

Année 2013

Thèse n° 2088

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Nutrition

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 décembre 2013

Par Ludivine ALLARD

Née le 10 juin 1986 à Colombes

Dysfonctions mitochondriales et homéostasie bioénergétique des motoneurones dans un modèle de sclérose latérale amyotrophique

Membres du Jury

M. Jean-Marc Israel – Directeur de Recherche – CNRS – Bordeaux - INSERM U862.....Président
M. Cédric Raoul – Directeur de Recherche – Montpellier - INSERM U1051.....Rapporteur
M. Pascal Reynier – Professeur – Praticien Hospitalier - Angers – INSERM U694.....Rapporteur
M. Gwendal Le Masson – Professeur - Praticien Hospitalier – Bordeaux - INSERM U862..Directeur
M. Rodrigue Rossignol – Chargé de Recherche – Bordeaux - INSERM U688.....Membre Invité

« La vraie science est une ignorance qui se sait. »

Montaigne

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr. Pascal Reynier et le Dr. Cédric Raoul d'avoir accepté de participer à ce jury et de me faire l'honneur de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je souhaite également remercier très chaleureusement le Dr. Jean-Marc Israel, tout d'abord d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse, mais surtout de m'avoir appris les rudiments de l'électrophysiologie. Merci pour votre soutien tout au long de ma thèse, pour votre bonne humeur et votre sympathie.

J'adresse également mes sincères remerciements au Dr. Rodrigue Rossignol pour avoir accepté de prendre part au jury en tant que membre invité. Je te remercie pour ton aide et ta précieuse expertise mitochondriale que tu m'as apportées tout au long de ce projet.

J'exprime toute ma gratitude à mon directeur de thèse, le Pr. Gwendal Le Masson, de m'avoir fait l'honneur de m'accueillir au sein de son équipe de recherche et d'avoir encadré mon travail de thèse au cours de ces trois années. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée dans la gestion de ce projet. Ces années de travail au sein d'un cadre privilégié furent extrêmement enrichissantes.

Mes remerciements vont ensuite aux membres de mon équipe de recherche.

Je tiens à remercier le Pr. Jean-Marie Cabelguen pour sa bonne humeur et sa sympathie. Je remercie également Virginie Morales pour son soutien et son attitude positive permanente. Merci de m'avoir soutenue tout au long de ce projet et d'avoir été à l'écoute ; tu as été un réel soutien en particulier durant ces derniers mois ! Je te souhaite bonne chance dans l'évolution de tes projets...

Je remercie également Claire Léger pour son aide en culture cellulaire. Je tiens à remercier très sincèrement les filles des pleurodèles ! Merci à Vanessa Charrier et Alexia Mathou pour votre sympathie et pour m'avoir soutenue lors des difficultés rencontrées au cours de ma thèse. Alexia, j'espère que tes projets avanceront comme tu le souhaites. Vanessa, ta soutenance approche ; je t'adresse tous mes vœux de réussite pour la continuité d'un avenir brillant. Et bien sûr, je te souhaite beaucoup de bonheur dans ton nouveau rôle qui se profile...

Et comment ne pas remercier très sincèrement Fanny Farrugia ! Merci pour tout, pour tes conseils scientifiques, pour les réponses apportées à mes « j'ai une question... », les pauses parfois nécessaires, ta sympathie, ton humour, ton écoute et ton soutien pendant ces quelques années. Je te souhaite bonne continuation dans tes projets.

Je remercie également Stéphanie Chevalier.

J'adresse aussi un clin d'œil à l'équipe du Pr. Marc Landry avec qui nous avons cohabité depuis le début de ma thèse : Marc, Olivier, Christel, Alexandre et Yves (et son aide électrophysiologique). Je tiens également à remercier Sara avec qui nous avons partagé l'expérience de la thèse ensemble au

cours de ces trois années. A ceux qui sont partis mais que je n'oublie pas, je vous remercie pour les bons moments que nous avons passés : Chérine, Tiphaine, Pétra, Paul, Morganne.

Un merci tout particulier à Charlotte Bertot pour les études sur l'ATP. J'espère que tu te plairas en thèse et que tu t'épanouiras dans ce projet. Bonne continuation pour la suite.

Je souhaite également remercier le Dr. Pier-Vicenzo Piazza de m'avoir accueilli au sein du Neurocentre Magendie. Je remercie les plateformes du Neurocentre, Delphine, Claire et Sarah pour les génotypages en urgence, Thierry pour les qPCRs rapides et l'animalerie. Je tiens à remercier l'animalerie spécialisée de Bordeaux 2 et particulièrement Pierre Costet de nous avoir fourni en partie les animaux nécessaires à ce projet.

Je remercie également l'Inserm et la Région Aquitaine d'avoir financé ce projet.

Mes remerciements vont ensuite à mes amis, qui m'ont fait rire lorsque j'en avais besoin et qui m'ont soutenue tout au long de ma thèse : Amaïa (ce sera bientôt ton tour !), Kcénia (mais si, Caen, c'est bien ; du moment que Demis R. t'accompagne !), Elsa (promis, la prochaine fois je viens te voir sur les planches !), Ornella (quelle sera ta prochaine destination ?), Alexia (ma motivation sport de ces derniers mois) et Hugues (on va y arriver !!!). Vous êtes formidables ! Un petit clin d'œil également à mes amis paras, Clément, Sylvain, Papa Patrick et les autres... On fêtera ça là-haut bientôt !

Enfin, je tiens à remercier également ma famille. Je vous suis très reconnaissante pour le soutien que vous m'avez apporté. Merci Mouchka pour ton écoute et tes précieux conseils. Merci encore pour les relectures grammaticales et orthographiques de mon manuscrit. Merci d'être toujours présente, dans les bons moments et ceux plus difficiles. Merci pour tout ce que tu m'as transmis et qui me permet d'avancer dans la vie. Thibaud et Aveline, merci d'être toujours là à mes côtés, et de m'apporter autant de bonheur fraternel au quotidien, sans oublier Stéphanie et Florian. Un merci à ma famille, en général, et plus particulièrement à mes grands-parents, toujours accueillants. Je remercie également ma belle-famille pour ses encouragements, et plus largement tous ceux qui sont là pour moi.

Et comment ne pas te remercier, Louis-Olivier, mon fiancé. Quelques phrases ne suffiraient pas pour te remercier de tout ce que tu m'apportes au quotidien... Merci mille fois pour ton soutien et ton amour inconditionnels. L'avenir nous appartient !

AVANT-PROPOS

Les maladies neurodégénératives forment un sous-groupe de maladies dégénératives affectant le fonctionnement du cerveau ou plus généralement le système nerveux de façon progressive au cours de leur évolution. Ces maladies provoquent généralement une détérioration du fonctionnement des cellules nerveuses, en particulier les neurones, pouvant conduire à leur mort cellulaire. Cette mort cellulaire conduit à une altération progressive et souvent irréversible des fonctions nerveuses, entraînant des handicaps majeurs, avec pour conséquence le décès du malade. Les maladies neurodégénératives peuvent être classées en fonction des régions du système nerveux atteintes par la maladie. Ainsi, les fonctions affectées dépendent de la région touchée et peuvent concerner la motricité, le langage, la mémoire, la perception ou la cognition. On distingue principalement deux types de maladies : celles atteignant le système nerveux central de celles touchant le système nerveux périphérique, voire le système nerveux autonome. Selon les populations neuronales atteintes, ces maladies neurodégénératives se manifestent soit par une atteinte majoritaire des fonctions cognitives, comme c'est le cas dans la maladie d'Alzheimer, soit des fonctions motrices, ce qui est observé dans la maladie de Parkinson ou la Sclérose Latérale Amyotrophique, soit encore des fonctions à la fois cognitives et motrices comme observé dans la maladie de Huntington.

Parmi les maladies neurodégénératives les plus connues, la maladie de Parkinson se caractérise par une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte. Dans la maladie, d'Alzheimer, on observe une dégénérescence sélective des neurones de projection du cortex entorhinal vers le gyrus dentelé, et des neurones pyramidaux de l'hippocampe CA1. Dans la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), ce sont les neurones du cortex moteur, du tronc cérébral et de la moelle épinière qui dégèrent. Le principal facteur de risque pour déclencher ces maladies est l'âge, bien que ces maladies neurodégénératives touchent parfois l'enfant ou le jeune adulte, comme dans les Amyotrophies Spinales Infantiles ou la maladie de Huntington.

A l'heure actuelle, du fait du vieillissement général de la population, nous assistons à une augmentation du nombre de personnes atteintes par ces maladies neurodégénératives. En 2010 en France, la maladie d'Alzheimer touchait 860 000 personnes, avec 225 000 nouveaux malades chaque année. Quant à la maladie de Parkinson, elle était diagnostiquée chez 100 000 personnes environ. A l'heure actuelle, les plus de 65 ans représentent 16% de la population, chiffre qui devrait passer à 25% en 2030, ce qui fait des maladies neurodégénératives un réel enjeu de santé public.

La SLA est la maladie neurodégénérative la plus répandue après les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. Elle est également la première maladie affectant les motoneurones ; en France, 4 200 personnes environ sont atteintes par cette pathologie.

À ce jour, l'absence de traitements curatifs pour la plupart de ces maladies neurodégénératives, en fait non seulement un réel problème de santé publique, mais également un défi majeur pour les neurosciences modernes.

La plupart de ces maladies neurodégénératives liées à l'âge apparaissent de manière sporadique, c'est-à-dire sans antécédents familiaux. Seulement un faible pourcentage (entre 5 et 10%) est lié à des mutations génétiques. Fait étonnant, les gènes impliqués dans ces maladies codent en général pour des protéines ubiquitaires et non spécifiques de la classe de neurones préférentiellement touchée dans la maladie, comme par exemple la SuperOxyde Dismutase 1 (SOD1) dans la SLA, la parkine dans la maladie de Parkinson ou la presénilline 1 dans la maladie d'Alzheimer. Les populations neuronales ciblées sont différentes dans ces diverses maladies, même si des mécanismes physiopathologiques communs ont été identifiés comme la présence d'agrégats et d'inclusions s'accumulant au cours de l'évolution des maladies, la présence d'agents oxydants ainsi que des dysfonctions de certaines organelles comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique.

Le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour cette maladie est une priorité. La SLA a été découverte il y a plus de cent quarante ans et les premiers gènes associés à cette maladie ont été isolés depuis une vingtaine d'années. L'utilisation de modèles transgéniques SOD1 mutants a permis d'établir de nombreux mécanismes de toxicité de la SLA. Les essais thérapeutiques conduits chez les souris se sont donc basés sur le blocage des processus toxiques, et ont consisté en l'utilisation de composés pharmacologiques (antioxydants, anti-agrégation,...), de thérapies géniques ou anti-sens, de transplantations cellulaires, ou encore d'immunisations. Malheureusement, hormis le riluzole, aucun essai thérapeutique modifiant significativement (supérieur à 10%) la survie des souris SOD1 mutantes n'a eu d'effet positif chez les patients. Deux explications principales sont avancées pouvant être à l'origine de ces échecs. D'une part, les souris utilisées dans les tests expriment en général des taux importants de protéines SOD1 mutée, contrairement à ce qui est observé chez les patients. La pertinence du modèle SOD1 comme reflet de la SLA est une question régulièrement posée. En effet, d'autres modèles, comme par exemple TDP-43, pourraient permettre de nouvelles avancées. L'idéal serait d'avoir un modèle animal de la forme sporadique de la maladie. Par ailleurs, de nombreux essais thérapeutiques se sont révélés efficaces chez la souris, mais ne sont pas transposables à l'homme. D'autre part, la majorité des essais thérapeutiques chez la souris sont entrepris avant le déclenchement des premiers

symptômes, alors que la maladie est diagnostiquée après l'apparition des premiers symptômes chez les patients. Il faut donc chercher des traitements fonctionnant chez la souris à partir de stades équivalents à ceux du diagnostic chez le patient, à savoir, après les premiers symptômes. Seules quelques études ont été réalisées aux alentours du déclenchement de la maladie chez les souris SOD1^{G93A} et se sont révélées bénéfiques : l'injection intramusculaire de vecteurs viraux codant pour l'IGF-1 et le VEGF et transportés de manière rétrograde vers les motoneurones. Ceci permet d'allonger la survie des souris de 14 à 18%. L'inhibition par interférence de Fas augmente également la survie des souris de 14%. Enfin, une autre étude a montré que la natation forcée chez les souris SOD1^{G93A} a des effets bénéfiques, en augmentant la survie d'environ 20%. Ces travaux élargissent ainsi le champ d'approches thérapeutiques de la SLA.

De nombreux dysfonctionnements ont été identifiés dans la SLA, mais la problématique réside dans le fait de trouver les processus initiateurs de la pathologie et de déterminer les causes de la maladie, responsables des dysfonctionnements observés et notamment de la dégénérescence des motoneurones. Dans ce contexte, il est important de déterminer les processus cellulaires perturbés très tôt, bien en amont des premiers symptômes de la maladie, qui pourraient être de bonnes cibles diagnostiques et thérapeutiques, en cherchant à limiter le déclenchement de la maladie, ou du moins à le retarder.

Dans ce contexte, le but de ma thèse a été d'identifier les processus pathologiques mitochondriaux qui sont observés très en amont des premiers symptômes de SLA, et de comprendre par quels mécanismes ils peuvent entraîner *in fine* la dégénérescence des motoneurones. Pour cela, nous avons utilisé des souris transgéniques surexprimant la SOD1 humaine mutée, modèle de la maladie le mieux caractérisé à ce jour.

RÉSUMÉS

RÉSUMÉ

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale de l'âge adulte, caractérisée par une perte de motoneurons, conduisant à une atrophie et une faiblesse musculaires. Des mutations de la superoxyde dismutase-1 (SOD1) provoquent une forme génétique de SLA. Comme chez les patients atteints de SLA, le modèle animal de SLA, SOD1 mutant, révèle que tous les motoneurons sont inégalement sensibles à l'évolution de la maladie. Les mitochondries, centrales énergétiques des cellules, sont des organelles précocement touchées dans la pathologie de la SLA. Un mécanisme attrayant qui sous-tend la susceptibilité différentielle est la nécessité bioénergétique variable de sous-ensembles distincts de motoneurons. Cela implique que dans le système nerveux central, la demande bioénergétique pourrait moduler le seuil pathologique. Même en l'absence de perte bioénergétique, on peut imaginer une situation dans laquelle une contrainte pathologique modifie le niveau à partir duquel la production ou la livraison de l'ATP devient insuffisant, précipitant la chute des neurones les plus vulnérables.

Dans les neurones, la majorité de l'ATP est produite par les mitochondries et l'homéostasie des gradients d'ions est le procédé le plus énergivore. La fonction mitochondriale est moindre pour modifier les propriétés électriques des motoneurons si la disponibilité en ATP devient insuffisante pour permettre aux pompes ioniques de maintenir des gradients appropriés.

Nous avons démontré que la concentration intracellulaire basale d'ATP dans des cultures de neurones moteurs est diminuée dans les cellules mutées SOD1 par rapport au type sauvage. Paradoxalement à ce résultat, le taux de consommation d'oxygène des mitochondries est augmenté dans les motoneurons SOD1m et il n'existe aucune preuve d'une augmentation de la consommation. Nos résultats appuient l'hypothèse intéressante qu'il y a un découplage entre la chaîne respiratoire et la production d'ATP. Ce découplage peut être utilisé comme une stratégie pour minimiser les propriétés toxiques des mitochondries hyper stimulées.

Mots clefs : Mitochondrie, Motoneurone, Bioénergétique, Découplage, SOD1, SLA

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal adult-onset neurodegenerative disorder characterized by a loss of motor neurons, leading to muscle wasting and weakness. Mutations in superoxide dismutase-1 (SOD1) cause a form of ALS. As in ALS patients, the mutant SOD1 animal model of ALS reveals that not all motor neurons are equally susceptible to the disease process. An attractive mechanism underlying differential susceptibility is the variable bioenergetics need of distinct subsets of motor neurons. This implies that within the CNS, bioenergetics can modulate the pathological threshold. Even in the absence of loss in bioenergetics, one can envision a situation in which a pathological stress alters the level at which either the production or delivery of ATP becomes insufficient, precipitating the demise of the most vulnerable neuron types.

In neurons, majority of ATP is produced by mitochondria and the homeostasis of ion gradients is the most energy-consuming process. Reduced mitochondrial function will modify the electrical properties of motor neurons if ATP availability becomes insufficient to allow ion pumps to maintain appropriate gradients.

We demonstrated that the basal ATP intra-cellular concentration in motor neuron cultures lower in SOD1 mutated cells compared to wild type. Paradoxically to this result, the oxygen consumption rate of mitochondria is increase in mSOD1 cells and there is no evidence for an increase of consumption. Our results support the interesting hypothesis that there is an uncoupling between the respiratory chain and the ATP production. This uncoupling might be used as a strategy to minor the toxic properties of hyper stimulated mitochondrion.

Keys words : Mitochondria, Motoneurons, Bioenergetic, Uncoupling, SOD1, ALS

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I - LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE (SLA)	1
<i>A - Présentation générale.....</i>	<i>1</i>
<i>B - Épidémiologie.....</i>	<i>4</i>
<i>C - Symptômes cliniques, diagnostic et prise en charge des patients</i>	<i>5</i>
<i>D - Les formes sporadiques et familiales de la SLA</i>	<i>9</i>
1 - Les formes sporadiques.....	9
a) L'environnement	10
b) Une susceptibilité génétique	10
2 - Les formes familiales	12
a) Le gène SOD	12
b) Les autres gènes impliqués	13
Les gènes codant pour des protéines de liaison à l'ADN.....	13
<i>Le gène TARDBP</i>	<i>13</i>
<i>Le gène FUS.....</i>	<i>15</i>
<i>Le gène SETX.....</i>	<i>16</i>
Les gènes codant pour des protéines impliquées dans le trafic et le transport vésiculaire.....	16
<i>Le gène VAPB.....</i>	<i>16</i>
<i>Le gène FIG4.....</i>	<i>17</i>
<i>Le gène DCTN 1.....</i>	<i>17</i>
<i>Le gène Alsine</i>	<i>17</i>
<i>Le gène SPG 11</i>	<i>18</i>
<i>Le gène OPTN.....</i>	<i>18</i>
Le gène ANG codant pour une protéine à fonction angiogénique.....	19
Le gène VCP codant pour une protéine impliquée dans la dégradation des protéines	19
3 - La répétition de l'hexanucléotide C9ORF72	21
II - LES MODELES D'ETUDE DE LA SLA	22
<i>A - Les modèles murins</i>	<i>22</i>
1 - Les souris SOD1	22
a) La souris déficiente en SOD1	22
b) Les souris mutantes SOD1 transgéniques.....	23
Les souris SOD1 ^{G93A}	23
Les souris SOD1 ^{G37R}	26
Les souris SOD1 ^{G85R}	26
Les souris SOD1 ^{G86R}	26
Autres modèles murins SOD1 mutants (moins utilisés)	27
c) Les souris transgéniques pour la SOD1 sauvage : SOD1 ^{wt}	27
2 - Les souris TDP-43	29
a) Les souris déficientes en TDP-43	29
b) Les souris surexprimant la protéine TDP-43 sauvage ou mutée.....	29
Les souris surexprimant la protéine TDP-43 ^{wt}	29
Les souris surexprimant des formes mutées de TDP-43	29
3 - Les souris VAPB.....	30
4 - La souris Alsine.....	30
<i>B - Autres modèles de SLA in vivo</i>	<i>31</i>
1 - Le modèle rat	31
a) Les rats SOD1 ^{G93A}	31

b) Les rats SOD1 ^{H46R}	32
c) Les rats TDP-43	32
d) Les rats Fus ^{R521C}	32
2 - Le modèle canin	34
3 - Les modèles invertébrés : la drosophile et <i>Caenorhabditis-elegans</i> (<i>C. elegans</i>) ...	34
a) Les modèles drosophiles d'étude de la SLA	35
b) Le modèle <i>C. elegans</i>	35
<i>C - Modèles in vitro d'étude de la SLA</i>	35
1 - Culture primaire de motoneurones	36
2 - Les lignées cellulaires "motoneuronales"	36
3 - Les motoneurones issus de cellules souches embryonnaires	37
4 - Les tranches organotypiques	38
III - PROCESSUS PHYSIOPATHOLOGIQUES DECRITS DANS LES MODELES MURINS DE LA SLA .	39
<i>A - Excitotoxicité</i>	39
<i>B - Agrégations de la protéine SOD1 mutée</i>	42
<i>C - Radicaux libres antioxydants et stress oxydatif</i>	43
<i>D - Hypermétabolisme</i>	46
<i>E - Implication des cellules environnantes dans la SLA</i>	46
1 - Mise en évidence de l'implication des cellules non-motoneuronales	46
2 - Implication des cellules gliales	48
a) Activation astrocytaire et microgliale dans la SLA	48
Les astrocytes	48
Les cellules microgliales	48
b) Implication des cellules gliales sur le déroulement de la maladie	49
Les cellules de Schwann	49
3 - Implication des muscles	50
IV - MECANISMES DE MORT CELLULAIRE DES MOTONEURONES SOD1 MUTANTS	52
<i>A - Une dénervation séquentielle des muscles dans la SLA</i>	52
1 - Diversité des fibres musculaires et des motoneurones	52
2 - Une dénervation sélective dans la SLA	55
3 - Participation de candidats locaux à la dénervation musculaire dans la SLA	57
a) L'hypermétabolisme du muscle squelettique	57
b) Candidats moléculaires pouvant participer à la dénervation	57
Les protéines du guidage axonal	57
<i>B - La mort cellulaire par apoptose</i>	59
1 - Généralités sur l'apoptose	59
a) La voie extrinsèque de mort : les récepteurs de mort	60
Présentation des récepteurs de mort et de leurs ligands	60
L'apoptose liée aux récepteurs de mort	60
b) La voie intrinsèque de mort par apoptose	61
La voie intrinsèque dépendante de la mitochondrie	61
La voie intrinsèque dépendante du Réticulum Endoplasmique ; en interaction avec la mitochondrie	63
2 - L'apoptose dans la SLA	64
a) Aspects morphologiques et marqueurs apoptotiques	64
Aspects morphologiques	64
Expression de marqueurs apoptotiques	65
b) Activation de l'apoptose dans la SLA	65
Activation des caspases	65
Diminution des protéines pro-survie au profit de l'augmentation de molécules pro-apoptotiques	66

