipids is linked to neurodegenerative processes in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Parkinson's disease and Gaucher's disease. In this review, we provide an overview of the role of sphingolipids in the development and maintenance of the nervous system. We describe the implications of altered metabolism of sphingolipids in the pathophysiology of certain neurodegenerative diseases, with a primary focus on ALS. Finally, we provide an update of potential treatments that could be used to target the metabolism of sphingolipids in neurodegenerative diseases.

1. Introduction

Lipids represent around 60% of the constituents of nervous tissue and are essential in the propagation of electrical and chemical signals [1]. The sphingolipids represent almost 20% of the lipids of the nervous system [2]. They belong to a major class of complex lipids that are involved in various physiological and developmental processes, thus ensuring the proper functioning of the nervous system. In this review, we describe the generalities of sphingolipids and their physiological roles in the nervous system, as well as the importance of sphingolipids in neurodegenerative diseases. Finally, we discuss therapeutic approaches associated with sphingolipids in animal models and clinical trials.

2. Biosynthesis of sphingolipids in the nervous system

The biosynthesis of sphingolipids begins at the cytosolic layer of the endoplasmic reticulum (ER) and progresses through several subcellular structures. The general structure of sphingolipids is defined by a sphingosine skeleton. Ceramide is the simplest sphingolipid. Made up of a sphingosine molecule and one fatty acid, it is the key precursor for the synthesis of many sphingolipids. Ceramide is obtained by the transformation of sphinganine into dihydroceramide by the ceramide synthase enzymes, which represent a large family of ER enzymes. Dihydroceramide is subsequently converted to ceramide by ceramidase [3]. During synthesis, the subclass of sphingolipids is determined through the addition of different chemical

Abbreviations: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; ER, endoplasmic reticulum; UGT8, galactosyltransferase; FAPP2, four-phosphate adaptator protein 2; SM, sphingomyelin; CNS, central nervous system; UGCG, UDP-glucose ceramide glycosyltransferase; MAGs, myelin-associated glycoproteins; SMase, sphingomyelinase; Trk, Tropomyosin receptor kinase; AD, Alzheimer's disease; PD, Parkinson's disease; GBA, β-Glucocerebrosidase; S1P, sphingosine-1-phosphate; BBB, blood-brain barrier.

* Corresponding author at: Université de Strasbourg, UMR_S 1118, Fédération de Médecine Translationnelle, CRBS, 1 rue Eugène Boeckel, 67000 Strasbourg, France.
E-mail address: loeffler@unistra.fr (J.-P. Loeffler).
[1] Alexandra Bouscary and Cyril Quessada contributed equally.

https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.10.008
Received 23 June 2020; Received in revised form 14 October 2020; Accepted 19 October 2020
Available online 5 November 2020
1084-9521/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

groups (radical group "R") to the ceramide (Fig. 1). Among these subclasses are the glycosphingolipids which are characterized by the addition of one or more monosaccharides. Once formed in the ER, ceramide can be directly transformed into galactosylceramide through the addition of one galactose by the enzyme ceramide galactosyltransferase (UGT8), or transported to the Golgi apparatus to give rise to several glycosphingolipids and gangliosides (Fig. 2). For example, when ceramide is transported to the Cis-Golgi network, the addition of glucose leads to the formation of glucosylceramide. At this stage, glucosylceramide is transported to the trans-Golgi apparatus via two mechanisms: through vesicular transport or through the transport protein four-phosphate adaptator protein 2 (FAPP2) [4,5]. At the trans-Golgi network, glucosylceramide is transformed into different glycosphingolipids (e.g. lactosylceramide, gangliosides, etc.). Using the ceramide transferase protein, ceramide can be transported directly to the trans-Golgi network, where the addition of a phosphocholine produces sphingomyelin. At the trans-Golgi network, several glycosphingolipids are formed. These glycosphingolipids are transported to the plasma membrane where they are integrated into lipid rafts. Finally, the addition of glucose and galactose to the ceramide allows for the formation of lactosylceramide. Addition of sialic acid to lactosylceramide leads to the production of the first ganglioside, GM3. Various derivatives can then be generated through the addition of N-acetylgalactosamine and galactose, which gives rise to GM2, GM1, and so on (Fig. 1).

The degradation of glycosphingolipids occurs in the endosomes and lysosomes. Endosomal glycosphingolipids are recycled to subcellular compartments (ER and Golgi apparatus) while the glycosphingolipids that are redirected to the lysosomes are hydrolyzed to ceramide and then to sphingosine.

3. Sphingolipids have major roles in the nervous system

Several studies show that sphingolipids are widely distributed across the central nervous system (CNS). The CNS is mainly composed of glycosphingolipids and gangliosides [6,7]. Gangliosides are mainly located in neurons, whereas galactosylceramide is mainly localized in the oligodendrocytes [8]. The distribution of sphingolipids in the CNS highlights their importance in the formation of different cell types, and in neurodevelopment.

3.1. Sphingolipids: driving the maturation of the nervous system

The gangliosides are the major class of sphingolipids that are found at high concentrations in the CNS. As such, they are indispensable for the development of the nervous system, axonal growth, and neuronal differentiation [9,10]. During embryonic development, ganglioside levels vary depending on the stage of maturation (Fig. 3). During the early stages of development, GM3 and GD3 are synthesized in large quantities during the formation of the neural tube, and they also participate in the proliferation and differentiation of neural stem cells [7,10,11]. Next, several derivatives of GM3 (like GD1a, GM1, GD1b and GT1b) participate in neuronal differentiation, synaptogenesis, and myelination until adulthood [12]. Sphingomyelin, galactosylceramide and sulfatide also participate in axonal arborization during development. Not surprisingly, an absence of GD3 synthase drastically delays axonal growth and myelination in mice [13]. By contrast, administration of GD3 improves the regeneration process after sciatic nerve injury in GD3 synthase knockout (KO) mice [14]. This age- and development-dependent expression of gangliosides highlights their crucial role in neurogenesis.

3.2. Implication of glycosphingolipids in neuronal differentiation and axonal growth

The other actors involved in the development of the nervous system are the glycosphingolipids. As gangliosides, glycosphingolipids are involved in establishing neuronal proliferation and maturation, as well as axonal growth [7,15,16]. In addition, many glycosphingolipid enzymes such as the synthetic enzymes of ceramide and glucosylceramide, ceramide synthase and the UDP-glucose ceramide glycosyltransferase

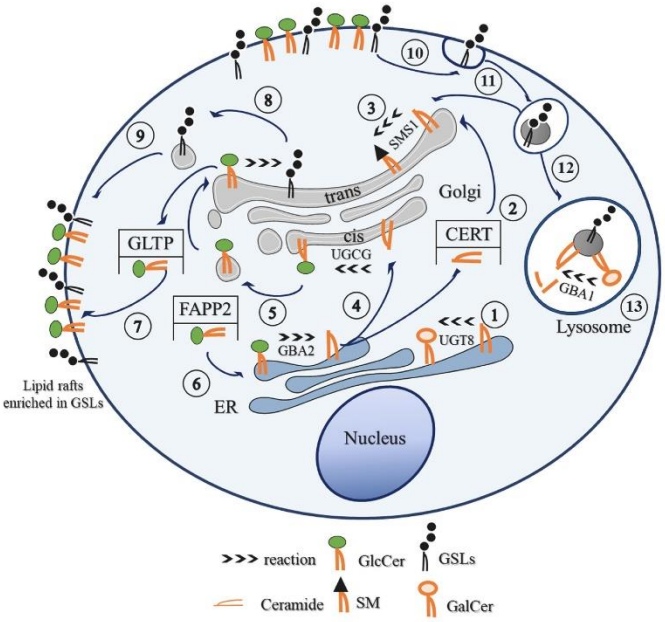


Fig. 1. Synthesis, degradation, and recycling of sphingolipids. The ceramide synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) can be transformed into different metabolites. (1) Ceramide (Cer) is transformed to galactosylceramide (GalCer) in the ER. (2) Cer is transported from the ER to the trans-Golgi apparatus by the ceramide transfer protein (CERT) (3) where it is transformed into sphingomyelin (SM). (4) Ceramide can also be transported from the ER to the cis-Golgi network to be transformed into glucosylceramide (GlcCer). (5) GlcCer can be transported to the trans-Golgi apparatus through vesicular transport. At the trans-Golgi network, GlcCer is transformed into different glycosphingolipids (GSLs). (6) Four-phosphate adaptator protein 2 (FFAP2) can transport GlcCer back to the ER where it can be degraded to Cer by GBA2. (7) GlcCer is transported to the membrane by the glycolipid transfer protein (GLTP) where it can integrate into lipid rafts. (8) GSLs are transported to the plasma membrane through vesicular transport, (9) where they can integrate into lipid rafts. (10) GSLs are recycled at the endosome (11) to the ER or Golgi apparatus (12) or degraded by lysosomal pathway. (13) Degradation of GlcCer at the lysosome level occurs by GBA1 (inspired by [6]).

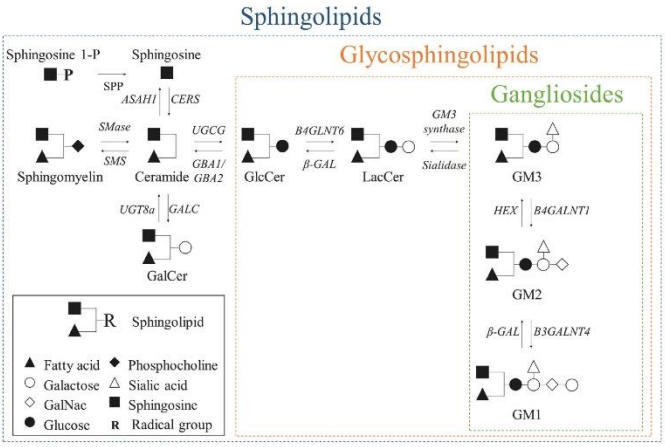


Fig. 2. Schematic representation of sphingolipid metabolism. Sphingolipids are characterized by the addition of a radical group to determine the subclass of sphingolipids; in this diagram the different classes of ceramide/dihydroceramide are not shown (e.g. hydrogen atom for ceramide is not shown). Sphingomyelin degradation by sphingomyelinase (SMase) generates ceramide (Cer). From the Cer, sphingosine and galactosylceramide (GalCer) are then synthesized by acid ceramidase (ASAH1) and ceramide galactosyltransferase (GALC) respectively. Glucosylceramide (GlcCer) is a glycosphingolipid which is obtained from Cer by glucocerebrosidase (GBA1/GBA2). The addition of galactose to GlcCer by galactosyltransferase (B4GLNT6) leads to the generation of lactosylceramide (LacCer). Then, the addition of sialic acid to LacCer forms GM3, a precursor of gangliosides. Ganglioside synthesis is continued through the successive addition of N-acetylgalactosamine (GalNac) and galactose residues by GalNac transferase 1 (GM2 synthase/ B4GLNT1 and B3GALNT4) respectively for GM2 and GM1.

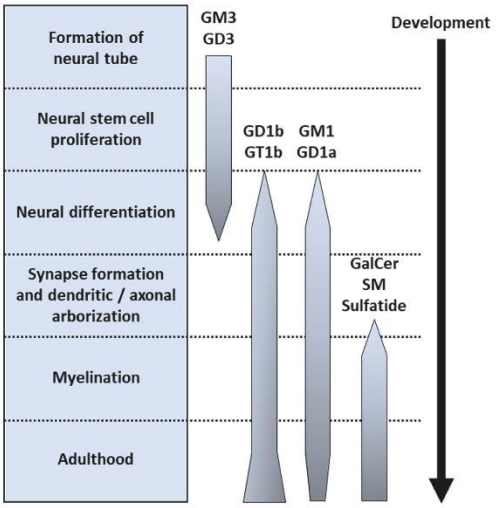


Fig. 3. Expression of gangliosides in the nervous system during development. Ganglioside composition changes during development. The gangliosides GD3 and GM3 are produced during the formation of the neural tube, and during neural stem cell proliferation. During neuronal differentiation, the expression of GD3 and GM3 decreases. In parallel, gangliosides necessary for neuronal differentiation, such as GD1a, GM1, GD1b and GT1b, are synthesized. In adulthood, the levels of GD1a and GM1 decrease while the levels of GD1b and GT1b continue to increase. Galactosylceramide (GalCer), sphingomyelin (SM) and sulfatide are synthesized during synaptogenesis. Their synthesis is maintained until adulthood (inspired by [8,11]).

(UGCG), have been shown to be essential for axonal and dendritic growth. In this regard, inhibition of ceramide synthase activity in murine neurons in vitro leads to a considerable decrease in levels of glycosphingolipid, thereby impairing neuronal growth [17,18]. Similarly, deletion of *UGCG* in the neural cells of mice causes axonal degeneration and demyelination of peripheral nerves, leading to the death [19]. In 2009, it was also shown that inhibition of *UGCG* with a shRNA led to a decrease in the expression of glycosphingolipids in mouse embryonic stem cells [20]. In sum, sphingolipids and the degradation of glucosylceramide into ceramide is crucial for the development of the nervous system.

3.3. Location and function in cell membranes of the nervous system

Cell membranes are composed of micro-domains, called lipid rafts, which are supplemented with phospholipids, cholesterol and sphingolipids. These lipid rafts play a structural role in cells but are also critical for signal transduction. Cholesterol is critical for the formation and maintenance of lipid rafts where they play a structural and anchoring role for membrane proteins involved in endocytosis, signal transduction, cell adhesion and rearrangement of the cytoskeleton [21–24]. Sphingolipids are an integral part of cell membranes where they act as modulators of signaling pathways. Ceramides, by their degree of saturation or chain length, can induce membrane gel domains, with far-reaching effects on signal transduction [25,26].

Several studies also suggest that lipid rafts, including sphingolipids, are directly responsible for the spatial organization of signaling molecules. These rafts group G proteins and neurotransmitter receptors to promote signal transmission [21]. Indeed, several sphingolipids (e.g. SM, GM1, etc.) interact with G protein coupled receptors [27–29]. Moreover, the glycosylated region of gangliosides, such as GM1, are positioned in the extracellular environment in a way that allows interaction with BDNF and NGF receptors [30–32]. Of note, GM1 is also found in the nuclear envelope of cells, where it regulates gene expression through its association with a sodium-calcium exchanger as during neuronal development [33–35]. To ensure the integrity of tissue in the nervous system, the gangliosides stabilize the myelin-associated glycoproteins (MAGs), thereby allowing strong architecture between the axon and the myelin sheath [7,36,37]. In 2005, Yamashita and collaborators reported disruptions in axon-myelin interactions in mice lacking GM3 and GM2 synthases, two enzymes that synthesize gangliosides [38]. Finally, sphingolipids are involved in cellular communication through the vesicles of endosomes and exosomes. Indeed, sphingomyelinase (SMase) for example, participates in the formation and secretion of exosome vesicles, and sphingosine kinase is involved in the regulation of endosomes [28]. All these data underline the importance of sphingolipids in cell integrity but also in the establishment of cellular communication.

3.4. GM1 and neurotrophic factors

It is widely accepted that GM1 interacts with neurotrophins, which themselves are essential for the growth and survival of neurons. GM1 is anchored to the cell membrane via its ceramide group, and 5 sugars (radical R) are exposed to the extracellular environment. The extracellular portion of GM1 can interact with growth factor receptors. Pioneering studies demonstrated that GM1 promoted the neurite growth in murine neuroblastomas [39–41]. Subsequently, a direct interaction between GM1 and the TrkA receptor, as well as the ability of GM1 to increase the activation of TrkA induced by NGF, was shown [30,42]. In the early 2000s, the enhanced effect of NGF on GM1-potentiated TrkA receptor activity was demonstrated in vivo in rats [32]. More recently, it has been proposed that this effect is due to the binding of NGF to the TrkA receptor, and activation of the Ras/Raf/MEK/Erk pathway [7]. Interestingly, cells deficient in GM1 do not express the TrkA receptor [43]. In line with these data, it has been shown that endogenous GM1 directly modulates the activity of the TrkA and TrkB receptors, as well as their associated signaling cascades [31,44,45]. GM1 also activates the various Trk receptors (A, B and C) by phosphorylation [32] and participates in the autophosphorylation of TrkC [46]. Critically, a 2002 study by Bachis and colleagues noted that GM1 appeared to prevent glutamate-related excitotoxicity by mimicking the action of BDNF on TrkB [47]. Collectively, these studies consolidate the close link between GM1 and Trk receptors in neuronal survival.

4. Sphingolipids in neurodegenerative diseases

Currently, more than 30 million people are affected by neurodegenerative diseases. Alzheimer's disease (AD) is the most common of these diseases and affects 25 million people worldwide, while 6.3 million people have Parkinson's disease (PD), and 220,000 have amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [48]. The accumulation or dysregulation of sphingolipids is proposed to contribute to the pathogenesis of these neurodegenerative diseases by severely affecting lysosomal enzyme activity, which triggers an accumulation of lipids within organelles of the "endosomal-autophagic-lysosomal" system [49].

4.1. Amyotrophic lateral sclerosis

Amyotrophic lateral sclerosis is a fatal neurodegenerative disease that is characterized by the irrevocable degeneration of upper and lower motor neurons. The progressive loss of neurons results in debilitating motor weakness, increasing paralysis, and death usually occurs within 3–5 years from symptom onset [50]. It is becoming evident that ALS pathology extends beyond the motor system [51].

Several studies have identified metabolic alterations in ALS patients. These are mostly defined by hypermetabolism and dyslipidemia, which are clinically associated with the severity of symptoms [52–54]. Hypermetabolism is an early phenomenon that is present throughout the disease [55–57], and that appears to negatively impact prognosis [58–60]. By contrast, hyperlipidemia appears to be a protective factor in ALS, and it is known that a hyperlipidemic diet significantly improves survival of ALS mice ($Sod1^{G86R}$) [61] and slows progression of disease in ALS patients [62]. Congruent with this, high levels of total cholesterol [63] and elevated levels of serum triglyceride [64] appear to be beneficial in ALS patients. More recently, the beneficial effects of high-caloric nutrition on the survival of ALS patients with fast-progressing disease were shown [65]. While the cause for metabolic dysregulation in ALS remains unknown, consistent observations of the beneficial effects of lipids has spurred extensive research into the contribution of lipid metabolism to the disease.

An abnormal increase in sphingolipid levels (sphingomyelin, ceramide, cholesterol, etc.) has been observed in the spinal cord of ALS patients, and in the spinal cord of asymptomatic and symptomatic $SOD1^{G93A}$ mice [66]. Subsequent studies confirming an increase in metabolites of sphingolipids (glucosylceramide, ceramide, galactosylceramide, GM3, GM1, etc.) and their associated enzymes (GBA1, GBA2, etc.) in the spinal cord of $Sod1^{G86R}$ mice [67], $SOD1^{G93A}$ mice and ALS patients [68] indicate that altered metabolism of sphingolipids could be integral to the progression of ALS pathology [69]. Interestingly, the inhibition of glucosylceramide synthesis dramatically accelerates disease progression in $SOD1^{G93A}$ mice while the intracerebroventricular perfusion of GM3 is able to significantly delay the onset of paralysis in $SOD1^{G93A}$ mice [68]. While the clinical relevance of altered sphingolipid metabolism remains to be established, levels of sphingomyelin and long chain triglycerides in the CSF of ALS patients has been shown to correlate with the progression of ALS [70,71].

The detection of antibodies targeting gangliosides, in particular GM1, in serum [72,73], brain [74] and spinal cord [75] of some patients with ALS led to clinical trials of ganglioside administration. These trials have not been conclusive [76–78]. However, Xu et al. have shown that a single injection of human IgM (rHIgM12) binding gangliosides extends the survival of two ALS mouse models [79] thus emphasizing a role for glycosphingolipids in ALS.

An increase in the levels of glucosylceramide and GM1 have been observed in the CSF of ALS patients [80]. Transcriptomic studies of muscle biopsies from ALS patients have reported a significant increase in the expression of the *UGCG* gene, encoding the enzyme responsible for the synthesis of glucosylceramide. Similar to ALS patients, mouse models of ALS show accumulation of glucosylceramide in skeletal muscle. Lipidomic analysis revealed complete modulation of sphingolipids in skeletal muscles and spinal cords of $Sod1^{G86R}$ mice prior to the onset of disease phenotypes. Interestingly, the levels of GM2 and GM3 were increased in $Sod1^{G86R}$ mice, but also in non-transgenic mice that had undergone axotomy, suggesting that altered sphingolipid metabolic might occurs as a consequence of denervation. In addition, inhibition of glucosylceramide synthesis by an UGCG inhibitor significantly delayed functional recovery after sciatic nerve injury [67]. Conversely, inhibition of the degradation of glucosylceramide by conduritol B epoxide, an irreversible inhibitor of GBA1 and GBA2, improved functional recovery in a model of sciatic nerve compression and slowed disease progression in $Sod1^{G86R}$ mice [80]. Thus, current evidence indicates that sphingolipid metabolism is likely to be a key modulator of disease course in ALS.

4.2. Other neurological diseases

In recent years, there has been a growing body of evidence to indicate that the metabolism of sphingolipids contributes to the pathophysiology of other diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Gaucher disease. The gradual accumulation of protein aggregates, which leads to toxicity and neurodegeneration of cells of the nervous system, occurs in response to defects in the metabolism of sphingolipids, major players in the lysosomal degradation of cellular debris.

4.2.1. Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease characterized by the accumulation of extracellular amyloid plaques and intraneuronal deposits of the Tau protein [81,82]. Although the molecular mechanism that underpins the development of the disease is not clear, numerous studies suggest that sphingolipids play a crucial role in the pathogenesis of AD [83–88]. Indeed, the levels of sphingolipids (e.g. sphingomyelin and ceramide) and their associated synthetic enzymes (sphingomyelin synthase and sphingomyelinase) are increased in the brains of AD mice and AD patients [89–91]. Several teams have also shown that elevated levels of serum ceramide in AD patients and AD model animals [92–96] may be predictive of AD and cognitive impairment [97–99]. Ceramide, produced by sphingomyelinases, stabilizes β-secretase, which leads to an increase in the cleavage of the amyloid precursor protein [100]. In this regard, increasing ceramide and sphingomyelinase levels promotes the accumulation of amyloid-β

(Aβ42) in two mouse models of AD [90,91] and ceramide-enriched exosomes worsen disease pathology [91]. Conversely, genetic inhibition of sphingomyelinase enzyme in a mouse model of AD decreases amyloid-β deposits and cognitive impairment [91,101], and attenuates the progression of disease [91]. Furthermore, knocking out the *SMS1* gene in the hippocampus of an AD-like transgenic mouse appears to limit the formation of amyloid plaques and improve cognitive function [102].

4.2.2. Gaucher disease and parkinson's disease

Glucosylceramidase activity is critical in these two diseases, with the lysosomal enzyme (GBA1) playing a particularly important role. The loss of GBA1 activity strongly modulates lysosomal function, which is involved in the elimination of cellular material through autophagy. Mutations in the *GBA1* gene lead to non-functional enzymes, either by total loss of functions or by driving a defect in the targeting of GBA1 to the lysosome, which results in the accumulation of glucosylceramide in the lysosomes.

GBA1 mutations are associated with Gaucher disease [49,103,104]. Gaucher disease is a lysosomal overload disease characterized by a complete loss of function of the GBA1 protein. This leads to an accumulation of glucosylceramide, which can be the cause of neuropathic forms of the disease [49,105]. Although no correlation has been made between the severity of Gaucher disease and the *GBA2* gene, studies suggest that GBA2 is involved in the pathophysiology of the disease [103,106].

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease that affects predominantly dopaminergic neurons of the substantia nigra. People with Parkinson's disease usually have motor symptoms, but the disease is also characterized by insidious cognitive decline, which increases with the duration of the disease. Mutations in the *GBA1* gene are considered a high-risk factor for Parkinson's disease. Indeed, *GBA1* mutations occur in 10–25% of patients with Parkinson's disease [104,107–112]. *GBA1* mutations cause a decrease in the levels of the GBA1 protein and its enzymatic activity, resulting in the toxic accumulation of α-synuclein and defecting autophagy [113,114]. Interestingly, activation of GBA1 induces clearance of α-synuclein and restores lysosomal function in dopaminergic neurons of Parkinson's patients [115]. Moreover, inhibition of GBA1 activity in a mouse model of synucleinopathy leads to accumulation of glucosylceramide and worsening of motor and cognitive phenotypes. By contrast, increasing the activity of GBA1 leads to a slowing of disease progression [116]. While studies suggest that the accumulation of glucosylceramide might alter the mechanisms that regulate α-synuclein [117,118], the molecular mechanisms that link GBA1 and α-synuclein are still poorly understood.

All of these data underline the importance of potential molecular targets (e.g. GBA1 and GBA2) in order to develop effective pharmacological strategies to limit the progression of these neurological diseases.

5. Therapeutic targeting of sphingolipids in neurodegeneration

With a growing body of evidence to show that sphingolipids actively participate in the pathophysiology of neurodegenerative disease [5,49,119], there is an increased focus on the targeting of the metabolism of sphingolipids for therapeutic development. Due to the complexity of the sphingolipid pathway, only the most common players in neurodegenerative diseases will be discussed.