3 – L’apoptose dans la SLA : implication de la voie extrinsèque.....	67
a) Le récepteur au NGF : p75 neurotrophin receptor (p75NTR)	67
b) Le récepteur au TNF α	68
c) Le récepteur à LIGHT : LT- β R.....	69
d) Le récepteur Fas et son ligand FasL	70
V - LES MITOCHONDRIES	74
<i>A - Présentation générale.....</i>	<i>74</i>
1 - Origine et historique	74
2 - Structure	75
3 - Fission Mitochondriale et Fusion Mitochondriale	77
4 - Le transport mitochondrial.....	78
<i>B - La fonction énergétique mitochondriale</i>	<i>80</i>
1 - Les phosphorylations oxydatives	81
a) Fonctionnement.....	81
b) Composition.....	83
La chaîne respiratoire mitochondriale.....	84
<i>le complexe I : NADH-Ubiquinone Oxydoréductase</i>	<i>84</i>
<i>le complexe II : Succinate-Ubiquinone Oxydoréductase</i>	<i>84</i>
<i>le complexe III : Ubiquinone-Cytochrome c Oxydoréductase</i>	<i>86</i>
<i>le complexe IV : Cytochrome c Oxydase.....</i>	<i>86</i>
Le complexe de phosphorylation : l’ATP synthase	87
Le canal potassium sensible à l’ATP	88
2 - Relation structure – fonction énergétique mitochondriale.....	90
3 - Régulation des phosphorylations oxydatives.....	91
a) Contrôle de la respiration mitochondriale.....	91
b) Régulation du rendement des phosphorylations oxydatives.....	92
Le découplage extrinsèque	92
<i>La fuite de protons basale</i>	<i>93</i>
<i>La fuite de protons inductible :</i>	<i>93</i>
Le découplage intrinsèque.....	95
<i>Stœchiométrie H⁺/e⁻</i>	<i>95</i>
<i>Stœchiométrie H⁺/ATP</i>	<i>95</i>
Nature des substrats fournis à la chaîne respiratoire	96
4 - Fonctions mitochondriales neuronales.....	96
<i>C - Dysfonctionnements mitochondriaux dans la SLA.....</i>	<i>97</i>
<i>D - Exemples de maladies neurodégénératives mitochondriales.....</i>	<i>98</i>
1 - Pathologies de la dynamique mitochondriale	98
2 - Neuropathies liées à des mutations de l’ADN mitochondrial.....	99

OBJECTIFS DE LA THESE 101

MATERIELS ET METHODES 104

I – LES ANIMAUX.....	105
II - CULTURES PRIMAIRES DE MOTONEURONES EMBRYONNAIRES DE SOURIS.....	105
<i>A - Mise au point de la technique.....</i>	<i>105</i>
<i>B - Le « coating »</i>	<i>106</i>
<i>C - La mise en culture</i>	<i>106</i>

1 - Dissection.....	106
2 - Dissociation et purification	107
3 - Ensemencement	107
III – CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN ATP	108
A - <i>Le kit de détection de l'ATP</i>	108
B - <i>L'extraction</i>	109
C - <i>Les mesures</i>	109
IV – RESPIRATION MITOCHONDRIALE	110
V – ENREGISTREMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES INTRACELLULAIRES.....	111
VI – PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	112
A - <i>Extraction des ARN totaux et contrôle de leur qualité</i>	112
B - <i>PCR quantitative en temps réel</i>	113
1 - Principe et protocole	113
2 - Préparation des ADNc	113
3 - Sélection et validation des couples d'amorces pour la qPCR.....	113
4 - Choix des gènes de référence.....	114
5 - Analyse de l'expression des gènes.....	114
VII – WESTERN BLOTS.....	115
A - <i>Extraction des protéines</i>	115
B - <i>Dosage des protéines</i>	115
C - <i>Western Blot Odyssey</i>	116
1 - Préparation des échantillons.....	116
2 - Électrophorèse et transfert.....	116
3 - Blocage de la membrane et incubation de l'anticorps primaire	116
4 - Incubation avec l'anticorps secondaire	116
VIII – ANALYSES STATISTIQUES.....	116
RESULTATS	117
CHAPITRE I - UN DECOUPLAGE ENERGETIQUE DES MOTONEURONES SOD1 ^{G93A}	118
I - Introduction	119
II – Concentration intracellulaire d'ATP dans les motoneurones	119
A - <i>La concentration intracellulaire d'ATP est diminuée dans les motoneurones SOD1^{G93A}</i>	120
B - <i>La majorité de l'ATP intracellulaire des motoneurones est produit par les mitochondries</i>	121
III – La consommation d'oxygène des motoneurones SOD1 ^{G93A} est augmentée	124
IV - Discussion.....	127
CHAPITRE II - MECANISMES DU DECOUPLAGE DANS LES MOTONEURONES SOD1	130
I – Introduction.....	131
II – Les protéines de découplages UCPs sont perturbées dans les motoneurones SOD1 ^{G93A}	132
III – La concentration intracellulaire d'ATP des motoneurones SOD1 ^{G93A} n'est pas modifiée en présence d'un découplant de la chaîne respiratoire.....	134
IV - Discussion.....	136

CHAPITRE III - LES CONSEQUENCES DU DECOUPLAGE DANS LES MOTONEURONES SOD	137
I – Introduction.....	138
II – L’activité électrique spontanée des motoneurones SOD1 ^{G93A} embryonnaires n’est pas perturbée.....	139
III – L’activité électrique des motoneurones SOD1 ^{G93A} n’est que peu modifiée en condition de blocage des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	142
IV – Perte de l’homéostasie énergétique face à une augmentation de la demande.....	147
V - Discussion	148
DISCUSSION GENERALE.....	151
I – DES PERTURBATIONS HOMEOSTASIQUES ET MITOCHONDRIALES DANS LE MODELE MURIN DE LA SLA	153
<i>A - Une augmentation des ROS.....</i>	<i>154</i>
<i>B - Perturbation de l’homéostasie protéique</i>	<i>155</i>
<i>C - Perturbation de l’homéostasie calcique.....</i>	<i>157</i>
<i>D - Perturbation de l’homéostasie énergétique</i>	<i>158</i>
II – UN DECOUPLAGE MITOCHONDRIAL PARTIEL DANS LE MODELE MURIN DE SLA	160
<i>A – Une diminution d’ATP intracellulaire.....</i>	<i>160</i>
<i>B – Une augmentation de l’activité de la chaîne respiratoire mitochondriale.....</i>	<i>161</i>
<i>C – Mécanismes mis en jeu</i>	<i>162</i>
III – CONSEQUENCES DES PERTURBATIONS HOMEOSTASIQUES ET BIOENERGETIQUES EN TERME PATHOLOGIQUE.....	163
<i>A - Conséquences sur l’activité neuronale.....</i>	<i>163</i>
<i>B – Une impossibilité d’adaptation énergétique.....</i>	<i>165</i>
<i>C - Une maladie de l’âge adulte ?</i>	<i>166</i>
IV - AUTRES EXEMPLES DE MALADIES NEURODEGENERATIVES DANS LESQUELLES INTERVIENNENT DES DYSFONCTIONS MITOCHONDRIALES.....	167
<i>A – Maladie de Parkinson et mitochondries</i>	<i>168</i>
<i>B – Maladie de Huntington et mitochondries</i>	<i>169</i>
<i>C – Maladie d’Alzheimer et mitochondries.....</i>	<i>170</i>
<i>D – Maladie de Charcot-Marie-Tooth et mitochondries</i>	<i>171</i>
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	173
ANNEXES.....	176
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	178

Liste des figures et illustrations

Figure 1 : Les neurones moteurs touchés dans la SLA	2
Figure 2 : Organisation de la voie cortico-spinale	3
Tableau 1 : Critères de diagnostic de la SLA.....	6
Figure 3 : Prise en charge multidisciplinaire d'un patient SLA.....	8
Équation 1 : Réaction catalysée par la superoxyde dismutase 1 (SOD1)	12
Tableau 2 : Récapitulatif des gènes impliqués dans la SLA "adulte"	14
Tableau 3 : Récapitulatif des gènes impliqués dans la SLA "juvénile" et les démences fronto-temporales	15
Figure 4 : Interaction des différentes voies moléculaires dans les neurones moteurs ; les causes de la SLA	20
Figure 5 : Séquence d'apparition des évènements cliniques et neuropathologiques chez les souris SOD1 ^{G93Ahigh}	25
Tableau 4 : Les modèles souris et rat surexprimant la SOD1 mutée	28
Tableau 5 : Les modèles souris et rat TDP-43 et FUS	33
Figure 6 : Rôle de la SOD1 mutée dans le processus d'excitotoxicité des motoneurones	40
Figure 7 : Toxicité liée à la formation d'agrégats de SOD1 mutée	42
Figure 8 : Causes et conséquences du stress oxydatif dans la SLA	44
Figure 9 : Production d'anions superoxydes par la microglie en présence de SOD1 mutée	45
Figure 10 : Vue d'ensemble des mécanismes de toxicité liée à la SOD1 mutée dans la SLA .	51
Figure 11 : Diagramme de la distribution des types rapide ou lent de fibres musculaires en fonction de l'activité physique de l'individu.....	53
Figure 12 : Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des motoneurones alpha	54
Figure 13 : Séquence de dénervation des jonctions neuromusculaires des souris SOD1 ^{G93A} ..	56
Figure 14 : Les voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques dans la SLA.....	62
Figure 15 : Cellule apoptotique à un stade avancé de la maladie chez les souris SOD1 ^{G93A} ...	64
Figure 16 : Les motoneurones SOD1 mutants sont vulnérables <i>in vitro</i> à la voie de mort Fas/NO	71
Figure 17 : Schéma général d'une mitochondrie	75
Figure 18 : Organisation du transport axonal mitochondrial	80
Figure 19 : Les phosphorylations oxydatives.....	82
Figure 20 : Potentiels d'oxydoréduction des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	83
Figure 21 : Structure du complexe II : Succinate-Ubiquinone Oxydoréductase.....	85

Tableau 6 : Séquence des amorces utilisées pour le génotypage des souris transgéniques ...	106
Figure 22 : Dissection, dissociation et purification de moelles épinières d'embryons murins à 12.5 jours.....	108
Équation 2 : Équation de la réaction catalysée par la luciférase	109
Tableau 7 : Séquence des primers forward et reverse utilisés pour les qPCR	114
Figure 23 : Concentration intracellulaire d'ATP dans les motoneurones en condition contrôle	120
Figure 24 : Concentration intracellulaire d'ATP en condition de blocage des voies de production.....	122
Figure 25 : Concentration intracellulaire d'ATP en condition de blocage des voies de production.....	123
Figure 26 : Taux de consommation d'oxygène dans les motoneurones wild-type et SOD1 ^{G93A} en condition contrôle.....	125
Figure 27 : Taux de consommation d'oxygène dans les motoneurones wild-type et SOD1 ^{G93A} en présence d'inhibiteurs des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	126
Figure 28 : Niveaux d'expression en ARNm des UCPs dans les motoneurones wild-type et SOD1 ^{G93A}	133
Figure 29 : Niveaux d'expression en protéines de découplage UCPs dans les motoneurones wild-type et SOD1 ^{G93A}	134
Figure 30 : Concentration intracellulaire d'ATP en présence d'un découplant	135
Tableau 8 : Principales propriétés électriques des motoneurones de moelle épinière de souris Wt et SOD1 ^{G93A} en culture.....	140
Figure 31 : Propriétés basales des motoneurones wild-type et SOD1 ^{G93A}	141
Figure 32 : Caractéristiques électrophysiologiques des motoneurones wild-type et SOD1 ^{G93A} sous l'action de l'oligomycine.....	143
Figure 33 : Caractéristiques électrophysiologiques des motoneurones wild-type et SOD1 ^{G93A} sous l'action de l'antimycine	145
Figure 34 : Concentration intracellulaire d'ATP et consommation d'oxygène dans les motoneurones wild-type et SOD1 ^{G93A} en cas d'activation avec du KCl.....	148
Figure 35 : Schéma récapitulatif des dysfonctions énergétiques dans les motoneurones SOD1 ^{G93A}	167

Liste des abréviations

ABC : ATP-binding cassette	DISC : Death Inducing Signal Complex
ACSF : Artificial CerebroSpinal Fluid	DIV : Days <i>in vitro</i>
ADN : Acide Désoxyribonucléique	Drp1 : Dynamin-related protein 1
ADNmt : ADN mitochondrial	DTT : dithiothréitol
ADP : Adénosine Diphosphate	EAAT : Excitatory Amino-Acid Transporter
AIF : Apoptosis-Inducing Factor	EFR : explorations fonctionnelles respiratoires
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazoll-4 propionate	ENMG : Electroneuromyographie
ANG : Angiogénine	eNOS : NO synthase endothéliale
ANT : Adenine Nucleotide Translocator	ESC : cellules souches embryonnaires
AP : Action Potential	FAD : flavine adénine dinucléotide
APP : Amyloid Precursor Protein	FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
APAF-1 : Assembly from apoptotic Protease-Activating Factor-1	FC : Fold Change
ARN : Acide Ribonucléique	FCCP : Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
ATP : Adénosine Triphosphate	FF : fast fatigable
Bak : Bcl-2 homologous Antagonist/Killer	FGF : Fibroblast Growth Factor
Bax : Bcl-2-Associated X protein	FR : fast fatigue-resistant
Bcl-2 : B-Cell Lymphoma 2	FUS : Fused in Sarcoma
BDNF : Brain-derived Neurotrophic Factor	GDNF : Glial cell line-derived Neurotrophic Factor
Bid : H3-Interacting Domain death agonist	GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
BIM : Bcl-2-Interacting Mediator of cell death	GFP : Green Fluorescent Protein
BSA : Bovine Serum Albumine	GLAST : GLutamate ASpartate Transporter
CARD : CASpase Recruitment Domain	GLT-1 : GLutamate Transporter 1
cFLIP : cellular FLICE/caspase 8-Like Inhibitory Protein	HFD : High Fat Diet
CHG : chromogranine	HSPs : Heat Shock Protein
CNTF : Ciliary Neurotrophic Factor	HVEM : Herpes Virus Entry Mediator
CRD : Cysteine Rich Domain	IAP : Inhibitor of Apoptosis Proteins
CRMPs : Collapsin Response Mediator Protein	IGF-1 : insulin-like growth factor-1
CVF : capacité vitale forcée	INF γ : interféron gamma
cyt a : cytochrome a	ISEL : In Situ End Labelling
cyt a ₃ : cytochrome a ₃	KBP : Kinesin Binding Protein
Cyt c : cytochrome c	Klf4 : Krueppel-like factor 4
DAXX : Death Domain-associated protein	LT- β -R : récepteur lymphotoxin- β
Dcr3 : decoy 3DD : Death Domain	MAP1a : Microtubule-Associated-Protein 1a
DED : Death Effector Domain	Mfn2 : mitofusin 2
DEP : débit expiratoire de pointe	mK _{ATP} : mitochondrial K ⁺ inward rectifier
DFT : Démences Fronto-Temporales	MN : Motoneurone
DIABLO : Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding Protein with LOw pI	mPTP : Mitochondrial Pore Transition Permeability

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
 NBM : Neurobasal medium
 NF : neurofilaments
 NFH : NF à chaîne lourde
 NFL : NF à chaîne légère
 NFM : NF à chaîne moyenne
 NGF : Nerve Growth Factor
 NMC : Neurone Moteur Central
 NMP : Neurone Moteur Périphérique
 nNOS : neuronal Nitric Oxide Synthase
 Nogo-A : Neurite Outgrowth inhibitor
 Nrf2 : NF-E2-related factor 2
 NSC-34 : Neuroblastome X spinal cord
 Oct4 : Octamer-binding Transcription factor 4
 OCR : Oxygen consumption ratio
 OPA 1 : Dynamin-related guanosine triphosphate mutated in dominant optic atrophy
 OSCP : Oligomycin Sensitivity Conferral Protein
 OXPHOS : phosphorylation oxydative
 PA : potentiel d'action
 Par-4 : Prostate Apoptosis Response 4
 PBS : Phosphate-Buffered Saline
 PBST : Phosphate-Buffered Saline - Tween
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PiC : transporteur du phosphate inorganique
 PGC-1 α : PPAR γ -co-activator 1
 PON : enzyme paraoxonase
 RE : Réticulum Endoplasmique
 ROS : dérivés réactifs de l'oxygène
 S : slow
 SDH : succinate déshydrogénase
 SEM : Standard error of mean
 Sema3A : Sémaphorine 3A
 Shh : sonic hedgehog
 SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
 SLAf : Sclérose Latérale Amyotrophique Familiale
 SLAj : Sclérose Latérale Amyotrophique Juvénile
 SLAs : Sclérose Latérale Amyotrophique Sporadique
 Smac : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
 SOD1 : Superoxyde Dismutase 1
 Sox2 : Sex determining region Y-box 2
 SUR : succinate-ubiquinone réductase
 TDP-43 : TAR DNA-binding protein 43
 TNF α : Tumor Necrosis Factor α
 TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor
 TIM : Translocase of the Inner Membrane
 TOM : Translocase of the Outer Membrane
 TRADD : TNF Receptor-Associated protein with Death Domain
 TTFA : thényltrofluoroacétone
 TUNEL: Terminal transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling
 UCP : Uncoupling Protein
 URL : Unité Relative de Lumière
 Vacht : Vesicular ACetylcholin Transporter
 VAPB : VAMP-Associated Protein B
 VDAC : Voltage Dependent Anion Channel
 VCP : Valosin Containing Protein
 VEGF : Vascular Endothélial Growth Factor
 VGCC : Voltage-Gated Ca²⁺ Channel
 VNI : ventilation non invasive
 WFN : World Federation of Neurology
 Wt : Wild-type
 XIAP : X-linked-IAP

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I - La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

A - Présentation générale

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) occupe une place unique dans l'histoire des maladies humaines en général et dans les maladies neurologiques en particulier. Jean-Martin Charcot (1825-1893), médecin français, a été le premier à établir la relation entre les signes cliniques et les résultats des autopsies. Il a décrit la SLA pour la première fois en 1865 sur un patient atteint de spasmes musculaires. Lors de l'autopsie de ce patient, il a observé une sclérose (aspect fibreux du tissu) ainsi que l'implication des voies latérales (voies pyramidales) de la moelle épinière, d'où son nom de « sclérose latérale ». De plus, cette maladie s'accompagne d'une atrophie des fibres musculaires, entraînant la fonte des muscles d'où le terme « amyotrophique ». Dans sa description de 1874, Charcot a établi une approche clinico-pathologique qui a dominé la nosologie médicale depuis. Dans la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, la SLA a été définie suite aux résultats des autopsies. Dans son livre « Leçons du mardi de la Salpêtrière, 1887-1888 », il décrit les principales caractéristiques cliniques de la maladie : une implication motrice précoce des membres inférieurs sans atrophie initiale, une amyotrophie des membres supérieurs avec peu de contractures, et une implication bulbaire (Goetz & Bonduelle, 1995; Rowland, 2001; Meininger, 2011).

La SLA est également appelée « maladie de Lou Gehrig » aux Etats-Unis, « Motor Neuron Disease » en Grande-Bretagne et « maladie de Charcot » en Europe.

La SLA se définit actuellement comme un trouble neurodégénératif apparaissant à l'âge adulte, caractérisé par la mort cellulaire des motoneurons α et γ du cortex moteur primaire du bulbe rachidien et de la moelle épinière, responsable d'une paralysie musculaire progressive entraînant la mort (le plus souvent par insuffisance respiratoire) (Wijesekera & Leigh, 2009; Kanning *et al.*, 2010). Ce syndrome est caractérisé par une vulnérabilité et une dégénérescence des neurones moteurs (Julien, 2007). Il y a en effet une mort sélective des motoneurons dans le cerveau et la moelle épinière, ce qui entraîne une paralysie des muscles volontaires. Cette dégénérescence débute dans un foyer localisé et se dissémine selon un modèle qui suggère que la dégénérescence se propage entre des pools continus de motoneurons (Pasinelli & Brown, 2006) (Figure 1).

La SLA a une prévalence de 4 200 personnes atteintes et une incidence de 2 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes (données de 2008). En comparaison, l'incidence la maladie d'Alzheimer est de 880 nouveaux cas pour 100 000 habitants et sa prévalence est de 850 000.

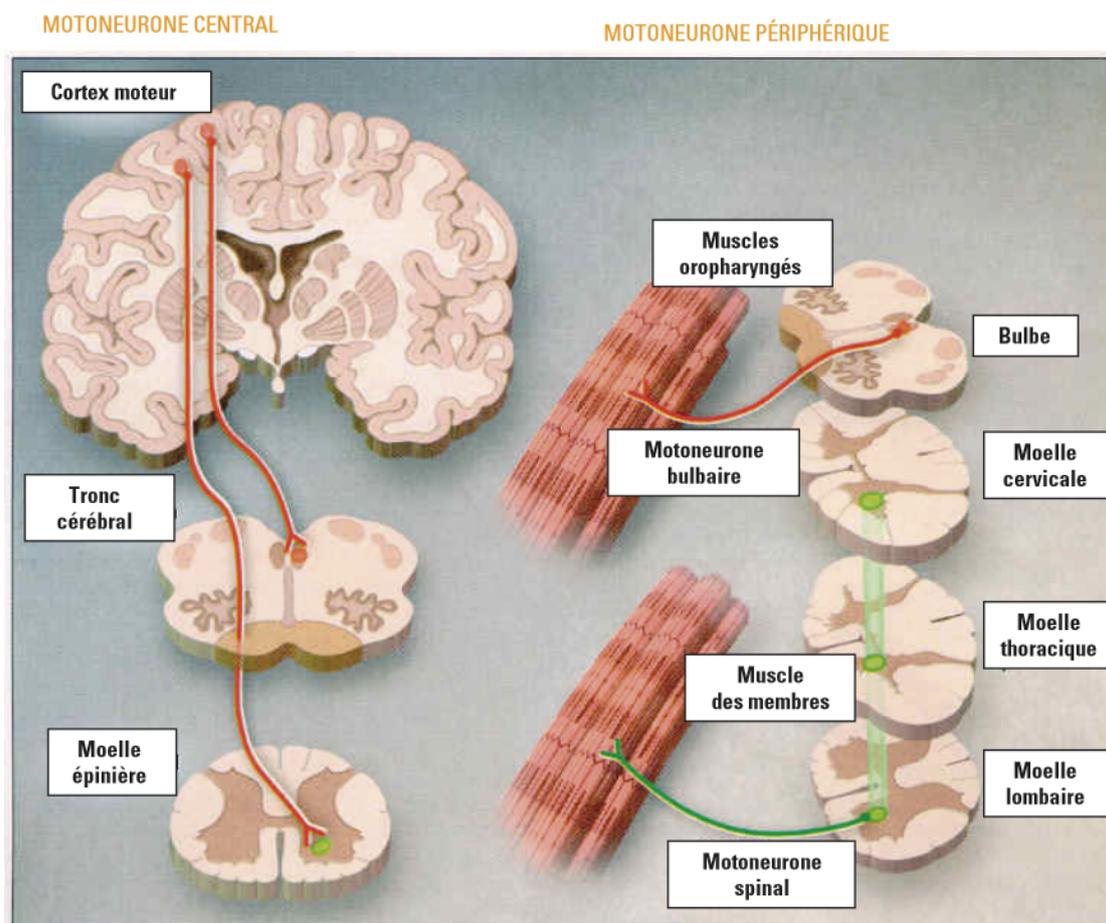


Figure 1 : Les neurones moteurs touchés dans la SLA

Les motoneurones sont des cellules spécialisées du système nerveux, impliquées dans la motricité. On distingue deux types de motoneurones : les motoneurones « centraux » et les motoneurones « périphériques ». Les motoneurones centraux (ou motoneurones supérieurs) sont localisés dans le cerveau au niveau d'une région spécialisée dans la motricité appelée le cortex moteur : ils reçoivent l'ordre d'exécution du mouvement et le transmettent au tronc cérébral et à la moelle épinière. Les motoneurones périphériques (ou motoneurones inférieurs) sont situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière ; ils sont directement connectés avec les muscles à qui ils vont transmettre l'ordre d'effectuer le mouvement. Les muscles des membres inférieurs sont contrôlés par les motoneurones périphériques qui sont situés dans la partie basse de la moelle épinière (moelle lombaire). Les muscles des membres supérieurs et le diaphragme (muscle respiratoire principal) sont contrôlés par les motoneurones périphériques situés dans la moelle épinière (moelle cervicale). Les capacités de parler, déglutir et mâcher sont contrôlées par les motoneurones périphériques situés au niveau d'une partie du tronc cérébral appelée le bulbe. *D'après (www.jle.com).*

Quant à la maladie de Parkinson, sa prévalence de 60 à 90 personnes atteintes pour 100 000 habitants. Par sa fréquence, la SLA est la première maladie du motoneurone. Elle est

caractérisée par une perte progressive, au stade symptomatique, d'environ 50% des neurones moteurs de la voie corticospinale, appelée faisceau pyramidal, incluant les neurones du cortex cérébral (appelés motoneurones supérieurs), ainsi que les neurones du tronc cérébral et de la moelle épinière (appelés motoneurones inférieurs) (Meininger, 2011; Ticozzi *et al.*, 2011) (Figure 2).

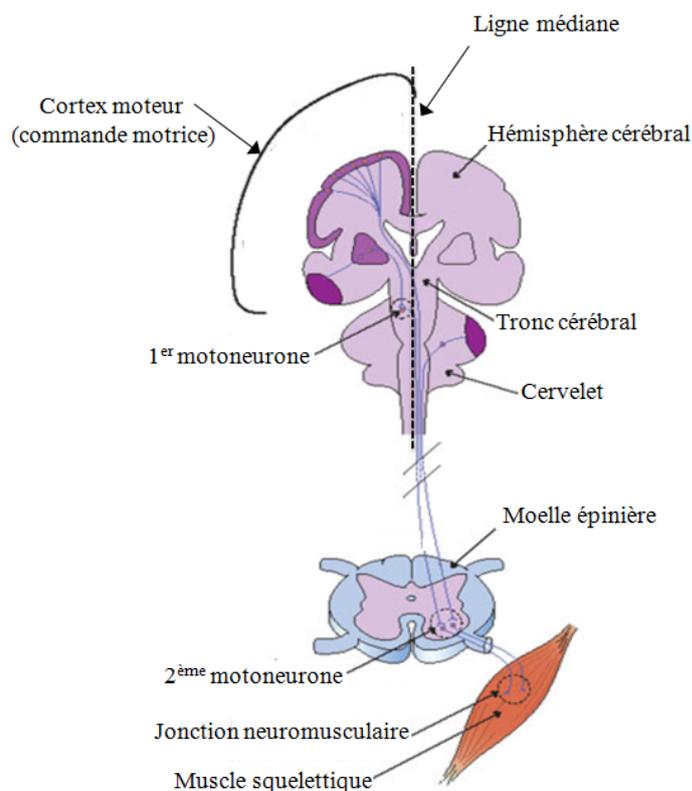


Figure 2 : Organisation de la voie cortico-spinale

Le cortex cérébral joue un rôle important dans le contrôle des mouvements volontaires par l'intermédiaire du faisceau pyramidal. Le faisceau pyramidal relie le cortex cérébral moteur aux motoneurones se trouvant dans le tronc cérébral (faisceau cortico-bulbaire) et dans la moelle épinière (faisceau cortico-spinal). L'influx nerveux part du motoneurone vers le nerf périphérique qui établit une synapse avec le muscle à la jonction neuromusculaire. La stimulation du nerf entraîne la contraction du muscle strié squelettique. *D'après (institut-myologie.org).*

Cette perte neuronale est associée à une atrophie, une faiblesse et une spasticité (syndrome pyramidal), ce qui entraîne une paralysie progressive des membres, aboutissant à la mort du patient généralement dans les trois à cinq ans après le diagnostic (Ticozzi *et al.*, 2011).

Environ 50% des patients atteints de SLA meurent dans les cinq ans après le diagnostic (Wijesekera & Leigh, 2009).

L'âge moyen d'apparition de la maladie se situe entre 50 et 65 ans. Seul 5% des cas, dit SLA juvénile (SLAj) se déclenchent avant 30 ans (Wijesekera & Leigh, 2009).

Il est possible de distinguer trois formes de SLA : la SLA familiale (SLAf), héréditaire à transmission autosomale dominante (bien que des profils d'hérédité autosomale récessive aient été observés), représentant 5 à 10% des cas, la SLA sporadique (SLAs), qui se déclare sans antécédents familiaux et qui est de loin la plus fréquente, et la SLA juvénile (SLAj) débutant avant 30 ans (Van Damme & Robberecht, 2009; Wijesekera & Leigh, 2009). Les présentations cliniques des SLAf et SLAs sont peu dissociables, bien qu'il y ait des différences détectables en fonction des différents types de mutations responsables des SLAf. Par ailleurs, l'âge d'apparition de la maladie est également un élément de divergence entre les SLAs et SLAf.

La SLA est à ce jour incurable. Le seul médicament utilisé est le riluzole (Rilutek®), considéré comme un inhibiteur du glutamate, neurotransmetteur essentiel des voies excitotoxiques. Il aurait également d'autres propriétés importantes comme antagoniste sélectif des canaux sodiques persistants. Son effet thérapeutique est relativement faible. En effet, il n'allonge l'espérance de vie que de trois mois environ (Bensimon *et al.*, 1994; Bryson *et al.*, 1996).

B - Épidémiologie

L'épidémiologie est l'étude des facteurs influant sur la santé et les maladies des populations. Il s'agit d'une discipline qui s'intéresse à la répartition, à la fréquence et à la gravité des états pathologiques.

Elle se quantifie par de nombreux facteurs, et notamment la prévalence, nombre de cas observés dans la population à un moment donné, et l'incidence, nombre de nouveaux cas par an. Dans le cas de la SLA, l'incidence observée de la maladie est d'environ 2 à 3 pour 100 000 habitants par an et la prévalence mesurée se situe entre 3 et 5,2 pour 100 000 habitants selon les estimations (Hardiman *et al.*, 2011). Notons que la prévalence de la SLAs est plutôt masculine (1,5 homme pour 1 femme). Après la ménopause, ce ratio approche un homme pour une femme, ce qui suggère un rôle protecteur des hormones chez la femme, notamment les œstrogènes (Mitchell & Borasio, 2007). Des études récentes (McCombe & Henderson, 2010; Adalbert & Coleman, 2012) tendent à montrer que ce ratio tend à se

réduire, possiblement en relation avec la progression du tabagisme chez les femmes, clairement identifié comme un facteur de risque. La SLAf affecte de manière égale les hommes et les femmes (Wijesekera & Leigh, 2009). Dans les SLA familiales, le déclenchement de la maladie apparaît environ 10 ans plus tôt et l'évolution de la maladie est généralement plus rapide (Ticozzi *et al.*, 2011).

Entre 90 et 95% des patients sont atteints par la forme sporadique de la SLA, alors que seulement 5 à 10% présentent une forme familiale, héréditaire (Menzies *et al.*, 2002).

Certains facteurs de risque génétiques ont été identifiés dans les cas de SLAf, bien que les causes de la SLA restent inconnues. Une mutation découverte récemment, la répétition d'un hexanucléotide (GGGGCC) dans une région non codante du gène C9ORF72 est associée à environ 8% des SLAs, et 43% des SLAf. L'hypothèse de facteurs environnementaux ou exogènes (régime alimentaire, activité physique, tabagisme, toxines) a également été explorée. Cependant, il ne semble pas y avoir d'association entre un seul facteur environnemental et le risque de développer une SLA. Actuellement, la thèse d'une implication multifactorielle est prédominante, associant l'interaction de facteurs environnementaux et de mutations génétiques (Wijesekera & Leigh, 2009).

C - Symptômes cliniques, diagnostic et prise en charge des patients

De part son caractère complexe, son large spectre clinique et l'apparition variable des symptômes, le diagnostic de la SLA est généralement long à établir. Le diagnostic est souvent retardé, son délai se situant environ un an après les premiers signes de la maladie. Le délai diagnostic moyen est de onze mois quelle que soit la SLA, de dix mois pour les patients présentant une forme bulbaire et de douze mois pour les patients présentant une forme spinale (Cellura *et al.*, 2012; Govoni *et al.*, 2012).

En 1994, les critères de diagnostic « El Escorial » ont été établis par la Fédération Mondiale de Neurologie (« World Federation of Neurology », WFN), puis révisés en 1998, alors renommés critères de « Airlie House », pour aider au diagnostic et à la classification des patients SLA (Wijesekera & Leigh, 2009). Le diagnostic, fiable à 95%, prend en compte à la fois des critères d'inclusion et d'exclusion de syndromes analogues à la SLA (Meininger, 2011). Ces critères sont résumés dans le Tableau 1. Plus récemment les critères d'AWAJI ont permis de mieux y intégrer les données de l'électromyographie (de Carvalho *et al.*, 2008).

Le diagnostic de SLA est classé en trois catégories : « SLA définie », « SLA possible » ou « SLA probable » (Wijesekera & Leigh, 2009).

Critère	El Escorial, 1994	Airlie House, 1998	Awaji-Shima, 2008
SLA définie	Atteinte du NMC et du NMP dans au moins trois régions anatomiques	Atteinte du NMC et du NMP dans au moins trois régions anatomiques	Signes cliniques ou ENMG d'atteinte du NMP et signes cliniques d'atteinte du NMC dans trois territoires
SLA probable	Atteinte du NMC et du NMP dans au moins deux régions anatomiques	Atteinte du NMC et du NMP dans au moins deux régions anatomiques	Signes cliniques ou ENMG d'atteinte du NMP et signes cliniques d'atteinte du NMC dans deux territoires avec présence de signes d'atteinte du NMC au dessus de l'atteinte du NMP
SLA probable étayée par les examens complémentaires	Non applicable	Atteinte du NMC et du NMP dans un territoire ou atteinte du NMC dans deux régions + Signes ENMG d'atteinte du NMP dans deux territoires	Non applicable
SLA possible	Atteinte du NMC et du NMP dans une seule région anatomique ou atteinte du NMP dans deux régions	Atteinte du NMC et du NMP dans une seule région anatomique ou atteinte du NMC dans deux régions ou atteinte du NMP au-dessus des signes d'atteinte du NMC	Signes cliniques ou ENMG d'atteinte du NMP et signes cliniques d'atteinte du NMC dans deux territoires ou signes cliniques d'atteinte du NMC dans deux territoires ou signes cliniques ou ENMG d'atteinte du NMP au dessus de l'atteinte du NMC
SLA suspectée	Atteinte du NMP dans deux territoires uniquement	Non applicable	Non applicable

NMC : Neurone Moteur Central

NMP : Neurone Moteur Périphérique

Tableau 1 : Critères de diagnostic de la SLA

Résumé des critères de diagnostic de la SLA d'après les critères d'El Escorial (1994) revisité en 1998 (critères d'Airlie-House). Le diagnostic de la SLA repose essentiellement sur des examens cliniques et électrophysiologiques. Selon le nombre de régions touchées et les signes pathologiques trouvés, la SLA est classée en « cliniquement définie », « cliniquement probable » ou « cliniquement possible ». Les critères de diagnostic considèrent quatre régions selon l'axe rostro-caudal, chacune étant responsable d'un ensemble de muscles : 1) la région du tronc cérébral (muscles de la face, du pharynx, du larynx et de la langue) ; 2) la région cervicale de la moelle épinière (muscles du cou, des membres supérieurs et du diaphragme) ; 3) la région thoracique de la moelle épinière (muscles du thorax, du dos et de l'abdomen) ; 4) la région lombo-sacrée de la moelle épinière (muscles des membres inférieurs). À partir de l'examen des symptômes, l'implication des motoneurons supérieurs sera définie par la présence d'un syndrome pyramidal avec spasticité et vivacité des réflexes ostéo-tendineux. L'implication des motoneurons médullaires pourra être déterminée par une atrophie, des fasciculations et surtout, une dénervation active à l'EMG. *D'après (Guennoc et al.; Hardiman et al., 2011).*

Les méthodes diagnostiques de la SLA sont :

- 1) des études électrophysiologiques : étude de la conduction des neurones (moteurs et sensoriels), électromyographies conventionnelle et quantitative, stimulation magnétique trans-crânienne et étude des potentiels évoqués moteurs. C'est l'examen de référence qui va confirmer la dénervation, signe majeur de l'atteinte de la corne antérieure ;
- 2) des études en neuro-imagerie : imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM). Son intérêt est discuté, tant la spécificité des images n'est pas claire. L'imagerie par tenseur de diffusion est une technique prometteuse, mais encore de recherche ;
- 3) des biopsies neuro-musculaires dans les situations de diagnostic différentiel avec d'autres neuropathies périphériques et des études anatomo-pathologiques ;
- 4) des études de laboratoire : enzymes musculaires, recherches immunologiques, étude du LCR, dosage de toxiques (métaux lourds) (Wijesekera & Leigh, 2009).

Une autre mesure, simple, objective et précoce de l'apparition de la maladie, est le pic de la courbe de poids. Ce stade se situe en amont de la dégénérescence axonale et de la perte des racines motrices de la moelle épinière (Boillée *et al.*, 2006).

Deux tiers des patients présentant une SLA voient la maladie débiter dans les membres ; il s'agit de la forme spinale de la SLA. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire pouvant commencer en position proximale ou distale dans les membres supérieurs ou inférieurs. Les patients peuvent également ressentir des contractions musculaires involontaires, des fasciculations, ou des crampes qui précèdent de plusieurs mois, voire de plusieurs années, le déficit musculaire. L'apparition des premiers symptômes, marquant le déclenchement de la maladie, est généralement asymétrique, ne touchant qu'un seul membre, puis progresse vers une atteinte symétrique des deux membres, jusqu'à toucher les territoires bulbaires, cervicaux, thoraciques et lombaires. La mort du patient est souvent due à des complications pulmonaires et à une déficience respiratoire.

Un tiers des patients présente une maladie débutant dans le bulbe ; il s'agit alors de la forme bulbaire. Elle se caractérise par une dégénérescence des neurones du tronc cérébral, et se traduit par des troubles de la parole (dysarthrie), des problèmes de déglutition (dysphagie et fausses routes), une exagération dans l'expression des émotions (rires et pleurs incontrôlés, spasmodiques), et finalement une faiblesse progressive des membres. Cette forme bulbaire de la SLA touche plus fréquemment les femmes et l'évolution de la maladie est généralement plus rapide, de 1 à 2 ans (Van Damme & Robberecht, 2009).

Par ailleurs, certains patients SLA peuvent souffrir de troubles cognitifs. Il existe des associations non fortuites entre la SLA et les démences fronto-temporales (DFT). De 20 à 40% des patients SLA présentent des dysfonctions frontales exécutives et 5% des patients sont atteints de démence fronto-temporale. Ces anomalies cognitives se traduisent par des changements de comportement et des difficultés d'expression (Leigh *et al.*, 2003; Van Damme & Robberecht, 2009). La découverte récente d'anomalies génétiques pouvant s'exprimer soit en SLA, soit en DFT, confirme les interactions entre ces deux pathologies, que certains considèrent comme deux expressions phénotypiques extrêmes d'une même maladie. La prise en charge des patients est très importante, afin d'optimiser leur qualité de vie et préserver leur autonomie le plus longtemps possible au cours des derniers stades de vie. Le corps médical a alors comme objectif de gérer de manière globale la prise en charge des patients sous plusieurs aspects : le traitement des symptômes, la gestion de la respiration, la gestion de l'alimentation, notamment en augmentant la prise calorique, le suivi des traitements et la prise en charge de l'aspect psychologique (Figure 3).

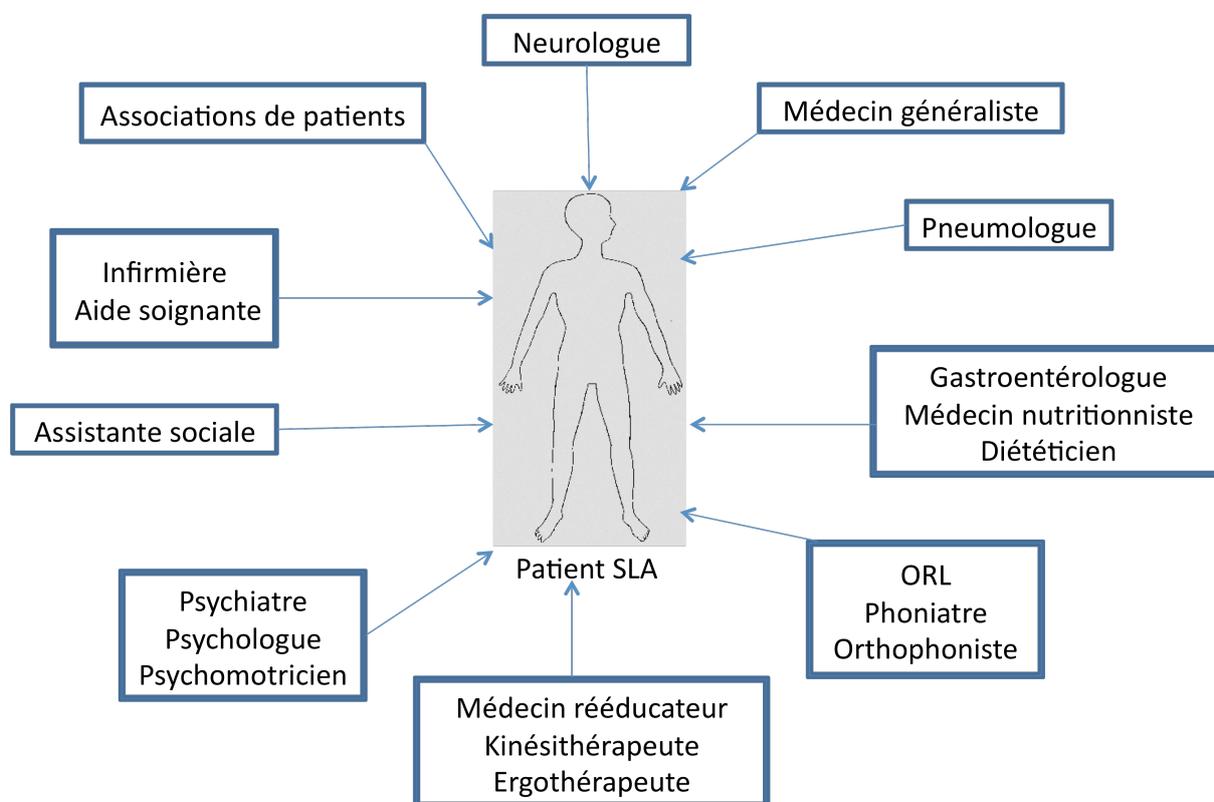


Figure 3 : Prise en charge multidisciplinaire d'un patient SLA

La prise en charge des patients SLA fait intervenir différents acteurs médicaux, paramédicaux et sociaux. La multidisciplinarité dans le suivi et la prise en charge des patients SLA permet d'assurer un meilleur suivi de la maladie et une meilleure adaptation du cadre de vie.

Pour suivre l'atteinte de la fonction ventilatoire, des explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) sont réalisées avec mesure de la capacité vitale forcée (CVF), des débits expiratoires et inspiratoires maximums et du débit expiratoire de pointe (DEP). On considère que lorsque la CVF diminue sous les 50% de la valeur théorique, une ventilation non invasive (VNI) est proposée. Certaines recommandations récentes suggèrent une VNI encore plus précoce à partir d'une réduction à 80% de la CVF. D'autres thérapeutiques respiratoires sont envisageables (stimulateurs diaphragmatiques, aide à la toux, voire acte plus invasif telle la trachéotomie dont la réalisation ne se fait qu'après une évaluation précautionneuse des désirs du patients et de son entourage et des possibilités de retour à domicile).

Enfin, les patients SLA souffrent souvent de troubles de la déglutition, provoquant des difficultés à avaler de la nourriture. Ces troubles peuvent conduire à une malnutrition et à une déshydratation, donc à une perte de masse corporelle. De plus, ces patients présentant souvent un état d'hypermétabolisme, il est alors nécessaire d'augmenter leurs apports caloriques. Une aide médicale pour se nourrir comme une gastrotomie endoscopique percutanée ou une alimentation parentérale peuvent être mises en place (Marin *et al.*, 2011; Lehericey *et al.*, 2012). C'est pour toutes ces raisons, qu'à partir de 2004, un ensemble de structures de référence ont été créées (les centres de référence SLA) dans toute la France. Ils regroupent au sein d'un même centre des spécialistes médicaux (neurologues, réanimateurs, rééducateurs, spécialistes des soins palliatifs, pneumologues) et paramédicaux de spécialités différentes et complémentaires (kinésithérapeutes, ergothérapeutes, infirmières, orthophonistes, assistants sociaux, psychologues et nutritionnistes).

D - Les formes sporadiques et familiales de la SLA

1 - Les formes sporadiques

Les SLA sporadiques représentent environ 90% des SLA totales, l'étiologie de l'apparition de la maladie n'étant pas clairement identifiée. Les causes de la SLA restent inconnues bien que certains facteurs de risque aient été identifiés. Plusieurs revues étudiant le rôle des facteurs de risque environnementaux sur la causalité de la SLA concluent qu'il n'y a pas d'association évidente entre un seul facteur de risque environnemental et le risque de développer une SLA. La plupart des auteurs privilégient l'hypothèse d'interactions complexes entre génétique et environnement comme facteur causal de la dégénérescence des motoneurones (Wijesekera & Leigh, 2009).

a) L'environnement

Plusieurs facteurs environnementaux ont été associés au développement de la SLA :

1. l'exposition à des métaux, pesticides, insecticides et neurotoxines

En effet, des travaux ont par exemple associé l'inhalation chronique d'insecticides à des désordres des neurones moteurs (Doi *et al.*, 2006). De même, l'exposition d'anciens soldats de la Guerre du Golfe à des gaz neurotoxiques a également été liée au développement d'une SLA, s'accompagnant de la forte diminution de l'enzyme paraoxonase PON1, ayant pour fonction de détoxifier les pesticides organophosphorés (Haley *et al.*, 1999).