5.1. Sphingolipids at the centre of new therapies in animal and cell models

Some molecules have proven to be promising candidates for attenuating various pathologies in in vitro and in vivo models of neurodegenerative disease.

5.1.1. Fingolimod (FTY720)

Fingolimod is an analogue of sphingosine. In the brain, it is converted to fingolimod -phosphate (FTY720-P). Fingolimod-P is a sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor agonist [120], which is reduced in Alzheimer's disease and Parkinson's disease [121–124]. Stimulation of S1P by FTY720 improves memory, synaptic plasticity, reduces β-amyloid production and enhances motor function in several distinct animal models of these diseases [125–128]. More recently, FTY720 was shown to significantly improve survival in the $SOD1^{G93A}$ mouse model of ALS [129].

5.1.2. Isofagomine

In 2009, Liebermann and co-workers demonstrated that isofagomine by acting as a chaperone of GBA1 ensured good conformational stability and activity of human GBA1 while also increasing its enzymatic activity [130] (see Table 1). In support of this, isofagomine was shown to extend the lifespan in animal models of Gaucher disease and increase the activity and levels of GBA1 in the brain and visceral tissues, although its effects on the accumulation of glucosylceramide and glycosphingosine is yet to be determined [131]. Finally, isofagomine reduces aggregates of human wildtype α-synuclein in dopaminergic neurons in the substantia nigra of a mouse model of synucleinopathy [132]. In general, current data on the use of isofagomine in Gaucher disease and synucleinopathies is encouraging.

5.1.3. Ambroxol

Ambroxol is a molecule known for its mucolytic, antioxidant and anaesthetic properties [133]. It can cross the blood-brain barrier (BBB) and improve the activity of GBA1 in Gaucher disease patient cells in vitro, and in wildtype mice in vivo [134] (see Table 1). In 2009, Maegawa and collaborators demonstrated that ambroxol stabilizes the conformation of GBA1, thereby increasing its enzymatic activity, and reducing the accumulation of glucosylceramide in fibroblasts from Gaucher disease patients [135]. Ambroxol has also been shown to enhance the activity of GBA1 in fibroblasts of Parkinson's disease patients, and to reduce the aggregation of α-synuclein [114,136]. In wildtype and transgenic mice overexpressing human α-synuclein, treatment with ambroxol led to an increase in GBA1 mRNA and enzyme activity in the brain, and a concomitant reduction in levels of α-synuclein [137]. Finally, the activities of GBA1 and β-hexosaminidase are significantly improved in non-human primates after treatment with ambroxol [138]. In the context of ALS, our laboratory has demonstrated that ambroxol prevents the loss of muscle strength, delays disease progression, and extends survival of $Sod1^{G86R}$ mice. Moreover, ambroxol promotes axonal growth and neuronal network complexity in vitro and in vivo [139,140]. Overall, ambroxol appears to be highly effective in modulating GBA1 activity to exert neuroprotective effects across a number of mouse models of neurodegeneration.

5.2. Sphingolipid modulation in humans

There is growing interest in targeting the metabolism of sphingolipids as a therapeutic strategy in human neurodegenerative diseases. In this section, we will only present clinical studies for Gaucher disease and Parkinson's disease.

5.2.1. Isofagomine

The defective activity of GBA1 in patients with Gaucher disease can be restored by isofagomine treatment. By stabilizing the binding of the GBA1 enzyme with its substrate [141], isofagomine increases GBA1 activity in Gaucher disease patient fibroblasts, thus preventing the toxic accumulation of glucosylceramide [130]. However, isofagomine has poor cell penetration and clinical trials for Gaucher disease have been inconclusive.

5.2.2. Ambroxol

In 2013, Zimran et al. showed that ambroxol was safe and had no adverse effects in patients with Gaucher disease [142]. In another pilot study, ambroxol was found to improve motor functions and neurological

Table 1
Summary of studies using treatments that modulate the metabolism of sphingolipids.

Drug	Disease	Model	Dose	Effects	References
Fingolimod (FTY720)	AD	Mouse	0.5 mg/kg	• Reduces amyloid-β production	[127]
	AD-like neurodegeneration	Rats	1 mg/kg	• Attenuates Aβ42-induced learning and memory impairment	[125]
	AD-like neurodegeneration	Rats	1 mg/kg	• Reduces inflammatory markers	[126]
	–	Chemical model of neurodegeneration	10–1000 nM	• Attenuates excitotoxicity and neuroinflammation	[145]
	–	Rats (Focal cerebral ischemia)	0.5 mg/kg	• Improves synaptic plasticity and memory deficit	[143]
	PD	Mouse	1 mg/kg	• Attenuates motor deficits • Reduces the loss of dopaminergic neurons	[146]
	ALS	Mouse	0.1 and 1 mg/kg	• Improves neurological scores and survival	[129]
Isofagomine	GD	Patients lysosomal enzyme (GBA1)	–	• Ensure good conformation and stability • Increases GBA1 enzymatic activity	[130]
	GD	Mouse	20 or 600 mg/kg	• Increases the activity and levels of GBA1 • Extends survival	[147]
	α-synucleinopathy	Mouse	100 mg/kg	• Reduces aggregates in dopaminergic neurons	[132]
Ambroxol	GD	Patients fibroblasts	20–125 μM	• Ensure good conformation and stability • Increases GBA1 enzymatic activity • Reduces GlcCer storage	[135]
	GD	Patients fibroblasts	0.3–10 mM	• Improves the activity of GBA1 • Neither toxicity in vivo	[134]
	GD	Patients	150 mg/d	• Safe • No adverse effects	[142]
	GD	Patients fibroblasts	60 μM	• Reduces ROS production • Improves the activity of GBA1	[136]
	GD	Patients	1.3 g/d	• Increases the activity of GBA1 • Reduces of myoclonus • Improves motor functions	[143]
	GD	Patients	21 mg/kg/d	• No effect	[148]
	GD	Patients	27 mg/kg/d	• Beneficial effects on neurological manifestation progression	[148]
	PD	Mouse	4 mM	• Increases brain GBA1 activity • Reduces α-synuclein levels	[137]
	PD	Neural crest stem cells line from PD and GBA1 mutations patients	60 μM	• Improves lysosomal process • Reduces α-synuclein levels	[114]
	PD	Non-human primate	100 mg/d	• Increases brain GBA1 activity	[138]
	PD	Patients	1.23 g/d	• Safety • Cross the BBB • Modulation of GBA activities • Stimulation of lysosomal activity	[144]
	ALS	Mouse	3 mM	• Prevents the loss of muscle strength • Delays disease progression • Extends survival	[139]

AD: Alzheimer's disease, ALS: amyotrophic lateral sclerosis, BBB: blood brain barrier, GBA: glucocerebrosidase, GD: Gaucher disease, GlcCer: glucosylceramide, PD: Parkinson's disease, ROS: reactive oxygen species

symptoms by decreasing myoclonus in Gaucher disease patients [143]. Recently, a phase II clinical trial, which aimed to assess the therapeutic potential of ambroxol in Parkinson's disease patients with or without *GBA1* mutations was carried out [144] (NCT02941822). Interim results for this trial are positive. Seventeen patients (8 with *GBA1* mutations, 9 without) received increasing doses of ambroxol (up to 420 mg, 3 times a day at the end of the study). Ambroxol did not cause any specific side effects and was well tolerated by patients. Given that ambroxol crosses BBB [144], this molecule seems to be a promising therapeutic candidate for the treatment of diseases that are characterized by defective GBA1 enzyme activity in parallel with the accumulation of misfolded proteins.

6. Conclusion

The pathophysiological mechanisms that underpin neurodegeneration are complex. The deregulation of sphingolipid metabolism appears to be common across a number of neurodegenerative diseases, yet the mechanisms by which the dysregulation in sphingolipid metabolism contributes to the degenerative process remains to be elucidated. While the targeting of sphingolipid metabolism has reached clinical stages for Parkinson's disease, this is yet to occur in Alzheimer's disease or ALS. Nonetheless, results in mouse models of neurodegenerative diseases, and in particular ALS, highlight that the modulation of sphingolipid metabolism may be beneficial. Future studies that clarify the role of sphingolipids in neurodegeneration, with the view to translate this knowledge into clinical trials and effective drug treatments are desperately needed.

Funding

The work was supported by AREMANE, FightMND, and Target ALS. Alexandra Bouscary is supported by AREMANE and André combat la SLA. The work was supported by "Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives" (AREMANE, Jean-Philippe Loeffler), and the "Association française contre les myopathies" (AFM, Jean-Philippe Loeffler). Cyril Quessada was supported by "Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives" and from Fight MND foundation. Shyuan T. Ngo is supported by a FightMND Mid-Career Research Fellowship. Bradley J. Turner was supported by an Australian NHMRC-ARC Dementia Research Leadership Fellowship. Bradley J. Turner, Michael Spedding,

Shyuan T. Ngo, and Jean-Philippe Loeffler are currently receiving funds from FightMND.

Author contributions

Alexandra Bouscary and Cyril Quessada did the literature search and wrote the article. All authors contributed to the critical revision of the manuscript.

Patents

Henriques, Loeffler and Spedding hold a patent entitled "Inhibitors of Glucosylceramide Degradation in the Treatment of Diseases of the Motor Units".

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

[1] J. Tamiji, D.A. Crawford, The neurobiology of lipid metabolism in autism spectrum disorders, NeuroSignals 18 (2011) 98–112, https://doi.org/10.1159/000323189.
[2] C. Fasano, A. Hiol, J.P. Miolan, J.P. Niel, Les sphingolipides: vecteurs d'agents pathogènes et cause de maladies génétiques, Med. Sci. 22 (2006) 411–415, https://doi.org/10.1051/medsci/2006224411.
[3] G. D'Angelo, S. Capasso, L. Sticco, D. Russo, Glycosphingolipids: synthesis and functions, FEBS J. 280 (2013) 6338–6353, https://doi.org/10.1111/febs.12559.
[4] G. D'Angelo, T. Uemura, C.C. Chuang, E. Polishchuk, M. Santoro, H. Ohvo-Rekilä, T. Sato, G. Di Tullio, A. Varriale, S. D'Auria, T. Daniele, F. Capuani, L. Johannes, P. Mattjus, M. Monti, P. Pucci, R.L. Williams, J.E. Burke, F.M. Platt, A. Harada, M. A. De Matteis, Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi, Nature 501 (2013) 116–120, https://doi.org/10.1038/nature12423.
[5] T.J. Tracey, F.J. Steyn, E.J. Wolvetang, S.T. Ngo, Neuronal lipid metabolism: multiple pathways driving functional outcomes in health and disease, Front. Mol. Neurosci. 11 (2018) 1–25, https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00010.
[6] N. Baumann, D. Pham-Dinh, Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system, Physiol. Rev. 81 (2001) 871–927, https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.871.
[7] A.S.B. Olsen, N.J. Færgeman, Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases, Open Biol. 7 (2017), https://doi.org/10.1098/rsob.170069.
[8] N. Schaeren-Wiemers, P. Van Der Bijl, M.F. Schwab, The UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase: expression pattern in oligodendrocytes and schwann cells during myelination and substrate preference for hydroxyceramide, J. Neurochem. 65 (1995) 2267–2278, https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65052267.x.
[9] R.K. Yu, Y.T. Tsai, T. Ariga, Functional roles of gangliosides in Neurodevelopment: an overview of recent advances, Neurochem. Res. 37 (2012) 1230–1244, https://doi.org/10.1007/s11064-012-0744-y.
[10] R.K. Yu, Y. Nakatani, M. Yanagisawa, The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain, J. Lipid Res. 50 (2009) 440–445, https://doi.org/10.1194/jlr.R800028-JLR200.
[11] R.K. Yu, L.J. Macala, T. Taki, H.M. Weinfeld, F.S. Yu, Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain, J. Neurochem. 50 (1988) 1825–1829, https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb02484.x.
[12] K. Palmano, A. Rowan, R. Guillermo, J. Guan, P. McJarrow, The role of gangliosides in neurodevelopment, Nutrients 7 (2015) 3891–3913, https://doi.org/10.3390/nu7053891.
[13] J. Wang, A. Cheng, C. Wakade, R.K. Yu, Ganglioside GD3 is required for neurogenesis and long-term maintenance of neural stem cells in the postnatal mouse brain, J. Neurosci. 34 (2014) 13790–13800, https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2275-14.2014.
[14] V.T. Ribeiro-Resende, T.A. Gomes, S. De Lima, M. Nascimento-Lima, M. Bargas-Rega, M.F. Santiago, R.A. De Melo Reis, F.G. De Mello, , Mice lacking GD3 synthase display morphological abnormalities in the sciatic nerve and neuronal disturbances during peripheral nerve regeneration, PLoS One 9 (2014) 1–12, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108919.
[15] M. Aureli, M. Samarani, V. Murdica, L. Mauri, N. Loberto, R. Bassi, A. Prinetti, S. Sonnino, Gangliosides and cell surface ganglioside glycohydrolases in the nervous system, Adv. Neurobiol. (2014) 223–244, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1154-7_10.
[16] M. Aureli, N. Loberto, P. Lanteri, V. Chigorno, A. Prinetti, S. Sonnino, Cell surface sphingolipid glycohydrolases in neuronal differentiation and aging in culture, J. Neurochem. 116 (2011) 891–899, https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07019.x.
[17] R. Harel, A.H. Futerman, Inhibition of sphingolipid synthesis affects axonal outgrowth in cultured hippocampal neurons, J. Biol. Chem. 268 (1993) 14476–14481.
[18] S. Furuya, K. Ono, Y. Hirabayashi, Sphingolipid biosynthesis is necessary for dendrite growth and survival of cerebellar purkinje cells in culture, J. Neurochem. 65 (1995) 1551–1561, https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65041551.x.
[19] R. Jennemann, R. Sandhoff, S. Wang, E. Kiss, N. Gretz, C. Zuliani, A. Martin-Villalba, R. Jäger, H. Schorle, M. Kenzelmann, M. Bonrouhi, H. Wiegandt, H. J. Gröne, Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 12459–12464, https://doi.org/10.1073/pnas.0500893102.
[20] J.U. Jung, K. Ko, D.H. Lee, K. Ko, K.T. Chang, Y.K. Choo, The roles of glycosphingolipids in the proliferation and neural differentiation of mouse embryonic stem cells, Exp. Mol. Med. 41 (2009) 935–945, https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.12.099.
[21] J.A. Allen, R.A. Halverson-Tamboli, M.M. Rasenick, Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling, Nat. Rev. Neurosci. 8 (2007) 128–140, https://doi.org/10.1038/nrn2059.
[22] G. Van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 101 (2009) 1–4, https://doi.org/10.1038/nrm2330. Membrane.
[23] A. Prinetti, N. Loberto, V. Chigorno, S. Sonnino, Glycosphingolipid behaviour in complex membranes, Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1788 (2009) 184–193, https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.001.
[24] E. Posse de Chaves, S. Sipione, Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction, FEBS Lett. 584 (2010) 1748–1759, https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.010.
[25] S.N. Pinto, L.C. Silva, A.H. Futerman, M. Prieto, Effect of ceramide structure on membrane biophysical properties: the role of acyl chain length and unsaturation, Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1808 (2011) 2753–2760, https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.023.
[26] B.M. Castro, M. Prieto, L.C. Silva, Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties, Prog. Lipid Res. 54 (2014) 53–67, https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.01.004.
[27] E. Kiyokawa, T. Baba, N. Otsuka, A. Makino, S. Ohno, T. Kobayashi, Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains, J. Biol. Chem. 280 (2005) 24072–24084, https://doi.org/10.1074/jbc.M502244200.
[28] M. Trayssac, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Role of sphingolipids in senescence: Implication in aging and age-related diseases, J. Clin. Invest. 128 (2018) 2702–2712, https://doi.org/10.1172/JCI97949.
[29] R. Ledeen, G. Wu, Gangliosides of the nervous system, 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8552-4_2.
[30] S.J. Rabin, I. Mocchetti, G.M.1 Ganglioside, Activates the high-affinity nerve growth factor receptor trkA, J. Neurochem. 65 (1995) 347–354, https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65010347.x.
[31] M. Pitto, T. Mutoh, M. Kuriyama, A. Ferraretto, P. Palestini, M. Masserini, Influence of endogenous GM1 ganglioside on TrkB activity, in cultured neurons, FEBS Lett. 439 (1998) 93–96, https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01344-1.
[32] A.M. Duchemin, Q. Ren, L. Mo, N.H. Neff, M. Hadjiconstantinou, GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain, J. Neurochem 81 (2002) 696–707, https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00831.x.
[33] G. Wu, X. Xie, Z.H. Lu, R.W. Ledeen, Sodium-calcium exchanger complexed with GM1 ganglioside in nuclear membrane transfers calcium from nucleoplasm to endoplasmic reticulum, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 10829–10834, https://doi.org/10.1073/pnas.0903408106.
[34] Y.-T. Tsai, Y. Itokazu, R.K. Yu, GM1 ganglioside is involved in epigenetic activation loci of neuronal cells, Neurochem. Res. 41 (2016) 107–115, https://doi.org/10.1007/s11064-015-1742-7.
[35] X. Xie, G. Wu, Z.H. Lu, R.W. Ledeen, Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside, J. Neurochem 81 (2002) 1185–1195, https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00917.x.
[36] B. Pan, S.E. Fromholt, E.J. Hess, T.O. Crawford, J.W. Griffin, K.A. Sheikh, R. L. Schnaar, Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice, Exp. Neurol. 195 (2005) 208–217, https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.04.017.
[37] P.H. Lopez, R.L. Schnaar, Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation, Curr. Opin. Struct. Biol. 19 (2009) 549–557, https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.06.001.
[38] T. Yamashita, Y.P. Wu, R. Sandhoff, N. Werth, H. Mizukami, J.M. Ellis, J. L. Dupreell, R. Geyer, K. Sandhoff, R.L. Proia, Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glial interactions, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 2725–2730, https://doi.org/10.1073/pnas.0407785102.
[39] F.J. Roisen, H. Bartfeld, R. Nagele, G. Yorke, Ganglioside stimulation of axonal sprouting in vitro, Science 214 (1981) 577–578, https://doi.org/10.1126/science.7291999.
[40] M.C. Byrne, R.W. Ledeen, F.J. Roisen, G. Yorke, J.R. Sclafani, Ganglioside-induced neuritogenesis: verification that gangliosides are the active agents, and comparison of molecular species, J. Neurochem. 41 (1983) 1214–1222, https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1983.tb00814.x.
[41] A. Ferreira, J. Busciglio, C. Landa, A. Caceres, Ganglioside-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of high-molecular-weight MAP-2, J. Neurosci. 10 (1990) 293–302, https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-01-00293.1990.

[42] T. Mutoh, A. Tokuda, T. Miyadai, M. Hamaguchi, N. Fujiki, Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (1995) 5087–5091, https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.5087.

[43] T. Mutoh, T. Hamano, S. Yano, H. Koga, H. Yamamoto, K. Furukawa, R. W. Ledeen, Stable transfection of GM1 synthase gene into GM1-deficient NG108-15 cells, CR-72 cells, rescues the responsiveness of Trk-neurotrophin receptor to its ligand, NGF, Neurochem. Res 27 (2002) 801–806, https://doi.org/10.1023/A:1020209008169.

[44] S. Fukumoto, T. Mutoh, T. Hasegawa, H. Miyazaki, M. Okada, G. Goto, K. Furukawa, T. Urano, K. Furukawa, GD3 synthase gene expression in PC12 cells results in the continuous activation of TrkA and ERK1/2 and enhanced proliferation, J. Biol. Chem. 275 (2000) 5832–5838, https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5832.

[45] K. Furukawa, Y. Ohmi, Y. Ohkawa, O. Tajima, K. Furukawa, Glycosphingolipids in the regulation of the nervous system, 2014, pp. 307–320. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1154-7_14.

[46] S.J. Rabin, A. Bachis, I. Mocchetti, Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins, J. Biol. Chem. 277 (2002) 49466–49472, https://doi.org/10.1074/jbc.M203240200.

[47] A. Bachis, S.J. Rabin, M.D. Fiacco, I. Mocchetti, Gangliosides prevent excitotoxicity through activation of TrkB receptor, Neurotox. Res. 4 (2002) 225–234, https://doi.org/10.1080/10298420290015836.

[48] K.C. Arthur, A. Calvo, T.R. Price, J.T. Geiger, A. Chiò, B.J. Traynor, Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040, Nat. Commun. 7 (2016) 1–6, https://doi.org/10.1038/ncomms12408.

[49] J.C. Dodge, Lipid involvement in neurodegenerative diseases of the motor system: insights from lysosomal storage diseases, Front. Mol. Neurosci. 10 (2017) 1–14, https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00356.

[50] M.A. van Es, O. Hardiman, A. Chio, A. Al-Chalabi, R.J. Pasterkamp, J.H. Veldink, L.H. van den Berg, Amyotrophic lateral sclerosis, Lancet 390 (2017) 2084–2098, https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31287-4.

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

[52] J.C. Desport, P.M. Preux, L. Magy, Y. Boirie, J.M. Vallat, B. Beaufrère, P. Couratier, Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis, Am. J. Clin. Nutr. 74 (2001) 328–334, https://doi.org/10.1093/ajcn/74.3.328.

[53] P.F. Pradat, G. Bruneteau, P.H. Gordon, L. Dupuis, D. Bonnefont-Rousselot, D. Simon, F. Salachas, P. Corcia, V. Frochot, J.M. Lacorte, C. Jardel, C. Coussieu, N. Le Forestier, L. Lacomblez, J.P. Loeffler, V. Meininger, Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis, Amyotroph. Lateral Scler. 11 (2010) 166–171, https://doi.org/10.3109/17482960902822960.

[54] L. Dupuis, P.F. Pradat, A.C. Ludolph, J.P. Loeffler, Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis, Lancet Neurol. 10 (2011) 75–82, https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70224-6.

[55] C. Bouteloup, J.C. Desport, P. Clavelou, N. Guy, H. Derumeaux-Burel, A. Ferrier, P. Couratier, Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon, J. Neurol. 256 (2009) 1236–1242, https://doi.org/10.1007/s00415-009-5100-z.

[56] B. Funalot, J.C. Desport, F. Sturtz, W. Camu, P. Couratier, High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis, Amyotroph. Lateral Scler. 10 (2009) 113–117, https://doi.org/10.1080/17482960802295192.

[57] R.S. Peter, A. Rosenbohm, L. Dupuis, T. Brehme, J. Kassubek, D. Rothenbacher, G. Nagel, A.C. Ludolph, Life course body mass index and risk and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: results from the ALS registry Swabia, Eur. J. Epidemiol. 32 (2017) 901–908, https://doi.org/10.1007/s10654-017-0318-z.

[58] L. Dupuis, P. Corcia, A. Fergani, J.-L. Gonzalez De Aguilar, D. Bonnefont-Rousselot, R. Bittar, D. Seilhean, J.-J. Hauw, L. Lacomblez, J.-P. Loeffler, V. Meininger, Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis, Neurology 70 (2008) 1004–1009, https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27.

[59] P. Jésus, P. Fayemendy, M. Nicol, G. Lautrette, H. Sourisseau, P.M. Preux, J. C. Desport, B. Marin, P. Couratier, Hypermetabolism is a deleterious prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis, Eur. J. Neurol. 25 (2018) 97–104, https://doi.org/10.1111/ene.13468.

[60] F.J. Steyn, Z.A. Ioannides, R.P.A. Van Eijk, S. Heggie, K.A. Thorpe, A. Ceslis, S. Heshmat, A.K. Henders, N.R. Wray, L.H. Van Den Berg, R.D. Henderson, P. A. McCombe, S.T. Ngo, Hypermetabolism in ALS is associated with greater functional decline and shorter survival, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 89 (2018) 1016–1023, https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317887.

[61] L. Dupuis, H. Oudart, F. René, J.L. Gonzalez De Aguilar, J.P. Loeffler, 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 (2004) 11159–11164, https://doi.org/10.1073/pnas.0402026101.

[62] J. Dorst, J. Cypionka, A.C. Ludolph, High-caloric food supplements in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: a prospective interventional study, Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener. 14 (2013) 533–536, https://doi.org/10.3109/21678421.2013.823999.

[63] R.M. Ahmed, E. Highton-Williamson, J. Caga, N. Thornton, E. Ramsey, M. Zoing, W.S. Kim, G.M. Halliday, O. Piguet, J.R. Hodges, I.S. Farooqi, M.C. Kiernan, Lipid metabolism and survival across the frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: relationships to eating behavior and cognition, J. Alzheimer's Dis. 61 (2017) 773–783, https://doi.org/10.3233/JAD-170660.

[64] R. Huang, X. Guo, X. Chen, Z. Zheng, Q. Wei, B. Cao, Y. Zeng, H. Shang, The serum lipid profiles of amyotrophic lateral sclerosis patients: a study from south-west China and a meta-analysis, Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener. 16 (2015) 359–365, https://doi.org/10.3109/21678421.2015.1047454.