2. la pratique du sport et les facteurs de risque associés

En Italie, il a été montré qu'il existait un risque plus important de développer une SLA chez les joueurs de football professionnels et amateurs (Belli & Vanacore, 2005). Le débat reste cependant ouvert pour établir s'il s'agit d'une conséquence de l'activité physique et des traumatismes associés à cette activité, ou si le risque est plutôt lié à des facteurs chimiques tels que les produits dopants, les suppléments diététiques ou encore les pesticides utilisés pour l'entretien des pelouses des stades.

3. le tabagisme

Chez les fumeurs, des études cas-contrôle sur la SLA ont montré qu'il existait un risque de développer une SLA augmenté d'un facteur 0.8 à 1.67 (Weisskopf *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2006). Le tabagisme est actuellement le seul facteur de risque avéré pour la SLA (Wijesekera & Leigh, 2009).

b) Une susceptibilité génétique

Un gène de susceptibilité ou de prédisposition est un gène qui tend à favoriser le développement d'une maladie, en association avec d'autres gènes, des facteurs environnementaux et/ou certains modes de vie. Ce ne sont en aucun cas des gènes suffisants pour déclencher la maladie, comme c'est le cas pour les gènes identifiés dans les SLAf, qui seront décrits dans la partie suivante. La présence de variants génétiques a donc été recherchée par des études d'association chez les patients SLAs. De manière générale, ces variants génétiques regroupent une proportion très faible de cas. Par exemple, l'étude de patients aurait mis en évidence un facteur de risque de développer une SLA avec des mutations des gènes codant pour les neurofilaments (NF). Les NFs constituent la majorité des filaments intermédiaires exprimés dans les neurones adultes et sont formés par l'assemblage de quatre sous-unités (NF à chaîne légère NFL, NF à chaîne moyenne NFM, NF à chaîne

lourde NFH et péricérine). L'accumulation anormale de NFs est d'ailleurs une caractéristique histopathologique retrouvée chez les patients SLA. Des mutations dans le domaine de phosphorylation de NFH et de la péricérine ont été associées à environ 1% des cas de SLAs (Tomkins *et al.*, 1998; Al-Chalabi *et al.*, 1999). Bien que les conséquences fonctionnelles de ces mutations restent inconnues, implication dans le transport axonal, assemblage des NFL, elles sont considérées comme facteurs de risque pour la SLA.

D'autres études se sont intéressées à un facteur angiogénique, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), après avoir identifié une délétion dans son domaine de réponse à l'hypoxie chez des souris présentant des troubles moteurs (Oosthuysen *et al.*, 2001). Une analyse de 1900 patients SLA a permis d'identifier trois polymorphismes dans la séquence de ce gène (Lambrechts *et al.*, 2003), mais cette observation n'a pas été confirmée par les études ultérieures.

D'autres études ont lié la présence de rares polymorphismes du gène de l'hémochromatose, notamment le variant H63D, avec des cas de SLAs (Wang *et al.*, 2004; Sutedja *et al.*, 2007). Des mutations dans ce gène entraînent une surcharge en fer, pouvant perturber la régulation du stress oxydatif, connu pour être augmenté dans la SLA (*cf* III, C).

Par ailleurs, suite aux données indiquant que l'exposition aux insecticides et neurotoxines pourrait être un facteur de risque de développer une SLA, des variants du gène de la paraoxonase (PON, enzyme nécessaire à la détoxification) ont été recherchés. Seule une étude s'est révélée positive sur des patients sporadiques, montrant un lien entre un variant de PON1 et PON2 et un risque de développer une SLA (Saeed *et al.*, 2006; Slowik *et al.*, 2006; Morahan *et al.*, 2007).

Enfin, des travaux ont montré l'implication de la chromogranine A et B (CHG) dans un mécanisme de toxicité lié à SOD1 muté, et la première recherche de variants des chromogranines chez les patients semblait prometteuse car elle associait un variant P413L de la CHG B avec un risque de 2,2% de développer une SLA (Gros-Louis *et al.*, 2009). Toutefois, deux études effectuées ensuite dans des populations hollandaise et française n'ont pas permis de confirmer ces résultats (van Vught *et al.*, 2010; Blasco *et al.*, 2011).

Ces études aux résultats contradictoires montrent que des populations plus importantes de patients sont nécessaires pour confirmer ou infirmer l'implication de ces gènes et soulignent la difficulté de compréhension des causes des SLA sporadiques.

Les études se sont donc focalisées sur les formes familiales de la maladie, liées à des mutations de gènes. En effet, les SLAs et SLAf étant très proches d'un point de vue

phénotypique, on peut espérer que des mécanismes physiopathologiques trouvés en utilisant des modèles de SLAf pourront également s'appliquer aux SLAs, même si leur facteur déclencheur est différent.

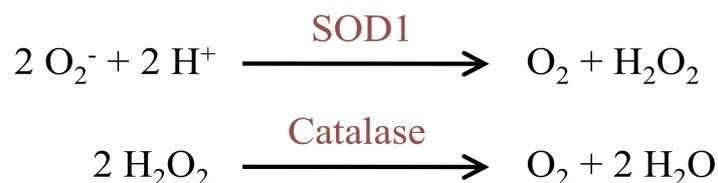
Enfin, de récentes études (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Millecamps *et al.*, 2012) ont mis en évidence la présence de la répétition d'un hexanucléotide (GGGGCC) dans une région non codante de C9ORF72, responsable de 20 à 25% des SLAs liées au chromosome 9p (*cf* I-D-3).

2 - Les formes familiales

Les formes familiales représentent seulement 10% des cas de SLA. L'identification de gènes mutés dans cette maladie est un enjeu primordial, car elle permettra d'étudier leur implication dans la pathologie en utilisant des modèles d'étude *in vitro* de la maladie et/ou en créant des modèles animaux reproduisant les caractéristiques de la maladie. Il est intéressant de noter que les gènes mutés identifiés comme liés à la SLA codent pour des protéines que l'on peut regrouper en cinq familles, selon leurs fonctions cellulaires, ce qui laisse supposer que ces protéines mutées pourraient, par leurs fonctions proches, être à l'origine de processus de toxicité communs. L'ensemble des gènes liés à la SLA et leurs caractéristiques sont résumés dans les tableaux 2 et 3.

a) Le gène SOD

Le gène SOD1 code pour une protéine à activité catalytique de défense contre les radicaux libres. Il a été le premier gène identifié. L'association génétique de la SLA 1 à la région chromosomique 21q22.1 a été décrite initialement en 1991 (Siddique *et al.*, 1991) et l'identification du gène responsable SOD1 suivra deux ans plus tard (Rosen *et al.*, 1993). Ce gène code pour la superoxyde dismutase 1 à cuivre et zinc, enzyme dont le rôle est de catalyser les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène (McCord & Fridovich, 1969) (Équation 1).



Équation 1 : Réaction catalysée par la superoxyde dismutase 1 (SOD1)

L'enzyme superoxyde dismutase 1 (SOD1) convertit les anions superoxydes O_2^- en peroxydes (H_2O_2). L'enzyme catalase transforme ensuite ce peroxyde en molécules d'eau (H_2O).

A ce jour, plus de cent quarante mutations ont été associées à ce gène, toutes (sauf une) liées à un phénotype de SLA. La majorité des mutations sont des substitutions faux-sens dispersées dans les cinq exons du gène ; huit sont des délétions et cinq des insertions aboutissant à une forme tronquée de la protéine (Gros-Louis *et al.*, 2006; Ticozzi *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces mutations représente environ 20% des SLAf et crée un phénotype variable tant au niveau du déclenchement de la maladie que de sa durée et de sa progression. Par exemple, la mutation A4V (exon 1), qui est la plus communément retrouvée, est associée à une forme très agressive de la maladie, avec un déclenchement précoce et une durée de vie après diagnostic d'environ un an seulement (Cudkowicz *et al.*, 1997; Juneja *et al.*, 1997). A l'inverse, la mutation H46R, située dans le domaine du site de liaison au cuivre, entraîne un phénotype modéré avec une survie des patients supérieure à vingt ans (Aoki *et al.*, 1993). Des modèles de souris surexprimant la SOD1 humaine (mSOD1) ont été créés et restent actuellement le modèle souris reproduisant au mieux les caractéristiques pathologiques de la SLA et donc, le plus étudié.

b) Les autres gènes impliqués

Les gènes codant pour des protéines de liaison à l'ADN

Le gène TARDBP :

Il a été mis en évidence par Neumann et ses collaborateurs (Neumann *et al.*, 2006) que la protéine TDP-43 (« TAR DNA-binding protein 43 ») était retrouvée dans la majorité des inclusions cytoplasmiques ubiquitinylées présentes chez la majorité des patients SLA, constituant un marqueur *post mortem* de diagnostic de la SLA. 5% des SLAf présentent des mutations de ce gène (Gitcho *et al.*, 2008; Sreedharan *et al.*, 2008; Van Deerlin *et al.*, 2008; Yokoseki *et al.*, 2008; Corrado *et al.*, 2009; Kabashi *et al.*, 2010; Iida *et al.*, 2012). Les mutations du gène TARDBP entraînent une SLA similaire aux SLA sporadiques et celles associées à des démences.

La protéine TDP-43 est une protéine de liaison à l'ADN/ARN et appartient à la famille des « heterogeneous nuclear ribonucleoproteins ». Elle est impliquée dans la régulation de la transcription de gènes, ainsi que dans l'épissage, le transport et la stabilisation de molécules d'ARN messenger (ARNm) (Buratti & Baralle, 2008). Les mutations dans ce gène sont rassemblées dans la zone codant pour la partie C-terminale, à une exception près, responsable des interactions protéine-protéine. Le rôle de TDP-43 dans la SLA n'est pas encore clairement identifié. Cependant, cette protéine, normalement nucléaire, peut être retrouvée agrégée dans

le cytoplasme et le réticulum endoplasmique des motoneurons de patients et plus particulièrement sous une forme hyperphosphorylée ou encore clivée en position C-terminale (Sasaki *et al.*, 2010).

Type de SLA	Mode de transmission (autosomal)	Locus	Gène	Nombre de mutations	Protéine	Références
ADULTE :						
SLA 1 : SLA typique	Dominant / Rarement récessif	21q22.1	SOD1	> 140	"Cu/Zn Superoxyde dismutase 1"	Siddique et al., 1991 Rosen et al., 1993
SLA 3 : SLA typique	Dominant	18q21	Inconnu			Hank CK et al., 2002
SLA 6 : SLA typique, et associée avec des DFT	Dominant	16p11.2	FUS	30	"Fused in sarcoma"	Abalkhail H et al., 2003 ; Sapp PC et al., 2003
SLA 7 :	Dominant	20p13	Inconnu			Sapp PC et al., 2003
SLA 8 : SLA typique, SLA atypique et amyotrophie spinale à déclenchement tardif	Dominant	20q13.33	VAPB	2	"Vesicle associated membrane protein (VAMP)-associated protein B"	Nishimura et al., 2004
SLA 9 : SLA typique	Dominant	14q11	ANG	15	Angiogenin	Wu et al., 2007 ; Conforti et al., 2008 ; Gellera et al., 2008 ; Paubel et al., 2008
SLA 10 : SLA typique, et associée avec des DFT	Dominant	1q36	TARDBP	30	"TAR-DNA Binding protein 43"	Corrado L et al., 2009 ; Van Deerlin et al., 2008 ; Iida et al., 2010 ; Sreedharan et al., 2008 ; Gitcho et al., 2008
SLA 11 : SLA typique et maladie de Charcot Marie Tooth IV	Dominant	6q21	FIG4	10	phosphatidyl-inositol 3,5-biphosphate 5-phosphatase	Chow et al., 2009
SLA 12 :	Dominant / Récessif	10p15-p14	OPTN	3	Optineurin	Maruyama et al., 2010 ; Millecamps et al., 2011
Maladie progressive lente du neurone moteur inférieur	Dominant	2q13	DCTN1	4	Dynactin	Puls et al., 2003 ; Munch et al., 2004
SLA classique et associée à des DFT	Dominant		VCP	4	"Valosin Containing Protein"	Johnson et al., 2010

DFT = Démences Fronto-Temporales

Tableau 2 : Récapitulatif des gènes impliqués dans la SLA "adulte"

Les gènes peuvent être regroupés selon la fonction cellulaire des protéines pour lesquelles ils codent. Les familles de protéines sont représentées selon un code couleur. Rose : protéines impliquées dans une fonction catalytique, ici, la superoxyde dismutase 1 ; Bleu : protéines de liaison à l'ADN/ARN (Fus et TDP-43) ; Vert : protéines impliquées dans le trafic ou le transport vésiculaire (VAPB, FIG4, Optineurin et Dynactine) ; Violet : protéines à activité angiogénique (l'angiogénine) et Jaune : protéines associées à la dégradation et au recyclage des protéines (VCP).

Le gène FUS :

Des mutations, essentiellement faux-sens, ont été identifiées dans le gène FUS (« Fused in Sarcoma ») de la région chromosomique 16p12.1-q21 chez des patients présentant une SLA classique à transmission autosomale dominante (Abalkhail *et al.*, 2003; Ruddy *et al.*, 2003; Sapp *et al.*, 2003; Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009). Les études de patients ont permis d'établir que ces mutations concernaient 4% des SLA. Les patients SLA avec des mutations FUS développent souvent une SLA qui cible les motoneurones inférieurs, mais quelques mutations ont été associées avec des cas de SLA à démence fronto-temporale (Yan *et al.*, 2010).

Type de SLA	Mode de transmission (autosomal)	Locus	Gène	Nombre de mutations associées	Protéine	Références
JUVENILE :						
SLA 2 : SLA typique, sclérose latérale primitive, paraplégie spastique héréditaire infantile	Récessif	2q33-35	ALS 2	10	Alsin	Eymard-Pierre <i>et al.</i> , 2002 ; Hadano <i>et al.</i> , 2001 ; Yang <i>et al.</i> , 2001 ; Kress <i>et al.</i> , 2005
SLA 4 : SLA à progression très lente	Dominant	9q34	SETX	3	Senataxin	Chen YZ <i>et al.</i> , 2004
SLA 5 : SLA à progression très lente	Récessif	15q15-21	SPG11	12	Spatacsine	Hentati <i>et al.</i> , 1998 ; Orlacchio <i>et al.</i> , 2010
SLA ASSOCIEE A DES DFTs :						
SLA DFT 1 adulte	Dominant	9q21-22	Inconnu			Finlayson <i>et al.</i> , 1973 ; Hosler <i>et al.</i> , 2000
SLA DFT 2 juvénile	Dominant	9p13.2-21.3	Inconnu			Finlayson <i>et al.</i> , 1973 ; Hosler <i>et al.</i> , 2000

Tableau 3 : Récapitulatif des gènes impliqués dans la SLA "juvénile" et les démences fronto-temporales

Les gènes sont classés selon la fonction cellulaire des protéines pour lesquelles ils codent. Bleu : protéines de liaison à l'ADN/ARN (Sénataxine) ; Vert : protéines impliquées dans le trafic ou le transport vésiculaire (Alsin et spatacsine).

Le gène FUS est un analogue fonctionnel de la protéine TDP-43 puisqu'il joue un rôle clef dans la maturation des ARN messagers. De nombreuses mutations sont d'ailleurs situées dans

la région codant pour la partie C-terminale de la protéine, requise pour sa liaison à l'ARN, ses fonctions d'épissage et sa localisation nucléaire (Lagier-Tourenne *et al.*, 2010). Comme pour TDP-43, il reste encore à déterminer si la toxicité du mutant FUS est due à une perturbation de ses fonctions de régulation du métabolisme de l'ARN et/ou à sa mauvaise localisation cellulaire, la forme mutée de FUS étant retrouvée dans le cytoplasme des motoneurons de patients atteints de SLA.

Le gène SETX :

La SLA 4 est définie comme une maladie du motoneurone, maladie autosomale dominante, rare, qui se déclenche de manière très précoce, chez le jeune. A ce jour, trois mutations faux-sens dans le gène codant pour la sénataxine y ont été associées (Chen *et al.*, 2004).

La sénataxine est une hélicase ADN/ARN exprimée de manière ubiquitaire, qui serait impliquée dans la réparation des doubles brins d'ADN lors d'un stress oxydatif (Suraweera *et al.*, 2007). Cette protéine se lie également à l'ARN polymérase II et pourrait alors être impliquée dans la régulation transcriptionnelle. Aucun lien n'a été fait à ce jour entre la mutation, la fonction de cette protéine et le déclenchement de la SLA.

Les gènes codant pour des protéines impliquées dans le trafic et le transport vésiculaire

Le gène VAPB :

La région chromosomique 20q13.33, responsable de la SLA 8, a été isolée dans une famille brésilienne qui présentait une forme de SLA autosomale dominante à progression lente (Nishimura *et al.*, 2004). Les individus de cette famille présentaient divers phénotypes décrits comme SLA typique (progression rapide) ou comme SLA atypique avec prépondérance de tremblements ou encore comme des cas d'amyotrophie spinale. Ces patients présentaient tous une mutation faux-sens P56S dans le gène codant pour la protéine VAPB (« VAMP-Associated Protein B ») (Nishimura *et al.*, 2004). Plus récemment, chez un patient atteint de SLA typique, il a été découvert une nouvelle mutation faux-sens, T46I, qui se situe dans une région extrêmement bien conservée de la protéine VAPB où se situe déjà la mutation P56S (Chen *et al.*, 2010). La protéine VAPB est une protéine ubiquitaire, localisée dans le réticulum endoplasmique. Cette structure s'associant aux microtubules fait suggérer que VAPB jouerait un rôle dans le trafic vésiculaire.

Le gène FIG4 :

En 2009, Chow et collaborateurs (Chow *et al.*, 2009) ont identifié dix mutations dans le gène FIG4, affectant 2% des patients SLAf et touchant également des patients présentant une sclérose latérale primitive. Il s'agit de mutations faux-sens, non-sens, d'insertions et de délétions. La mutation I41T de ce gène a également été isolée dans une neuropathie démyélinisante chez l'enfant, la maladie de Charcot-Marie-Tooth IV (Chow *et al.*, 2007). FIG4 code pour une phosphatase phosphoinositide qui régule la synthèse d'un lipide, le phosphatidylinositol-3,5-biphosphate impliqué dans le transport rétrograde de vésicules endosomales de l'appareil de Golgi (Rutherford *et al.*, 2006). A ce jour, aucun lien n'a été fait entre la mutation, la fonction de cette protéine et le déclenchement de la maladie.

Le gène DCTN 1 :

Une mutation G59S dans le gène codant pour la dynactine a initialement été trouvée chez une famille de patients présentant une maladie du motoneurone proche de la SLA, de type autosomale dominante à progression lente, entraînant une paralysie des cordes vocales. Par la suite, trois autres mutations faux-sens ont été identifiées chez des patients présentant une SLA classique (Puls *et al.*, 2003; Munch *et al.*, 2004). La dynactine est une protéine aux multiples sous-unités, gérant la liaison entre la dynéine (moteur moléculaire) et les microtubules, et qui est donc nécessaire pour le transport axonal rétrograde. La mutation G59S abolit la liaison de la dynactine aux microtubules, ce qui se traduit par une perturbation du transport axonal très dommageable pour les motoneurones, très dépendants de ce transport en raison de leur grande taille.

Le gène Alsine :

La région chromosomique 2q33-35, où se situe le gène Alsine, lié à la SLA2 a été identifiée en 1994 avant la découverte des mutations dans le gène. La SLA2 est définie comme une maladie des motoneurones à transmission autosomale récessive et qui se déclenche chez le sujet jeune (Hentati *et al.*, 1994).

Le gène Alsine, produit deux types de protéines après épissage : une forme longue et une forme courte. La majorité des mutations dans le gène Alsine sont des délétions qui aboutissent à une version tronquée de la forme longue et/ou de la forme courte. Si les mutations affectent à la fois les formes longue et courte de la protéine, le phénotype est celui d'une SLA juvénile, alors que si les mutations touchent uniquement la forme longue, le phénotype est plus modéré et correspond à une sclérose latérale primitive juvénile ou à une paraplégie spastique familiale

de l'enfant. La diversité des phénotypes observés selon les mutations a par ailleurs remis en question l'appartenance du gène Alsine à la famille de gènes responsables de la SLA (Hadano *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Devon *et al.*, 2003; Gros-Louis *et al.*, 2003; Eymard-Pierre *et al.*, 2006; Panzeri *et al.*, 2006).

La protéine Alsine est localisée à la surface cytosolique des membranes des endosomes et agit comme un facteur d'échange de guanine pour Rab5 (petite GTPase des endosomes précoces), et serait donc impliquée dans le trafic vésiculaire et l'organisation du cytosquelette (Otomo *et al.*, 2003). Pour l'instant, le mécanisme d'action de l'alsine mutée dans la SLA n'est pas connu.

Le gène SPG 11 :

La SLA5 est une maladie autosomale récessive du motoneurone qui a été associée à des mutations dans le gène codant pour la spatacine. Douze mutations, majoritairement non-sens ou décalant le cadre de lecture, ont été identifiées (Orlacchio *et al.*, 2010). La spatacine contient quatre domaines transmembranaires, ce qui suggère qu'elle serait un récepteur ou un transporteur. Son rôle physiopathologique reste inconnu, mais elle pourrait être impliquée dans le transport axonal (Salinas *et al.*, 2008).

Le gène OPTN :

Un autre gène récemment identifié chez des patients SLA code pour l'optineurine. Trois mutations dont une mutation dominante faux-sens E478G, une mutation récessive non-sens homozygote Q398X et une délétion récessive homozygote ont été identifiées chez des patients SLA (Maruyama *et al.*, 2010). Le phénotype clinique correspond à une mutation à progression lente. L'optineurine a été retrouvée dans les inclusions à hyaline et « skeun like » et est également présente dans les inclusions TDP-43 et/ou SOD1 positives, ce qui suggère que cette protéine mutée pourrait partager un mécanisme de pathogénicité avec d'autres SLA. Cette protéine régule de nombreuses fonctions comme l'inhibition du facteur nucléaire NF- κ B, facteur de transcription régulant la mort cellulaire. Elle participe également au maintien du complexe golgien, au trafic membranaire, ainsi qu'au processus d'exocytose en interagissant avec la myosine et Rab8, petite protéine GTPase. Contrairement à la protéine sauvage, la forme mutée E478G du gène forme des inclusions cytoplasmiques, ce qui pourrait perturber le fonctionnement cellulaire.