[65] A.C. Ludolph, J. Dorst, J. Dreyhaupt, J.H. Weishaupt, J. Kassubek, U. Weiland, T. Meyer, S. Petri, A. Hermann, A. Emmer, J. Grosskreutz, T. Grehl, D. Zeller, M. Boentert, B. Schrank, J. Prudlo, A.S. Winkler, S. Gorbulev, F. Roselli, J. Schuster, L. Dupuis, Effect of high-caloric nutrition on survival in amyotrophic lateral sclerosis, Ann. Neurol. 87 (2020) 206–216, https://doi.org/10.1002/ana.25661.

[66] R.G. Cutler, W.A. Pedersen, S. Camandola, J.D. Rothstein, M.P. Mattson, Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress – induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis, Ann. Neurol. 52 (2002) 448–457, https://doi.org/10.1002/ana.10312.

[67] A. Henriques, V. Croixmarie, D.A. Priestman, A. Rosenbohm, S. Dirrig-Grosch, E. D'Ambra, M. Huebecker, G. Hussain, C. Boursier-Neyret, A. Echaniz-Laguna, A. C. Ludolph, F.M. Platt, B. Walther, M. Spedding, J.P. Loeffler, J.L.G. De Aguilar, Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase, Hum. Mol. Genet. 24 (2015) 7390–7405, https://doi.org/10.1093/hmg/ddv439.

[68] J.C. Dodge, C.M. Treleaven, J. Pacheco, S. Cooper, C. Bao, M. Abraham, M. Cromwell, S.P. Sardi, W.L. Chuang, R.L. Sidman, S.H. Cheng, L. S. Shihabuddin, Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112 (2015) 8100–8105, https://doi.org/10.1073/pnas.1508767112.

[69] A. Henriques, V. Croixmarie, A. Bouscary, A. Moshach, C. Keime, C. Boursier-Neyret, B. Walter, M. Spedding, J.P. Loeffler, Sphingolipid metabolism is dysregulated at transcriptomic and metabolic levels in the spinal cord of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis, Front. Mol. Neurosci. 10 (2018) 1–14, https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00433.

[70] H. Blasco, C. Veyrat-Durebex, C. Bocca, F. Patin, P. Vourc'H, J. Kouassi Nzoughet, G. Lenaers, C.R. Andres, G. Simard, P. Corcia, P. Reynier, Lipidomics reveals cerebrospinal-fluid signatures of ALS, Sci. Rep. 7 (2017) 1–10, https://doi.org/10.1038/s41598-017-17389-9.

[71] H. Blasco, F. Patin, A. Descat, G. Garçon, P. Corcia, P. Gelé, T. Lenglet, P. Bede, V. Meininger, D. Devos, J.F. Gossens, P.F. Pradat, A pharmaco-metabolomics approach in a clinical trial of ALS: Identification of predictive markers of progression, PLoS One 13 (2018) 1–14, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198116.

[72] A. Pestronk, R.N. Adams, L. Clawson, D. Cornblath, R.W. Kuncl, D. Griffin, D. B. Drachman, Serum antibodies to GM1 ganglioside in amyotrophic lateral sclerosis, Neurology 38 (1988), https://doi.org/10.1212/WNL.38.9.1457.

[73] A. Pestronk, R.N. Adams, D. Cornblath, R.W. Kuncl, D.B. Drachman, L.C. Rn, Patterns of serum IgM antibodies to GM1 and GD1a gangliosides in amyotrophic lateral sclerosis, Ann. Neurol. 25 (1989) 98–102, https://doi.org/10.1002/ana.410250118.

[74] M.M. Rapport, H. Donnenfeld, W. Brunner, B. Hungund, H. Bartfeld, Ganglioside patterns in amyotrophic lateral sclerosis brain regions, Ann. Neurol. 18 (1985) 60–67, https://doi.org/10.1002/ana.410180111.

[75] G. Dawson, K. Stefansson, Gangliosides of human spinal cord: aberrant composition of cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis, J. Neurosci. Res. 12 (1984) 213–220, https://doi.org/10.1002/jnr.490120209.

[76] W.G. Bradley, Double-blind controlled trial of purified brain gangliosides in amyotrophic lateral sclerosis and experience with peripheral neuropathies, 1984, pp. 565–573. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1200-0_47.

[77] M. Hallett, H. Harrington, H.R. Tyler, T. Flood, N. Slater, Trials of ganglioside therapy for amyotrophic lateral sclerosis and diabetic neuropathy, 1984, pp. 575–579. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1200-0_48.

[78] H. Harrington, M. Hallett, H.R. Tyler, Ganglioside therapy for amyotrophic lateral sclerosis: a double-blind con trolled trial, Neurology 34 (1984), https://doi.org/10.1212/WNL.34.8.1083.

[79] X. Xu, A. Denic, L.R. Jordan, N.J. Wittenberg, A.E. Warrington, B. Wootla, L. M. Papke, L.J. Zoecklein, D. Yoo, J. Shaver, S.H. Oh, L.R. Pease, M. Rodriguez, A natural human IgM that binds to gangliosides is therapeutic in murine models of amyotrophic lateral sclerosis, DMM Dis. Model. Mech. 8 (2015) 831–842, https://doi.org/10.1242/dmm.020727.

[80] A. Henriques, M. Huebecker, H. Blasco, C. Keime, C.R. Andres, P. Corcia, D. A. Priestman, F.M. Platt, M. Spedding, J.P. Loeffler, Inhibition of β-glucocerebrosidase activity preserves motor unit integrity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, Sci. Rep. 7 (2017) 1–15, https://doi.org/10.1038/s41598-017-05313-0.

[81] K. Blennow, H. Hampel, M. Weiner, H. Zetterberg, Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease, Nat. Rev. Neurol. 6 (2010) 131–144, https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.4.

[82] A.M. Fagan, D. Head, A.R. Shah, D. Marcus, M. Mintun, J.C. Morris, D. M. Holtzman, Decreased cerebrospinal fluid Aβ 42 correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly, Ann. Neurol. 65 (2009) 176–183, https://doi.org/10.1002/ana.21559.

[83] T. Hartmann, J. Kuchenbecker, M.O.W. Grimm, Alzheimer's disease: the lipid connection, J. Neurochem. 103 (Suppl) (2007) 159–170, https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04715.x.

[84] K. Czubowicz, H. Jęśko, P. Wencel, W.J. Lukiw, R.P. Strosznajder, The role of ceramide and sphingosine-1-phosphate in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders, Mol. Neurobiol. 56 (2019) 5436–5455, https://doi.org/10.1007/s12035-018-1448-3.

[85] G. Van Echten-Deckert, J. Walter, Sphingolipids: critical players in Alzheimer's disease, Prog. Lipid Res. 51 (2012) 378–393, https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.07.001.
[86] M. Trayssac, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Role of sphingolipids in senescence: Implication in aging and age-related diseases, J. Clin. Invest. 128 (2018) 2702–2712, https://doi.org/10.1172/JCI97949.
[87] M. Kosicek, H. Zetterberg, N. Andreasen, J. Peter-Katalinic, S. Hecimovic, Elevated cerebrospinal fluid sphingomyelin levels in prodromal Alzheimer's disease, Neurosci. Lett. 516 (2012) 302–305, https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.04.019.
[88] F. Parveen, D. Bender, S.-H. Law, V.K. Mishra, C.-C. Chen, L.-Y. Ke, Role of ceramidases in sphingolipid metabolism and human diseases, Cells 8 (2019) 1573, https://doi.org/10.3390/cells8121573.
[89] A. Jana, K. Pahan, Fibrillar amyloid-β peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease, J. Biol. Chem. 279 (2004) 51451–51459, https://doi.org/10.1074/jbc.M404635200.
[90] M.O.W. Grimm, T.L. Rothhaar, T. Hartmann, The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism, Exp. Brain Res. 217 (2012) 365–375, https://doi.org/10.1007/s00221-011-2975-6.
[91] M.B. Dinkins, J. Enasko, C. Hernandez, G. Wang, J. Kong, I. Helwa, Y. Liu, A. V. Terry, E. Bieberich, Neutral sphingomyelinase-2 deficiency ameliorates Alzheimer's disease pathology and improves cognition in the 5XFAD mouse, J. Neurosci. 36 (2016) 8653–8667, https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1429-16.2016.
[92] A.V. Alessenko, A.E. Bugrova, L.B. Dudnik, Connection of lipid peroxide oxidation with the sphingomyelin pathway in the development of Alzheimer's disease, Biochem. Soc. Trans. 32 (2004) 144–146, https://doi.org/10.1042/BST0320144.
[93] H. Satoi, H. Tomimoto, R. Ohtani, T. Kitano, T. Kondo, M. Watanabe, N. Oka, I. Akiguchi, S. Furuya, Y. Hirabayashi, T. Okazaki, Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis, Neuroscience 130 (2005) 657–666, https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.056.
[94] N. Marks, M.J. Berg, M. Saito, M. Saito, Glucosylceramide synthase decrease in frontal cortex of Alzheimer brain correlates with abnormal increase in endogenous ceramides: consequences to morphology and viability on enzyme suppression in cultured primary neurons, Brain Res. 1191 (2008) 136–147, https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.066.
[95] J. Wang, G.W. Farr, D.H. Hall, F. Li, K. Furtak, L. Dreier, A.L. Horwich, An ALS-linked mutant SOD1 produces a locomotor defect associated with aggregation and synaptic dysfunction when expressed in neurons of Caenorhabditis elegans, PLoS Genet. 5 (2009), e1000350, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000350.
[96] V. Filippov, M.A. Song, K. Zhang, H.V. Vinters, S. Tung, W.M. Kirsch, J. Yang, P. J. Duerksen-Hughes, Increased ceramide in brains with alzheimer's and other neurodegenerative diseases, J. Alzheimer's Dis. 29 (2012) 537–547, https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111202.
[97] M.M. Mielke, V.V.R. Bandaru, N.J. Haughey, P.V. Rabins, C.G. Lyketsos, M. C. Carlson, Serum sphingomyelins and ceramides are early predictors of memory impairment, Neurobiol. Aging 31 (2010) 17–24, https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.03.011.
[98] M.M. Mielke, V.V.R. Bandaru, N.J. Haughey, J. Xia, L.P. Fried, S. Yasar, M. Albert, V. Varma, G. Harris, E.B. Schneider, P.V. Rabins, K. Bandeen-Roche, C. G. Lyketsos, M.C. Carlson, Serum ceramides increase the risk of Alzheimer disease: the Women's health and aging study II, Neurology 79 (2012) 633–641, https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318264e380.
[99] Y. Xing, Y. Tang, L. Zhao, Q. Wang, W. Qin, X. Ji, J. Zhang, J. Jia, Associations between plasma ceramides and cognitive and neuropsychiatric manifestations in Parkinson's disease dementia, J. Neurol. Sci. 370 (2016) 82–87, https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.09.028.
[100] L. Puglielli, B.C. Ellis, A.J. Saunders, D.M. Kovacs, Ceramide stabilizes β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid β-peptide biogenesis, J. Biol. Chem. 278 (2003) 19777–19783, https://doi.org/10.1074/jbc.M300466200.
[101] J.K. Lee, H.K. Jin, M.H. Park, B.R. Kim, P.H. Lee, H. Nakauchi, J.E. Carter, X. He, E.H. Schuchman, J.S. Bae, Acid sphingomyelinase modulates the autophagic process by controlling lysosomal biogenesis in Alzheimer's disease, J. Exp. Med. 211 (2014) 1551–1570, https://doi.org/10.1084/jem.20132451.
[102] M.H. Lu, W.L. Ji, D.E. Xu, P.P. Yao, X.Y. Zhao, Z.T. Wang, L.P. Fang, R. Huang, L. J. Lan, J.B. Chen, T.H. Wang, L.H. Cheng, R.X. Xu, C.F. Liu, L. Puglielli, Q.H. Ma, Inhibition of sphingomyelin synthase 1 ameliorates alzheimer-like pathology in APP/PS1 transgenic mice through promoting lysosomal degradation of BACE1, Exp. Neurol. 311 (2019) 67–79, https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.09.012.
[103] M. Horowitz, D. Elstein, A. Zimran, O. Goker-Alpan, New directions in gaucher disease, Hum. Mutat. 37 (2016) 1121–1136, https://doi.org/10.1002/humu.23056.
[104] S. Mullin, D. Hughes, A. Mehta, A.H.V. Schapira, Neurological effects of glucocerebrosidase gene mutations, Eur. J. Neurol. 26 (2019) 388–e29, https://doi.org/10.1111/ene.13837.
[105] T.M. Cox, J.P. Schofield, Gaucher's disease: clinical features and natural history, 1997. https://doi.org/10.1016/S0950-3536(97)80033-9.
[106] N. Dekker, T. Voorn-Brouwer, M. Verhoek, T. Wennekes, R.S. Narayan, D. Speijer, C.E.M. Hollak, H.S. Overkleeft, R.G. Boot, J.M.F.G. Aerts, The cytosolic β-glucosidase GBA3 does not influence type 1 Gaucher disease manifestation, Blood Cells, Mol. Dis. 46 (2011) 19–26, https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.07.009.
[107] M.J. Barrett, P. Giraldo, J.L. Capablo, P. Alfonso, P. Irun, B. Garcia-Rodriguez, M. Pocovi, G.M. Pastores, Greater risk of parkinsonism associated with non-N370S GBA1 mutations, J. Inherit. Metab. Dis. 36 (2013) 575–580, https://doi.org/10.1007/s10545-012-9527-5.
[108] J. Mitsui, I. Mizuta, A. Toyoda, R. Ashida, Y. Takahashi, J. Goto, Y. Fukuda, H. Date, A. Iwata, M. Yamamoto, N. Hattori, M. Murata, T. Toda, S. Tsuji, Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease, Arch. Neurol. 66 (2009) 571–576, https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.72.
[109] G. O'Regan, R.M. Desouza, R. Balestrino, A.H. Schapira, Glucocerebrosidase mutations in parkinson disease, J. Park. Dis. 7 (2017) 411–422, https://doi.org/10.3233/JPD-171092.
[110] E. Sidransky, M.A. Nalls, J.O. Aasly, G. Annesi, E.R. Barbosa, A. Bar-shira, D. Berg, J. Bras, A. Brice, L.N. Clark, C. Condroyer, A. Rolfs, H. Rosenbaum, R. Rozenberg, A. Samii, M. Spitz, E. Tan, N. Tayebi, T. Toda, Multicenter_GBAmutations_PD 361 (2010) 1651–1661. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901281.Multi-center.
[111] A.H.V. Schapira, Glucocerebrosidase and Parkinson disease: recent advances, Mol. Cell. Neurosci. 66 (2015) 37–42, https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.03.013.
[112] I. Stojkovska, D. Krainc, J.R. Mazzulli, Molecular mechanisms of α-synuclein and GBA1 in Parkinson's disease, Cell Tissue Res. 373 (2018) 51–60, https://doi.org/10.1007/s00441-017-2704-y.
[113] T. Shachar, C. Lo Bianco, A. Recchia, C. Wiessner, A. Raas-Rothschild, A. H. Futerman, Lysosomal storage disorders and Parkinson's disease: Gaucher disease and beyond, Mov. Disord. 26 (2011) 1593–1604, https://doi.org/10.1002/mds.23774.
[114] S.Y. Yang, M. Beavan, K.Y. Chau, J.W. Taanman, A.H.V. Schapira, A human neural crest stem cell-derived dopaminergic neuronal model recapitulates biochemical abnormalities in GBA1 mutation carriers, Stem Cell Rep. 8 (2017) 728–742, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.011.
[115] J.R. Mazzulli, F. Zunke, T. Tsunemi, N.J. Toker, S. Jeon, L.F. Burbulla, S. Patnaik, E. Sidransky, J.J. Marugan, C.M. Sue, D. Krainc, Activation of β-glucocerebrosidase reduces pathological α-synuclein and restores lysosomal function in Parkinson's patient midbrain neurons, J. Neurosci. 36 (2016) 7693–7706, https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0628-16.2016.
[116] E. Rockenstein, J. Clarke, C. Viel, N. Panarello, C.M. Treleaven, C. Kim, B. Spencer, A. Adame, H. Park, J.C. Dodge, S.H. Cheng, L.S. Shihabuddin, E. Masliah, S.P. Sardi, Glucocerebrosidase modulates cognitive and motor activities in murine models of Parkinson's disease, Hum. Mol. Genet. 25 (2016) 2645–2660, https://doi.org/10.1093/hmg/ddw124.
[117] J. Blanz, P. Saftig, Parkinson's disease: acid-glucocerebrosidase activity and alpha-synuclein clearance, J. Neurochem. 139 (2016) 198–215, https://doi.org/10.1111/jnc.13517.
[118] E. Sidransky, G. Lopez, The link between the GBA gene and parkinsonism, Lancet Neurol. 11 (2012) 986–998, https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70190-4.
[119] F. Schmitt, G. Hussain, L. Dupuis, J.P. Loeffler, A. Henriques, A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure, Front. Cell. Neurosci. 8 (2014) 1–10, https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00025.
[120] M. Bigaud, D. Guerini, A. Billich, F. Bassilana, V. Brinkmann, Second generation S1P pathway modulators: Research strategies and clinical developments, Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids 1841 (2014) 745–758, https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.001.
[121] J. Ceccom, N. Loukh, V. Lauwers-Cances, C. Touriol, Y. Nicaise, C. Gentil, E. Uro-Coste, S. Pitson, C.A. Maurage, C. Duyckaerts, O. Cuvillier, M.B. Delisle, Reduced sphingosine kinase-1 and enhanced sphingosine 1-phosphate lyase expression demonstrate deregulated sphingosine 1-phosphate signaling in Alzheimer's disease, Acta Neuropathol. Commun. 2 (2014) 1–10, https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-12.
[122] A. Di Pardo, V. Maglione, Sphingolipid metabolism: a new therapeutic opportunity for brain degenerative disorders, Front. Neurosci. 12 (2018) 1–8, https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00249.
[123] S. Grassi, L. Mauri, S. Prioni, L. Cabitta, S. Sonnino, A. Prinetti, P. Giussani, Sphingosine 1-phosphate receptors and metabolic enzymes as druggable targets for brain diseases, Front. Pharmacol. 10 (2019) 1–20, https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00807.
[124] G. Vidal-Martinez, K. Najera, J.D. Miranda, C. Gil-Tommee, B. Yang, J. Vargas-Medrano, V. Diaz-Pacheco, R.G. Perez, FTY720 improves behavior, increases brain derived neurotrophic factor levels and reduces α-synuclein pathology in parkinsonian GM2 −/− mice, Neuroscience 411 (2019) 1–10, https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.029.
[125] M. Asle-Rousta, Z. Kolahdooz, S. Oryan, A. Ahmadiani, L. Dargahi, FTY720 (Fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (Aβ42)- induced impairment of spatial learning and memory in rats, J. Mol. Neurosci. 50 (2013) 524–532, https://doi.org/10.1007/s12031-013-9979-6.
[126] M. Asle-Rousta, Z. Kolahdooz, L. Dargahi, A. Ahmadiani, S. Nasoohi, Prominence of central sphingosine-1-phosphate receptor-1 in attenuating Aβ-induced injury by fingolimod, J. Mol. Neurosci. 54 (2014) 698–703, https://doi.org/10.1007/s12031-014-0423-3.
[127] N. Takasugi, T. Sasaki, I. Ebinuma, S. Osawa, H. Isshiki, K. Takeo, T. Tomita, T. Iwatsubo, FTY720/Fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid-β production in neurons, PLoS One 8 (2013) 1–8, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064050.
[128] M. Nazari, S. Keshavarz, A. Rafati, M.R. Namavar, M. Haghani, Fingolimod (FTY720) improves hippocampal synaptic plasticity and memory deficit in rats

following focal cerebral ischemia, Brain Res. Bull. 124 (2016) 95–102, https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.04.004.
[129] R.L. Potenza, R. De Simone, M. Armida, V. Mazziotti, A. Pèzzola, P. Popoli, L. Minghetti, Fingolimod: a disease-modifier drug in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, Neurotherapeutics 13 (2016) 918–927, https://doi.org/10.1007/s13311-016-0462-2.
[130] R.L. Lieberman, J.A. D'Aquino, D. Ringe, G.A. Petsko, Effects of pH and iminosugar pharmacological chaperones on lysosomal glycosidase structure and stability, Biochemistry 48 (2009) 4816–4827, https://doi.org/10.1021/bi9002265.
[131] Y. Sun, H. Ran, B. Liou, B. Quinn, M. Zamzow, W. Zhang, J. Bielawski, K. Kitatani, K.D.R. Setchell, Y.A. Hannun, G.A. Grabowski, Isofagomine in vivo effects in a neuronopathic gaucher disease mouse, PLoS One 6 (2011), https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019037.
[132] F. Richter, S.M. Fleming, M. Watson, V. Lemesre, L. Pellegrino, B. Ranes, C. Zhu, F. Mortazavi, C.K. Mulligan, P.C. Sioshansi, S. Hean, K. De La Rosa, R. Khanna, J. Flanagan, D.J. Lockhart, B.A. Wustman, S.W. Clark, M.F. Chesselet, A GCase chaperone improves motor function in a mouse model of synucleinopathy, Neurotherapeutics 11 (2014) 840–856, https://doi.org/10.1007/s13311-014-0294-x.
[133] M. Malerba, B. Ragnoli, Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update, Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 4 (2008) 1119–1129, https://doi.org/10.1517/17425255.4.8.1119.
[134] Z. Luan, L. Li, K. Higaki, E. Nanba, Y. Suzuki, K. Ohno, The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice, Brain Dev. 35 (2013) 317–322, https://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.05.008.
[135] G.H.B. Maegawa, M.B. Tropak, J.D. Buttner, B.A. Rigat, M. Fuller, D. Pandit, L. Tang, G.J. Kornhaber, Y. Hamuro, J.T.R. Clarke, D.J. Mahuran, Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease, J. Biol. Chem. 284 (2009) 23502–23516, https://doi.org/10.1074/jbc.M109.012393.
[136] A. McNeill, J. Magalhaes, C. Shen, K.Y. Chau, D. Hughes, A. Mehta, T. Foltynie, J. M. Cooper, A.Y. Abramov, M. Gegg, A.H.V. Schapira, Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells, Brain 137 (2014) 1481–1495, https://doi.org/10.1093/brain/awu020.
[137] A. Migdalska-Richards, L. Daly, E. Bezard, A.H.V. Schapira, Ambroxol effects in glucocerebrosidase and α-synuclein transgenic mice, Ann. Neurol. 80 (2016) 766–775, https://doi.org/10.1002/ana.24790.
[138] A. Migdalska-Richards, W.K.D. Ko, Q. Li, E. Bezard, A.H.V. Schapira, Oral ambroxol increases brain glucocerebrosidase activity in a nonhuman primate, Synapse 71 (2017) 17–19, https://doi.org/10.1002/syn.21967.
[139] A. Bouscary, C. Quessada, A. Mosbach, N. Callizot, M. Spedding, J. Loeffler-Philippe, A. Henriques, Ambroxol hydrochloride improves motor functions and extends survival in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis, Front. Pharmacol. 10 (2019), https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00883.
[140] A. Bouscary, C. Quessada, F. René, M. Spedding, A. Henriques, S. Ngo, J. P. Loeffler, Drug repositioning in neurodegeneration: an overview of the use of ambroxol in neurodegenerative diseases, Eur. J. Pharmacol. 884 (2020), 173446, https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173446.
[141] R.L. Lieberman, B.A. Wustman, P. Huertas, A.C. Powe, C.W. Pine, R. Khanna, M. G. Schlossmacher, D. Ringe, G.A. Petsko, Structure of acid β-glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease, Nat. Chem. Biol. 3 (2007) 101–107, https://doi.org/10.1038/nchembio850.
[142] A. Zimran, G. Altarescu, D. Elstein, Pilot study using ambroxol as a pharmacological chaperone in type 1 Gaucher disease, Blood Cells Mol. Dis. 50 (2013) 134–137, https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.09.006.
[143] A. Narita, K. Shirai, S. Itamura, A. Matsuda, A. Ishihara, K. Matsushita, C. Fukuda, N. Kubota, R. Takayama, H. Shigematsu, A. Hayashi, T. Kumada, K. Yuge, Y. Watanabe, S. Kosugi, H. Nishida, Y. Kimura, Y. Endo, K. Higaki, E. Nanba, Y. Nishimura, A. Tamasaki, M. Togawa, Y. Saito, Y. Maegaki, K. Ohno, Y. Suzuki, Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: a pilot study, Ann. Clin. Transl. Neurol. 3 (2016) 200–215, https://doi.org/10.1002/acn3.292.
[144] S. Mullin, L. Smith, K. Lee, G. D'Souza, P. Woodgate, J. Elflein, J. Hällqvist, M. Toffoli, A. Streeter, J. Hosking, W.E. Heywood, R. Khengar, P. Campbell, J. Hehir, S. Cable, K. Mills, H. Zetterberg, P. Limousin, V. Libri, T. Foltynie, A.H. V. Schapira, Ambroxol for the treatment of patients with Parkinson disease with and without glucocerebrosidase gene mutations: a nonrandomized, noncontrolled trial, JAMA Neurol. (2020) 1–8, https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.4611.
[145] R. Cipriani, J.C. Chara, A. Rodríguez-Antigüedad, C. Matute, FTY720 attenuates excitotoxicity and neuroinflammation, J. Neuroinflamm. 12 (2015) 1–14, https://doi.org/10.1186/s12974-015-0308-6.
[146] P. Zhao, X. Yang, L. Yang, M. Li, K. Wood, Q. Liu, X. Zhu, Neuroprotective effects of fingolimod in mouse models of Parkinson's disease, FASEB J. 31 (2017) 172–179, https://doi.org/10.1096/fj.201600751R.
[147] Y.H. Xu, Y. Sun, H. Ran, B. Quinn, D. Witte, G.A. Grabowski, Accumulation and distribution of β-synuclein and ubiquitin in the CNS of Gaucher disease mouse models, Mol. Genet. Metab. 102 (2011) 436–447, https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.12.014.
[148] Y.M. Kim, M.S. Yum, S.H. Heo, T. Kim, H.K. Jin, J.S. Bae, G.H. Seo, A. Oh, H. M. Yoon, H.T. Lim, H.W. Kim, T.S. Ko, H.S. Lim, M.J. Osborn, J. Tolar, C. Cozma, A. Rolfs, A. Zimran, B.H. Lee, H.W. Yoo, Pharmacologic properties of high-dose ambroxol in four patients with Gaucher disease and myoclonic epilepsy, J. Med. Genet. 57 (2020) 124–131, https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106132.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., Hamada, C., Tanaka, M., Akimoto, M., Nakamura, K., et al. (2017). Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet Neurology *16*, 505–512.

Abumrad, N.A., Perkins, R.C., Park, J.H., and Park, C.R. (1981). Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. J Biol Chem *256*, 9183–9191.

Abumrad, N.A., Park, J.H., and Park, C.R. (1984). Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein. J Biol Chem *259*, 8945–8953.

Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., and Grimaldi, P.A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. J Biol Chem *268*, 17665–17668.

Aggarwal, A. (2002). Detection of preclinical motor neurone loss in SOD1 mutation carriers using motor unit number estimation. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry *73*, 199–201.

Agosta, F., Pagani, E., Petrolini, M., Caputo, D., Perini, M., Prelle, A., Salvi, F., and Filippi, M. (2010). Assessment of White Matter Tract Damage in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Diffusion Tensor MR Imaging Tractography Study: Fig 1. AJNR Am J Neuroradiol *31*, 1457–1461.

Al-Chalabi, A., and Hardiman, O. (2013). The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. Nat Rev Neurol *9*, 617–628.

Al-Chalabi, A., Hardiman, O., Kiernan, M.C., Chiò, A., Rix-Brooks, B., and van den Berg, L.H. (2016). Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. The Lancet Neurology *15*, 1182–1194.

Aldakkak, M., Camara, A.K.S., Heisner, J.S., Yang, M., and Stowe, D.F. (2011). Ranolazine reduces Ca2+ overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. Pharmacological Research *64*, 381–392.

Alexianu, M.E., Kozovska, M., and Appel, S.H. (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. Neurology *57*, 1282–1289.

Allaman, I., Bélanger, M., and Magistretti, P.J. (2011). Astrocyte–neuron metabolic relationships: for better and for worse. Trends in Neurosciences *34*, 76–87.

Almer, G., Teismann, P., Stevic, Z., Halaschek-Wiener, J., Deecke, L., Kostic, V., and Przedborski, S. (2002). Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. Neurology *58*, 1277–1279.

Andersen, P.M., and Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? Nat Rev Neurol *7*, 603–615.

Anderson, D.M., Makarewich, C.A., Anderson, K.M., Shelton, J.M., Bezprozvannaya, S., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2016). Widespread control of calcium signaling by a family of SERCA-inhibiting micropeptides. Sci Signal *9*, ra119.

Appel, S.H., Zhao, W., Beers, D.R., and Henkel, J.S. (2011). The microglial-motoneuron dialogue in ALS. Acta Myol *30*, 4–8.

Armon, C. (2009). Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. 6.

Armon, C., and Traynor, B.J. (2019). High BMI is associated with low ALS risk: What does it mean? Neurology *93*, 189–191.

Arnold (1953). Amyotrophic lateral sclerosis; fifty cases observed on Guam. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration *14*, 501–506.

Arnold, W.D., Kline, D., Sanderson, A., Hawash, A.A., Bartlett, A., Novak, K.R., Rich, M.M., and Kissel, J.T. (2017). Open-label trial of ranolazine for the treatment of myotonia congenita. Neurology *89*, 710–713.

Ash, P.E.A., Bieniek, K.F., Gendron, T.F., Caulfield, T., Lin, W.-L., DeJesus-Hernandez, M., van Blitterswijk, M.M., Jansen-West, K., Paul, J.W., Rademakers, R., et al. (2013). Unconventional Translation of C9ORF72 GGGGCC Expansion Generates Insoluble Polypeptides Specific to c9FTD/ALS. Neuron *77*, 639–646.

Atkin, J.D., Scott, R.L., West, J.M., Lopes, E., Quah, A.K.J., and Cheema, S.S. (2005). Properties of slow- and fast-twitch muscle fibres in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neuromuscular Disorders *15*, 377–388.

Attwell, D., and Laughlin, S.B. (2001). An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain. J Cereb Blood Flow Metab *21*, 1133–1145.

Ayers, J.I., Fromholt, S., Koch, M., DeBosier, A., McMahon, B., Xu, G., and Borchelt, D.R. (2014). Experimental transmissibility of mutant SOD1 motor neuron disease. Acta Neuropathol *128*, 791–803.

Ayers, J.I., Fromholt, S.E., O'Neal, V.M., Diamond, J.H., and Borchelt, D.R. (2016). Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. Acta Neuropathol *131*, 103–114.

Barber, S.C., and Shaw, P.J. (2010). Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. Free Radical Biology and Medicine *48*, 629–641.

Barber, S.C., Mead, R.J., and Shaw, P.J. (2006). Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease *1762*, 1051–1067.

Barschke, P., Oeckl, P., Steinacker, P., Ludolph, A., and Otto, M. (2017). Proteomic studies in the discovery of cerebrospinal fluid biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. Expert Review of Proteomics *14*, 769–777.

Basso, M., Pozzi, S., Tortarolo, M., Fiordaliso, F., Bisighini, C., Pasetto, L., Spaltro, G., Lidonnici, D., Gensano, F., Battaglia, E., et al. (2013). Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem *288*, 15699–15711.

Beckman, J.S., Carson, M., Smith, C.D., and Koppenol, W.H. (1993). ALS, SOD and peroxynitrite. Nature *364*, 584.

Beers, D.R., Henkel, J.S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A.A., Siklos, L., McKercher, S.R., and Appel, S.H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 16021–16026.

Bellingham, M.C. (2011). A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade? CNS Neurosci Ther *17*, 4–31.

Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. N Engl J Med *330*, 585–591.

Bensimon, G., Lacomblez, L., Delumeau, J.C., Bejuit, R., Truffinet, P., and Meininger, V. (2002). A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. Journal of Neurology *249*, 609–615.

Bergouignan, A., Antoun, E., Momken, I., Schoeller, D.A., Gauquelin-Koch, G., Simon, C., and Blanc, S. (2013). Effect of contrasted levels of habitual physical activity on metabolic flexibility. J Appl Physiol (1985) *114*, 371–379.

Berlowitz, D.J., Howard, M.E., Fiore, J.F., Vander Hoorn, S., O'Donoghue, F.J., Westlake, J., Smith, A., Beer, F., Mathers, S., and Talman, P. (2016). Identifying who will benefit from non-invasive ventilation in amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease in a clinical cohort. J Neurol Neurosurg Psychiatry *87*, 280–286.

Bertholet, A.M., Kazak, L., Chouchani, E.T., Bogaczyńska, M.G., Paranjpe, I., Wainwright, G.L., Bétourné, A., Kajimura, S., Spiegelman, B.M., and Kirichok, Y. (2017). Mitochondrial Patch Clamp of Beige Adipocytes Reveals UCP1-Positive and UCP1-Negative Cells Both Exhibiting Futile Creatine Cycling. Cell Metab *25*, 811-822.e4.

Berthoud, H.-R. (2007). Interactions between the "cognitive" and "metabolic" brain in the control of food intake. Physiology & Behavior *91*, 486–498.

Bezaire, V., Bruce, C.R., Heigenhauser, G.J.F., Tandon, N.N., Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.J.F., Bonen, A., and Spriet, L.L. (2006). Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. Am J Physiol Endocrinol Metab *290*, E509-515.

Blasco, H., Corcia, P., Pradat, P.-F., Bocca, C., Gordon, P.H., Veyrat-Durebex, C., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Moreau, C., Devos, D., et al. (2013). Metabolomics in Cerebrospinal Fluid of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Untargeted Approach via High-Resolution Mass Spectrometry. J. Proteome Res. *12*, 3746–3754.

Blasco, H., Veyrat-Durebex, C., Bocca, C., Patin, F., Vourc'h, P., Kouassi Nzoughet, J., Lenaers, G., Andres, C.R., Simard, G., Corcia, P., et al. (2017). Lipidomics Reveals Cerebrospinal-Fluid Signatures of ALS. Sci Rep *7*, 17652.

Bogdanov, M., Brown, R.H., Matson, W., Smart, R., Hayden, D., O'Donnell, H., Flint Beal, M., and Cudkowicz, M. (2000). Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. Free Radical Biology and Medicine *29*, 652–658.

Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. Science, New Series *312*, 1389–1392.

Bonen, A., Luiken, J.J., Liu, S., Dyck, D.J., Kiens, B., Kristiansen, S., Turcotte, L.P., Van Der Vusse, G.J., and Glatz, J.F. (1998). Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles. Am J Physiol *275*, E471-478.

Bonen, A., Luiken, J.J.F.P., Arumugam, Y., Glatz, J.F.C., and Tandon, N.N. (2000). Acute Regulation of Fatty Acid Uptake Involves the Cellular Redistribution of Fatty Acid Translocase. Journal of Biological Chemistry *275*, 14501–14508.

Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.S., Guarnieri, M., Xu, Z.S., Wong, P.C., Brown, R.H., Price, D.L., Sisodia, S.S., and Cleveland, D.W. (1994). Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 8292–8296.

Borthwick, G.M., Johnson, M.A., Ince, P.G., Shaw, P.J., and Turnbull, D.M. (1999). Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. Ann Neurol *46*, 787–790.

Bosco, D.A., Morfini, G., Karabacak, N.M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B.A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., et al. (2010). Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. Nat Neurosci *13*, 1396–1403.

Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. FEBS Lett *408*, 39–42.

Bottinelli, R., Canepari, M., Reggiani, C., and Stienen, G.J. (1994). Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. The Journal of Physiology *481*, 663–675.

Bourke, S.C., Tomlinson, M., Williams, T.L., Bullock, R.E., Shaw, P.J., and Gibson, G.J. (2006). Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. Lancet Neurol *5*, 140–147.

Bouscary, A., Quessada, C., Mosbach, A., Callizot, N., Spedding, M., Loeffler, J.-P., and Henriques, A. (2019). Ambroxol Hydrochloride Improves Motor Functions and Extends Survival in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. Front. Pharmacol. *10*, 883.

Bouteloup, C., Desport, J.-C., Clavelou, P., Guy, N., Derumeaux-Burel, H., Ferrier, A., and Couratier, P. (2009). Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. J Neurol *256*, 1236–1242.

Bowker-Kinley, M.M., Davis, I.W., Wu, P., Harris, A.R., and Popov, M.K. (1998). Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. Biochemical Journal *329*, 191–196.

Bowling, A.C., Schulz, J.B., Brown, R.H., and Beal, M.F. (1993). Superoxide Dismutase Activity, Oxidative Damage, and Mitochondrial Energy Metabolism in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. Journal of Neurochemistry *61*, 2322–2325.

Boyd, J.G., and Gordon, T. (2003). Neurotrophic Factors and Their Receptors in Axonal Regeneration and Functional Recovery After Peripheral Nerve Injury. MN *27*, 277–324.

Braak, H., Brettschneider, J., Ludolph, A.C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Del Tredici, K. (2013). Amyotrophic lateral sclerosis--a model of corticofugal axonal spread. Nat Rev Neurol *9*, 708–714.

Bradley, W.G., and Mash, D.C. (2009). Beyond Guam: The cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. Amyotrophic Lateral Sclerosis *10*, 7–20.

Brand, M.D., Chien, L.F., and Diolez, P. (1994). Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport. Biochem J *297 (Pt 1)*, 27–29.

Brettschneider, J., Kurent, J., and Ludolph, A. (2013). Drug therapy for pain in amyotrophic lateral sclerosis or motor neuron disease. Cochrane Database Syst Rev CD005226.

Bristol, L.A., and Rothstein, J.D. (1996). Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. Ann Neurol. *39*, 676–679.

Brites, D., and Vaz, A.R. (2014). Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. Front Cell Neurosci *8*, 117.

Bromberg, M.B., and Brownell, A.A. (2008). Motor unit number estimation in the assessment of performance and function in motor neuron disease. Phys Med Rehabil Clin N Am *19*, 509–532, ix.

Brooks, B.R. (1994). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial “Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis” workshop contributors. J Neurol Sci *124 Suppl*, 96–107.

Brooks, B.P., and Fischbeck, K.H. (1995). Spinal and bulbar muscular atrophy: a trinucleotide-repeat expansion neurodegenerative disease. Trends in Neurosciences *18*, 459–461.

Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., Munsat, T.L., and World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord *1*, 293–299.

Browne, S.E., Yang, L., DiMauro, J.-P., Fuller, S.W., Licata, S.C., and Beal, M.F. (2006). Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. Neurobiology of Disease *22*, 599–610.

Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., and Cleveland, D.W. (1998). Aggregation and Motor Neuron Toxicity of an ALS-Linked SOD1 Mutant Independent from Wild-Type SOD1. Science, New Series *281*, 1851–1854.

Bruijn, L.I., Miller, T.M., and Cleveland, D.W. (2004). Unraveling The Mechanisms Involved In Motor Neuron Degeneration In ALS. Annu. Rev. Neurosci. *27*, 723–749.

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

Bryson, H.M., Fulton, B., and Benfield, P. (1996). Riluzole: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Potential in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Drugs *52*, 549–563.

Burke, R.E., Levine, D.N., Zajac, F.E., Tsairis, P., and Engel, W.K. (1971). Mammalian Motor Units: Physiological-Histochemical Correlation in Three Types in Cat Gastrocnemius. Science *174*, 709–712.

Butz, M., Wollinsky, K.H., Wiedemuth-Catrinescu, U., Sperfeld, A., Winter, S., Mehrkens, H.H., Ludolph, A.C., and Schreiber, H. (2003). Longitudinal effects of noninvasive positive-pressure ventilation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Am J Phys Med Rehabil *82*, 597–604.

Cai, H. (2005). Loss of ALS2 Function Is Insufficient to Trigger Motor Neuron Degeneration in Knock-Out Mice But Predisposes Neurons to Oxidative Stress. Journal of Neuroscience *25*, 7567–7574.

Canosa, A., Pagani, M., Cistaro, A., Montuschi, A., Iazzolino, B., Fania, P., Cammarosano, S., Ilardi, A., Moglia, C., Calvo, A., et al. (2016). ^{18} F-FDG-PET correlates of cognitive impairment in ALS. Neurology *86*, 44–49.

Canto, M.C.D., and Gurney, M.E. (1997). A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathologica *93*, 537–550.

Canto, M.C.D., and Gurneyt, M.E. (1994). Development of Central Nervous System Pathology in a Murine Transgenic Model of Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. *145*, 9.

Carling, D., Zammit, V.A., and Hardie, D.G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. FEBS Lett *223*, 217–222.

Carreras, I., Yuruker, S., Aytan, N., Hossain, L., Choi, J.-K., Jenkins, B.G., Kowall, N.W., and Dedeoglu, A. (2010). Moderate exercise delays the motor performance decline in a transgenic model of ALS. Brain Research *1313*, 192–201.

Carrì, M.T. (1997). Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca $^{2+}$ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. FEBS Letters *414*, 365–368.

Carrì, M.T., D'Ambrosi, N., and Cozzolino, M. (2017). Pathways to mitochondrial dysfunction in ALS pathogenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications *483*, 1187–1193.

Carvalho, M.D., and Swash, M. (2009). Awaji diagnostic algorithm increases sensitivity of El Escorial criteria for ALS diagnosis. Amyotroph Lateral Scler *10*, 53–57.

de Carvalho, M., and Swash, M. (2000). Nerve conduction studies in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve *23*, 344–352.

de Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J.D., Kaji, R., Kimura, J., Mills, K., Mitsumoto, H., Nodera, H., Shefner, J., et al. (2008). Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. Clin Neurophysiol *119*, 497–503.

Castonguay, A., Lévesque, S., and Robitaille, R. (2001). Glial cells as active partners in synaptic functions. Prog Brain Res *132*, 227–240.

Cedarbaum, J.M., and Stambler, N. (1997). Performance of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS) in multicenter clinical trials. Journal of the Neurological Sciences *152*, s1–s9.

Cedarbaum, J.M., Stambler, N., Malta, E., Fuller, C., Hilt, D., Thurmond, B., and Nakanishi, A. (1999). The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. Journal of the Neurological Sciences *169*, 13–21.

Chance, P.F., Rabin, B.A., Ryan, S.G., Ding, Y., Scavina, M., Crain, B., Griffin, J.W., and Cornblath, D.R. (1998). Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. Am J Hum Genet *62*, 633–640.

Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., Tian, G., Ilieva, H., Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Wong, P.C., and Lin, C.G. (2008). Messenger RNA Oxidation Occurs Early in Disease Pathogenesis and Promotes Motor Neuron Degeneration in ALS. PLoS ONE *3*, e2849.

Chattopadhyay, M., Durazo, A., Sohn, S.H., Strong, C.D., Gralla, E.B., Whitelegge, J.P., and Valentine, J.S. (2008). Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 18663–18668.

Cheah, B.C., Vucic, S., Krishnan, A.V., and Kiernan, M.C. (2010). Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. Curr Med Chem *17*, 1942–1199.

Chen, F., Dong, R.R., Zhong, K.L., Ghosh, A., Tang, S.S., Long, Y., Hu, M., Miao, M.X., Liao, J.M., Sun, H.B., et al. (2016). Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid-β across the blood-brain barrier and memory impairment in db/db mice. Neuropharmacology *101*, 123–136.

Chen, Y., Azad, M.B., and Gibson, S.B. (2009). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. Cell Death Differ *16*, 1040–1052.

Chen, Y.-Z., Bennett, C.L., Huynh, H.M., Blair, I.P., Puls, I., Irobi, J., Dierick, I., Abel, A., Kennerson, M.L., Rabin, B.A., et al. (2004). DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). Am J Hum Genet *74*, 1128–1135.

Chio, A. (2005). Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. Brain *128*, 472–476.

Chio, A. (2006). Positive effects of tertiary centres for amyotrophic lateral sclerosis on outcome and use of hospital facilities. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry *77*, 948–950.

Chio, A., Mora, G., Calvo, A., Mazzini, L., Bottacchi, E., Mutani, R., and On behalf of the PARALS (2009). Epidemiology of ALS in Italy: A 10-year prospective population-based study. Neurology *72*, 725–731.

Chio, A., Calvo, A., Moglia, C., Mazzini, L., Mora, G., and PARALS study group (2011). Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry *82*, 740–746.

Chiò, A., Logroscino, G., Traynor, B.J., Collins, J., Simeone, J.C., Goldstein, L.A., and White, L.A. (2013). Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. Neuroepidemiology *41*, 118–130.

Cholet, N., Pellerin, L., Welker, E., Lacombe, P., Seylaz, J., Magistretti, P., and Bonvento, G. (2001). Local Injection of Antisense Oligonucleotides Targeted to the Glial Glutamate Transporter GLAST Decreases the Metabolic Response to Somatosensory Activation. J Cereb Blood Flow Metab *21*, 404–412.

Chung, M.J., and Suh, Y.-L. (2002). Ultrastructural Changes of Mitochondria in the Skeletal Muscle of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. Ultrastructural Pathology *26*, 3–7.

Chunzheng, G., Shengzhong, M., Yinglian, J., Ji-e, W., and Jianmin, L. (2008). Siatic nerve regeneration in rats stimulated by fibrin glue containing nerve growth factor: An experimental study. Injury *39*, 1414–1420.

Cistaro, A., Valentini, M.C., Chiò, A., Nobili, F., Calvo, A., Moglia, C., Montuschi, A., Morbelli, S., Salmaso, D., Fania, P., et al. (2012). Brain hypermetabolism in amyotrophic lateral sclerosis: a FDG PET study in ALS of spinal and bulbar onset. Eur J Nucl Med Mol Imaging *39*, 251–259.

Cistaro, A., Pagani, M., Montuschi, A., Calvo, A., Moglia, C., Canosa, A., Restagno, G., Brunetti, M., Traynor, B.J., Nobili, F., et al. (2014). The metabolic signature of C9ORF72-related ALS: FDG PET comparison with nonmutated patients. Eur J Nucl Med Mol Imaging *41*, 844–852.

Clapham, J.C. (2012). Central control of thermogenesis. Neuropharmacology *63*, 111–123.

Clarke, B. (1996). Ranolazine Increases Active Pyruvate Dehydrogenase in Perfused Normoxic Rat Hearts: Evidence for an Indirect Mechanism. Journal of Molecular and Cellular Cardiology *28*, 341–350.

Cleveland, D.W., and Rothstein, J.D. (2001). From charcot to lou gehrig: deciphering selective motor neuron death in als. Nat Rev Neurosci *2*, 806–819.

Coburn, C.T., Knapp, F.F., Febbraio, M., Beets, A.L., Silverstein, R.L., and Abumrad, N.A. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. J Biol Chem *275*, 32523–32529.

Connolly, J., Romano, T., and Patruno, M. (1999). Selections from current literature: effects of dieting and exercise on resting metabolic rate and implications for weight management. Fam Pract *16*, 196–201.

Corcia, P., Pradat, P., Salachas, F., Bruneteau, G., le Forestier, N., Seilhean, D., Hauw, J., and Meininger, V. (2008). Causes of death in a post-mortem series of ALS patients. Amyotrophic Lateral Sclerosis *9*, 59–62.

Corcia, P., Tauber, C., Vercoullie, J., Arlicot, N., Prunier, C., Praline, J., Nicolas, G., Venel, Y., Hommet, C., Baulieu, J.-L., et al. (2012). Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. PLoS One *7*, e52941.

Costa, J., Swash, M., and de Carvalho, M. (2012). Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis:a systematic review. Arch Neurol *69*, 1410–1416.

Couratier, P., Sindou, P., Hugon, J., Couratier, P., Hugon, J., Vallat, J.-M., and Dumas, M. (1993). Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. The Lancet *341*, 265–268.

Couratier, P., Corcia, P., Lautrette, G., Nicol, M., Preux, P.-M., and Marin, B. (2016). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. Revue Neurologique *172*, 37–45.

Cox, P.A., and Sacks, O.W. (2002). Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. Neurology *58*, 956–959.

Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., and Bergman, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. Proceedings of the National Academy of Sciences *102*, 5074–5078.

Cozzolino, M., and Carrì, M.T. (2012). Mitochondrial dysfunction in ALS. Progress in Neurobiology *97*, 54–66.

Crews, L., Spencer, B., Desplats, P., Patrick, C., Paulino, A., Rockenstein, E., Hansen, L., Adame, A., Galasko, D., and Masliah, E. (2010). Selective Molecular Alterations in the Autophagy Pathway in Patients with Lewy Body Disease and in Models of α-Synucleinopathy. PLoS ONE *5*, e9313.

Crugnola, V., Lamperti, C., Lucchini, V., Ronchi, D., Peverelli, L., Prelle, A., Sciacco, M., Bordoni, A., Fassone, E., Fortunato, F., et al. (2010). Mitochondrial Respiratory Chain Dysfunction in Muscle From Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. Arch Neurol *67*.

Cudkowicz, M.E., Titus, S., Kearney, M., Yu, H., Sherman, A., Schoenfeld, D., Hayden, D., Shui, A., Brooks, B., Conwit, R., et al. (2014). Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Neurol *13*, 1083–1091.

Dadon-Nachum, M., Melamed, E., and Offen, D. (2011). The "Dying-Back" Phenomenon of Motor Neurons in ALS. J Mol Neurosci *43*, 470–477.

Dal Bello-Haas, V., and Florence, J.M. (2013). Therapeutic exercise for people with amyotrophic lateral sclerosis or motor neuron disease. Cochrane Database of Systematic Reviews.

Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1995). Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). Brain Res *676*, 25–40.

Dalakas, M.C., Hatazawa, J., Brooks, R.A., and Di Chiro, G. (1987). Lowered cerebral glucose utilization in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol. *22*, 580–586.

Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M., and Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca^{2+} capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice: Mitochondrial Ca^{2+} capacity in mutant SOD1 mice. Journal of Neurochemistry *96*, 1349–1361.

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

De Vos, K.J., Chapman, A.L., Tennant, M.E., Manser, C., Tudor, E.L., Lau, K.-F., Brownlees, J., Ackerley, S., Shaw, P.J., McLoughlin, D.M., et al. (2007). Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. Hum Mol Genet *16*, 2720–2728.