Le gène ANG codant pour une protéine à fonction angiogénique

En 2003, des études ont montré que des mutations dans le gène codant pour le VEGF pouvaient représenter des facteurs de susceptibilité dans des cas de SLAs. Ces données ont conduit en 2004 à étudier si l'angiogénine, un effecteur en aval de VEGF, pouvait présenter des formes mutées dans des cas de SLA. Quinze mutations à transmission autosomale dominante ont été identifiées dans ce gène (Wu *et al.*, 2007; Gellera *et al.*, 2008; Paubel *et al.*, 2008; Millicamps *et al.*, 2010). L'angiogénine appartient à la famille des ribonucléases pancréatiques et possède diverses fonctions cellulaires. Elle stimule la transcription des ARN de transfert, la formation des ribosomes, la traduction des protéines, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (Moroianu & Riordan, 1994; Smith & Raines, 2006). Des travaux *in vitro* ont montré que l'angiogénine protégeait les motoneurones de la mort induite par différents stress cellulaires comme la privation de facteurs trophiques, le stress du réticulum endoplasmique ou l'hypoxie (Kieran *et al.*, 2008), alors que l'angiogénine mutée perdrait cette capacité (Sebastia *et al.*, 2009). Par ailleurs, la surexpression d'angiogénine mutée affecte la croissance neuritique et la survie des motoneurones *in vitro* (Subramanian & Feng, 2007; Subramanian *et al.*, 2008).

Le gène VCP codant pour une protéine impliquée dans la dégradation des protéines

Quatre mutations, R191Q, R159G, D592N et R155H dans le gène VCP (« Valosin Containing Protein ») ont récemment été identifiées dans une famille italienne. La fréquence de ces mutations représente environ 2% des SLAs (Johnson *et al.*, 2010). La majorité des patients présentait une SLA classique qui débutait principalement au niveau des membres inférieurs ; une minorité présentait une SLA associée à une démence fronto-temporale.

Ce gène code pour un membre conservé de la famille des ATPase AAA+ ; sa fonction principale est de réguler l'homéostasie protéique. Celle-ci participe à la dégradation associée au système ubiquitine protéasome, mais également au processus d'autophagie et à la naissance des organelles (Shaw, 2010).

Des inclusions TDP-43 sont visibles dans les neurones des patients SLA « VCP ». Cette observation est intéressante car il a été montré *in vitro* et *in vivo* que la surexpression de la protéine VCP mutée induisait une redistribution de TDP-43 du noyau vers le cytoplasme (Gitcho *et al.*, 2009). La toxicité de VCP pourrait donc dépendre d'une mauvaise localisation de TDP-43. Les mutations de VCP pourraient également perturber sa fonction de dégradation

des protéines et aboutir à une accumulation de protéines ubiquitylées (van der Zee *et al.*, 2009).

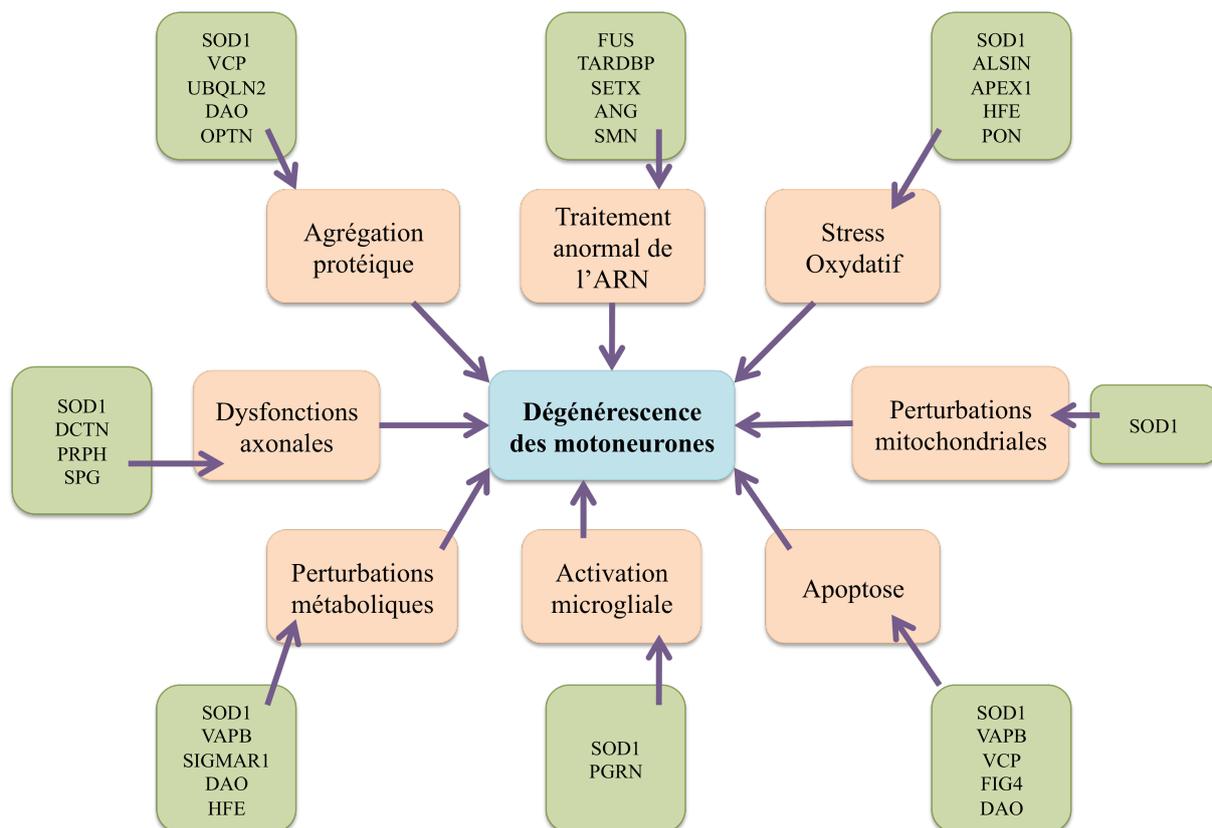


Figure 4 : Interaction des différentes voies moléculaires dans les neurones moteurs ; les causes de la SLA

Les cellules microgliales activent une cascade inflammatoire via la sécrétion de cytokines. Les astrocytes conduisent à altérer les motoneurones par la libération de médiateurs inflammatoires tels que l'oxyde nitrique et la prostaglandine E2. L'accumulation de radicaux superoxydes et le stress oxydatif, le traitement anormal de l'ARN, le mauvais repliement des protéines et des protéines insolubles peut provoquer la dégénérescence des motoneurones dans la SLA. L'agrégation protéique peut conduire au stress du réticulum endoplasmique avec un trafic endosomal défectueux et des dommages mitochondriaux, ce qui peut entraîner une perturbation de ces organelles et activer des voies autophagiques et l'apoptose. Les anomalies du transport axonal peuvent conduire à un déficit d'énergie axonal avec une croissance axonale défectueuse et des dysfonctions axonales. Les dysfonctions axonales, l'angiogénèse défectueuse et les troubles métaboliques peuvent contribuer à la dégénérescence des motoneurones dans la SLA. *D'après (Chen et al., 2013).*

L'ensemble de ces gènes liés à la SLA cible cinq fonctions importantes pour la survie cellulaire (Figure 4). Les motoneurones, en tant que cellules de grande taille, ont besoin d'une lourde machinerie pour leur fonctionnement, des systèmes de production d'ARNm et de protéines constants, ainsi qu'un système de transport vésiculaire efficace. Ils doivent en outre

être préservés de stress cellulaires, tels que l'accumulation de protéines ou de composants oxydants. Pour l'instant, bien que de nouvelles pièces du puzzle soient découvertes régulièrement, il est encore difficile de comprendre par quels mécanismes l'ensemble de ces gènes peut entraîner la mort du motoneurone.

3 - La répétition de l'hexanucléotide C9ORF72

La SLA, dans la très grande majorité des cas, n'est pas familiale. Depuis 2006, des éléments soutiennent l'hypothèse qu'un gène situé sur le chromosome 9 pourrait être responsable des cas familiaux de SLA associés à des troubles cognitifs. De nombreuses équipes internationales se sont alors engagées dans la quête du gène responsable situé dans cette région du chromosome 9. C'est finalement en 2011 (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011) qu'est venue la découverte majeure de l'implication d'un gène, C9ORF72. Cette anomalie est retrouvée dans 46% des cas familiaux de SLA et dans 21,1% des cas sporadiques de SLA dans une population finlandaise de patients (Renton *et al.*, 2011). Dans une population française de patients SLA, cette mutation est présente dans 46% des cas de SLA et 8% des cas de SLAs (Millecamps *et al.*, 2012). L'anomalie génétique est inhabituelle, et c'est la raison pour laquelle le temps de la détecter a été relativement long. Il s'agit de la répétition de six bases (GGGGCC) qui ont la particularité de se situer dans des régions introniques non codantes du gène. Chez les individus sains, cette séquence est répétée deux à cinq fois. Elle est rarement répétée plus de cinq fois et elle n'est jamais répétée plus de trente fois. La taille de la répétition chez les patients SLA reste incertaine, mais il est probable qu'elle soit répétée plusieurs centaines de fois voire plusieurs milliers de fois (Robberecht & Philips, 2013). Les anomalies qu'entraîne cette modification du gène est une question qui n'est pas encore résolue. Notamment, la fonction normale du gène n'est pas connue. La protéine C9ORF72 serait probablement cytoplasmique. Une conséquence de la modification du gène pourrait être une perturbation des ARN. Cette répétition est également retrouvée dans des cas de dégénérescence du lobe fronto-temporal (FTLD) (Robberecht & Philips, 2013). Il est probable que cette anomalie puisse s'exprimer d'un point de vue phénotypique soit par une SLA typique, SLA avec troubles cognitifs de type frontaux, soit par une DFT. Les raisons qui conduisent la même anomalie à cette diversité phénotypique ne sont pas élucidées.

II - Les modèles d'étude de la SLA

(Tableaux 4 et 5)

De part sa complexité et sa progression rapide, la SLA est une maladie difficile à diagnostiquer. Les recherches sur les patients sont donc compliquées et ne peuvent s'effectuer, pour la majorité que *post mortem*. L'étude de modèles animaux reproduisant la maladie permet de comprendre et de définir les mécanismes pouvant aboutir à la mort des motoneurones. De nombreux modèles animaux sont utilisés, chacun présentant des caractéristiques distinctes et donc des avantages et des inconvénients distincts. Les souris transgéniques ont été développées à partir des gènes identifiés dans les SLA et font partie des modèles les plus utilisés. Pour chaque modèle, nous décrirons les symptômes *in vivo* et les caractéristiques associées.

A - Les modèles murins

1 - Les souris SOD1

En 1993, les travaux de Rosen et collaborateurs ont montré que des mutations dans le gène SOD1 codant pour la superoxyde dismutase 1 étaient retrouvées dans 20% des cas familiaux de SLA. Environ 150 mutations ont été mises en évidence dans ce gène à ce jour. La SOD1 est une métalloenzyme cytosolique ubiquitaire dont la fonction est de catalyser la dismutation des ions superoxyde (O_2^-), toxiques pour la cellule. Les premiers travaux ont cherché à identifier si les mutations de la SOD1 entraînaient un gain ou une perte de fonction, et à développer, à l'aide de la transgénèse, un modèle animal de la maladie.

a) La souris déficiente en SOD1

L'ensemble des mutations SOD1, réparties tout au long des cinq exons du gène et conduisant toutes au même syndrome neurologique, pouvait suggérer qu'une perte de fonction de la protéine SOD1 était à l'origine de la pathologie. Des souris homozygotes déficientes pour la SOD1 ont été produites dès 1996 (Reaume *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 1998). Ces souris se sont montrées plus sensibles que les souris sauvages à différents stress comme l'axotomie (Reaume *et al.*, 1996) ou la toxicité induite par certains pesticides (Ho *et al.*, 1998). En outre, ces souris ne présentent que peu de déficits moteurs, à l'exception d'une axonopathie périphérique chronique liée à l'âge, une sarcopénie, c'est-à-dire une perte musculaire accélérée au profit de la masse adipeuse, ainsi qu'une dénervation des muscles des pattes arrière (50% à quatre mois et totale à dix-huit mois).

Cependant, ces souris ne présentent pas de perte motoneuronale ni de symptôme moteur analogues à ceux de la SLA (Flood *et al.*, 1999; Shefner *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2006; Fischer & Glass, 2007). Ces résultats ne permettent pas d'exclure les effets délétères de la perte de fonction de la protéine SOD1 sur les fonctions motrices, mais il est difficile de lier cette perte de fonction à la SLA.

b) Les souris mutantes SOD1 transgéniques

La découverte de mutations dans le gène SOD1 a conduit au développement de nombreuses souris transgéniques exprimant de façon constitutive une forme mutée de la SOD1 humaine (Gurney *et al.*, 1994). A l'inverse des souris déficientes en protéine SOD1, ces souris présentent des symptômes moteurs plus proches de ceux observés dans la SLA. La durée de progression de la maladie et le temps de latence varient en fonction des mutations, du nombre de copie du gène, de la stabilité et de l'activité de la SOD1 mutée. Quinze lignées différentes de souris transgéniques portant des mutations sur le gène SOD1 ont été produites, mais les modèles les plus utilisés en recherche sont les souris transgéniques SOD1^{G93A}, SOD1^{G85R}, SOD1^{G37R} et SOD^{G86R}.

Les souris SOD1^{G93A}

Le modèle de souris transgénique SOD1^{G93A} est le plus couramment utilisé en recherche fondamentale, particulièrement les lignées exprimant de nombreuses copies de SOD1 mutée (SOD1^{G93Ahigh}), développant rapidement les symptômes de la maladie.

Ces souris à nombreuses copies (vingt-cinq), développées par Gurney et collaborateurs, (Gurney *et al.*, 1994) présentent une séquence d'évènements bien reproductible. Au dixième jour postnatal (P10), les souris mutantes présentent un retard dans le réflexe de redressement postural et des erreurs de placement des membres antérieurs (van Zundert *et al.*, 2008). Autour du troisième mois, on peut détecter des tremblements des pattes arrière et une faiblesse musculaire, que l'on assimile au point de déclenchement de la maladie. Ces symptômes coïncident avec des déficits moteurs, une hyperréflexivité, une amyotrophie et une paralysie progressive. Les souris présentent alors des difficultés pour se mouvoir et se nourrir. Elles meurent prématurément entre quatre et cinq mois (Shibata, 2001). D'un point de vue cellulaire, les jonctions neuromusculaires sont dénervées entre quarante et cinquante jours, mais seulement dans les muscles innervés par une sous-population de motoneurons appelés vulnérables (*cf* IV) (Fischer *et al.*, 2004; Pun *et al.*, 2006). La perte d'axones proximaux est

maximale à partir de quatre-vingt jours, coïncidant avec l'apparition des problèmes moteurs, et suivie par une perte de la moitié des neurones moteurs à cent jours (Fischer *et al.*, 2004). L'implication des neurones moteurs du cortex et du tronc cérébral dans ce modèle a longtemps été négligée. Pourtant, on a pu noter une atrophie de la moelle épinière et des noyaux du tronc cérébral à des stades avancés de la maladie (Shibata, 2001). Comme chez les patients, une perte d'environ 30% des neurones des noyaux moteurs du tronc cérébral a été quantifiée aux stades finaux de la maladie chez ces souris (Lever *et al.*, 2009; Ferrucci *et al.*, 2010). De plus, une étude récente a montré qu'une dégénérescence des neurones moteurs de la couche 5 du cortex dès 60 jours aboutissait à une perte d'environ 50% de ces cellules autour de cent jours (Ozdinler *et al.*, 2011).

Une microgliose ainsi qu'une astrocytose se développent respectivement à partir de trente et cinquante jours dans la moelle épinière de ces souris, et augmentent de façon progressive jusqu'à la mort (Fischer *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2009). À partir de soixante jours post-nataux, on observe une rupture partielle de la barrière hémato-encéphalique et une diminution du flux sanguin (Zhong *et al.*, 2008). Des changements morphologiques et moléculaires dans les motoneurones ont également été décrits chez ces souris ; dès le trentième jour, on observe une fragmentation de l'appareil de Golgi, une dilatation du réticulum endoplasmique et des mitochondries, entraînant l'apparition de nombreuses vacuoles dans les motoneurones. Bien avant les premiers symptômes, il a été montré des dysfonctionnements de la fonction mitochondriale (Duffy *et al.*, 2011), du réticulum endoplasmique (Nassif *et al.*, 2010) et du transport axonal (De Vos *et al.*, 2008). Une accumulation de protéines et d'ubiquitine peut être détectée à des stades asymptomatiques et augmente tout au long de la progression de la maladie (Saxena *et al.*, 2009). Au déclenchement de la maladie, les motoneurones sont atrophiés et présentent des inclusions positives aux neurofilaments et des inclusions ubiquitinylées contenant la protéine SOD1 mutée, caractéristiques également retrouvées chez certains patients (Dal Canto & Gurney, 1995; Shibata *et al.*, 1998).

La sévérité de la maladie chez les souris est proportionnelle au nombre de copies de la SOD1^{G93A}. Des lignées exprimant un faible taux de SOD1 mutées ont également été développées. Selon le nombre de copies de ces lignées, le déclenchement de la maladie chez ces souris apparaît entre six et dix mois et la durée de la maladie est assez longue, puisqu'elle s'étend entre deux et quatre mois (Dal Canto & Gurney, 1997; Gurney, 1997). Ce modèle est cependant moins utilisé que le modèle SOD1^{G93A} à nombreuses copies.

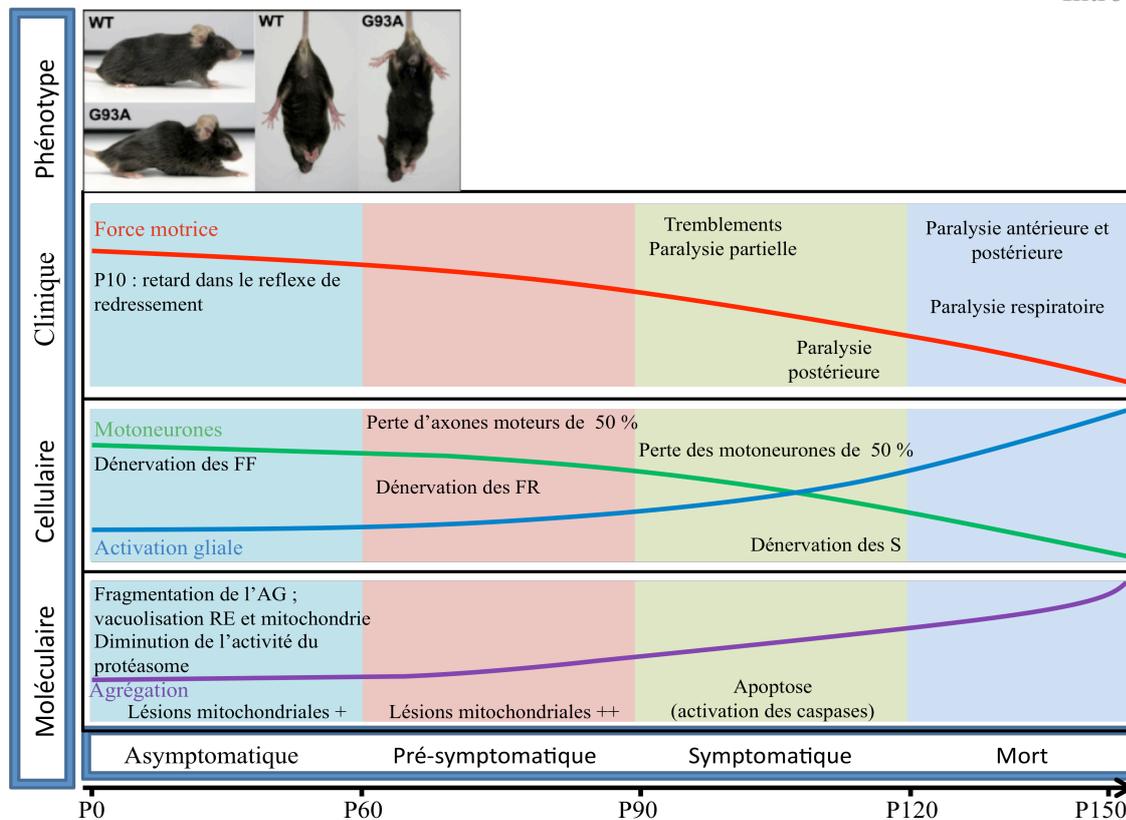


Figure 5 : Séquence d'apparition des évènements cliniques et neuropathologiques chez les souris SOD1^{G93Ahigh}

Évolution au niveau phénotypique, clinique, cellulaire et moléculaire de la maladie chez les souris SOD1^{G93Ahigh}. Les différents stades de la maladie sont définis comme : stade asymptomatique (de 0 à 60 jours postnatal), stade présymptomatique (de 60 à 90 jours postnatal), et stade symptomatique (à partir de 90 jours et jusqu'à la mort de la souris à partir de 120 jours). 90 jours est le point de déclenchement de la maladie. D'un point de vue phénotypique, les souris SOD1^{G93A} présentent au déclenchement de la maladie, une anomalie dans le reflexe des pattes arrière par rapport aux souris contrôles. En effet, celles-ci rétractent leurs pattes arrière vers le tronc lorsqu'elles sont tendues par la queue, alors que chez les souris contrôles, les pattes restent tendues. Leur force motrice diminue au cours du temps (courbe rouge), et cela s'accompagne de tremblement des pattes arrière à 90 jours et d'une paralysie à partir de 100 jours. Elles s'affaissent alors au niveau des pattes arrière (*cf* phénotype) puis au niveau des pattes avant, ce qui les empêche de se déplacer et de se nourrir. D'un point de vue cellulaire, on observe une perte de motoneurones (courbe verte) et une augmentation de l'activation gliale (courbe bleue). La mise en place de la mort des motoneurones commence très tôt (environ 45 jours) par la dénervation d'une sous-population de motoneurones dits « vulnérables », les motoneurones FF, puis par la dénervation massive des motoneurones dits « résistants », les motoneurones FR (vers 80 jours), ce qui mènera à la perte axonale puis motoneuronale à 100 jours. D'un point de vue cellulaire, la caractéristique majeure est l'augmentation de la proportion d'agrégats au cours de la progression de la maladie (courbe violette), concomitante à l'apparition de dysfonctionnements des motoneurones tels que des vacuolisations de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique, le stress du RE, des défauts dans le transport axonal, et dans le système ubiquitine protéasome, aboutissant à l'apoptose.

Illustration adaptée de (Turner & Talbot, 2008).

Les souris SOD1^{G37R}

Il a été montré par des travaux *in vitro* que la mutation SOD1^{G37R} est celle qui conduit à la plus grande augmentation de l'activité dismutase de la SOD1 (Wong *et al.*, 1995). Les souris porteuses de la mutation SOD1^{G37R} présentent des symptômes moteurs similaires à ceux de la SOD1^{G93A} à partir de cinq mois. La progression de la maladie est rapide avec une mort survenant autour des six mois (Wong *et al.*, 1995). La paralysie s'accompagne d'une perte des motoneurons de la corne ventrale des parties cervicale, thoracique et lombaire de la moelle épinière et du tronc cérébral. Comme les souris SOD1^{G93A}, ces souris présentent une pathologie des vacuoles qui se traduit par leurs présences liées à la membrane, probablement dérivées des mitochondries, dans les axones et les dendrites. De plus, une astroglie est retrouvée dans ces modèles animaux, le long de la moelle épinière.