DeAngelo, A.B., George, M.H., and House, D.E. (1999). Hepatocarcinogenicity In The Male B6c3f1 Mouse Following A Lifetime Exposure To Dichloroacetic Acid In The Drinking Water: Dose-Response Determination And Modes Of Action. Journal of Toxicology and Environmental Health *58*, 485–507.

Deforges, S., Branchu, J., Biondi, O., Grondard, C., Pariset, C., Lécolle, S., Lopes, P., Vidal, P.-P., Chanoine, C., and Charbonnier, F. (2009). Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Motoneuron activation and neuroprotection in ALS mice. The Journal of Physiology *587*, 3561–3572.

Deitch, J.S., Alexander, G.M., Bensinger, A., Yang, S., Jiang, J.T., and Heiman-Patterson, T.D. (2014). Phenotype of transgenic mice carrying a very low copy number of the mutant human G93A superoxide dismutase-1 gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. PLoS One *9*, e99879.

DeLoach, A., Cozart, M., Kiaei, A., and Kiaei, M. (2015). A retrospective review of the progress in amyotrophic lateral sclerosis drug discovery over the last decade and a look at the latest strategies. Expert Opin Drug Discov *10*, 1099–1118.

Deng, H.-X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.-Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P., et al. (1993). Amyotrophic Lateral Sclerosis and Structural Defects in Cu,Zn Superoxide Dismutase. *261*, 5.

Deng, H.-X., Shi, Y., Furukawa, Y., Zhai, H., Fu, R., Liu, E., Gorrie, G.H., Khan, M.S., Hung, W.-Y., Bigio, E.H., et al. (2006). Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 7142–7147.

Deng, H.-X., Chen, W., Hong, S.-T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., et al. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. Nature *477*, 211–215.

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

Derave, W., Van Den Bosch, L., Lemmens, G., Eijnde, B.O., Robberecht, W., and Hespel, P. (2003). Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. Neurobiology of Disease *13*, 264–272.

Desport, J.C., Preux, P.M., Truong, T.C., Vallat, J.M., Sautereau, D., and Couratier, P. (1999). Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. Neurology *53*, 1059–1059.

Desport, J.C., Preux, P.M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J.M., Beaufrère, B., and Couratier, P. (2001). Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. The American Journal of Clinical Nutrition *74*, 328–334.

Desport, J.-C., Torny, F., Lacoste, M., Preux, P.-M., and Couratier, P. (2005). Hypermetabolism in ALS: Correlations with Clinical and Paraclinical Parameters. Neurodegener Dis *2*, 202–207.

Desseille, C., Deforges, S., Biondi, O., Houdebine, L., D'amico, D., Lamazière, A., Caradeuc, C., Bertho, G., Bruneteau, G., Weill, L., et al. (2017). Specific Physical Exercise Improves Energetic Metabolism in the Skeletal Muscle of Amyotrophic-Lateral- Sclerosis Mice. Front. Mol. Neurosci. *10*, 332.

Dézsi, C.A. (2016). Trimetazidine in Practice: Review of the Clinical and Experimental Evidence. American Journal of Therapeutics *23*, e871–e879.

Distad, B.J., Meekins, G.D., Liou, L.L., Weiss, M.D., Carter, G.T., and Miller, R.G. (2008). Drug Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America *19*, 633–651.

Ditsworth, D., Maldonado, M., McAlonis-Downes, M., Sun, S., Seelman, A., Drenner, K., Arnold, E., Ling, S.-C., Pizzo, D., Ravits, J., et al. (2017). Mutant TDP-43 within motor neurons drives disease onset but not progression in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol *133*, 907–922.

Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Bonconpagni, S., Belia, S., Wannenes, F., Nicoletti, C., Del Prete, Z., et al. (2008). Skeletal Muscle Is a Primary Target of SOD1G93A-Mediated Toxicity. Cell Metabolism *8*, 425–436.

Dobrowolny, G., Lepore, E., Martini, M., Barberi, L., Nunn, A., Scicchitano, B.M., and Musarò, A. (2018). Metabolic Changes Associated With Muscle Expression of SOD1G93A. Front. Physiol. *9*, 831.

Dobson, R. (2002). An exceptional man. BMJ *324*, 1478.

Dorst, J., Kühnlein, P., Hendrich, C., Kassubek, J., Sperfeld, A.D., and Ludolph, A.C. (2011). Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol *258*, 613–617.

Dorst, J., Cypionka, J., and Ludolph, A.C. (2013). High-caloric food supplements in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: A prospective interventional study. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration *14*, 533–536.

Dorst, J., Dupuis, L., Petri, S., Kollewe, K., Abdulla, S., Wolf, J., Weber, M., Czell, D., Burkhardt, C., Hanisch, F., et al. (2015). Percutaneous endoscopic gastrostomy in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective observational study. J Neurol *262*, 849–858.

Dorst, J., Ludolph, A.C., and Huebers, A. (2018). Disease-modifying and symptomatic treatment of amyotrophic lateral sclerosis. Ther Adv Neurol Disord *11*, 175628561773473.

Duchen, L.W. (1973). The effects of tetanus toxin on the motor end-plates of the mouse. An electron microscopic study. J Neurol Sci *19*, 153–167.

Dupuis, L., de Tapia, M., René, F., Lutz-Bucher, B., Gordon, J.W., Mercken, L., Pradier, L., and 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. Neurobiology of Disease *7*, 274–285.

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, F.S., et al. (2002). Nogo Provides a Molecular Marker for Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neurobiology of Disease *10*, 358–365.

Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., de Aguilar, J.-L.G., and Loeffler, J.-P. (2004a). 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 *101*, 11159–11164.

Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Oudart, H., de Tapia, M., Barbeito, L., and Loeffler, J.-P. (2004b). Mitochondria in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Trigger and a Target. Neurodegener Dis *1*, 245–254.

Dupuis, L., Corcia, P., and Fergani, A. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. 7.

Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Echaniz-Laguna, A., Eschbach, J., Rene, F., Oudart, H., Halter, B., Huze, C., Schaeffer, L., Bouillaud, F., et al. (2009). Muscle Mitochondrial Uncoupling Dismantles Neuromuscular Junction and Triggers Distal Degeneration of Motor Neurons. PLoS ONE *4*, e5390.

Dupuis, L., Pradat, P.-F., Ludolph, A.C., and Loeffler, J.-P. (2011). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet Neurology *10*, 75–82.

Echaniz-Laguna, A., Zoll, J., Ribera, F., Tranchant, C., Warter, J.-M., Lonsdorfer, J., and Lampert, E. (2002). Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients. Ann Neurol. *52*, 623–627.

Echaniz-Laguna, A., Zoll, J., Ponsot, E., N'Guessan, B., Tranchant, C., Loeffler, J.-P., and Lampert, E. (2006). Muscular mitochondrial function in amyotrophic lateral sclerosis is progressively altered as the disease develops: A temporal study in man. Experimental Neurology *198*, 25–30.

Edstrom, L., and Kugelberg, E. (1968). Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry *31*, 424–433.

Eisen, A., Schulzer, M., MacNeil, M., Pant, B., and Mak, E. (1993). Duration of amyotrophic lateral sclerosis is age dependent. Muscle Nerve *16*, 27–32.

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

Elamin, M., Bede, P., Montuschi, A., Pender, N., Chio, A., and Hardiman, O. (2015). Predicting prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a simple algorithm. J Neurol *262*, 1447–1454.

Endo, F., Komine, O., Fujimori-Tonou, N., Katsuno, M., Jin, S., Watanabe, S., Sobue, G., Dezawa, M., Wyss-Coray, T., and Yamanaka, K. (2015). Astrocyte-Derived TGF-β1 Accelerates Disease Progression in ALS Mice by Interfering with the Neuroprotective Functions of Microglia and T Cells. Cell Reports *11*, 592–604.

Endo, H., Sekiguchi, K., Ueda, T., Kowa, H., Kanda, F., and Toda, T. (2017). Regional glucose hypometabolic spread within the primary motor cortex is associated with amyotrophic lateral sclerosis disease progression: A fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. ENeurologicalSci *6*, 74–79.

Engelhardt, J.I., Tajti, J., and Appel, S.H. (1993). Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. Arch Neurol *50*, 30–36.

van Es, M.A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R.J., Veldink, J.H., and van den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet *390*, 2084–2098.

Eshraghi, M., McFall, E., Gibeault, S., and Kothary, R. (2016). Effect of genetic background on the phenotype of the Smn2B/- mouse model of spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet *25*, 4494–4506.

Evans, R.M., Barish, G.D., and Wang, Y.-X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. Nat Med *10*, 355–361.

Fang, F., Ingre, C., Roos, P., Kamel, F., and Piehl, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. CLEP 181.

Fang, Y.-H., Piao, L., Hong, Z., Toth, P.T., Marsboom, G., Bache-Wiig, P., Rehman, J., and Archer, S.L. (2012). Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle. J Mol Med *90*, 31–43.

Faroni, A., Mobasseri, S.A., Kingham, P.J., and Reid, A.J. (2015). Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. Advanced Drug Delivery Reviews *82–83*, 160–167.

Fayemendy, P., Marin, B., Labrunie, A., Boirie, Y., Walrand, S., Achamrah, N., Coëffier, M., Preux, P.-M., Lautrette, G., Desport, J.-C., et al. (2021). Hypermetabolism is a reality in amyotrophic lateral sclerosis compared to healthy subjects. Journal of the Neurological Sciences *420*, 117257.

Fecto, F. (2011). SQSTM1 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. Arch Neurol *68*, 1440.

Fedorenko, A., Lishko, P.V., and Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. Cell *151*, 400–413.

Fenoglio, C., Galimberti, D., Lovati, C., Guidi, I., Gatti, A., Fogliarino, S., Tiriticco, M., Mariani, C., Forloni, G., Pettenati, C., et al. (2004). MCP-1 in Alzheimer's disease patients: A-2518G polymorphism and serum levels. Neurobiology of Aging *25*, 1169–1173.

Ferraiuolo, L., Higginbottom, A., Heath, P.R., Barber, S., Greenald, D., Kirby, J., and Shaw, P.J. (2011). Dysregulation of astrocyte–motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. Brain *134*, 2627–2641.

Ferraro, E., Giammarioli, A.M., Caldarola, S., Lista, P., Feraco, A., Tinari, A., Salvatore, A.M., Malorni, W., Berghella, L., and Rosano, G. (2013). The metabolic modulator trimetazidine triggers autophagy and counteracts stress-induced atrophy in skeletal muscle myotubes. FEBS J *280*, 5094–5108.

Ferraro, E., Giammarioli, A.M., Chiandotto, S., Spoletini, I., and Rosano, G. (2014). Exercise-Induced Skeletal Muscle Remodeling and Metabolic Adaptation: Redox Signaling and Role of Autophagy. Antioxidants & Redox Signaling *21*, 154–176.

Ferraro, E., Pin, F., Gorini, S., Pontecorvo, L., Ferri, A., Mollace, V., Costelli, P., and Rosano, G. (2016). Improvement of skeletal muscle performance in ageing by the metabolic modulator Trimetazidine: Metabolism remodeling in skeletal muscle. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle *7*, 449–457.

Figlewicz, D.A., Garruto, R.M., Krizus, A., Yanagihara, R., and Rouleau, G.A. (1994). The Cu/Zn superoxide dismutase gene in ALS and parkinsonism-dementia of Guam. Neuroreport *5*, 557–560.

Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., and Glass, J.D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. Experimental Neurology *185*, 232–240.

Fischer, L.R., Li, Y., Asress, S.A., Jones, D.P., and Glass, J.D. (2012). Absence of SOD1 leads to oxidative stress in peripheral nerve and causes a progressive distal motor axonopathy. Experimental Neurology *233*, 163–171.

Flis, D.J., Dzik, K., Kaczor, J.J., Cieminski, K., Halon-Golabek, M., Antosiewicz, J., Wieckowski, M.R., and Ziolkowski, W. (2019). Swim Training Modulates Mouse Skeletal Muscle Energy Metabolism and Ameliorates Reduction in Grip Strength in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. IJMS *20*, 233.

Flood, D.G., Reaume, A.G., Gruner, J.A., Hoffman, E.K., Hirsch, J.D., Lin, Y.-G., Dorfman, K.S., and Scott, R.W. (1999). Hindlimb Motor Neurons Require Cu/Zn Superoxide Dismutase for Maintenance of Neuromuscular Junctions. The American Journal of Pathology *155*, 663–672.

Flucher, B.E., and Daniels, M.P. (1989). Distribution of Na+ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. Neuron *3*, 163–175.

Foretz, M., Guigas, B., and Viollet, B. (2006). [From cancer to diabetes treatment : the tumor suppressor LKB1 as a new pharmacological target]. Med Sci (Paris) *22*, 348–350.

Forsberg, K., Jonsson, P.A., Andersen, P.M., Bergemalm, D., Graffmo, K.S., Hultdin, M., Jacobsson, J., Rosquist, R., Marklund, S.L., and Brännström, T. (2010). Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. PLoS One *5*, e11552.

Fragasso, G., Piatti, MD, P.M., Monti, L., Palloshi, A., Setola, E., Puccetti, P., Calori, G., Lopaschuk, G.D., and Margonato, A. (2003). Short- and long-term beneficial effects of trimetazidine in patients with diabetes and ischemic cardiomyopathy. American Heart Journal *146*, 854.

Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., and Caroni, P. (2000). Early and Selective Loss of Neuromuscular Synapse Subtypes with Low Sprouting Competence in Motoneuron Diseases. J. Neurosci. *20*, 2534–2542.

Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. Calcif Tissue Int *96*, 183–195.

Fryer, L.G., Hajduch, E., Rencurel, F., Salt, I.P., Hundal, H.S., Hardie, D.G., and Carling, D. (2000). Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. Diabetes *49*, 1978–1985.

Fryer, L.G.D., Parbu-Patel, A., and Carling, D. (2002). The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. J Biol Chem *277*, 25226–25232.

Funalot, B., Desport, J.-C., Sturtz, F., Camu, W., and Couratier, P. (2009). High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis *10*, 113–117.

Gandhi, S., and Abramov, A.Y. (2012). Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. Oxidative Medicine and Cellular Longevity *2012*, 1–11.

Ganzini, L., Johnston, W.S., and Hoffman, W.F. (1999). Correlates of suffering in amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *52*, 1434–1440.

Garbuzova-Davis, S., Saporta, S., Haller, E., Kolomey, I., Bennett, S.P., Potter, H., and Sanberg, P.R. (2007). Evidence of Compromised Blood-Spinal Cord Barrier in Early and Late Symptomatic SOD1 Mice Modeling ALS. PLoS ONE *2*, e1205.

Garruto, R.M., Gajdusek, D.C., and Chen, K.-M. (1981). Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia among Filipino migrants to Guam. Ann Neurol. *10*, 341–350.

Gautam, M., Jara, J.H., Kocak, N., Rylaarsdam, L.E., Kim, K.D., Bigio, E.H., and Hande Özdinler, P. (2019). Mitochondria, ER, and nuclear membrane defects reveal early mechanisms for upper motor neuron vulnerability with respect to TDP-43 pathology. Acta Neuropathol *137*, 47–69.

Geevasinga, N., Menon, P., Scherman, D.B., Simon, N., Yiannikas, C., Henderson, R.D., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2016). Diagnostic criteria in amyotrophic lateral sclerosis: A multicenter prospective study. Neurology *87*, 684–690.

Gerber, Y.N., Sabourin, J.-C., Rabano, M., Vivanco, M. d M., and Perrin, F.E. (2012). Early Functional Deficit and Microglial Disturbances in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. PLoS ONE *7*, e36000.

Gil, J., Funalot, B., Verschueren, A., Danel-Brunaud, V., Camu, W., Vandenberghe, N., Desnuelle, C., Guy, N., Camdessanche, J.P., Cintas, P., et al. (2008). Causes of death amongst French patients with amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. European Journal of Neurology *15*, 1245–1251.

Gille, B., De Schaepdryver, M., Goossens, J., Dedeene, L., De Vocht, J., Oldoni, E., Goris, A., Van Den Bosch, L., Depreitere, B., Claeys, K.G., et al. (2019). Serum neurofilament light chain levels as a marker of upper motor neuron degeneration in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neuropathol Appl Neurobiol *45*, 291–304.

Gimeno, R.E., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Shyjan, A.W., Gimeno, C.J., Iris, F., Ellis, S.J., Woolf, E.A., and Tartaglia, L.A. (1997). Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. Diabetes *46*, 900–906.

Glatz, J.F.C., Bonen, A., and Luiken, J.J.F.P. (2002). Exercise and insulin increase muscle fatty acid uptake by recruiting putative fatty acid transporters to the sarcolemma: Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care *5*, 365–370.

Gong, W., Ma, Y., Li, A., Shi, H., and Nie, S. (2018). Trimetazidine suppresses oxidative stress, inhibits MMP-2 and MMP-9 expression, and prevents cardiac rupture in mice with myocardial infarction. Cardiovasc Ther *36*, e12460.

Gonzalez de Aguilar, J.-L., Niederhauser-Wiederkehr, C., Halter, B., De Tapia, M., Di Scala, F., Demougin, P., Dupuis, L., Primig, M., Meininger, V., and Loeffler, J.-P. (2008). Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. Physiological Genomics *32*, 207–218.

Gordon, P.H., Miller, R.G., and Moore, D.H. (2004). ALSFRS-R. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders *5*, 90–93.

Gordon, T., Tyreman, N., Li, S., Putman, C.T., and Hegedus, J. (2010). Functional over-load saves motor units in the SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis *37*, 412–422.

Gould, T.W. (2006). Complete Dissociation of Motor Neuron Death from Motor Dysfunction by Bax Deletion in a Mouse Model of ALS. Journal of Neuroscience *26*, 8774–8786.

Grad, L.I., Guest, W.C., Yanai, A., Pokrishevsky, E., O'Neill, M.A., Gibbs, E., Semenchenko, V., Yousefi, M., Wishart, D.S., Plotkin, S.S., et al. (2011). Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 16398–16403.

Grad, L.I., Pokrishevsky, E., and Cashman, N.R. (2017). Intercellular Prion-Like Conversion and Transmission of Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) in Cell Culture. Methods Mol Biol *1658*, 357–367.

Granata, C., Jamnick, N.A., and Bishop, D.J. (2018). Training-Induced Changes in Mitochondrial Content and Respiratory Function in Human Skeletal Muscle. Sports Med *48*, 1809–1828.

Greenwood, D.I. (2013). Nutrition Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Nutr Clin Pract *28*, 392–399.

Gresham, L.S., Molgaard, C.A., Golbeck, A.L., and Smith, R. (1986). Amyotrophic lateral sclerosis and occupational heavy metal exposure: a case-control study. Neuroepidemiology *5*, 29–38.

Groeneveld, G.J., Van Kan, H.J.M., Kalmijn, S., Veldink, J.H., Guchelaar, H.-J., Wokke, J.H.J., and Van den Berg, L.H. (2003). Riluzole serum concentrations in patients with ALS: Associations with side effects and symptoms. Neurology *61*, 1141–1143.

Gros-Louis, F., Kriz, J., Kabashi, E., McDearmid, J., Millecamps, S., Urushitani, M., Lin, L., Dion, P., Zhu, Q., Drapeau, P., et al. (2008). Als2 mRNA splicing variants detected in KO mice rescue severe motor dysfunction phenotype in Als2 knock-down zebrafish. Human Molecular Genetics *17*, 2691–2702.

Grundström, E., Lindholm, D., Johansson, A., Blennow, K., and Askmark, H. (2000). GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. Neuroreport *11*, 1781–1783.

Guarini, G., Huqi, A., Morrone, D., Giuseppina Capozza, P.F., and Marzilli, M. (2018). Trimetazidine and Other Metabolic Modifiers. European Cardiology Review *13*, 1.

Gundersen, K. (2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. Biological Reviews *86*, 564–600.

Guo, H. (2003). Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. Human Molecular Genetics *12*, 2519–2532.

Gurney, M., Pu, H., Chiu, A., Dal Canto, M., Polchow, C., Alexander, D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y., Deng, H., et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science *264*, 1772–1775.

Gurney, M.E., Fleck, T.J., Himes, C.S., and Hall, E.D. (1998). Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *50*, 62–66.

Hall, E.D., Oostveen, J.A., and Gurney, M.E. (1998). Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. Glia *23*, 249–256.

Halter, B., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Rene, F., Petri, S., Fricker, B., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Larmet, Y., and Loeffler, J.-P. (2010). Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Free Radical Biology and Medicine *48*, 915–923.

Hamilton, J.A., Johnson, R.A., Corkey, B., and Kamp, F. (2001). Fatty acid transport: the diffusion mechanism in model and biological membranes. J Mol Neurosci *16*, 99–108; discussion 151-157.

Hamilton, J.A., Guo, W., and Kamp, F. (2002). Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: Do we need cellular proteins? Mol Cell Biochem *239*, 17–23.

Harel, N.Y., Cudkowicz, M.E., Brown, R.H., and Strittmatter, S.M. (2009). Serum Nogo-A levels are not elevated in amyotrophic lateral sclerosis patients. Biomarkers *14*, 414–417.

Hatazawa, J., Brooks, R.A., Dalakas, M.C., Mansi, L., and Di Chiro, G. (1988). Cortical motor-sensory hypometabolism in amyotrophic lateral sclerosis: a PET study. J Comput Assist Tomogr *12*, 630–636.

Hayashi, Y., and Ito, M. (2016). Klotho-Related Protein KLrP: Structure and Functions. Vitam Horm *101*, 1–16.

Hayashi, S., Sakurai, A., Amari, M., and Okamoto, K. (2001). Pathological study of the diffuse myelin pallor in the anterolateral columns of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci *188*, 3–7.

Hayashi, T., Hirshman, M.F., Kurth, E.J., Winder, W.W., and Goodyear, L.J. (1998). Evidence for 5'AMP-Activated Protein Kinase Mediation of the Effect of Muscle Contraction on Glucose Transport. *47*, 5.

Heckman, C.J., and Enoka, R.M. (2012). Motor unit. Compr Physiol *2*, 2629–2682.

Hegedus, J., Putman, C.T., and Gordon, T. (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiology of Disease *28*, 154–164.

Hegedus, J., Putman, C.T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 ^{G93A} transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Motor units in mouse ALS. The Journal of Physiology *586*, 3337–3351.

Henkel, J.S., Engelhardt, J.I., Siklós, L., Simpson, E.P., Kim, S.H., Pan, T., Goodman, J.C., Siddique, T., Beers, D.R., and Appel, S.H. (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. Ann Neurol *55*, 221–235.

Henkel, J.S., Beers, D.R., Siklós, L., and Appel, S.H. (2006). The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. Mol Cell Neurosci *31*, 427–437.

Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D.A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., D'Ambra, E., Huebecker, M., Hussain, G., Boursier-Neyret, C., Echaniz-Laguna, A., et al. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. Hum. Mol. Genet. *24*, 7390–7405.

Henriques, A., Croixmarie, V., Bouscary, A., Mosbach, A., Keime, C., Boursier-Neyret, C., Walter, B., Spedding, M., and Loeffler, J.-P. (2018). Sphingolipid Metabolism Is Dysregulated at Transcriptomic and Metabolic Levels in the Spinal Cord of an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Front. Mol. Neurosci. *10*, 433.

Hertz, L., and Dienel, G.A. (2002). Energy metabolism in the brain. Int Rev Neurobiol *51*, 1–102.

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

Hill, J.A., and Schofield, R.S. (2002). The use of ranolazine in cardiovascular disease. Expert Opinion on Investigational Drugs *11*, 117–123.

Hirano, A., Nakano, I., Kurland, L.T., Mulder, D.W., Holley, P.W., and Saccomanno, G. (1984). Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol *43*, 471–480.

Hogg, M.C., Halang, L., Woods, I., Coughlan, K.S., and Prehn, J.H.M. (2018). Riluzole does not improve lifespan or motor function in three ALS mouse models. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration *19*, 438–445.

Holmes, B.F., Kurth-Kraczek, E.J., and Winder, W.W. (1999). Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. J Appl Physiol (1985) *87*, 1990–1995.

Holness, M.J., and Sugden, M.C. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. Biochemical Society Transactions *31*, 1143–1151.

Houi, K., Kobayashi, T., Kato, S., Mochio, S., and Inoue, K. (2002). Increased plasma TGF-beta1 in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neurol Scand *106*, 299–301.

Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., et al. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Proceedings of the National Academy of Sciences *99*, 1604–1609.

Huang, M.-T., and Veech, R.L. (1985). Metabolic Fluxes Between [^{14} C]2-Deoxy-D-Glucose and [^{14} C]2-Deoxy-D-Glucose-6-Phosphate in Brain In Vivo. J Neurochem *44*, 567–573.

Huang, S., and Czech, M.P. (2007). The GLUT4 Glucose Transporter. Cell Metabolism *5*, 237–252.

Huang, H., Chen, L., Zhang, H., Li, S., Liu, P., Zhao, T., and Li, C. (2016). Autophagy Promotes Peripheral Nerve Regeneration and Motor Recovery Following Sciatic Nerve Crush Injury in Rats. J Mol Neurosci *58*, 416–423.

Hue, L., and Taegtmeyer, H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism *297*, E578–E591.

Huisman, M.H.B., Seelen, M., de Jong, S.W., Dorresteijn, K.R.I.S., van Doormaal, P.T.C., van der Kooi, A.J., de Visser, M., Schelhaas, H.J., van den Berg, L.H., and Veldink, J.H. (2013). Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry *84*, 976–981.

Hwang, C.-S., Liu, G.-T., Chang, M.D.-T., Liao, I.-L., and Chang, H.-T. (2013). Elevated serum autoantibody against high mobility group box 1 as a potent surrogate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis *58*, 13–18.

Ilzecka, J., and Stelmasiak, Z. (2003). Creatine kinase activity in amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurological Sciences *24*, 286–287.

Ismail, A., Cooper-Knock, J., Highley, J.R., Milano, A., Kirby, J., Goodall, E., Lowe, J., Scott, I., Constantinescu, C.S., Walters, S.J., et al. (2013). Concurrence of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis in patients with hexanucleotide repeat expansions of C9ORF72. J Neurol Neurosurg Psychiatry *84*, 79–87.

Israelson, A., Arbel, N., Da Cruz, S., Ilieva, H., Yamanaka, K., Shoshan-Barmatz, V., and Cleveland, D.W. (2010). Misfolded Mutant SOD1 Directly Inhibits VDAC1 Conductance in a Mouse Model of Inherited ALS. Neuron *67*, 575–587.

Jaarsma, D., Rognoni, F., van Duijn, W., Verspaget, H.W., Haasdijk, E.D., and Holstege, J.C. (2001a). CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. Acta Neuropathol *102*, 293–305.

Jaarsma, D., Rognoni, F., van Duijn, W., Verspaget, H.W., Haasdijk, E.D., and Holstege, J.C. (2001b). CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. Acta Neuropathol *102*, 293–305.

Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E.D., De Zeeuw, C.I., and Hoogenraad, C.C. (2008). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. J Neurosci *28*, 2075–2088.

Jaiswal, M., Zech, W.-D., Goos, M., Leutbecher, C., Ferri, A., Zippelius, A., Carrì, M., Nau, R., and Keller, B.U. (2009). Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. BMC Neurosci *10*, 64.

Jara, J.H., Villa, S.R., Khan, N.A., Bohn, M.C., and Ozdinler, P.H. (2012). AAV2 mediated retrograde transduction of corticospinal motor neurons reveals initial and selective apical dendrite degeneration in ALS. Neurobiol Dis *47*, 174–183.

Jara, J.H., Genç, B., Stanford, M.J., Pytel, P., Roos, R.P., Weintraub, S., Mesulam, M.M., Bigio, E.H., Miller, R.J., and Özdinler, P.H. (2017). Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. J Neuroinflammation *14*, 129.

Jawaid, A., Murthy, S.B., Wilson, A.M., Qureshi, S.U., Amro, M.J., Wheaton, M., Simpson, E., Harati, Y., Strutt, A.M., York, M.K., et al. (2010). A decrease in body mass index is associated with faster progression of motor symptoms and shorter survival in ALS. Amyotrophic Lateral Sclerosis *11*, 542–548.

Jeoung, N.H., Wu, P., Joshi, M.A., Jaskiewicz, J., Bock, C.B., Depaoli-Roach, A.A., and Harris, R.A. (2006). Role of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) in glucose homoeostasis during starvation. Biochemical Journal *397*, 417–425.

Jésus, P., Fayemendy, P., Nicol, M., Lautrette, G., Sourisseau, H., Preux, P.-M., Desport, J.-C., Marin, B., and Couratier, P. (2018). Hypermetabolism is a deleterious prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurol *25*, 97–104.

Johann, S., Heitzer, M., Kanagaratnam, M., Goswami, A., Rizo, T., Weis, J., Troost, D., and Beyer, C. (2015). NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. Glia *63*, 2260–2273.

Johnson, E.O., Charchanti, A., and Soucacos, P.N. (2008). Nerve repair: Experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration. Injury *39*, 37–42.

Johnston, C.A., Stanton, B.R., Turner, M.R., Gray, R., Blunt, A.H.-M., Butt, D., Ampong, M.-A., Shaw, C.E., Leigh, P.N., and Al-Chalabi, A. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: A population based study of inner city London. J Neurol *253*, 1642–1643.

Johnston, M., Earll, L., Giles, M., Mcclenahan, R., Stevens, D., and Morrison, V. (1999). Mood as a predictor of disability and survival in patients newly diagnosed with ALS/MND. British Journal of Health Psychology *4*, 127–136.

Jokela, M., Huovinen, S., Raheem, O., Lindfors, M., Palmio, J., Penttilä, S., and Udd, B. (2016). Distinct Muscle Biopsy Findings in Genetically Defined Adult-Onset Motor Neuron Disorders. PLoS ONE *11*, e0151376.

Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Pradat, P.-F., Dupuis, L., Echaniz-Laguna, A., Muller, A., Dubourg, O., Seilhean, D., Hauw, J.-J., Loeffler, J.-P., et al. (2005). Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. Ann Neurol. *57*, 553–556.

Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J., Dimou, L., Lin, S., Fergani, A., Ruegg, M.A., Schwab, M.E., Dupuis, L., and Loeffler, J. (2006). The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. EMBO Rep *7*, 1162–1167.

Jouaville, L.S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G.A., and Rizzuto, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 13807–13812.

Joyce, N.C., and Carter, G.T. (2013). Electrodiagnosis in Persons With Amyotrophic Lateral Sclerosis. PM&R *5*, S89–S95.

Julien, J.P. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. Cell *104*, 581–591.

Jung, C., Higgins, C.M.J., and Xu, Z. (2002). Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: Mitochondrial ETC dysfunction in ALS transgenic mice. Journal of Neurochemistry *83*, 535–545.

Kabashi, E., Agar, J.N., Taylor, D.M., Minotti, S., and Durham, H.D. (2004). Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem *89*, 1325–1335.

Kaneb, H.M., Sharp, P.S., Rahmani-Kondori, N., and Wells, D.J. (2011). Metformin Treatment Has No Beneficial Effect in a Dose-Response Survival Study in the SOD1G93A Mouse Model of ALS and Is Harmful in Female Mice. PLoS ONE *6*, e24189.

Kang, S.H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D.W., Ostrow, L.W., Rothstein, J.D., and Bergles, D.E. (2013). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. Nat Neurosci *16*, 571–579.

Kanning, K.C., Kaplan, A., and Henderson, C.E. (2010). Motor Neuron Diversity in Development and Disease. Annu. Rev. Neurosci. *33*, 409–440.

Kantor, P.F., Lucien, A., Kozak, R., and Lopaschuk, G.D. (2000). The Antianginal Drug Trimetazidine Shifts Cardiac Energy Metabolism From Fatty Acid Oxidation to Glucose Oxidation by Inhibiting Mitochondrial Long-Chain 3-Ketoacyl Coenzyme A Thiolase. Circulation Research *86*, 580–588.

Kanwal, A., and Banerjee, S.K. (2013). SGLT inhibitors: a novel target for diabetes. Pharm Pat Anal *2*, 77–91.

Karahan, G., Kaya, H., Erdogan, M.A., Yigitturk, G., Gokyayla, E., and Erbas, O. (2019). Effects of trimetazidine on nerve regeneration in a rat sciatic nerve injury model. BLL *120*, 777–782.

Kasarskis, E.J., Berryman, S., Vanderleest, J.G., Schneider, A.R., and McClain, C.J. (1996). Nutritional status of patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to the proximity of death. The American Journal of Clinical Nutrition *63*, 130–137.

Kassubek, J., and Pagani, M. (2019). Imaging in amyotrophic lateral sclerosis: MRI and PET. Current Opinion in Neurology *32*, 740–746.

Kaufmann, P., Levy, G., Thompson, J.L.P., DelBene, M.L., Battista, V., Gordon, P.H., Rowland, L.P., Levin, B., and Mitsumoto, H. (2005). The ALSFRSr predicts survival time in an ALS clinic population. Neurology *64*, 38–43.

Ke, R., Xu, Q., Li, C., Luo, L., and Huang, D. (2018). Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism: AMPK and ATP balance. Cell Biol Int *42*, 384–392.

Keller, A.F., Gravel, M., and Kriz, J. (2009). Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells. Glia *57*, 1130–1142.

Kelley, D.E., and Mandarino, L.J. (2000). Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. Diabetes *49*, 677–683.

Kelley, D.E., Goodpaster, B., Wing, R.R., and Simoneau, J.A. (1999). Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. Am J Physiol *277*, E1130-1141.

Kennel, P., Revah, F., Bohme, G.A., Bejuit, R., Gallix, P., Stutzmann, J.-M., Imperato, A., and Pratt, J. (2000). Riluzole prolongs survival and delays muscle strength deterioration in mice with progressive motor neuronopathy (pmn). Journal of the Neurological Sciences *180*, 55–61.

Kiaei, M. (2004). Genetically Decreased Spinal Cord Copper Concentration Prolongs Life in a Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Journal of Neuroscience *24*, 7945–7950.

Kiens, B. (2006). Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. Physiol Rev *86*, 205–243.

Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J., and Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. Exp Neurobiol *24*, 325–340.

Kim, Y.I., Lee, F.N., Choi, W.S., Lee, S., and Youn, J.H. (2006). Insulin Regulation of Skeletal Muscle PDK4 mRNA Expression Is Impaired in Acute Insulin-Resistant States. Diabetes *55*, 2311–2317.

Kimura, F., Fujimura, C., Ishida, S., Nakajima, H., Furutama, D., Uehara, H., Shinoda, K., Sugino, M., and Hanafusa, T. (2006). Progression rate of ALSFRS-R at time of diagnosis predicts survival time in ALS. Neurology *66*, 265–267.

Kirk, S.E., Tracey, T.J., Steyn, F.J., and Ngo, S.T. (2019). Biomarkers of Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Front. Neurol. *10*, 191.

Kirkinezos, I.G., Hernandez, D., Bradley, W.G., and Moraes, C.T. (2003). Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol *53*, 804–807.

Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L.A., Boulting, G.L., Moccia, R., Wainger, B.J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., et al. (2014). Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. Cell Stem Cell *14*, 781–795.

Ko, C.-P., and Robitaille, R. (2015). Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. Cold Spring Harb Perspect Biol *7*, a020503.

Koerner (1952). Amyotrophic Lateral Sclerosis On Guam: A Clinical Study And Review Of The Literature. Ann Intern Med *37*, 1204.

Kong, J., and Xu, Z. (1998). Massive Mitochondrial Degeneration in Motor Neurons Triggers the Onset of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Mice Expressing a Mutant SOD1. J. Neurosci. *18*, 3241–3250.

Konrad, C., Jansen, A., Henningsen, H., Sommer, J., Turski, P.A., Brooks, B.R., and Knecht, S. (2006). Subcortical reorganization in amyotrophic lateral sclerosis. Exp Brain Res *172*, 361–369.

Körner, S., Hendricks, M., Kollewe, K., Zapf, A., Dengler, R., Silani, V., and Petri, S. (2013). Weight loss, dysphagia and supplement intake in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): impact on quality of life and therapeutic options. BMC Neurol *13*, 84.

Krarup, C. (2011). Lower motor neuron involvement examined by quantitative electromyography in amyotrophic lateral sclerosis. Clinical Neurophysiology *122*, 414–422.

Kreft, M., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., and Schousboe, A. (2012). Aspects of Astrocyte Energy Metabolism, Amino Acid Neurotransmitter Homoeostasis and Metabolic Compartmentation. ASN Neuro *4*, AN20120007.

Kriz, J., Nguyen, M.D., and Julien, J.-P. (2002). Minocycline Slows Disease Progression in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neurobiology of Disease *10*, 268–278.

Kumar, V., Islam, A., Hassan, M.I., and Ahmad, F. (2016). Therapeutic progress in amyotrophic lateral sclerosis-beginning to learning. Eur J Med Chem *121*, 903–917.

Kuralay, F., Altekin, E., Yazlar, A.S., Onvural, B., and Goldeli, O. (2006). Suppression of Angioplasty-Related Inflammation by Pre-Procedural Treatment with Trimetazidine. Tohoku J. Exp. Med. *208*, 203–212.

Kurian, K.M., Forbes, R.B., Colville, S., and Swingler, R.J. (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. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry *80*, 84–87.

Kurland, L.T. (1988). AmyotrophiclateralsclerosisandParkinson'sdisease complexonGuamlinkedtoanenWronmentanl eurotoxin. *11*, 4.

Kurth-Kraczek, E.J., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., and Winder, W.W. (1999). 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. Diabetes *48*, 1667–1671.

Labra, J., Menon, P., Byth, K., Morrison, S., and Vucic, S. (2016). Rate of disease progression: a prognostic biomarker in ALS. J Neurol Neurosurg Psychiatry *87*, 628–632.

Lafontan, M. (2008). Advances in adipose tissue metabolism. Int J Obes (Lond) *32 Suppl 7*, S39-51.

Lau, D.H.W., Hartopp, N., Welsh, N.J., Mueller, S., Glennon, E.B., Mórotz, G.M., Annibali, A., Gomez-Suaga, P., Stoica, R., Paillusson, S., et al. (2018). Disruption of ER−mitochondria signalling in fronto-temporal dementia and related amyotrophic lateral sclerosis. Cell Death Dis *9*, 327.

Lee, Y., Morrison, B.M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M.H., Hoffman, P.N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.-W., et al. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. Nature *487*, 443–448.

Lemarie, A., and Grimm, S. (2011). Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer? Oncogene *30*, 3985–4003.

Lepore, A.C., Rauck, B., Dejea, C., Pardo, A.C., Rao, M.S., Rothstein, J.D., and Maragakis, N.J. (2008). Focal transplantation–based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. Nat Neurosci *11*, 1294–1301.

Lepore, E., Casola, I., Dobrowolny, G., and Musarò, A. (2019). Neuromuscular Junction as an Entity of Nerve-Muscle Communication. Cells *8*, 906.

Leto, D., and Saltiel, A.R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. Nat Rev Mol Cell Biol *13*, 383–396.

Li, L., Zhang, X., and Le, W. (2008). Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. Autophagy *4*, 290–293.

Li, R., Jia, Z., and Trush, M.A. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. React Oxyg Species (Apex) *1*, 9–21.

Li, R., Li, D., Wu, C., Ye, L., Wu, Y., Yuan, Y., Yang, S., Xie, L., Mao, Y., Jiang, T., et al. (2020). Nerve growth factor activates autophagy in Schwann cells to enhance myelin debris clearance and to expedite nerve regeneration. Theranostics *10*, 1649–1677.

Liao, B., Zhao, W., Beers, D.R., Henkel, J.S., and Appel, S.H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. Experimental Neurology *237*, 147–152.

Lindauer, E., Dupuis, L., Müller, H.-P., Neumann, H., Ludolph, A.C., and Kassubek, J. (2013). Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. PLoS ONE *8*, e67783.

Ling, D., Song, H.-J., Garza, D., Neufeld, T.P., and Salvaterra, P.M. (2009). Abeta42-induced neurodegeneration via an age-dependent autophagic-lysosomal injury in Drosophila. PLoS One *4*, e4201.

Ling, S.-C., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2013). Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. Neuron *79*, 416–438.

Lino, M.M., Schneider, C., and Caroni, P. (2002). Accumulation of SOD1 Mutants in Postnatal Motoneurons Does Not Cause Motoneuron Pathology or Motoneuron Disease. J. Neurosci. *22*, 4825–4832.

Lionetti, V., Stanley, W.C., and Recchia, F.A. (2011). Modulating fatty acid oxidation in heart failure. Cardiovascular Research *90*, 202–209.

Liu, J., and Wang, F. (2017). Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. Front. Immunol. *8*, 1005.

Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P.A., Velde, C.V., Ward, C.M., Miller, T.M., Subramaniam, J.R., Rothstein, J.D., Marklund, S., Andersen, P.M., et al. (2004). Toxicity of Familial ALS-Linked SOD1 Mutants from Selective Recruitment to Spinal Mitochondria. Neuron *43*, 5–17.

Liu, L., Tian, D., Liu, C., Yu, K., and Bai, J. (2019). Metformin Enhances Functional Recovery of Peripheral Nerve in Rats with Sciatic Nerve Crush Injury. Med Sci Monit *25*, 10067–10076.

Loaiza, A., Porras, O.H., and Barros, L.F. (2003). Glutamate Triggers Rapid Glucose Transport Stimulation in Astrocytes as Evidenced by Real-Time Confocal Microscopy. J. Neurosci. *23*, 7337–7342.

Lobsiger, C.S., Boillee, S., McAlonis-Downes, M., Khan, A.M., Feltri, M.L., Yamanaka, K., and Cleveland, D.W. (2009). Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 4465–4470.

Loeffler, J., Picchiarelli, G., Dupuis, L., and Gonzalez De Aguilar, J. (2016). The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Brain Pathology *26*, 227–236.

Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chiò, A., Mitchell, D., Swingler, R.J., Millul, A., Benn, E., Beghi, E., and EURALS (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. J Neurol Neurosurg Psychiatry *81*, 385–390.

Logroscino, G., Piccininni, M., Marin, B., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Alahdab, F., Asgedom, S.W., Awasthi, A., Chaiah, Y., et al. (2018). Global, regional, and national burden of motor neuron diseases 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet Neurology *17*, 1083–1097.

Longstreth, W.T., McGuire, V., Koepsell, T.D., Wang, Y., and van Belle, G. (1998). Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis and History of Physical Activity: A Population-Based Case-Control Study. Arch Neurol *55*, 201.

Lopaschuk, G.D., Barr, R., Thomas, P.D., and Dyck, J.R.B. (2003). Beneficial Effects of Trimetazidine in Ex Vivo Working Ischemic Hearts Are Due to a Stimulation of Glucose Oxidation Secondary to Inhibition of Long-Chain 3-Ketoacyl Coenzyme A Thiolase. Circulation Research *93*.

Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D.L., Jaswal, J.S., and Stanley, W.C. (2010). Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. Physiological Reviews *90*, 207–258.

Lorusso, S., Kline, D., Bartlett, A., Freimer, M., Agriesti, J., Hawash, A.A., Rich, M.M., Kissel, J.T., and David Arnold, W. (2019). Open-label trial of ranolazine for the treatment of paramyotonia congenita: Ranolazine for Paramyotonia. Muscle Nerve *59*, 240–243.

Lu, C.-H., Allen, K., Oei, F., Leoni, E., Kuhle, J., Tree, T., Fratta, P., Sharma, N., Sidle, K., Howard, R., et al. (2016). Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm *3*, e244.

Ludolph, A., Drory, V., Hardiman, O., Nakano, I., Ravits, J., Robberecht, W., Shefner, J., and for The WFN Research Group On ALS/MND (2015). A revision of the El Escorial criteria - 2015. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration *16*, 291–292.

Ludolph, A.C., Langen, K.J., Regard, M., Herzog, H., Kemper, B., Kuwert, T., Böttger, I.G., and Feinendegen, L. (1992). Frontal lobe function in amyotrophic lateral sclerosis: a neuropsychologic and positron emission tomography study. Acta Neurologica Scandinavica *85*, 81–89.

Ludolph, A.C., Dorst, J., Dreyhaupt, J., Weishaupt, J.H., Kassubek, J., Weiland, U., Meyer, T., Petri, S., Hermann, A., Emmer, A., et al. (2020). Effect of High-Caloric Nutrition on Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Ann Neurol *87*, 206–216.

Luiken, J.J.F.P., Dyck, D.J., Han, X.-X., Tandon, N.N., Arumugam, Y., Glatz, J.F.C., and Bonen, A. (2002). Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism *282*, E491–E495.

Luo, G., Yi, J., Ma, C., Xiao, Y., Yi, F., Yu, T., and Zhou, J. (2013). Defective Mitochondrial Dynamics Is an Early Event in Skeletal Muscle of an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. PLoS ONE *8*, e82112.

Magrané, J., and Manfredi, G. (2009). Mitochondrial Function, Morphology, and Axonal Transport in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Antioxidants & Redox Signaling *11*, 1615–1626.

Magrané, J., Cortez, C., Gan, W.-B., and Manfredi, G. (2014). Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. Hum Mol Genet *23*, 1413–1424.

Maher, F., Vannucci, S.J., and Simpson, I.A. (1994). Glucose transporter proteins in brain. FASEB j. *8*, 1003–1011.

Mahoney, D.J., Rodriguez, C., Devries, M., Yasuda, N., and Tarnopolsky, M.A. (2004). Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve *29*, 656–662.

Mahoney, D.J., Kaczor, J.J., Bourgeois, J., Yasuda, N., and Tarnopolsky, M.A. (2006). Oxidative stress and antioxidant enzyme upregulation in SOD1-G93A mouse skeletal muscle. Muscle Nerve *33*, 809–816.

Malek, A.M., Barchowsky, A., Bowser, R., Youk, A., and Talbott, E.O. (2012). Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis of epidemiological studies. Environmental Research *117*, 112–119.

Manjaly, Z.R., Scott, K.M., Abhinav, K., Wijesekera, L., Ganesalingam, J., Goldstein, L.H., Janssen, A., Dougherty, A., Willey, E., Stanton, B.R., et al. (2010). The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. Amyotrophic Lateral Sclerosis *11*, 439–442.

Marin, B., Desport, J.C., Kajeu, P., Jesus, P., Nicolaud, B., Nicol, M., Preux, P.M., and Couratier, P. (2011). Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry *82*, 628–634.

Marin, B., Hamidou, B., Couratier, P., Nicol, M., Delzor, A., Raymondeau, M., Druet-Cabanac, M., Lautrette, G., Boumediene, F., Preux, P.M., et al. (2014). Population-based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in an ageing Europe--the French register of ALS in Limousin (FRALim register). Eur J Neurol *21*, 1292–1300, e78-79.

Marin, B., Boumédiene, F., Logroscino, G., Couratier, P., Babron, M.-C., Leutenegger, A.L., Copetti, M., Preux, P.-M., and Beghi, E. (2016). Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. Int. J. Epidemiol. dyw061.

Marini, C., Morbelli, S., Cistaro, A., Campi, C., Caponnetto, C., Bauckneht, M., Bellini, A., Buschiazzo, A., Calamia, I., Beltrametti, M.C., et al. (2018). Interplay between spinal cord and cerebral cortex metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Brain *141*, 2272–2279.

Mariosa, D., Kamel, F., Bellocco, R., Ye, W., and Fang, F. (2015). Association between diabetes and amyotrophic lateral sclerosis in Sweden. Eur J Neurol *22*, 1436–1442.

Mariosa, D., Hammar, N., Malmström, H., Ingre, C., Jungner, I., Ye, W., Fang, F., and Walldius, G. (2017). Blood biomarkers of carbohydrate, lipid, and apolipoprotein metabolisms and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A more than 20-year follow-up of the Swedish AMORIS cohort: Blood Biomarkers of Energy Metabolism and ALS Risk. Ann Neurol. *81*, 718–728.

Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. Curr Biol *10*, 1247–1255.

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

Matías-Guiu, J.A., Pytel, V., Cabrera-Martín, M.N., Galán, L., Valles-Salgado, M., Guerrero, A., Moreno-Ramos, T., Matías-Guiu, J., and Carreras, J.L. (2016). Amyloid- and FDG-PET imaging in amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Nucl Med Mol Imaging *43*, 2050–2060.

Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2002). Mutated Human SOD1 Causes Dysfunction of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of Transgenic Mice. Journal of Biological Chemistry *277*, 29626–29633.

Mattson, M.P., Cutler, R.G., and Camandola, S. (2007). Energy Intake and Amyotrophic Lateral Sclerosis. NMM *9*, 17–20.

Mattsson, N., Insel, P.S., Palmqvist, S., Portelius, E., Zetterberg, H., Weiner, M., Blennow, K., Hansson, O., and the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016). Cerebrospinal fluid tau, neurogranin, and neurofilament light in Alzheimer's disease. EMBO Mol Med *8*, 1184–1196.

McCauley, M.E., and Baloh, R.H. (2019). Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. Acta Neuropathol *137*, 715–730.

McComas, A.J., Fawcett, P.R., Campbell, M.J., and Sica, R.E. (1971). Electrophysiological estimation of the number of motor units within a human muscle. J Neurol Neurosurg Psychiatry *34*, 121–131.

McCormack, J.G., Stanley, W.C., and Wolff, A.A. (1998). Ranolazine: A Novel Metabolic Modulator for the Treatment of Angina. General Pharmacology: The Vascular System *30*, 639–645.

McGarry, J.D., Mannaerts, G.P., and Foster, D.W. (1977). A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. J Clin Invest *60*, 265–270.

McVeigh, J.J., and Lopaschuk, G.D. (1990). Dichloroacetate stimulation of glucose oxidation improves recovery of ischemic rat hearts. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology *259*, H1079–H1085.

Meissner, F., Molawi, K., and Zychlinsky, A. (2010). Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1beta accelerates ALS pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 13046–13050.

Mejzini, R., Flynn, L.L., Pitout, I.L., Fletcher, S., Wilton, S.D., and Akkari, P.A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? Front. Neurosci. *13*, 1310.

Menzies, F.M. (2002). Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Brain *125*, 1522–1533.

Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., and Winder, W.W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism *273*, E1107–E1112.