Les souris SOD1^{G85R}

A l'inverse des deux modèles précédents, la mutation SOD1^{G85R} induit une pathologie à des niveaux faibles d'expression de la protéine SOD1 mutée, liés à son instabilité (Fukada *et al.*, 2001; Turner & Talbot, 2008). Ce modèle murin présente une activité dismutase négligeable qui semble attribuable à une faible liaison au cuivre. Les souris SOD1^{G85R} présentent une pathologie du motoneurone à déclenchement tardif, autour de huit à dix mois. Une fois la maladie déclenchée, la progression est rapide ; en deux semaines, 40% des motoneurons dégénèrent ce qui conduit à une paralysie totale (Bruijn *et al.*, 1997). Deux types d'inclusions sont retrouvés bien avant l'apparition des symptômes dans les motoneurons et les cellules gliales de ces souris : des inclusions ubiquitinylées et des inclusions protéiques de SOD1. Par ailleurs, une perte de GLUT1, un transporteur glial du glutamate, fait apparaître l'hypothèse de l'implication d'un processus d'excitotoxicité dans la maladie.

Les souris SOD1^{G86R}

Ces modèles de souris transgéniques surexpriment la forme mutée G86R de la SOD1 et sont l'équivalent murin de la SOD1^{G85R} (Ripps *et al.*, 1995). Ces animaux développent une faiblesse musculaire progressant vers une paralysie et aboutissant à la mort vers cent vingt jours (Ripps *et al.*, 1995). Aux stades terminaux, il est observé une perte de motoneurons et d'interneurons, des accumulations cytoplasmiques de neurofilaments et une astrocytose (Morrison *et al.*, 1996).

Autres modèles murins SOD1 mutants (moins utilisés)

La mutation A4V étant la plus fréquente chez les patients SLAf « SOD1 mutée », des souris surexprimant la mutation SOD1^{A4V} ont été créées. Chez les patients, cette mutation présente un caractère très agressif, ce qui laissait supposer un modèle de la maladie foudroyant. D'une manière inattendue, ces souris ne développent pas de phénotype moteur et seuls quelques symptômes de la SLA sont retrouvés chez des souris très âgées (Siddique & Deng, 1996). En revanche, les souris SOD1^{A4V} croisées avec des souris surexprimant la SOD1 sauvage humaine développent un phénotype SLA (Deng *et al.*, 2006), qui pourrait s'expliquer par une hétérodimérisation de la SOD1 mutée et sauvage qui stabiliserait la forme mutée A4V et conduirait à une toxicité.

Des souris surexprimant des formes tronquées de la SOD1 humaine en C-terminal ont été développées. Ces souris, SOD1^{L126X}, SOD1^{L126delTT} et SOD1^{G127X} présentent une maladie à déclenchement tardif, aux alentours de sept à neuf mois avec une progression rapide et létale vers dix mois (Jonsson *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2006). Ces souris expriment un faible niveau de SOD1 mutées et présentent des inclusions SOD1 insolubles aux détergents dans la moelle épinière et les compartiments somato-dendritiques. La progression de la maladie s'accompagne également d'une perte de motoneurons et d'une astrogliose.

c) Les souris transgéniques pour la SOD1 sauvage : SOD1^{WT}

Les souris transgéniques surexprimant une forme mutée de la SOD1 n'ont été validées comme modèles de SLA qu'après avoir vérifié que ce n'était pas la surexpression elle-même de la SOD1 humaine non mutée qui pouvait entraîner la maladie. A l'origine, les souris surexprimant la SOD1^{WT} ont été développées comme modèles du syndrome de Down, et semblaient phénotypiquement normales (Epstein *et al.*, 1987). Lorsqu'elles ont été étudiées en parallèle des modèles souris exprimant la SOD1 mutée, il a été observé qu'elles présentaient une pathologie vacuolaire, une perte axonale et une dégénérescence des neurones moteurs de la moelle épinière, mais seulement chez des animaux âgés de deux ans ou plus (Dal Canto & Gurney, 1995; Jaarsma *et al.*, 2000; Jonsson *et al.*, 2006). Bien qu'on ne puisse nier que la surexpression de la SOD1 humaine cause des dégénérescences motrices, leur apparition très tardive ne permet pas de les définir comme des SLA.

Modèle	Mutation de la protéine humaine	Fonction générale	Âge de déclenchement (mois)	Durée	Caractéristiques	Activité dismutase /SOD1 endogène	Publication
Souris SOD1	G93A, nombreuses copies (18 à 25)	Superoxyde dismutase 1, catalyse de la dismutation des ions superoxydes, néfastes pour la cellule	3-4	1 - 2 mois	Inclusions SOD+/Ubiquitine (Ub+); vacuolisations ; perte des neurones moteurs supérieurs (S) et inférieurs (I) , activation gliale	11 à 13 fois	(Gurney <i>et al.</i> , 1994)
	G93A, faibles copies (2 à 10)	Superoxyde dismutase 1, catalyse de la dismutation des ions superoxydes, néfastes pour la cellule	G1L (8) : 6-8 G5/G5 (10) : 10 G20 (2) : >10	2 - 3 mois 3 - 4 mois	Peu de pathologie vacuolaire contrairement aux nombreuses copies	7 1,6	(Dal Canto & Gurney, 1995; 1997; Gurney, 1997)
	G37R	Superoxyde dismutase 1, catalyse de la dismutation des ions superoxydes, néfastes pour la cellule	5	1 mois	Agrégation SOD1, vacuolisation mitochondriale, perte des neurones moteurs S et I ; activation gliale	14,5 fois	(Wong <i>et al.</i> , 1995)
	G85R	Superoxyde dismutase 1, catalyse de la dismutation des ions superoxydes, néfastes pour la cellule	8-10	15 jours	Inclusions SOD1 Ub+ dans les motoneurones et les astrocytes ; perte de motoneurones	0	(Bruijn <i>et al.</i> , 1997)
	G86R (forme murine de G85R)	Superoxyde dismutase 1, catalyse de la dismutation des ions superoxydes, néfastes pour la cellule	3-4	1 mois	Accumulation de neurofilaments dans les motoneurones, activation gliale, perte des motoneurones S et I	0	(Ripps <i>et al.</i> , 1995)
	L126X, L126deITT, G127X (forme tronquée en C-terminal)	Superoxyde dismutase 1, catalyse de la dismutation des ions superoxydes, néfastes pour la cellule	7-9	1 mois	Inclusions SOD1 ; perte de motoneurones ; activation gliale	0	(Jonsson <i>et al.</i> , 2004; Wang <i>et al.</i> , 2005; Watanabe <i>et al.</i> , 2005)
	H46R, H46R/H48, H46R/H48Q/H63G/H120G (déplétée en métal)	Superoxyde dismutase 1, catalyse de la dismutation des ions superoxydes, néfastes pour la cellule	H46R : 5 H46R/H48 : 4 - 6 H46R/H48Q/H63G/H120G : 8 - 12	1 mois - -	Inclusions SOD1+ et Ub+ ; perte de motoneurones I, peu de vacuolisation	0 - -	(Wang <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2003; Chang-Hong <i>et al.</i> , 2005)
Rat SOD1	G93A	Superoxyde dismutase 1, catalyse de la dismutation des ions superoxydes, néfastes pour la cellule	4	10 jours	Agrégats SOD1+ et Ub+ ;Perte des motoneurones, vacuolisation ; activation gliale	8 fois	(Nagai <i>et al.</i> , 2001; Howland <i>et al.</i> , 2002)
	H46R	Superoxyde dismutase 1, catalyse de la dismutation des ions superoxydes, néfastes pour la cellule	5	25 jours	Agrégats SOD1 ; perte de motoneurones ; activation gliale	0,2 fois	(Nagai <i>et al.</i> , 2001)

Tableau 4 : Les modèles souris et rat surexprimant la SOD1 mutée

Caractéristiques principales des différents modèles murins surexprimant une forme mutée de la SOD1. Selon le niveau d'expression de la SOD1 mutée, le phénotype clinique sera plus ou moins rapide. Ces animaux montrent en général une perte de neurones moteurs, des inclusions, une activation gliale et une progression assez rapide de la maladie après le déclenchement des symptômes.

L'ensemble des données sur les différentes souris SOD1 indique que des seuils intermédiaires de l'expression de SOD1 sont essentiels dans le maintien à long terme des neurones moteurs et de leurs connexions axonales. La découverte de mutations liées à la SLA dans d'autres gènes a amené à la création de nouveaux modèles murins de SLA, qui permettront de définir des éléments de toxicité communs et importants pour la dégénérescence des motoneurones.

2 - Les souris TDP-43

a) Les souris déficientes en TDP-43

Les souris homozygotes déficientes en TDP-43 ne sont pas viables et meurent au stade embryonnaire à sept jours et demi, ce qui prouve la fonction essentielle de cette protéine au cours du développement (Kraemer *et al.*, 2010; Sephton *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010). Les souris hétérozygotes pour TDP-43 présentent une faiblesse musculaire tardive et subtile, mesurée par le test de la force de prise, mais aucun symptôme d'une pathologie motoneuronale (Kraemer *et al.*, 2010). Par conséquent, elles ne semblent pas constituer un bon modèle d'étude de la SLA.

b) Les souris surexprimant la protéine TDP-43 sauvage ou mutée

Plusieurs groupes ont développé des souris surexprimant la protéine TDP-43, soit sauvage, soit mutée, sous différents promoteurs.

Les souris surexprimant la protéine TDP-43^{WT}

Des souris transgéniques surexprimant la forme sauvage de TDP-43 sous le promoteur neuronal Thy-1 ou prion ont été développées (Stallings *et al.*, 2010; Wils *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010). De manière générale, la surexpression de TDP-43 sauvage peut provoquer une dégénérescence neuronale et une mort dose-dépendantes. En effet, les souris de Wils et Xu, qui expriment la protéine TDP-43 sauvage à forte dose sous le promoteur prion ou Thy-1 meurent entre un et deux mois (Wils *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010), alors que les souris présentant un niveau d'expression plus faible de TDP-43 ne développent pas de symptômes moteurs avant quatre mois (Wils *et al.*, 2010), voire aucun, même à un âge avancé (Stallings *et al.*, 2010).

Les souris surexprimant des formes mutées de TDP-43

Deux souris transgéniques surexprimant la forme mutée humaine TDP-43^{A315T} et TDP-43^{M337V}, sous le contrôle du promoteur prion ont été créées (Wegorzewska *et al.*, 2009;

Stallings *et al.*, 2010). Selon les lignées, ces souris ont un phénotype moteur apparaissant entre deux et quatre mois et ont une survie moyenne de trois à cinq mois (Wegorzewska *et al.*, 2009). Les souris mutantes présentent une faiblesse particulièrement importante au niveau des membres inférieurs, une réduction de la force d'accroche et de la longueur des pas. De nombreux défauts tissulaires ont été observés, comme des fibres musculaires atrophiées et angulaires, correspondant à une dénervation, ainsi qu'une astroglie. Elles présentent, comme chez les patients, des agrégats ubiquitinylés dans la couche IV du cortex frontal, ainsi que dans les motoneurones de la moelle épinière. La forme clivée TDP-43 observée chez des patients SLA est également retrouvée dans le cerveau et la moelle épinière des souris TDP-43^{A315T}. De plus, comme chez les patients (Igaz *et al.*, 2008), TDP-43 est présent dans le cytoplasme des motoneurones, mais seule sa forme phosphorylée colocalise avec les agrégats de protéines ubiquitinylées. Au stade final de la maladie, ces souris présentent une atrophie des axones et des fibres musculaires, ainsi qu'une perte d'environ 20% des motoneurones (Wegorzewska *et al.*, 2009).

3 – Les souris VAPB

En 2010, ont été créés des souris surexprimant la forme sauvage ou mutée (P56S) de VAPB sous le promoteur du gène prion (Tudor *et al.*, 2010). Des inclusions VAPB^{P56S} sont observées chez les souris mutantes dans le cerveau et la moelle épinière. Divers tests de comportement et des facultés motrices n'ont pas permis de détecter de phénotype moteur chez la souris VAPB^{WT} et VAPB^{P56S} jusqu'à l'âge de deux ans. A dix-huit mois, les souris VAPB^{P56S} présentent des inclusions ubiquitinylées cytoplasmiques dans les neurones moteurs du cerveau et dans les motoneurones de la moelle épinière. Par ailleurs, des inclusions cytoplasmiques larges et granulaires de TDP-43 sont retrouvées chez les souris VAPB^{P56S}, et colocalisent avec les inclusions ubiquitinylées. Aucune forme clivée de TDP-43 n'est retrouvée dans le cerveau ou la moelle épinière de ces souris.

4 – La souris Alsine

La mutation du gène Alsine liée à la SLA est de type autosomale récessive. Afin d'établir un modèle murin, quatre équipes ont produit des souris déficientes en alsine (Cai *et al.*, 2005a; Devon *et al.*, 2006; Hadano *et al.*, 2006; Gros-Louis *et al.*, 2008). L'ensemble de ces études montre que la délétion génétique d'alsine ne produit pas de phénotype moteur sévère. Cependant, Cai et collaborateurs ont observé que ces souris présentaient des problèmes de

coordination motrice liés à l'âge, et d'un point de vue tissulaire, Hadano et collaborateurs ont montré une perte progressive des cellules du cervelet, une réduction des axones moteurs ventraux, une astroglie et des déficits dans le trafic endosomal, ces signes pathologiques apparaissant seulement chez les souris âgées. Enfin, un dernier groupe a observé une dégénérescence des axones de la voie corticospinale ainsi que des défauts dans le transport axonal des souris *alsine*^{-/-} (Gros-Louis *et al.*, 2008).

De nombreux modèles de souris transgéniques ont été développés, mais actuellement, les modèles SOD1^{G93A}, SOD1^{G85R} et SOD1^{G37R} sont les plus convaincants et les plus utilisés. Toutefois, notons que le modèle souris reste très éloigné de l'homme, et donc, sa portée reste limitée. Pour mieux comprendre la SLA, il est nécessaire d'utiliser différents modèles, notamment le modèle rat.

B - Autres modèles de SLA *in vivo*

1 - Le modèle rat

Le modèle rat est un meilleur modèle mammifère que la souris, car il permet des approches expérimentales plus larges, comme l'administration aisée de drogues en intrathécal en raison de sa grande taille, la transplantation de cellules souches, un échantillonnage plus grand de fluide cérébrospinal et la microchirurgie. Le rat est également utilisé afin d'étudier l'efficacité thérapeutique et/ou la toxicité de divers composés. Son utilisation comme modèle reste cependant limitée, car les rats transgéniques restent nettement plus difficiles à produire que les souris transgéniques.

a) Les rats SOD1^{G93A}

Deux équipes ont développé des rats surexprimant le SOD1^{G93A}. Ces lignées développent des symptômes moteurs très rapidement. Le déclenchement de la maladie apparaît vers 115-120 jours et se caractérise par une posture anormale des pattes arrière, une faiblesse musculaire (activité spontanée diminuée) et une perte de poids (Nagai *et al.*, 2001; Howland *et al.*, 2002). Le stade final de la maladie est atteint en moyenne huit à onze jours après les premiers symptômes. En général, la paralysie est d'abord asymétrique puis atteint le second membre en deux jours. D'un point de vue histologique, les fibres musculaires sont atrophiées ; les neurones moteurs de la moelle épinière, du tronc cérébral et du cortex présentent des vacuolisations à cent jours et des agrégats positifs pour la SOD1 et l'ubiquitine au

déclenchement de la maladie. La moitié des neurones moteurs sont perdus à cent vingt jours (Nagai *et al.*, 2001; Howland *et al.*, 2002).

b) Les rats SOD1^{H46R}

Ces rats présentent, comme chez les souris, une activité faible de la SOD1 par rapport aux contrôles, liée à une diminution de la liaison au cuivre. Ces rats développent également une pathologie du motoneurone, un peu plus tardive que chez les rats SOD1^{G93A}. Le début de la maladie se situe autour de cent quarante cinq jours et la durée de la maladie est d'environ vingt-cinq jours (Nagai *et al.*, 2001). Les motoneurones présentent une importante proportion d'agrégats. Par ailleurs, il est observé une augmentation d'astrocytes et de microglie activés, ainsi qu'une perte des motoneurones à partir de cent cinquante jours.

c) Les rats TDP-43

Comme chez les souris transgéniques, l'expression constitutive du mutant TDP-43^{M337V} chez les rats induit un phénotype extrêmement rapide (paralysie à vingt jours), ne permettant pas une reproduction des fondateurs de la colonie (Zhou *et al.*, 2010). Pour pallier ce problème, les auteurs ont utilisé un système d'induction à la tétracycline/doxycycline afin de contrôler l'expression temporelle de TDP-43 mutée. Avec ce système, ils peuvent induire l'expression du gène muté *tdp-43* en période postnatale et non plus dès la période embryonnaire. Ces rats mutants développent des symptômes moteurs (définis dans cette étude par la réduction du temps de maintien sur le rotarod) autour de trente-cinq à quarante jours et survivent environ cinquante jours. Les rats surexprimant la forme sauvage de la protéine TDP-43 dans des conditions analogues ne présentent pas de phénotype particulier jusqu'à deux cents jours. D'un point de vue histologique, dès le déclenchement de la maladie, une perte des neurones moteurs, une dégénérescence des axones, une dénervation des fibres musculaires et une activation gliale sont observables. Enfin, comme dans les modèles souris, des inclusions positives à la TDP-43 et à l'ubiquitine et des fragments de TDP-43 sont détectés chez ces animaux à des stades terminaux de la pathologie (Zhou *et al.*, 2010).

d) Les rats Fus^{R521C}

Comme la protéine nucléaire TDP-43, la protéine Fus est également fortement exprimée au cours du développement, ce qui amène les auteurs (Huang *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012) à utiliser le système d'induction tétracycline/doxycycline. Deux lignées surexprimant la forme

mutée R521C de Fus ont été développées et présentent un déclenchement de la maladie entre trente et cinquante jours environ, les rats surexprimant la forme sauvage ne développant pas de phénotype moteur (Huang *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012). Leur probabilité de survie varie en fonction des lignées entre trente-cinq et soixante-cinq jours. Chez ces animaux, il a été observé une perte des jonctions neuromusculaires, mais pas de perte des neurones moteurs. Cependant, les auteurs ont montré une perte des neurones corticaux et hippocampiques, phénotype retrouvé chez des patients atteints de démence fronto-temporale (DFT).

Modèle	Mutation de la protéine humaine	Fonction générale	Âge de déclenchement	Durée	Caractéristiques	Remarque	Publication
Souris TDP-43	A315T	Protéine de liaison à l'ADN/ARN	2-4 mois	1 mois	Inclusions Ub+ dans le cortex et la moelle épinière, activation gliale, TDP-43 cytoplasmique	Promoteur prion	(Wegorzewska <i>et al.</i> , 2009; Stallings <i>et al.</i> , 2010)
	M337V	Protéine de liaison à l'ADN/ARN	2-4 mois	1 mois	Inclusions Ub+ dans le cortex et la moelle épinière, activation gliale, TDP-43 cytoplasmique	Promoteur prion	(Wegorzewska <i>et al.</i> , 2009; Stallings <i>et al.</i> , 2010)
	sauvage	Protéine de liaison à l'ADN/ARN			Possibilité de dégénérescence dose-dépendante	promoteur thy-1 ou prion	(Stallings <i>et al.</i> , 2010; Wils <i>et al.</i> , 2010)
Rat TDP-43	A315T	Protéine de liaison à l'ADN/ARN	1-1,5 mois	15 jours	Perte des motoneurones, activation gliale, TDP-43 cytoplasmique	Système d'induction Tétracycline/ Doxycycline	(Zhou <i>et al.</i> , 2010)
	M337V	Protéine de liaison à l'ADN/ARN	1-1,5 mois	15 jours	Perte des motoneurones, activation gliale, TDP-43 cytoplasmique	Système d'induction Tétracycline/ Doxycycline	(Zhou <i>et al.</i> , 2010)
FUS	R521C	Protéine de liaison à l'ADN/ARN	1-1,5 mois	15 jours	Inclusions Ub+, activation gliale, perte des jonctions neuromusculaires, pas de perte des neurones corticaux et hippocampiques	Système d'induction Tétracycline/ Doxycycline	(Huang <i>et al.</i> , 2011)

Tableau 5 : Les modèles souris et rat TDP-43 et FUS

Caractéristiques des modèles rongeurs, développés ces dernières années, surexprimant des formes sauvages et mutées des protéines TDP-43 et FUS. Ces rongeurs développent des symptômes moteurs assez précocement. Il semblerait que la surexpression de TDP-43 sauvage puisse aussi avoir un effet dose-dépendant.

De plus, des inclusions ubiquitinylées, mais sans colocalisation avec la protéine Fus ont été observées chez les rats portant la mutation du gène Fus, dans le cortex et la moelle épinière.

La protéine Fus est principalement retrouvée dans le noyau et ne diffuse que partiellement dans le cytoplasme chez les rats mutants, contrairement aux patients chez qui cette protéine est retrouvée délocalisée dans le cytoplasme.

2 - Le modèle canin

Chez le chien adulte, une maladie motoneuronale, la myélopathie dégénérative, a été découverte il y a plus de trente-cinq ans. Les premiers symptômes apparaissent vers huit ans et se caractérisent par une ataxie générale proprioceptive, c'est-à-dire des troubles de l'équilibre dans les membres inférieurs. S'ensuivent alors une faiblesse asymétrique et une atrophie musculaire qui progressent en paraplégie, atteignant également les membres antérieurs. La durée de progression de la maladie est rapide, ne dépassant pas plus de trois mois (Averill, 1973; Griffiths & Duncan, 1975b; a; Bichsel *et al.*, 1983; Matthews & de Lahunta, 1985; Coates *et al.*, 2007a; Coates *et al.*, 2007b). Une mutation faux-sens E40K, à transmission autosomale récessive, a été identifiée dans le gène SOD1 de ces chiens (Awano *et al.*, 2009). Des études histopathologiques ont mis en évidence la présence d'inclusions cytoplasmiques positives pour la SOD1 dans la moelle épinière, similaires à celles retrouvées chez les patients SLA ou dans les modèles murins. Ce modèle canin récapitule les symptômes de la SLA. Par ailleurs, de par sa taille, la structure et la complexité du système nerveux et la durée de la maladie, ce modèle est plus proche de la maladie humaine que les autres modèles mammifères. De plus, comme chez l'homme et contrairement aux modèles de rongeurs, ces chiens n'ont pas besoin de forts niveaux d'expression de la SOD1 mutée pour le déclenchement de la maladie. L'utilisation de ce modèle permettrait d'étudier des processus dégénératifs à un stade non final de la maladie, puisque ces chiens sont souvent euthanasiés dès l'apparition des premiers symptômes et pourraient permettre des études thérapeutiques de traitement de la SLA. Notons cependant que l'utilisation de modèles canins en recherche en France est devenue anecdotique, de par le développement des lois relatives à l'expérimentation animale et les questions éthiques.

3 - Les modèles invertébrés : la drosophile et *Caenorhabditis-elegans* (*C. elegans*)

La drosophile et *C. elegans* sont des modèles moins complexes en biologie, dont l'avantage est de permettre de nombreux croisements génétiques de par leur court cycle de reproduction. De plus, ils présentent une facilité de manipulation par leur petite taille, permettant l'étude de

l'organisme entier. Par ailleurs, environ la moitié de leurs gènes possède au moins un homologue chez l'humain.

a) Les modèles drosophiles d'étude de la SLA

L'expression de la SOD1 humaine sauvage ou mutée A4V ou G85R chez la drosophile induit des déficits moteurs progressifs, notamment une difficulté à grimper sur une surface verticale. D'un point de vue tissulaire, on retrouve chez ces animaux une accumulation de la protéine SOD1 dans les motoneurons, une activation de la microglie, mais une absence de mort neuronale (Watson *et al.*, 2008). La surexpression de la forme sauvage ou mutée A315T de TDP-43 chez la drosophile conduit à une toxicité dans les motoneurons dépendante de leur niveau d'expression (Estes *et al.*, 2011). L'expression de la protéine Fus mutée chez la drosophile entraîne une accumulation de protéines ubiquitinylées, une dégénérescence des neurones et une mort précoce. Fus mutée est localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme alors que la forme sauvage est uniquement retrouvée dans le noyau (Lanson *et al.*, 2011). D'autres travaux ont mis en évidence que la surexpression de VAPB^{P56S} forme des agrégats qui piègent VAPB sauvage. La toxicité liée à VAPB mutant pourrait s'exercer par un processus dominant négatif (Ratnaparkhi *et al.*, 2008). La mutation P56S, comme chez les rongeurs, perturbe le processus de sécrétion et favorise le développement d'inclusions ubiquitinylées dans le réticulum endoplasmique et une réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) (Tsuda *et al.*, 2008).

b) Le modèle *C. elegans*

Les vers surexprimant la SOD1 mutée G85R présentent des défauts de locomotion, associés à la présence d'agrégats de la protéine SOD1^{G85R}. Une diminution des jonctions neuromusculaires ainsi que du nombre de vésicules synaptiques est observée chez ces mutants (Wang *et al.*, 2009a).

C - Modèles *in vitro* d'étude de la SLA

Les modèles *in vivo* sont essentiels pour déterminer l'implication d'un candidat dans une pathologie. Cependant, les études *in vitro* sont quant à elles indispensables à l'étude des mécanismes cellulaires, et permettent de quantifier et d'analyser morphologiquement des cellules ou encore de tester les effets de l'application d'une drogue.

1 - Culture primaire de motoneurones

La première culture de motoneurones effectuée à partir d'embryons de poulet et de rat a été décrite en 1981 par Schnaar et Schaffner (Schnaar & Schaffner, 1981). Ces cultures ont ensuite été adaptées au modèle souris, permettant l'utilisation de souche de souris génétiquement modifiées.

Brièvement, la technique consiste à disséquer la moelle épinière puis à isoler les motoneurones en s'appuyant sur leur caractéristique principale, à savoir que ce sont des cellules de grande taille mais de faible densité. Leur séparation des autres cellules s'effectue donc par une centrifugation modérée sur une solution permettant l'établissement d'un gradient de densité (à base d'Optiprep ou de métrizamide). Les motoneurones se retrouvent groupés à l'interface gradient-milieu alors que la majorité des autres cellules comme les interneurones ou les cellules gliales, se retrouvent dans le culot. La survie des motoneurones en culture peut aller jusqu'à cinq à six semaines, en présence de facteurs trophiques (cocktail de BDNF, CNTF et GDNF) qui sont indispensables à la survie et compensent l'absence de production *in vivo* par les cellules gliales ou les muscles (Henderson *et al.*, 1993; Kaal *et al.*, 1997; Abalkhail *et al.*, 2003). Une fois en culture, les motoneurones maintiennent leur polarité, développent des prolongements à caractéristiques dendritiques ou axonales. Pour faciliter l'identification des motoneurones en culture, nous avons également utilisé des souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente GFP sous le promoteur HB9, un gène homéoboîte permettant la spécification de l'identité motoneuronale au stade embryonnaire (Arber *et al.*, 1999).

2 - Les lignées cellulaires "motoneuronales"

Les lignées cellulaires motoneuronales ont été développées par Cashman et collaborateurs il y a une vingtaine d'année, afin d'obtenir des cellules gardant la capacité de se multiplier tout en possédant de nombreuses caractéristiques motoneuronales (Cashman *et al.*, 1992). Ces cellules sont avantageuses car elles sont plus faciles à cultiver que des motoneurones primaires, et permettent d'obtenir des quantités de matériel plus importantes en vue de certaines études biochimiques ou biologiques.

La lignée la plus utilisée, les NSC-34 (« Neuroblastome X spinal cord »), est le résultat de la fusion de motoneurones de rat purifiés avec un neuroblastome de souris. Les cellules dites différenciées en « neurones », par une diminution de sérum dans le milieu de culture, sont des cellules multipolaires adhérentes avec de longs neurites. Ces cellules possèdent également les

systèmes de capture, de synthèse, de stockage et de libération de l'acétylcholine et elles peuvent établir des synapses cholinergiques avec des myotubes de souris mis en co-culture. D'un point de vue histochimique, ces cellules, comme les motoneurones, expriment le gène homéoboîte HB9, les neurofilaments et la protéine MAP1a (« Microtubule-Associated-Protein1a »), les récepteurs aux facteurs de croissance (Matusica *et al.*, 2008) et le glutamate (Eggett *et al.*, 2000). Bien que ces cellules soient capables de générer des potentiels d'action, leurs caractéristiques électrophysiologiques sont néanmoins différentes des motoneurones, traduisant une différence de maturité. L'immortalité de ces cellules s'accompagne d'une augmentation du facteur de transcription N-myc, qui peut réprimer l'expression de certains gènes de maturation (Cashman *et al.*, 1992) et biaiser les mécanismes de mort cellulaire. Pour prendre en compte ce paramètre lorsque des études sont réalisées avec ces cellules, il est important de confirmer les résultats avec des cultures primaires et/ou dans des modèles *in vivo*.

3 - Les motoneurones issus de cellules souches embryonnaires

Les premières tentatives de production de motoneurones à partir de cellules souches embryonnaires (ESC) ont été publiées par Renoncourt et collaborateurs (Renoncourt *et al.*, 1998), puis développées et affinées par l'équipe de Jessell (Wichterle *et al.*, 2002).

La transformation de ESC en motoneurones requiert deux étapes : l'induction neurale et la spécification en motoneurones (Wichterle *et al.*, 2002). Les cellules souches sont maintenues à l'état prolifératif sous la forme de petites sphères appelées corps embryoïdes. L'expression de gènes neuronaux est activée par l'ajout d'acide rétinoïque et la spécification en motoneurones nécessite l'ajout de la protéine « sonic hedgehog » (Shh), ce qui permet d'obtenir une proportion d'environ 30 à 50% de motoneurones.

Il est également possible de dériver des motoneurones à partir de cellules souches neurales qui sont cultivées en neurosphères en présence de facteurs de croissance tels que le FGF. Elles se différencient en motoneurones (à hauteur d'environ 30%) lorsqu'elles sont privées de facteurs de croissance (Weiss *et al.*, 1996; MacDonald *et al.*, 2003).

Il a été possible de dériver des motoneurones humains à partir de cellules souches embryonnaires humaines (Li *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005). De plus, une équipe a réussi à reprogrammer des fibroblastes de patients SLA en cellules souches pluripotentes, par induction des gènes Klf4 (« Krueppel-like factor 4 »), Sox2 (« Sex determining region Y-box 2 »), Oct4 (« Octamer-binding Transcription factor 4 ») et c-Myc. En culture, ces cellules

s'agrègent en corps embryoides et se différencient en motoneurones après traitement à l'acide rétinoïque et au Shh (Dimos *et al.*, 2008). Ces « motoneurones » de patients permettront d'étudier et de comprendre certains mécanismes de mort communs aux formes familiales et sporadiques.

4 – Les tranches organotypiques

Le modèle des tranches organotypiques est un bon modèle intermédiaire entre les modèles *in vitro* et *in vivo*. En effet, il conserve les avantages de la culture tout en préservant la connectivité entre les différents types cellulaires et la structure *in vivo*. La majorité des modèles de tranches organotypiques de moelle épinière sont réalisés chez des embryons de souris ou chez les souriceaux (entre le deuxième et le dixième jour postnatal) (Rothstein *et al.*, 1993). Les tranches ont une bonne survie de une à trois semaines selon les études *in vitro*. Elles sont majoritairement utilisées pour des études d'électrophysiologie et d'excitotoxicité, comparant des tranches issues de souris sauvages ou SOD1^{G93A} (Rothstein *et al.*, 1993; Avossa *et al.*, 2006; Amendola *et al.*, 2007; Kosuge *et al.*, 2009). Peu d'études ont comparé la survie des motoneurones dans les tranches « sauvages » par rapport aux tranches « SOD1 mutées ». Ces modèles restent plus des modèles d'études développementaux que des modèles d'études de la maladie.

III - Processus physiopathologiques décrits dans les modèles murins de la SLA

Les modèles murins de la SLA ont permis de mettre en évidence de nombreux dysfonctionnements dans différents compartiments cellulaires, que nous allons décrire ci-après. Différents mécanismes ont été postulés pour expliquer la mort des motoneurones dans la SLA comme le stress oxydatif (Rao & Weiss, 2004), l'excitotoxicité au glutamate, des perturbations du transport axonal, des phénomènes d'apoptose, des dysfonctions et difformités mitochondriales (Kaal *et al.*, 2000; Dupuis *et al.*, 2004a; Jaiswal *et al.*, 2009).

A – Excitotoxicité

(Figure 6)

L'excitotoxicité peut être définie comme un processus neuronal pathologique induit par un excès de glutamate stimulant ses récepteurs à la surface cellulaire ayant pour conséquence un influx massif de calcium dans la cellule neuronale. Cette entrée massive de calcium conduit à augmenter la formation d'oxyde nitrique et entraîne la mort neuronale (Wijesekera & Leigh, 2009). L'excès de calcium est souvent le problème central de la mort cellulaire : le calcium stimule de nombreuses enzymes, parmi lesquelles certaines, comme la PLA2 et la calpaïne, dégradent les éléments structuraux de la cellule et d'autres, parmi lesquelles la xanthine oxydase et la cyclooxygénase, produisent des radicaux libres. La forte concentration en calcium et le stress oxydatif sont des stimuli pour l'ouverture d'un « mégapore » mitochondrial et pour le relargage de facteurs d'incitation à l'apoptose (Bar, 2000). Les motoneurones sont plus sensibles que d'autres types neuronaux à des perturbations de l'homéostasie calcique (Langou *et al.*, 2010), car ils sont peu armés contre ce phénomène. En effet, ils reçoivent des stimulations glutamatergiques fortes et expriment de nombreux récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozoll-4 propionate) qui sont hautement perméables au calcium en raison de l'absence de la sous-unité GLUR2 dans ces récepteurs. Les motoneurones possèdent également une faible capacité de tamponnage du calcium (Heath & Shaw, 2002; Kawahara *et al.*, 2003; Van Den Bosch *et al.*, 2006). Cette faible capacité de tamponnage leur confère l'avantage d'une facilité de mobilisation calcique qui leur permet d'effectuer des échanges transitoires de calcium à faible coût énergétique pour ces cellules de taille importante (Lips & Keller, 1999). Cependant, dans un contexte pathologique, ces caractéristiques sont exacerbées et peuvent précipiter la mort des motoneurones et/ou y participer.

La présence de niveaux élevés de calcium cytoplasmique est critique dans la mort des motoneurones. En effet, une étude a montré que les motoneurones dits « vulnérables » dans la maladie, présentent une capacité de tamponnage du calcium cinq à six fois moindre que les motoneurones résistants à la maladie (comme les neurones du noyau oculomoteur par exemple) (Lips & Keller, 1998; Palecek *et al.*, 1999; Vanselow & Keller, 2000).

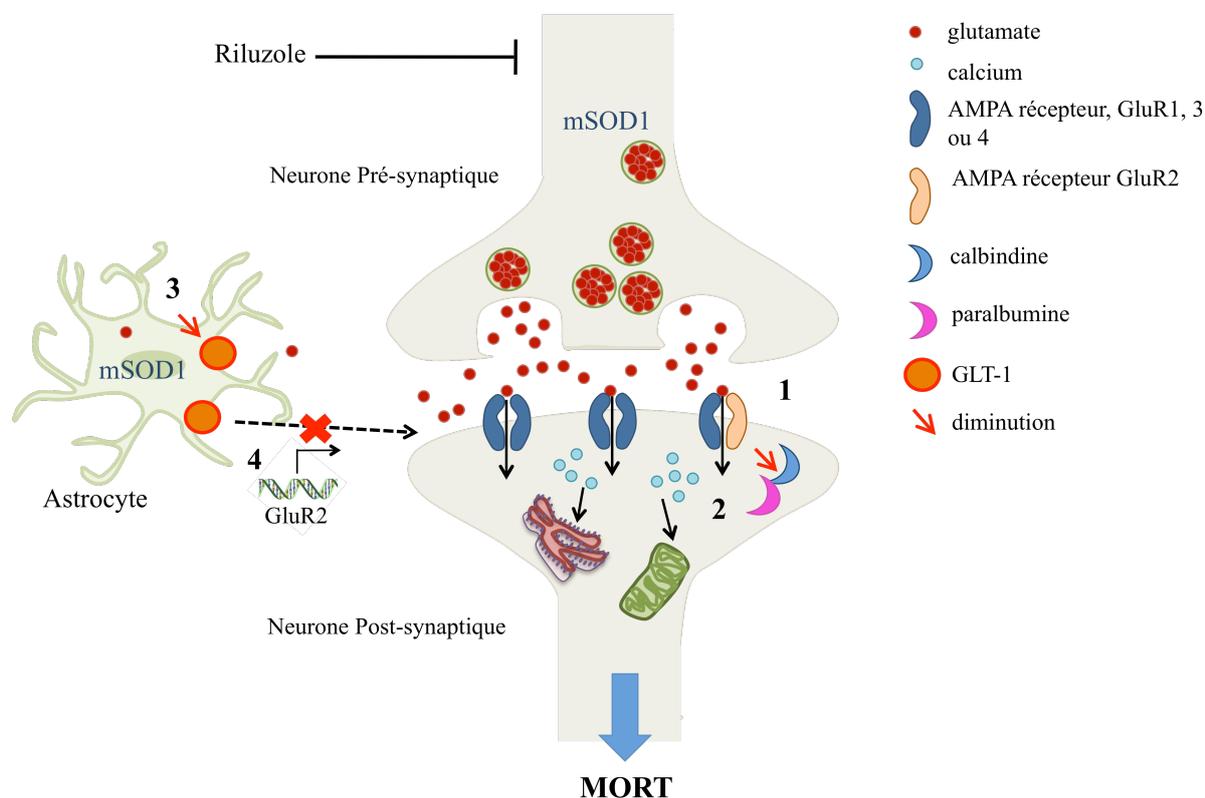


Figure 6 : Rôle de la SOD1 mutée dans le processus d'excitotoxicité des motoneurones

(1) La libération massive de glutamate par le neurone pré-synaptique active les récepteurs AMPA des motoneurones post-synaptiques. Les motoneurones expriment une majorité de récepteurs AMPA perméables au calcium, car ils possèdent peu de sous-unités GluR2. (2) La stimulation de ces récepteurs AMPA va entraîner un flux de calcium entrant. Les motoneurones possèdent peu de protéines tampon de calcium dans le cytoplasme. Le calcium sera alors capturé par la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. Cependant, une entrée massive de calcium dans ces organelles peut perturber leur fonctionnement et favoriser des voies apoptotiques. (3) Par ailleurs, les astrocytes SOD1 mutants, contrairement aux astrocytes « sains », expriment peu le transporteur GLT-1, permettant la recapture du glutamate extracellulaire, afin de diminuer l'activation excessive des récepteurs AMPA. (4) Enfin, les astrocytes SOD1 mutants perdent la capacité à réguler la synthèse de la sous-unité GluR2. L'ensemble de ces dysfonctionnements amplifie le processus d'excitotoxicité des motoneurones SOD1 mutants. *D'après (Grosskreutz et al., 2010).*

De même, l'absence de la sous-unité GLUR2, responsable de la perméabilité au calcium du récepteur AMPA est cruciale dans la mort des motoneurones SOD1^{G93A}. Une déficience dans

cette sous-unité accélère la progression de la maladie alors qu'au contraire, sa surexpression augmente la survie des souris (Tateno *et al.*, 2004; Van Damme *et al.*, 2005). La calbindine-D28K et la parvalbumine sont des protéines tampons du calcium, qui jouent aussi un rôle de protéine de liaison au calcium dans le cytoplasme et sont diminuées dans la moelle épinière des patients SLA et des souris SOD1^{G93A} (Alexianu *et al.*, 1994; Jaiswal *et al.*, 2009). Le rôle de tamponnage du calcium qu'elles assurent est important car la surexpression de la parvalbumine chez les SOD1^{G93A} est bénéfique (Beers *et al.*, 2001). Le tamponnage du calcium intracellulaire dans les motoneurones est également effectué au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique (Jahn *et al.*, 2006). Or, la présence de la SOD1 mutée dans ces deux organelles perturbe à la fois leur morphologie et leur fonctionnement et rend alors déficiente leur capacité à tamponner le calcium (Kawamata & Manfredi, 2010). Une détérioration mitochondriale dans la capacité à charger le calcium chez les souris SOD1^{G93A} peut avoir deux conséquences : (1) entraîner des dysfonctions mitochondriales dans l'excitotoxicité au glutamate, mécanisme potentiel de la toxicité sélective des motoneurones dans la SLA ; (2) altérer l'intégrité et compromettre les fonctions mitochondriales par une augmentation de la production de radicaux libres par la mitochondrie (Manfredi & Xu, 2005).

Une des fonctions des astrocytes est de réguler le glutamate du milieu extracellulaire afin d'éviter son action neurotoxique. Cette régulation se fait grâce à la présence de transporteurs au glutamate GLAST (« GLutamate ASpartate Transporter ») et GLT-1 (« GLutamate Transporter 1 »), dont les homologues humains sont EAAT1 et EAAT2. Or, chez la souris SOD1^{G93A}, comme chez les patients, il est observé une perte sélective de ces transporteurs (Fray *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 2000; Bendotti *et al.*, 2001; Howland *et al.*, 2002). L'ablation partielle de GLT-1 chez les souris SOD1^{G93A} conduit à une perte plus précoce des motoneurones et à une mort accélérée (Pardo *et al.*, 2006), alors que la surexpression de ce transporteur dans les astrocytes chez les souris mutantes retarde la dégénérescence des neurones moteurs et des fonctions motrices mais ne présente aucun effet sur la survie des souris (Guo *et al.*, 2003).

De plus, des études ont montré, en utilisant des systèmes de co-cultures neurones-glie, que les astrocytes exprimant la SOD1 mutée étaient incapables de sécréter certains facteurs (notamment des facteurs neurotrophiques) qui activaient la transcription de la sous-unité GLUR2 dans les motoneurones, amplifiant le processus d'excitotoxicité (Van Damme *et al.*, 2007; Bogaert *et al.*, 2010).

Enfin, le seul composé actuellement utilisé ayant un effet sur la progression de la maladie des patients est le riluzole, antagoniste de la libération glutamatergique. Ceci suggère un rôle important du processus d'excitotoxicité dans la SLA.

B – Agrégations de la protéine SOD1 mutée

(Figure 7)

Plusieurs maladies neurodégénératives ont un point commun : l'agrégation de protéines. Dans certains cas de SLA, comme par exemple chez les souris SOD1^{G85R}, ces agrégats représentent le premier signe physiopathologique de la maladie et l'abondance de ces agrégats est manifestement augmentée pendant la progression de la maladie (Cleveland & Rothstein, 2001). L'agrégation est une des caractéristiques prédominante dans les modèles souris de la SLA, comme c'est le cas chez les patients. En effet, les souris surexprimant les protéines mutées SOD1, TDP-43, FUS ou encore VAPB, présentent des agrégats dans le cytoplasme et dans certaines organelles, comme le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie.

SOD1 mal repliée → Agrégats protéiques → Dysfonctionnement de ...

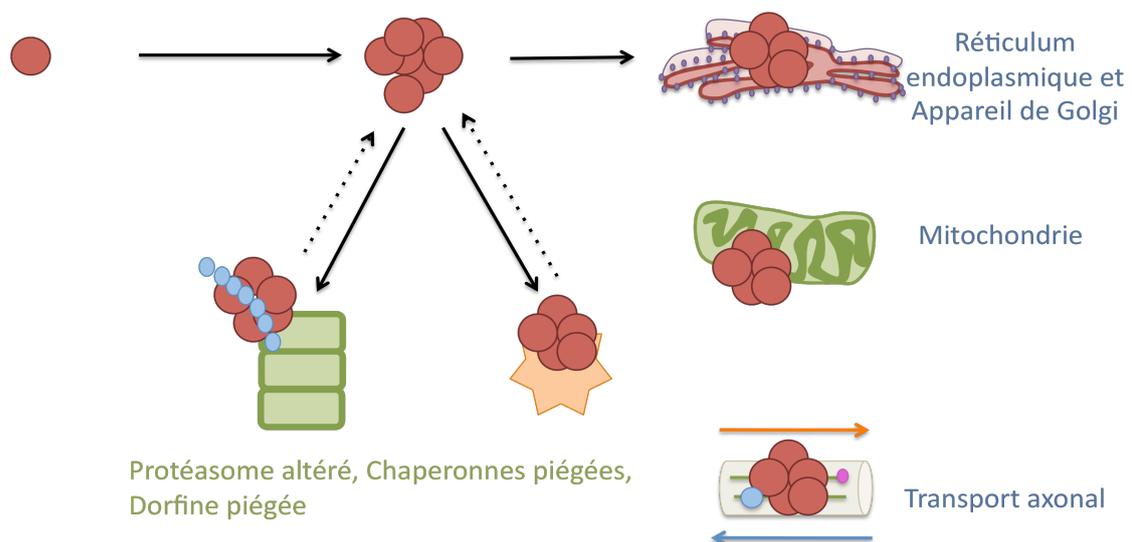


Figure 7 : Toxicité liée à la formation d'agrégats de SOD1 mutée

La protéine SOD1 mutée possède une forte tendance à s'agréger et la formation de ces agrégats peut avoir des conséquences importantes sur le fonctionnement cellulaire. En effet, ils peuvent piéger des composants cytoplasmiques essentiels comme les chaperonnes ou encore bloquer l'activité du protéasome. Ces deux phénomènes auront comme conséquence d'augmenter encore plus le nombre d'agrégats. A terme, ces agrégats peuvent perturber la fonction du RE, de la mitochondrie et du transport axonal, mécanismes essentiels pour la survie du motoneurone. *D'après (Boillée et al., 2006).*

Les structure et fonction finales de la SOD1 nécessitent plusieurs étapes de maturation comme une acétylation de la partie N-terminale, l'insertion des ions cuivre et zinc, la formation des ponts disulfure et une dimérisation (Chattopadhyay & Valentine, 2009). Or, la SOD1 mutée a tendance à ne pas être repliée correctement et peut s'associer avec d'autres monomères de SOD1 ou de d'autres protéines, et former des agrégats (Furukawa *et al.*, 2006; Furukawa, 2012) de poids moléculaires importants, insolubles, qui se concentrent dans les tissus d'une manière dépendante de l'âge (Bruijn *et al.*, 1998; Johnston *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Furukawa *et al.*, 2006). Ces agrégats sont localisés en plus grande proportion dans les motoneurones (Kabashi *et al.*, 2004). Leur accumulation au cours du temps s'effectue en parallèle à la progression de la mort des motoneurones, ce qui suggère que ces agrégats pourraient être toxiques. De plus, la propension de la SOD1 mutée à s'agréger serait corrélée à une survie diminuée des patients (Wang *et al.*, 2004).