Migrenne, S., Marsollier, N., Crucianiguglielmacci, C., and Magnan, C. (2006). Importance of the gut–brain axis in the control of glucose homeostasis. Current Opinion in Pharmacology *6*, 592–597.

Millecamps, S., Salachas, F., Cazeneuve, C., Gordon, P., Bricka, B., Camuzat, A., Guillot-Noel, L., Russaouen, O., Bruneteau, G., Pradat, P.-F., et al. (2010). SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. Journal of Medical Genetics *47*, 554–560.

Millecamps, S., Boillée, S., Le Ber, I., Seilhean, D., Teyssou, E., Giraudeau, M., Moigneu, C., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Corcia, P., et al. (2012). Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in *C9ORF72* and patients with mutations in other ALS-related genes. J Med Genet *49*, 258–263.

Miller, R.G., Bouchard, J.P., Duquette, P., Eisen, A., Gelinas, D., Harati, Y., Munsat, T.L., Powe, L., Rothstein, J., Salzman, P., et al. (1996). Clinical trials of riluzole in patients with ALS. Neurology *47*, 86S-92S.

Miller, R.G., Mitchell, J.D., and Moore, D.H. (2012). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). Cochrane Database of Systematic Reviews.

Miller, T.M., Smith, R.A., and Cleveland, D.W. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis and gene therapy. Nat Rev Neurol *2*, 462–463.

Mills, K.R., and Nithi, K.A. (1998). Peripheral and central motor conduction in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci *159*, 82–87.

Miquel, E., Cassina, A., Martínez-Palma, L., Bolatto, C., Trías, E., Gandelman, M., Radi, R., Barbeito, L., and Cassina, P. (2012). Modulation of Astrocytic Mitochondrial Function by Dichloroacetate Improves Survival and Motor Performance in Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. PLoS ONE *7*, e34776.

Mitchell, J.D., and Borasio, G.D. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis. *369*, 11.

Mitsumoto, H., Santella, R.M., Liu, X., Bogdanov, M., Zipprich, J., Wu, H.-C., Mahata, J., Kilty, M., Bednarz, K., Bell, D., et al. (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. Amyotrophic Lateral Sclerosis *9*, 177–183.

Miyazaki, K., Masamoto, K., Morimoto, N., Kurata, T., Mimoto, T., Obata, T., Kanno, I., and Abe, K. (2012). Early and Progressive Impairment of Spinal Blood Flow—Glucose Metabolism Coupling in Motor Neuron Degeneration of ALS Model Mice. J Cereb Blood Flow Metab *32*, 456–467.

Moglia, C., Calvo, A., Grassano, M., Canosa, A., Manera, U., D'Ovidio, F., Bombaci, A., Bersano, E., Mazzini, L., Mora, G., et al. (2019). Early weight loss in amyotrophic lateral sclerosis: outcome relevance and clinical correlates in a population-based cohort. J Neurol Neurosurg Psychiatry *90*, 666–673.

Molinari, F., Pin, F., Gorini, S., Chiandotto, S., Pontecorvo, L., Penna, F., Rizzuto, E., Pisu, S., Musarò, A., Costelli, P., et al. (2017). The mitochondrial metabolic reprogramming agent trimetazidine as an 'exercise mimetic' in cachectic C26-bearing mice: Metabolic modulation in cancer cachexia. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle *8*, 954–973.

Moloney, E.B., de Winter, F., and Verhaagen, J. (2014). ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. Front. Neurosci. *8*.

Mori, K., Weng, S.-M., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., Schmid, B., Kretzschmar, H.A., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., et al. (2013). The C9orf72 GGGGCC Repeat Is Translated into Aggregating Dipeptide-Repeat Proteins in FTLD/ALS. Science *339*, 1335–1338.

Morrison, B.M., Janssen, W.G., Gordon, J.W., and Morrison, J.H. (1998). Time course of neuropathology in the spinal cord of G86R superoxide dismutase transgenic mice. J Comp Neurol *391*, 64–77.

Mourouzis, I., Mantzouratou, P., Galanopoulos, G., Kostakou, E., Dhalla, A.K., Belardinelli, L., and Pantos, C. (2014). The Beneficial Effects of Ranolazine on Cardiac Function After Myocardial Infarction Are Greater in Diabetic Than in Nondiabetic Rats. J Cardiovasc Pharmacol Ther *19*, 457–469.

Muller, F.L., Song, W., Liu, Y., Chaudhuri, A., Pieke-Dahl, S., Strong, R., Huang, T.-T., Epstein, C.J., Roberts, L.J., Csete, M., et al. (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. Free Radical Biology and Medicine *40*, 1993–2004.

Münch, C., O'Brien, J., and Bertolotti, A. (2011). Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. Proc Natl Acad Sci USA *108*, 3548–3553.

Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., and Sacks, O.W. (2004). Occurrence of beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. Acta Neurol Scand *110*, 267–269.

Murdock, B.J., Zhou, T., Kashlan, S.R., Little, R.J., Goutman, S.A., and Feldman, E.L. (2017). Correlation of Peripheral Immunity With Rapid Amyotrophic Lateral Sclerosis Progression. JAMA Neurol *74*, 1446–1454.

Musarò, A. (2013). Understanding ALS: new therapeutic approaches. FEBS J *280*, 4315–4322.

Mustfa, N., Walsh, E., Bryant, V., Lyall, R.A., Addington-Hall, J., Goldstein, L.H., Donaldson, N., Polkey, M.I., Moxham, J., and Leigh, P.N. (2006). The effect of noninvasive ventilation on ALS patients and their caregivers. Neurology *66*, 1211–1217.

Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H., and Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. Nat Neurosci *10*, 615–622.

Nahlé, Z., Hsieh, M., Pietka, T., Coburn, C.T., Grimaldi, P.A., Zhang, M.Q., Das, D., and Abumrad, N.A. (2008). CD36-dependent Regulation of Muscle FoxO1 and PDK4 in the PPARδ/β-mediated Adaptation to Metabolic Stress. Journal of Biological Chemistry *283*, 14317–14326.

Nakken, O., Meyer, H.E., Stigum, H., and Holmøy, T. (2019). High BMI is associated with low ALS risk: A population-based study. Neurology *93*, e424–e432.

Nelson, L.M., McGuire, V., Longstreth, W.T., and Matkin, C. (2000). Population-Based Case-Control Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Western Washington State. I. Cigarette Smoking and Alcohol Consumption. American Journal of Epidemiology *151*, 156–163.

Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., et al. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Science *314*, 130–133.

Ngo, S.T., Baumann, F., Ridall, P.G., Pettitt, A.N., Henderson, R.D., Bellingham, M.C., and McCombe, P.A. (2012). The relationship between Bayesian motor unit number estimation and histological measurements of motor neurons in wild-type and SOD1G93A mice. Clinical Neurophysiology *123*, 2080–2091.

Ngo, S.T., Steyn, F.J., Huang, L., Mantovani, S., Pfluger, C.M.M., Woodruff, T.M., O'Sullivan, J.D., Henderson, R.D., and McCombe, P.A. (2015). Altered expression of metabolic proteins and adipokines in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Journal of the Neurological Sciences *357*, 22–27.

Nguyen, D.K.H., Thombre, R., and Wang, J. (2019). Autophagy as a common pathway in amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience Letters *697*, 34–48.

Nguyen, H.P., Van Broeckhoven, C., and van der Zee, J. (2018). ALS Genes in the Genomic Era and their Implications for FTD. Trends in Genetics *34*, 404–423.

Nguyen, M.D., Julien, J.P., and Rivest, S. (2001). Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1beta in neurodegeneration. Ann Neurol *50*, 630–639.

Niebroj-Dobosz, I., Rafałowska, J., Fidziańska, A., Gadamski, R., and Grieb, P. (2007). Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in SOD1G93A transgenic rats. Folia Neuropathol *45*, 236–241.

Nonaka, T., Masuda-Suzukake, M., Arai, T., Hasegawa, Y., Akatsu, H., Obi, T., Yoshida, M., Murayama, S., Mann, D.M.A., Akiyama, H., et al. (2013). Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. Cell Rep *4*, 124–134.

Novak, K.R., Norman, J., Mitchell, J.R., Pinter, M.J., and Rich, M.M. (2015). Sodium channel slow inactivation as a therapeutic target for myotonia congenita: Slow Inactivation. Ann Neurol. *77*, 320–332.

Okamoto, K., Hirai, S., Shoji, M., Senoh, Y., and Yamazaki, T. (1990). Axonal swellings in the corticospinal tracts in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol *80*, 222–226.

Orban, P., Devon, R.S., Hayden, M.R., and Leavitt, B.R. (2007). Juvenile amyotrophic lateral sclerosis. Handb Clin Neurol *82*, 301–312.

O'Reilly, É.J., Wang, H., Weisskopf, M.G., Fitzgerald, K.C., Falcone, G., McCullough, M.L., Thun, M., Park, Y., Kolonel, L.N., and Ascherio, A. (2013). Premorbid body mass index and risk of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration *14*, 205–211.

Ozdinler, P.H., Benn, S., Yamamoto, T.H., Güzel, M., Brown, R.H., and Macklis, J.D. (2011). Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G^{93}A transgenic ALS mice. J Neurosci *31*, 4166–4177.

Pagani, M., Chio, A., Valentini, M.C., Oberg, J., Nobili, F., Calvo, A., Moglia, C., Bertuzzo, D., Morbelli, S., De Carli, F., et al. (2014). Functional pattern of brain FDG-PET in amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *83*, 1067–1074.

Paganoni, S., Deng, J., Jaffa, M., Cudkowicz, M.E., and Wills, A.-M. (2011). Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve *44*, 20–24.

Paganoni, S., Macklin, E.A., Lee, A., Murphy, A., Chang, J., Zipf, A., Cudkowicz, M., and Atassi, N. (2014). Diagnostic timelines and delays in diagnosing amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener *15*, 453–456.

Paganoni, S., Karam, C., Joyce, N., Bedlack, R., and Carter, G.T. (2015). Comprehensive rehabilitative care across the spectrum of amyotrophic lateral sclerosis. NeuroRehabilitation *37*, 53–68.

Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S.T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J., et al. (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.

Pandya, R.S., Zhu, H., Li, W., Bowser, R., Friedlander, R.M., and Wang, X. (2013). Therapeutic neuroprotective agents for amyotrophic lateral sclerosis. Cell. Mol. Life Sci. *70*, 4729–4745.

Papadeas, S.T., Kraig, S.E., O'Banion, C., Lepore, A.C., and Maragakis, N.J. (2011). Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 17803–17808.

Pape, J.A., and Grose, J.H. (2020). The effects of diet and sex in amyotrophic lateral sclerosis. Revue Neurologique *176*, 301–315.

Park, H., Kaushik, V.K., Constant, S., Prentki, M., Przybytkowski, E., Ruderman, N.B., and Saha, A.K. (2002). Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. J Biol Chem *277*, 32571–32577.

Parkinson, N., Ince, P.G., Smith, M.O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P.M., Morrison, K.E., Pall, H.S., Hardiman, O., Collinge, J., et al. (2006). ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). Neurology *67*, 1074–1077.

Parone, P.A., Da Cruz, S., Han, J.S., McAlonis-Downes, M., Vetto, A.P., Lee, S.K., Tseng, E., and Cleveland, D.W. (2013). Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci *33*, 4657–4671.

Pascuzzi, R.M., Shefner, J., Chappell, A.S., Bjerke, J.S., Tamura, R., Chaudhry, V., Clawson, L., Haas, L., and Rothstein, J.D. (2010). A phase II trial of talampanel in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler *11*, 266–271.

Pasinelli, P., Belford, M.E., Lennon, N., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., Trotti, D., and Brown, R.H. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. Neuron *43*, 19–30.

Paulukonis, S.T., Roberts, E.M., Valle, J.P., Collins, N.N., English, P.B., and Kaye, W.E. (2015). Survival and Cause of Death among a Cohort of Confirmed Amyotrophic Lateral Sclerosis Cases. PLoS ONE *10*, e0131965.

Pedrini, S., Sau, D., Guareschi, S., Bogush, M., Brown, R.H., Naniche, N., Kia, A., Trotti, D., and Pasinelli, P. (2010). ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. Hum Mol Genet *19*, 2974–2986.

Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M.R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J.S., Estévez, A.G., and Barbeito, L. (2004). Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem *89*, 464–473.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. Proceedings of the National Academy of Sciences *91*, 10625–10629.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (2004). Neuroenergetics: Calling Upon Astrocytes to Satisfy Hungry Neurons. Neuroscientist *10*, 53–62.

Pellerin, L., Pellegri, G., Bittar, P.G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J.-L., Stella, N., and Magistretti, P.J. (1998). Evidence Supporting the Existence of an Activity-Dependent Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle. Dev Neurosci *20*, 291–299.

Perrie, W.T., Lee, G.T., Curtis, E.M., Sparke, J., Buller, J.R., and Rossi, M.L. (1993). Changes in the myelinated axons of femoral nerve in amyotrophic lateral sclerosis. J Neural Transm Suppl *39*, 223–233.

Peter, R.S., Rosenbohm, A., Dupuis, L., Brehme, T., Kassubek, J., Rothenbacher, D., Nagel, G., and Ludolph, A.C. (2017). Life course body mass index and risk and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: results from the ALS registry Swabia. Eur J Epidemiol *32*, 901–908.

Petit, J.-M., and Magistretti, P.J. (2016). Regulation of neuron–astrocyte metabolic coupling across the sleep–wake cycle. Neuroscience *323*, 135–156.

Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., and Hermine, O. (2017). ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? Front. Aging Neurosci. *9*.

Pette, D., and Staron, R.S. (2001). Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. Histochem Cell Biol *115*, 359–372.

Pfohl, S.R., Halicek, M.T., and Mitchell, C.S. (2015). Characterization of the Contribution of Genetic Background and Gender to Disease Progression in the SOD1 G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. JND *2*, 137–150.

Philips, T., and Rothstein, J.D. (2015). Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Current Protocols in Pharmacology *69*.

Pickles, S., Destroismaisons, L., Peyrard, S.L., Cadot, S., Rouleau, G.A., Brown, R.H., Julien, J.-P., Arbour, N., and Vande Velde, C. (2013). Mitochondrial damage revealed by immunoselection for ALS-linked misfolded SOD1. Human Molecular Genetics *22*, 3947–3959.

Pickles, S., Semmler, S., Broom, H.R., Destroismaisons, L., Legroux, L., Arbour, N., Meiering, E., Cashman, N.R., and Vande Velde, C. (2016). ALS-linked misfolded SOD1 species have divergent impacts on mitochondria. Acta Neuropathol Commun *4*, 43.

Picone, P., Nuzzo, D., Caruana, L., Messina, E., Barera, A., Vasto, S., and Di Carlo, M. (2015). Metformin increases APP expression and processing via oxidative stress, mitochondrial dysfunction and NF-κB activation: Use of insulin to attenuate metformin's effect. Biochim Biophys Acta *1853*, 1046–1059.

Poindron, P., Callizot, N., and Piguet, P. (2008). Theoretical Considerations on Animal Models. In Biovalley Monographs, P. Poindron, and P. Piguet, eds. (Basel: KARGER), pp. 1–10.

Poitry-Yamate, C.L., Poitry, S., and Tsacopoulos, M. (1995). Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. J Neurosci *15*, 5179–5191.

Pradat, P.-F., Bruneteau, G., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Dupuis, L., Jokic, N., Salachas, F., Le Forestier, N., Echaniz-Laguna, A., Dubourg, O., Hauw, J.-J., et al. (2007). Muscle Nogo-a expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. Ann Neurol. *62*, 15–20.

Pradat, P.-F., Bruneteau, G., Gordon, P.H., Dupuis, L., Bonnefont-Rousselot, D., Simon, D., Salachas, F., Corcia, P., Frochot, V., Lacorte, J.-M., et al. (2010). Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis *11*, 166–171.

Pradat, P.-F., Dubourg, O., de Tapia, M., di Scala, F., Dupuis, L., Lenglet, T., Bruneteau, G., Salachas, F., Lacomblez, L., Corvol, J.-C., et al. (2012). Muscle Gene Expression Is a Marker of Amyotrophic Lateral Sclerosis Severity. Neurodegener Dis *9*, 38–52.

Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K., and Rouleau, G.A. (2001). Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase 1 in Transgenic Mice Does Not Lead to Motor Impairment. J. Neurosci. *21*, 3369–3374.

Prentki, M. (1996). New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. Eur J Endocrinol *134*, 272–286.

ProGas Study Group (2015). Gastrostomy in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ProGas): a prospective cohort study. Lancet Neurol *14*, 702–709.

Pugdahl, K., Fuglsang-Frederiksen, A., Johnsen, B., de Carvalho, M., Fawcett, P.R.W., Labarre-Vila, A., Liguori, R., Nix, W.A., and Schofield, I.S. (2008). A prospective multicentre study on sural nerve action potentials in ALS. Clin Neurophysiol *119*, 1106–1110.

Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L., and Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. Nat Neurosci *9*, 408–419.

Pupillo, E., Messina, P., Giussani, G., Logroscino, G., Zoccolella, S., Chiò, A., Calvo, A., Corbo, M., Lunetta, C., Marin, B., et al. (2014a). Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: A European population-based case-control study: Physical Activity in ALS. Ann Neurol. *75*, 708–716.

Pupillo, E., Messina, P., Logroscino, G., Beghi, E., and the SLALOM Group (2014b). Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: A population-based study: Long-Term Survival in ALS. Ann Neurol. *75*, 287–297.

Quessada, C., Bouscary, A., René, F., Valle, C., Ferri, A., Ngo, S.T., and Loeffler, J.-P. (2021). Skeletal Muscle Metabolism: Origin or Prognostic Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Development? Cells *10*, 1449.

Radunović, A., Mitsumoto, H., and Leigh, P.N. (2007). Clinical care of patients with amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet Neurology *6*, 913–925.

Rajagopalan, V., and Pioro, E.P. (2019). Longitudinal 18F-FDG PET and MRI Reveal Evolving Imaging Pathology That Corresponds to Disease Progression in a Patient With ALS-FTD. Front. Neurol. *10*, 234.

Rakhit, R., Cunningham, P., Furtos-Matei, A., Dahan, S., Qi, X.-F., Crow, J.P., Cashman, N.R., Kondejewski, L.H., and Chakrabartty, A. (2002). Oxidation-induced Misfolding and Aggregation of Superoxide Dismutase and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis. Journal of Biological Chemistry *277*, 47551–47556.

Randle, P.J. (1998). Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. Diabetes Metab. Rev. 21.

Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., and Newsholme, E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet *1*, 785–789.

Ravits, J., Appel, S., Baloh, R.H., Barohn, R., Rix Brooks, B., Elman, L., Floeter, M.K., Henderson, C., Lomen-Hoerth, C., Macklis, J.D., et al. (2013). Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: What phenotype, neuropathology and

genetics are telling us about pathogenesis. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration *14*, 5–18.

Ray, S.S., Nowak, R.J., Strokovich, K., Brown, R.H., Walz, T., and Lansbury, P.T. (2004). An intersubunit disulfide bond prevents in vitro aggregation of a superoxide dismutase-1 mutant linked to familial amytrophic lateral sclerosis. Biochemistry *43*, 4899–4905.

Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., et al. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. Nat Genet *13*, 43–47.

Reddy, J.K., and Hashimoto, T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. Annu Rev Nutr *21*, 193–230.

Reich-Slotky, R., Andrews, J., Cheng, B., Buchsbaum, R., Levy, D., Kaufmann, P., and Thompson, J.L.P. (2013). Body mass index (BMI) as predictor of ALSFRS-R score decline in ALS patients. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration *14*, 212–216.

Renton, A.E., Chiò, A., and Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. Nat Neurosci *17*, 17–23.

Reyes, E.T., Perurena, O.H., Festoff, B.W., Jorgensen, R., and Moore, W.V. (1984). Insulin resistance in amyotrophic lateral sclerosis. Journal of the Neurological Sciences *63*, 317–324.

Ricquier, D., and Kader, J.-C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. Biochemical and Biophysical Research Communications *73*, 577–583.

Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., Morrison, J.H., and Gordon, J.W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences *92*, 689–693.

Robelin, L., and Gonzalez De Aguilar, J.L. (2014). Blood Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Myth or Reality? BioMed Research International *2014*, 1–11.

Rocha, M.C., Pousinha, P.A., Correia, A.M., Sebastião, A.M., and Ribeiro, J.A. (2013). Early Changes of Neuromuscular Transmission in the SOD1(G93A) Mice Model of ALS Start Long before Motor Symptoms Onset. PLoS ONE *8*, e73846.

Rodrigues, T.B., Valette, J., and Bouzier-Sore, A.-K. (2013). 13C NMR spectroscopy applications to brain energy metabolism. Front. Neuroenergetics *5*.

Rolfe, D.F., Hulbert, A.J., and Brand, M.D. (1994). Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. Biochim Biophys Acta *1188*, 405–416.

Roselli, F., and Caroni, P. (2014). Modeling Neuronal Vulnerability in ALS. Neuron *83*, 758–760.

Rosen, D.R. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature *364*, 362.

Rossi, S., Cozzolino, M., and Carrì, M.T. (2016). Old *versus* New Mechanisms in the Pathogenesis of ALS: New mechanisms in ALS. Brain Pathology *26*, 276–286.

Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, A., Stauch, B.L., and Coyle, J.T. (1990). Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol. *28*, 18–25.

Rothstein, J.D., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med *326*, 1464–1468.

Rotshenker, S. (2011). Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. J Neuroinflammation *8*, 109.

Rotunno, M.S., and Bosco, D.A. (2013). An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. Front. Cell. Neurosci. *7*.

Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Menger, Y., Boutillier, A.-L., and 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. Journal of Neuroscience *27*, 5535–5545.

Rowland, L.P., and Shneider, N.A. (2001). Amyotrophic Lateral Sclerosis. The New England Journal of Medicine 13.

Rusten, T.E., and Simonsen, A. (2008). ESCRT functions in autophagy and associated disease. Cell Cycle *7*, 1166–1172.

Ryan, M., Heverin, M., McLaughlin, R.L., and Hardiman, O. (2019). Lifetime Risk and Heritability of Amyotrophic Lateral Sclerosis. JAMA Neurol *76*, 1367.

Rynders, C.A., Blanc, S., DeJong, N., Bessesen, D.H., and Bergouignan, A. (2018). Sedentary behaviour is a key determinant of metabolic inflexibility. J Physiol *596*, 1319–1330.

Sabatelli, M., Madia, F., Conte, A., Luigetti, M., Zollino, M., Mancuso, I., Lo Monaco, M., Lippi, G., and Tonali, P. (2008). Natural history of young-adult amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *71*, 876–881.

Saccon, R.A., Bunton-Stasyshyn, R.K.A., Fisher, E.M.C., and Fratta, P. (2013). Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? Brain *136*, 2342–2358.

Saha, A.K., Schwarsin, A.J., Roduit, R., Masse, F., Kaushik, V., Tornheim, K., Prentki, M., and Ruderman, N.B. (2000). Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta -D-ribofuranoside. J Biol Chem *275*, 24279–24283.

Sakamoto, K., and Holman, G.D. (2008). Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. Am J Physiol Endocrinol Metab *295*, E29-37.

Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature *414*, 799–806.

Santini, E., Heiman, M., Greengard, P., Valjent, E., and Fisone, G. (2009). Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. Sci Signal *2*, ra36.

Sasaki, S. (2011). Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol *70*, 349–359.

Sasaki, S., and Iwata, M. (1996). Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience Letters *204*, 53–56.

Sasaki, S., and Iwata, M. (1999). Motor neuron disease with predominantly upper extremity involvement: a clinicopathological study. Acta Neuropathol *98*, 645–650.

Sasaki, S., Horie, Y., and Iwata, M. (2007). Mitochondrial alterations in dorsal root ganglion cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol *114*, 633–639.

Sawada, H. (2017). Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. Expert Opin Pharmacother *18*, 735–738.

Scaricamazza, S., Salvatori, I., Giacovazzo, G., Loeffler, J.P., Renè, F., Rosina, M., Quessada, C., Proietti, D., Heil, C., Rossi, S., et al. (2020). Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-SOD1G93A Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target. IScience *23*, 101087.

Scarmeas, N., Shih, T., Stern, Y., Ottman, R., and Rowland, L.P. (2002). Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. Neurology *59*, 773–775.

Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H.E., Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., Allmeroth, K., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., et al. (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol *133*, 887–906.

Schaefer, A.M., Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2005). A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J. Comp. Neurol. *490*, 209–219.

Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. Physiological Reviews *91*, 1447–1531.

Schiaffino, S., Hanzlíková, V., and Pierobon, S. (1970). Relations Between Structure And Function In Rat Skeletal Muscle Fibers. Journal of Cell Biology *47*, 107–119.

Schoenfeld, M.A., Tempelmann, C., Gaul, C., Kühnel, G.R., Düzel, E., Hopf, J.-M., Feistner, H., Zierz, S., Heinze, H.-J., and Vielhaber, S. (2005). Functional motor compensation in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol *252*, 944–952.

Senda, J., Kato, S., Kaga, T., Ito, M., Atsuta, N., Nakamura, T., Watanabe, H., Tanaka, F., Naganawa, S., and Sobue, G. (2011). Progressive and widespread brain damage in ALS: MRI voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging study. Amyotrophic Lateral Sclerosis *12*, 59–69.

Serarslan, Y., Bal, R., Altug, M.E., Kontaş, T., Keleş, O.N., Unal, D., and Unal, B. (2009). Effects of trimetazidine on crush injury of the sciatic nerve in rats: A biochemical and stereological study. Brain Research *1247*, 11–20.

Shaw, P.J., Ince, P.G., Falkous, G., and Mantle, D. (1995). Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. Ann Neurol. *38*, 691–695.

Shibata, N., Asayama, K., Hirano, A., and Kobayashi, M. (1996). Immunohistochemical Study on Superoxide Dismutases in Spinal Cords from Autopsied Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. Dev Neurosci *18*, 492–498.

Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Canto, M.C.D., Gurney, M.E., Komori, T., Umahara, T., and Asayama, K. (1998). Presence of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) immunoreactivity in neuronal hyaline inclusions in spinal cords from mice carrying a transgene for Gly93Ala mutant human Cu/Zn SOD. Acta Neuropathologica *95*, 136–142.

Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S., and Kobayashi, M. (2001). Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. Brain Research *917*, 97–104.

Siklós, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R.G., Joó, F., and Appel, S.H. (1996). Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophc lateral sclerosis: Calcium in ALS Motor Nerve Terminals. Ann Neurol. *39*, 203–216.

Simpson, E.P., Henry, Y.K., Henkel, J.S., Smith, R.G., and Appel, S.H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: A potential biomarker of disease burden. Neurology *62*, 1758–1765.

Sjogren, M. (2004). Increased intrathecal inflammatory activity in frontotemporal dementia: pathophysiological implications. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry *75*, 1107–1111.

Smith, E.F., Shaw, P.J., and De Vos, K.J. (2019). The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience Letters *710*, 132933.

Smith, R.G., Henry, Y.K., Mattson, M.P., and Appel, S.H. (1998). Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol. *44*, 696–699.

Soares, M.J., and Müller, M.J. (2018). Resting energy expenditure and body composition: critical aspects for clinical nutrition. Eur J Clin Nutr *72*, 1208–1214.

Song, W., Song, Y., Kincaid, B., Bossy, B., and Bossy-Wetzel, E. (2013). Mutant SOD1G93A triggers mitochondrial fragmentation in spinal cord motor neurons: neuroprotection by SIRT3 and PGC-1α. Neurobiol Dis *51*, 72–81.

Soo, K.Y., Sultana, J., King, A., Atkinson, R., Warraich, S.T., Sundaramoorthy, V., Blair, I., Farg, M.A., and Atkin, J.D. (2015). ALS-associated mutant FUS inhibits macroautophagy which is restored by overexpression of Rab1. Cell Death Discovery *1*, 15030.

Sorenson, E.J. (2012). The electrophysiology of the motor neuron diseases. Neurol Clin *30*, 605–620.

Spataro, R., Bono, V., Marchese, S., and La Bella, V. (2012). Tracheostomy mechanical ventilation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Clinical features and survival analysis. Journal of the Neurological Sciences *323*, 66–70.

Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A.C., and Robertson, R.C. (1987). Guam Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism- Dementia Linked to a Plant Excitant Neurotoxin. *237*, 6.

Spilman, P., Podlutskaya, N., Hart, M.J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R., and Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. PLoS One *5*, e9979.

Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P.F., Le Forestier, N., Marouan, A., Dib, M., and Meininger, V. (2002). Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. Journal of the Neurological Sciences *193*, 73–78.

Staats, K.A., Hernandez, S., Schönefeldt, S., Bento-Abreu, A., Dooley, J., Van Damme, P., Liston, A., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2013). Rapamycin increases survival in ALS mice lacking mature lymphocytes. Mol Neurodegener *8*, 31.

Stanley, W.C. (2002). Partial fatty acid oxidation inhibitors for stable angina. Expert Opinion on Investigational Drugs *11*, 615–629.

Stanton, B.R., Williams, V.C., Leigh, P.N., Williams, S.C.R., Blain, C.R.V., Jarosz, J.M., and Simmons, A. (2007). Altered cortical activation during a motor task in ALS: Evidence for involvement of central pathways. J Neurol *254*, 1260–1267.

Steyn, F.J., Ioannides, Z.A., van Eijk, R.P.A., Heggie, S., Thorpe, K.A., Ceslis, A., Heshmat, S., Henders, A.K., Wray, N.R., van den Berg, L.H., et al. (2018). Hypermetabolism in ALS is associated with greater functional decline and shorter survival. J Neurol Neurosurg Psychiatry *89*, 1016–1023.

Stoica, R., De Vos, K.J., Paillusson, S., Mueller, S., Sancho, R.M., Lau, K.-F., Vizcay-Barrena, G., Lin, W.-L., Xu, Y.-F., Lewis, J., et al. (2014). ER–mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. Nat Commun *5*, 3996.

Stoica, R., Paillusson, S., Gomez-Suaga, P., Mitchell, J.C., Lau, D.H., Gray, E.H., Sancho, R.M., Vizcay-Barrena, G., De Vos, K.J., Shaw, C.E., et al. (2016). ALS / FTD -associated FUS activates GSK -3β to disrupt the VAPB – PTPIP 51 interaction and ER –mitochondria associations. EMBO Rep *17*, 1326–1342.

Suarez, R.K. (2012). Energy and Metabolism. In Comprehensive Physiology, R. Terjung, ed. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p. c110009.

Swinnen, B., and Robberecht, W. (2014). The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. Nat Rev Neurol *10*, 661–670.

Szelechowski, M., Amoedo, N., Obre, E., Léger, C., Allard, L., Bonneu, M., Claverol, S., Lacombe, D., Oliet, S., Chevallier, S., et al. (2018). Metabolic Reprogramming in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Sci Rep *8*, 3953.

Tafreshi, M.J., and Fisher, E. (2006). Ranolazine: A New Approach to Management of Patients with Angina. Ann Pharmacother *40*, 689–693.

Talanian, J.L., Holloway, G.P., Snook, L.A., Heigenhauser, G.J.F., Bonen, A., and Spriet, L.L. (2010). Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism *299*, E180–E188.

Tanaka, M., Ichiba, T., Kondo, S., Hirai, S., and Okamoto, K. (2003a). Cerebral blood flow and oxygen metabolism in patients with progressive dementia and amyotrophic lateral sclerosis. Neurological Research *25*, 351–356.

Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R.X., Tachibana, K., et al. (2003b). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 15924–15929.

Taylor, P., and Radić, Z. (1994). The cholinesterases: from genes to proteins. Annu Rev Pharmacol Toxicol *34*, 281–320.

Taylor, J.P., Brown, R.H., and Cleveland, D.W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. Nature *539*, 197–206.

Tefera, T.W., Steyn, F.J., Ngo, S.T., and Borges, K. (2021). CNS glucose metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a therapeutic target? Cell Biosci *11*, 14.

Terruzzi, I., Montesano, A., Senesi, P., Vacante, F., Benedini, S., and Luzi, L. (2017). Ranolazine promotes muscle differentiation and reduces oxidative stress in C2C12 skeletal muscle cells. Endocrine *58*, 33–45.

Tetik, C., Ozden, A., Calli, N., Bilgihan, A., Bostanci, B., Yis, O., and Bayramoglu, H. (1999). Cytoprotective effect of trimetazidine on 60 minutes of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. Transpl Int *12*, 108–112.

Thomson, D. (2018). The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. IJMS *19*, 3125.

Thomson, D.M., and Winder, W.W. (2009). AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. Acta Physiologica *196*, 147–154.

Thorens, B., and Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism *298*, E141–E145.

Tortelli, R., Ruggieri, M., Cortese, R., D'Errico, E., Capozzo, R., Leo, A., Mastrapasqua, M., Zoccolella, S., Leante, R., Livrea, P., et al. (2012). Elevated cerebrospinal fluid neurofilament light levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a possible marker of disease severity and progression. Eur J Neurol *19*, 1561–1567.

Towne, C., Raoul, C., Schneider, B.L., and 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, B.J., Codd, M.B., Corr, B., Forde, C., Frost, E., and Hardiman, O.M. (2000). Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. Arch Neurol *57*, 1171–1176.

Treebak, J.T., Glund, S., Deshmukh, A., Klein, D.K., Long, Y.C., Jensen, T.E., Jørgensen, S.B., Viollet, B., Andersson, L., Neumann, D., et al. (2006). AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. Diabetes *55*, 2051–2058.

Trotti, null, Rolfs, null, Danbolt, null, Brown, null, and Hediger, null (1999). SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. Nat Neurosci *2*, 848.

Tsacopoulos, M., Evêquoz-Mercier, V., Perrottet, P., and Buchner, E. (1988). Honeybee retinal glial cells transform glucose and supply the neurons with metabolic substrate. Proc Natl Acad Sci U S A *85*, 8727–8731.

Tsai, C.-P., Chang, B.-H., and Lee, C.T.-C. (2013). Underlying Cause and Place of Death Among Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis in Taiwan: A Population-Based Study, 2003^|^ndash;2008. Journal of Epidemiology *23*, 424–428.

Tsujihata, M., Hazama, R., Yoshimura, T., Satoh, A., Mori, M., and Nagataki, S. (1984). The motor end-plate fine structure and ultrastructural localization of acetylcholine receptors in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve *7*, 243–249.

Turnbull, J. (2018). Is edaravone harmful? (A placebo is not a control). Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration *19*, 477–482.

Turner, B., and Talbot, K. (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. Progress in Neurobiology *85*, 94–134.

Turner, B.J., Rembach, A., Spark, R., Lopes, E.C., and Cheema, S.S. (2003). Opposing effects of low and high-dose clozapine on survival of transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. J. Neurosci. Res. *74*, 605–613.

Turner, B.J., Ackerley, S., Davies, K.E., and Talbot, K. (2010). Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. Hum Mol Genet *19*, 815–824.

Turner, M.R., Parton, M.J., and Leigh, P.N. (2001). Clinical Trials in ALS: An Overview. Semin Neurol *21*, 167–176.

Turner, M.R., Goldacre, R., Ramagopalan, S., Talbot, K., and Goldacre, M.J. (2013). Autoimmune disease preceding amyotrophic lateral sclerosis: An epidemiologic study. Neurology *81*, 1222–1225.

Turner, M.R., Al-Chalabi, A., Chio, A., Hardiman, O., Kiernan, M.C., Rohrer, J.D., Rowe, J., Seeley, W., and Talbot, K. (2017). Genetic screening in sporadic ALS and FTD. J Neurol Neurosurg Psychiatry *88*, 1042–1044.

Urushitani, M., Kurisu, J., Tsukita, K., and Takahashi, R. (2002). Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem *83*, 1030–1042.

Valenti, M., Pontieri, F.E., Conti, F., Altobelli, E., Manzoni, T., and Frati, L. (2005). Amyotrophic lateral sclerosis and sports: a case-control study. Eur J Neurol *12*, 223–225.

Valentine, J.S., Doucette, P.A., and Zittin Potter, S. (2005). Copper-Zinc Superoxide Dismutase And Amyotrophic Lateral Sclerosis. Annu. Rev. Biochem. *74*, 563–593.

Van Damme, P., Bogaert, E., Dewil, M., Hersmus, N., Kiraly, D., Scheveneels, W., Bockx, I., Braeken, D., Verpoorten, N., Verhoeven, K., et al. (2007). Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 14825–14830.

Van Laere, K., Vanhee, A., Verschueren, J., De Coster, L., Driesen, A., Dupont, P., Robberecht, W., and Van Damme, P. (2014). Value of ^{18} Fluorodeoxyglucose–Positron-Emission Tomography in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Prospective Study. JAMA Neurol *71*, 553.

Van Weehaeghe, D., Ceccarini, J., Delva, A., Robberecht, W., Van Damme, P., and Van Laere, K. (2016). Prospective Validation of ^{18} F-FDG Brain PET Discriminant Analysis Methods in the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. J Nucl Med *57*, 1238–1243.

Vandoorne, T., De Bock, K., and Van Den Bosch, L. (2018). Energy metabolism in ALS: an underappreciated opportunity? Acta Neuropathol *135*, 489–509.

Véga, C., Martiel, J., Drouhault, D., Burckhart, M., and Coles, J.A. (2003). Uptake of locally applied deoxyglucose, glucose and lactate by axons and schwann cells of rat vagus nerve. The Journal of Physiology *546*, 551–564.

Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. Mol Cell Biol *20*, 1868–1876.

Velasco, G., Geelen, M.J., and Guzmán, M. (1997). Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. Arch Biochem Biophys *337*, 169–175.

Vielhaber, S., Winkler, K., Kirches, E., Kunz, D., Büchner, M., Feistner, H., Elger, C.E., Ludolph, A.C., Riepe, M.W., and Kunz, W.S. (1999). Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Journal of the Neurological Sciences *169*, 133–139.

Vinceti, M., Bonvicini, F., Rothman, K.J., Vescovi, L., and Wang, F. (2010). The relation between amyotrophic lateral sclerosis and inorganic selenium in drinking water: a population-based case-control study. Environ Health *9*, 77.

Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Moore, V.D.G., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013). Characterization of early pathogenesis in the SOD1 ^{G93A} mouse model of ALS: part I, background and methods. Brain Behav *3*, 335–350.

Voutsinos-Porche, B. (2003). Glial Glutamate Transporters and Maturation of the Mouse Somatosensory Cortex. Cerebral Cortex *13*, 1110–1121.

Vucic, S., and Rutkove, S.B. (2018). Neurophysiological biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. Current Opinion in Neurology *31*, 640–647.

Waibel, S., Reuter, A., Malessa, S., Blaugrund, E., and Ludolph, AlbertC. (2004). Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. J Neurol *251*.

Waldemar, G., Vorstrup, S., Jensen, T.S., Johnsen, A., and Boysen, G. (1992). Focal reductions of cerebral blood flow in amyotrophic lateral sclerosis: a [99mTc]-d,l-HMPAO SPECT study. J Neurol Sci *107*, 19–28.

Wan, P., Su, W., Zhang, Y., Li, Z., Deng, C., and Zhuo, Y. (2017). Trimetazidine protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/Ho-1 pathway. Clinical Science *131*, 2363–2375.

Wang, Y.-P., and Lei, Q.-Y. (2018). Metabolite sensing and signaling in cell metabolism. Sig Transduct Target Ther *3*, 30.

Wang, F.C., Gérard, P., and Bouquiaux, O. (2004). [Advantages and limitations of the motor unit number estimation techniques]. Rev Med Liege *59 Suppl 1*, 38–48.

Wang, L., Sharma, K., Deng, H.-X., Siddique, T., Grisotti, G., Liu, E., and Roos, R.P. (2008). Restricted expression of mutant SOD1 in spinal motor neurons and interneurons induces motor neuron pathology. Neurobiology of Disease *29*, 400–408.

Wang, L., Gutmann, D.H., and Roos, R.P. (2011). Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. Human Molecular Genetics *20*, 286–293.

Wang, W., Li, L., Lin, W.-L., Dickson, D.W., Petrucelli, L., Zhang, T., and Wang, X. (2013). The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. Hum Mol Genet *22*, 4706–4719.

Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Cizewski Culotta, V., Price, D.L., Wong, P.C., and Rothstein, J.D. (2001). Histological Evidence of Protein Aggregation in Mutant SOD1 Transgenic Mice and in Amyotrophic Lateral Sclerosis Neural Tissues. Neurobiology of Disease *8*, 933–941.

Wate, R., Ito, H., Zhang, J.H., Ohnishi, S., Nakano, S., and Kusaka, H. (2005). Expression of an endoplasmic reticulum-resident chaperone, glucose-regulated stress protein 78, in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol *110*, 557–562.

Weerasekera, A., Crabbé, M., Tomé, S.O., Gsell, W., Sima, D., Casteels, C., Dresselaers, T., Deroose, C., Van Huffel, S., Rudolf Thal, D., et al. (2020). Non-invasive characterization of amyotrophic lateral sclerosis in a hTDP-43A315T mouse model: A PET-MR study. NeuroImage: Clinical *27*, 102327.

Westeneng, H.-J., Al-Chalabi, A., Hardiman, O., Debray, T.P., and van den Berg, L.H. (2018). The life expectancy of Stephen Hawking, according to the ENCALS model. The Lancet Neurology *17*, 662–663.

Westerterp, K.R. (2004). Diet induced thermogenesis. Nutr Metab (Lond) *1*, 5.

Weyer, C., Snitker, S., Rising, R., Bogardus, C., and Ravussin, E. (1999). Determinants of energy expenditure and fuel utilization in man: effects of body composition, age, sex, ethnicity and glucose tolerance in 916 subjects. Int J Obes Relat Metab Disord *23*, 715–722.

Whitehouse, S., and Randle, P.J. (1973). Activation of pyruvate dehydrogenase in perfused rat heart by dichloroacetate (Short Communication). Biochem J *134*, 651–653.

Widmann, M., Nieß, A.M., and Munz, B. (2019). Physical Exercise and Epigenetic Modifications in Skeletal Muscle. Sports Med *49*, 509–523.

Wiedemann, F.R., Manfredi, G., Mawrin, C., Beal, M.F., and Schon, E.A. (2002). Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. J Neurochem *80*, 616–625.

Wijesekera, L.C., and Leigh, P.N. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis. Orphanet Journal of Rare Diseases 22.

Williams, T.L., Day, N.C., Ince, P.G., Kamboj, R.K., and Shaw, P.J. (1997). Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol *42*, 200–207.

Wills, A.-M., Hubbard, J., Macklin, E.A., Glass, J., Tandan, R., Simpson, E.P., Brooks, B., Gelinas, D., Mitsumoto, H., Mozaffar, T., et al. (2014). Hypercaloric enteral nutrition in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. The Lancet *383*, 2065–2072.

Wilson, J.M., Loenneke, J.P., Jo, E., Wilson, G.J., Zourdos, M.C., and Kim, J.-S. (2012). The Effects of Endurance, Strength, and Power Training on Muscle Fiber Type Shifting. Journal of Strength and Conditioning Research *26*, 1724–1729.

Wittendorp-Rechenmann, E., Lam, C.D., Steibel, J., Lasbennes, F., and Nehlig, A. (2002). High Resolution Tracer Targeting Microautoradiographic Imaging By Cellular C-Trajectography With Immunohistochemistry: A Novel Protocol to Demonstrate Metabolism Of 2-Deoxyglucose By Neurons And Astrocytes. Journal of Trace and Microprobe Techniques *20*, 505–515.

Wolf, J., Safer, A., Wöhrle, J.C., Palm, F., Nix, W.A., Maschke, M., and Grau, A.J. (2014). Factors predicting one-year mortality in amyotrophic lateral sclerosis patients - data from a population-based registry. BMC Neurol *14*, 197.

Wolff, A.A., Rotmensch, H.H., Stanley, W.C., and Ferrari, R. (2002). Metabolic Approaches to the Treatment of Ischemic Heart Disease: The Clinicians' Perspective. 17.

Wong, M., and Martin, L.J. (2010). Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. Human Molecular Genetics *19*, 2284–2302.

Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (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, S.J., and R. Slater, C. (2001). Safety factor at the neuromuscular junction. Progress in Neurobiology *64*, 393–429.

Worms, P.M. (2001). The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. Journal of the Neurological Sciences *191*, 3–9.

Xu, Z., Henderson, R.D., David, M., and McCombe, P.A. (2016). Neurofilaments as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS ONE *11*, e0164625.

Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E.A., Garcia, M.L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O.R., Cleveland, D.W., and Goldstein, L.S.B. (2008). Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 7594–7599.

Yamashita, T., Hatakeyama, T., Sato, K., Fukui, Y., Hishikawa, N., Ohta, Y., Nishiyama, Y., Kawai, N., Tamiya, T., and Abe, K. (2017). Flow-metabolism uncoupling in the cervical spinal cord of ALS patients. Neurol Sci *38*, 659–665.

Yang, R., Huang, R., Chen, D., Song, W., Zeng, Y., Zhao, B., Zhou, D., and Shang, H.-F. (2011). Causes and places of death of patients with amyotrophic lateral sclerosis in south-west China. Amyotrophic Lateral Sclerosis *12*, 206–209.

Yang, Y., Li, N., Chen, T., Zhang, C., Liu, L., Qi, Y., and Bu, P. (2019). Trimetazidine ameliorates sunitinib-induced cardiotoxicity in mice via the AMPK/mTOR/autophagy pathway. Pharmaceutical Biology *57*, 625–631.

Yasojima, K., Tourtellotte, W.W., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2001). Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy. Neurology *57*, 952–956.

Yim, M.B., Kang, J.H., Yim, H.S., Kwak, H.S., Chock, P.B., and Stadtman, E.R. (1996). A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 5709–5714.

Zammit, V.A. (1999). The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function. Biochem J *343 Pt 3*, 505–515.

Zhang, F., Ström, A.-L., Fukada, K., Lee, S., Hayward, L.J., and Zhu, H. (2007). Interaction between Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)-linked SOD1 Mutants and the Dynein Complex. Journal of Biological Chemistry *282*, 16691–16699.

Zhang, L., Keung, W., Samokhvalov, V., Wang, W., and Lopaschuk, G.D. (2010). Role of fatty acid uptake and fatty acid β-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids *1801*, 1–22.

Zhang, R., Gascon, R., Miller, R.G., Gelinas, D.F., Mass, J., Hadlock, K., Jin, X., Reis, J., Narvaez, A., and McGrath, M.S. (2005). Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). J Neuroimmunol *159*, 215–224.

Zhang, R., Hadlock, K.G., Do, H., Yu, S., Honrada, R., Champion, S., Forshew, D., Madison, C., Katz, J., Miller, R.G., et al. (2011). Gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). J Neuroimmunol *230*, 114–123.

Zhang, S., Hulver, M.W., McMillan, R.P., Cline, M.A., and Gilbert, E.R. (2014). The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. Nutr Metab (Lond) *11*, 10.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest *108*, 1167–1174.

Zhou, J., Yi, J., Fu, R., Liu, E., Siddique, T., Ríos, E., and Deng, H.-X. (2010). Hyperactive Intracellular Calcium Signaling Associated with Localized Mitochondrial Defects in Skeletal Muscle of an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Journal of Biological Chemistry *285*, 705–712.

Zoccolella, S., Beghi, E., Palagano, G., Fraddosio, A., Guerra, V., Samarelli, V., Lepore, V., Simone, I.L., Lamberti, P., Serlenga, L., et al. (2007). Riluzole and amyotrophic lateral sclerosis survival: a population-based study in southern Italy: Riluzole and ALS survival in Puglia. European Journal of Neurology *14*, 262–268.

Zubiri, I., Lombardi, V., Bremang, M., Mitra, V., Nardo, G., Adiutori, R., Lu, C.-H., Leoni, E., Yip, P., Yildiz, O., et al. (2018). Tissue-enhanced plasma proteomic analysis for disease stratification in amyotrophic lateral sclerosis. Mol Neurodegeneration *13*, 60.

Université de Strasbourg

Cyril QUESSADA

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Analyse de la flexibilité métabolique dans la Sclérose Latérale Amyotrophique et approches thérapeutiques

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale qui est caractérisée par la dégénérescence sélective des neurones moteurs cortico-spinaux et des motoneurones bulbaires et spinaux. Les perturbations du métabolisme énergétique font de la SLA une maladie systémique. Mes travaux mettent en évidence un déséquilibre de la balance énergétique (glycolyse vs β-oxydation) indiquant un déficit d'utilisation du glucose comme source principale d'énergie chez les souris SLA *SOD1*^{G93A} et *Sod1*^{G86R}. L'objectif de ma thèse a été de déterminer si une correction de cette balance énergétique grâce à deux agents pharmacologiques actuellement utilisés en clinique, la ranolazine (RAN) et la trimétazidine (TMZ), ralentissait la progression de la maladie. J'ai pu ainsi montrer que les traitements ont des effets bénéfiques sur les composantes métabolique et motrice de ces deux modèles. En plus de l'effet neuroprotecteur du TMZ, ce dernier augmente la survie des souris *SOD1*^{G93A} suggérant un repositionnement médicamenteux du TMZ pour le traitement de la SLA.

Mots clés : SLA, glycolyse / β-oxydation, RAN, TMZ, PDK4

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the selective degeneration of corticospinal motor neurons and bulbar and spinal motor neurons. Disturbances in energy metabolism make ALS a systemic disease. My work highlights an imbalance in the energy balance (eg glycolysis vs β-oxidation). It indicates a deficit in the use of glucose as the main source of energy in *SOD1*^{G93A} and *Sod1*^{G86R} ALS mice. The main of my thesis work was to determine whether a correction of this energy balance with two pharmacological agents currently in clinical use (eg ranolazine (RAN) and trimetazidine (TMZ)), slows down the disease progression. I was able to show that the treatments have beneficial effects on the metabolic and motor components of these two models. In addition to the neuroprotective effect of TMZ, it increases the survival of *SOD1*^{G93A} mice. These preclinical studies suggest that this drug currently in clinical use for heart disease can be repositioned for ALS treatment.

Key words: SLA, glycolysis / β-oxidation, RAN, TMZ, PDK4