L'accumulation de la SOD1 mutée peut perturber le fonctionnement de certaines organelles et piéger des composés essentiels pour la cellule. Par exemple, la SOD1 mutée peut piéger les protéines chaperonnes cytoplasmiques de la famille des HSPs (« Heat Shock Protein »), et diminuer ainsi leur activité (Bruening *et al.*, 1999; Okado-Matsumoto & Fridovich, 2002; Tummala *et al.*, 2005; Weisberg *et al.*, 2012).

A l'inverse, l'augmentation des HSPs *in vitro* diminue le nombre d'agrégats et la mort cellulaire (Bruening *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2005). *In vivo*, bien que la surexpression génétique de HSP70 chez la souris SLA n'ait aucun effet sur la progression de la maladie (Liu *et al.*, 2005), le traitement des souris SOD1^{G93A} avec l'arimoclomol, une drogue induisant des niveaux élevés des protéines chaperonnes HSP70 et HSP90, augmente la survie des souris (Kieran *et al.*, 2004). Plus généralement, l'agrégation de la protéine SOD1 mutée peut avoir des conséquences sur de nombreuses fonctions comme la sécrétion, la respiration mitochondriale, le transport axonal et l'activité du protéasome (Boillée *et al.*, 2006).

C - Radicaux libres antioxydants et stress oxydatif

(Figure 8)

Le stress oxydatif se définit comme l'agression des constituants de la cellule par des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), tels que les radicaux libres, les ions oxygénés, les peroxydes et en particulier l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'oxygène (H_2O_2), l'oxyde nitrique (NO) ou encore le peroxynitrite (ONOO⁻). La fonction de la protéine SOD1 étant d'assurer la catalyse des ions superoxydes, les mutations dans le gène de la SOD1 pourraient conduire soit

à une diminution de l'activité de capture des radicaux libres, soit à une production aberrante de radicaux. Cependant, comme la déficience en SOD1 n'induit pas la maladie et que des souris exprimant des protéines SOD1 mutées développent la maladie alors même que l'activité dismutase est préservée, la première hypothèse est peu probable. En revanche, une augmentation de protéines oxydées a été observée chez les souris SOD1^{G93A}, ce qui est en faveur de la seconde hypothèse (Andrus *et al.*, 1998). En effet, des dommages oxydatifs liés au peroxynitrite ont été rapportés chez les souris SOD1^{G93A} et chez les patients SLA (Beal, 1997; Bruijn *et al.*, 1997; Barber & Shaw, 2010).

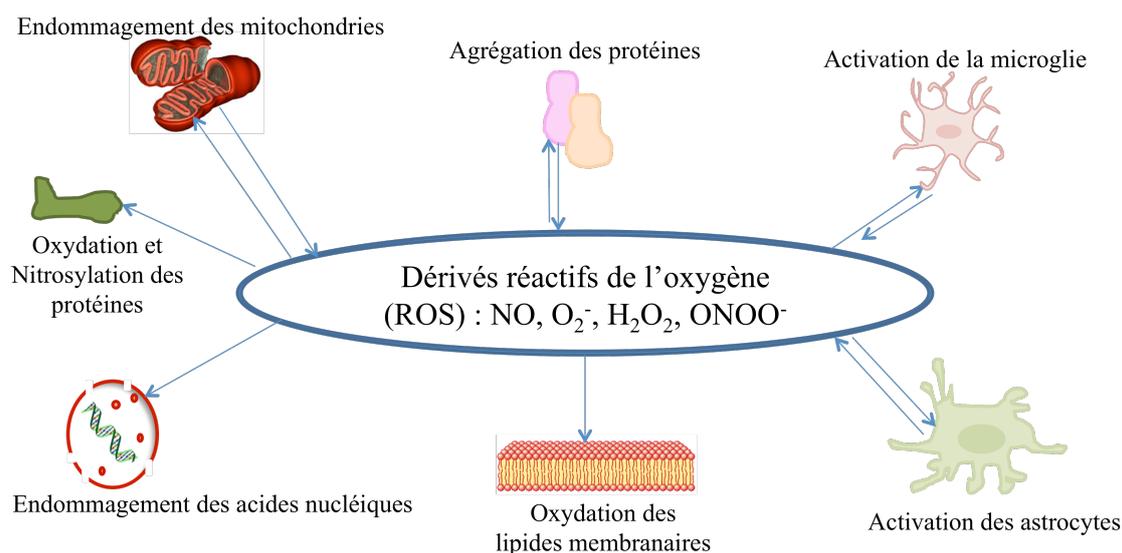


Figure 8 : Causes et conséquences du stress oxydatif dans la SLA

Le stress oxydatif se définit comme l'agression des constituants cellulaires par des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) tels que les radicaux libres, les ions oxygénés, les peroxydes, notamment l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) et le peroxynitrite ($ONOO^-$). Les ROS peuvent être responsables du dysfonctionnement de compartiments de la cellule tels que le RE et la mitochondrie, cette dernière pouvant en retour produire des ROS. Ces réactifs oxygénés peuvent causer l'oxydation de lipides de la membrane, perturbant la structure de la surface membranaire et de protéines, ce qui peut entraîner la formation d'agrégats, et des dommages aux acides nucléiques. Les cellules gliales comme les astrocytes et la microglie qui expriment SOD1 mutée, sécrètent également des ROS (Liu *et al.*, 1999; Barber & Shaw, 2010).

Les ROS associés à la production de peroxynitrite conduisent à de nombreux dégâts cellulaires comme la nitration de protéines qui change leur conformation ce qui peut aboutir à leur dégradation ; l'oxydation des lipides qui altère la dynamique de la membrane plasmique et enfin des dommages de l'ADN et de l'ARN (Barber & Shaw, 2010). Récemment, une étude a montré que l'ablation génétique de l'enzyme synthétisant l'oxyde nitrique (iNOS) améliore la survie des souris SOD1^{G93A} (Martin *et al.*, 2007). La production de ROS peut

provenir, chez les motoneurones, de mitochondries endommagées et de cellules gliales environnantes.

Par exemple, la SOD1 mutée dans la microglie conduit à la production d'anions superoxydes ; en effet, la protéine SOD1 mutée se lie avec une plus grande affinité que la SOD1 sauvage à une petite GTPase rac1, stimulant l'activation de la NADPH oxydase (« Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate ») et notamment de sa sous-unité catalytique Nox2, induisant la production d'anions superoxydes (Figure 9) (Harraz *et al.*, 2008; Ilieva *et al.*, 2009). De plus, la délétion génétique de la sous-unité Nox2 ou l'injection d'un inhibiteur de l'activation des Nos, l'apocynine, retarde le déclenchement de la maladie. Par ailleurs, l'apocynine à forte dose double la survie des souris (240 jours au lieu de 125 jours) (Marden *et al.*, 2007; Harraz *et al.*, 2008).

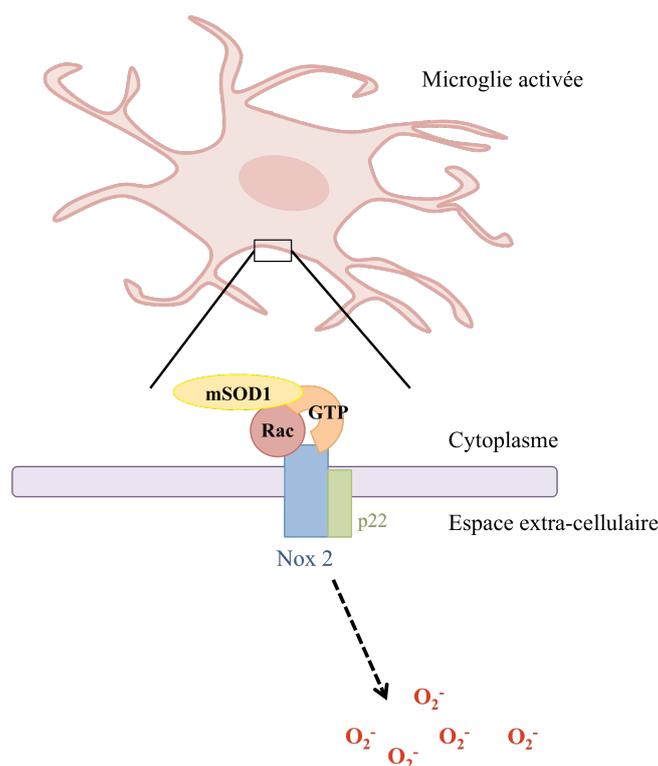


Figure 9 : Production d'anions superoxydes par la microglie en présence de SOD1 mutée

En conditions réductrices, la protéine SOD1 mutée s'associe à la petite protéine GTPase Rac1, avec une affinité supérieure à celle de la SOD1 sauvage. Cette protéine Rac1 va activer de manière constitutive le complexe de la NADPH oxydase et notamment la sous-unité catalytique Nox2. Cette protéine activée va produire des ions superoxydes, espèces réactives de l'oxygène (Harraz *et al.*, 2008; Ilieva *et al.*, 2009).

Enfin, la SOD1 mutée peut également être oxydée, phénomène pouvant participer à son agrégation (Karch *et al.*, 2009). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'oxydation de la

SOD1 sauvage lui procure de nouvelles propriétés identiques à la SOD1 mutée, notamment celle de l'agrégation (Ezzi *et al.*, 2007; Bosco *et al.*, 2010).

D – Hypermétabolisme

Les patients SLA présentent un état hypermétabolique. Cet hypermétabolisme, principalement d'origine musculaire, peut représenter en lui-même une force supplémentaire impliquée dans la vulnérabilité des neurones moteurs. La question est de savoir : comment les changements de l'homéostasie énergétique peuvent contribuer au processus maladif ?

Par ailleurs, le déficit énergétique observé chez les souris transgéniques n'est pas lié à une moindre prise alimentaire, mais est associée à une augmentation du ratio métabolique. Les souris SOD1^{G93A} et SOD1^{G86R} sont plus maigres que les souris sauvages. Il n'y a pas de réduction de la prise alimentaire, mais un épuisement des réserves lipidiques et des altérations dans les statuts endocriniens, indiquant une augmentation de la dépense énergétique. En effet, il y a une augmentation de la lipolyse chez les souris SOD1 ; il y a donc moins de stockage lipidique. Chez les souris SOD1^{G86R} et SOD1^{G93A}, la consommation d'oxygène et la dépense énergétique sont plus élevées que chez les souris sauvages. La diminution de poids chez les souris mutantes n'est donc pas liée à une augmentation d'activités motrices (Dupuis *et al.*, 2004a). De plus, chez les patients SLA, l'oxydation des lipides et des protéines est augmentée dans les motoneurones et les cellules gliales de la moelle épinière, ce qui suggère que la formation de ces composés est impliquée dans la dégénérescence des motoneurones (Bacman *et al.*, 2006). Enfin, nous pouvons noter qu'un régime riche en lipides (High Fat Diet ou HFD) augmente l'espérance de vie de 20% chez les souris SOD1, ce qui peut être une piste pour une meilleure prise en charge des patients (Dupuis *et al.*, 2004a).

E – Implication des cellules environnantes dans la SLA

1 – Mise en évidence de l'implication des cellules non-motoneuronales

Il a d'abord été pensé que la toxicité liée à la protéine SOD1 mutée dans les motoneurones impliquait un processus cellule-autonome, générant un certain nombre de dégâts, devenant létaux au-delà d'un certain seuil. Cependant, des études récentes ont montré que ce processus pathologique possédait également une composante cellule non-autonome, impliquant les cellules gliales et microgliales en contact proche avec les motoneurones (Lobsiger & Cleveland, 2007). Ce concept de cellule non-autonome est apparu lorsqu'il a été montré que

la surexpression de la SOD1 mutée (G37R, G85R et G93A) seulement dans les motoneurones n'induisait pas de pathologie motrice (Pramatarova *et al.*, 2001; Lino *et al.*, 2002; Seifert *et al.*, 2006) ou alors une pathologie se déclenchant très tardivement et progressant lentement chez les souris homozygotes (Jaarsma *et al.*, 2008). En outre, la surexpression de la SOD1 mutée seulement dans les astrocytes (Gong *et al.*, 2000) ou dans la microglie (Beers *et al.*, 2006) n'est pas suffisante pour induire des phénomènes moteurs. Ces résultats montrent donc que la dégénérescence motoneuronale est le résultat d'une coopération entre plusieurs types cellulaires.

Afin de déterminer si l'environnement cellulaire des motoneurones SOD1 mutants influence des étapes précises de la maladie, des souris chimères ont été créées, contenant des cellules exprimant la SOD1 mutée entourées par une proportion variable de cellules sauvages. De manière intéressante, plus la proportion de cellules sauvages est grande, plus la survie des motoneurones SOD1 mutants est augmentée (Clement *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2008a) ; la survie des souris est améliorée.

Dans le but de déterminer quels sont les types cellulaires participant aux différentes étapes de la maladie, des excisions cellule-spécifique de la SOD1 mutée par le système Cre/Lox ont été effectuées. L'excision de la SOD1 mutée G37R spécifiquement dans les motoneurones a été réalisée en utilisant la Cre recombinase sous le promoteur Islet ou Vacht (« Vesicular ACetylcholin Transporter »), tous les deux marqueurs de populations motoneuronales (Boillée *et al.*, 2006; Yamanaka *et al.*, 2008a), et celle de la SOD1 mutée G85R en combinant une excision dans les motoneurones et les interneurones (Lhx3-cre, protéine à homéodomaine caractérisant le devenir neuronal) (Wang *et al.*, 2009a). Trois étapes de la maladie ont été analysés : le déclenchement de la maladie, se définissant comme le pic de poids de la souris avant son déclin ; la phase précoce de la progression de la maladie, définit comme la période entre le pic de poids de l'animal et la perte de 10% de son poids maximal et enfin, la phase tardive de la progression de la maladie, qui se définit comme la période allant de la perte de poids de 10% du poids maximal de la souris jusqu'à la mort de l'animal (Boillee *et al.*, 2006). L'excision de la SOD1 mutée G37R ou G85R dans les motoneurones retarde efficacement le déclenchement de la maladie (Yamanaka *et al.*, 2008a), ainsi que la phase précoce de la progression de la maladie (Boillée *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009b) mais n'a pas d'effet sur sa phase de progression tardive (Yamanaka *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2009b). Ces observations soulèvent la question de la contribution des cellules environnantes dans les différentes périodes de progression de la maladie.

2 – Implication des cellules gliales

Les cellules gliales entourent les neurones et assurent de nombreuses fonctions auxiliaires : elles apportent un support physique, nourricier (astrocytes) ou immunitaire (microglie) et permettent la production de myéline (oligodendrocytes et cellules de Schwann).

a) Activation astrocytaire et microgliale dans la SLA

Les astrocytes

Les astrocytes constituent la majorité de la macroglie du système nerveux central. Leur rôle dans la SLA a été présumé en raison de leurs fonctions clefs dans la survie des motoneurones. Elles sont notamment sources de glucose, de métabolites et de facteurs neurotrophiques pour les motoneurones. De plus, les astrocytes ont une fonction de recapture du glutamate extracellulaire, potentiellement toxique.

Chez les souris SOD1^{G93A}, la majorité des astrocytes sont dits « activés », c'est-à-dire qu'ils expriment la protéine GFAP (« Glial Fibrillary Acidic Protein ») et forment de grands prolongements épais. Certains présentent une morphologie sphéroïde et sont positifs pour l'ubiquitine et la caspase 3 (Barbeito *et al.*, 2010). Des études *in vitro* ont montré que des motoneurones sauvages meurent lorsqu'ils sont cultivés sur un tapis astrocytaire exprimant la SOD1 mutée, provenant de souris ou de patients SLA (Vargas *et al.*, 2006; Di Giorgio *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2007; Haidet-Phillips *et al.*, 2011). Cette toxicité impliquerait la sécrétion de facteurs toxiques pour les motoneurones par les astrocytes SOD1 mutants, et notamment des facteurs oxydants tels que l'oxyde nitrique (Vargas & Johnson, 2010). Par ailleurs, remarquons que la stimulation du facteur Nrf2 (« NF-E2-related factor 2 »), permettant la production de facteurs antioxydants par les astrocytes, est bénéfique pour les motoneurones et prolonge la survie des souris SOD1^{G93A} (Vargas *et al.*, 2008). Enfin, la participation des astrocytes SOD1 mutants à la mort des motoneurones proviendrait également de leur difficulté à recapter le glutamate, favorisant ainsi l'excitotoxicité.

Les cellules microgliales

Les cellules microgliales forment la principale défense immunitaire du système nerveux central. En fonction du stimulus reçu, la microglie est activée mais peut avoir une réponse pro-survie ou cytotoxique (Henkel *et al.*, 2009). Lorsque la microglie surexprime la SOD1 mutée, ou lorsqu'elle est mise en présence de SOD1 mutée extracellulaire, elle sécrète un ensemble de facteurs toxiques et notamment des produits oxygénés, comme les ions

superoxydes (O_2^-) et l'oxyde nitrique (NO), et des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine1 β et le TNF α (Tumor Necrosis Factor) (Beers *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2007). La microglie activée par la SOD1 mutée est toxique pour les motoneurones en co-culture (Urushitani *et al.*, 2006).

b) Implication des cellules gliales sur le déroulement de la maladie

L'excision de la SOD1^{G37R} spécifiquement dans les astrocytes à l'aide de la Cre recombinase exprimée sous le promoteur astrocytaire GFAP ralentit la progression de la maladie, surtout la phase tardive, mais ne modifie pas son déclenchement. La survie des souris est alors prolongée de soixante jours (Yamanaka *et al.*, 2008b). En revanche, des études récentes ont montré que l'excision de la SOD1^{G85R} dans les astrocytes, réalisée par la même méthode, pouvait retarder le déclenchement de la maladie et la phase précoce de la progression, mais non la phase tardive (Wang *et al.*, 2011a). La différence entre ces résultats peut être due aux propriétés propres des protéines SOD1 mutées, la SOD1^{G37R}, contrairement à la SOD1^{G85R}, étant stable et active dans sa fonction dismutase.

Enfin, la diminution des niveaux de la SOD1 mutée dans les cellules de lignage myéloïde (microglies et macrophages) au moyen de la Cre recombinase exprimée sous le promoteur CD11b, contrôlant la spécification en lignage myéloïde, ralentit la progression de la maladie d'environ soixante-quinze jours (Boillee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009b). Une expérience complémentaire a été réalisée en utilisant des souris SOD1 mutantes préalablement croisées avec des souris PU.1 déficientes, incapables de produire des macrophages et de la microglie. La greffe d'une lignée myéloïde exprimant la SOD1 mutée dans ces souris aboutit à une accélération de la maladie, prouvant ainsi la contribution de la microglie dans la SLA (Beers *et al.*, 2006).

Les cellules de Schwann

Les cellules de Schwann sont spécifiques au système nerveux périphérique. Elles sont en contact rapproché avec les motoneurones et sont à l'origine de la production de la gaine de myéline, essentielle pour la transmission rapide des informations électriques. Contrairement à ce qui aurait pu être envisagé, l'excision de la SOD1 mutée G37R dans les cellules de Schwann n'a pas d'effet bénéfique sur la maladie, mais à l'inverse, accélère la SLA (Lobsiger *et al.*, 2009). L'hypothèse proposée par les auteurs est que les cellules de Schwann seraient dépendantes de l'activité dismutase de la SOD1^{G37R}, et qu'en son absence, elles seraient

incapables d'assurer leur rôle (Lobsiger *et al.*, 2009). A ce jour, il n'y a donc aucune preuve que les cellules de Schwann exprimant la SOD1 mutée soient délétères pour les motoneurones.

3 – Implication des muscles

La déconnexion des axones des motoneurones au niveau des jonctions neuromusculaires dans le muscle est un évènement précoce chez les souris modèles de la SLA. Une des hypothèses proposée pour expliquer ce phénomène est que la présence de la SOD1 mutée dans les muscles provoquerait une atrophie musculaire, endommageant alors les jonctions neuromusculaires, ce qui provoquerait une rétraction des axones (Fischer *et al.*, 2004; Pun *et al.*, 2006). Si cette hypothèse est exacte, une diminution de la SOD1 mutée dans le muscle devrait avoir un effet bénéfique. Or, une diminution de la SOD1^{G37R} dans le muscle, par interférence-ARN ou par excision de gène, n'a aucun effet bénéfique sur les souris (Miller *et al.*, 2006; Towne *et al.*, 2008). Par contre, la surexpression de la SOD1 mutée G93A ou G37R, uniquement dans les muscles, semble avoir des effets dommageables sur ces souris, ces dernières présentant une faiblesse musculaire à un âge tardif (autour de douze mois), des dommages dans les muscles, avec notamment la perte de fibres musculaires, ainsi qu'une dégénérescence motoneuronale (Dobrowolny *et al.*, 2008; Wong & Martin, 2010). Afin d'empêcher l'atrophie musculaire et de développer une thérapie, des stimulations de la myogenèse par inhibition de la myostatine ont été réalisées mais n'ont abouti à aucune amélioration de la maladie (Holzbaur *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006). Bien que les muscles seuls ne semblent pas jouer un rôle décisif dans la progression de la maladie, on ne peut toutefois nier qu'ils participent, en association avec les autres types cellulaires, à la dénervation et à la dégénérescence des motoneurones (Dobrowolny *et al.*, 2008; Wong & Martin, 2010).

L'ensemble de ces travaux montre l'importance de stratégies thérapeutiques ciblées, afin de pouvoir induire la diminution de la SOD1 mutée seulement dans les types cellulaires impliqués dans le processus de toxicité.

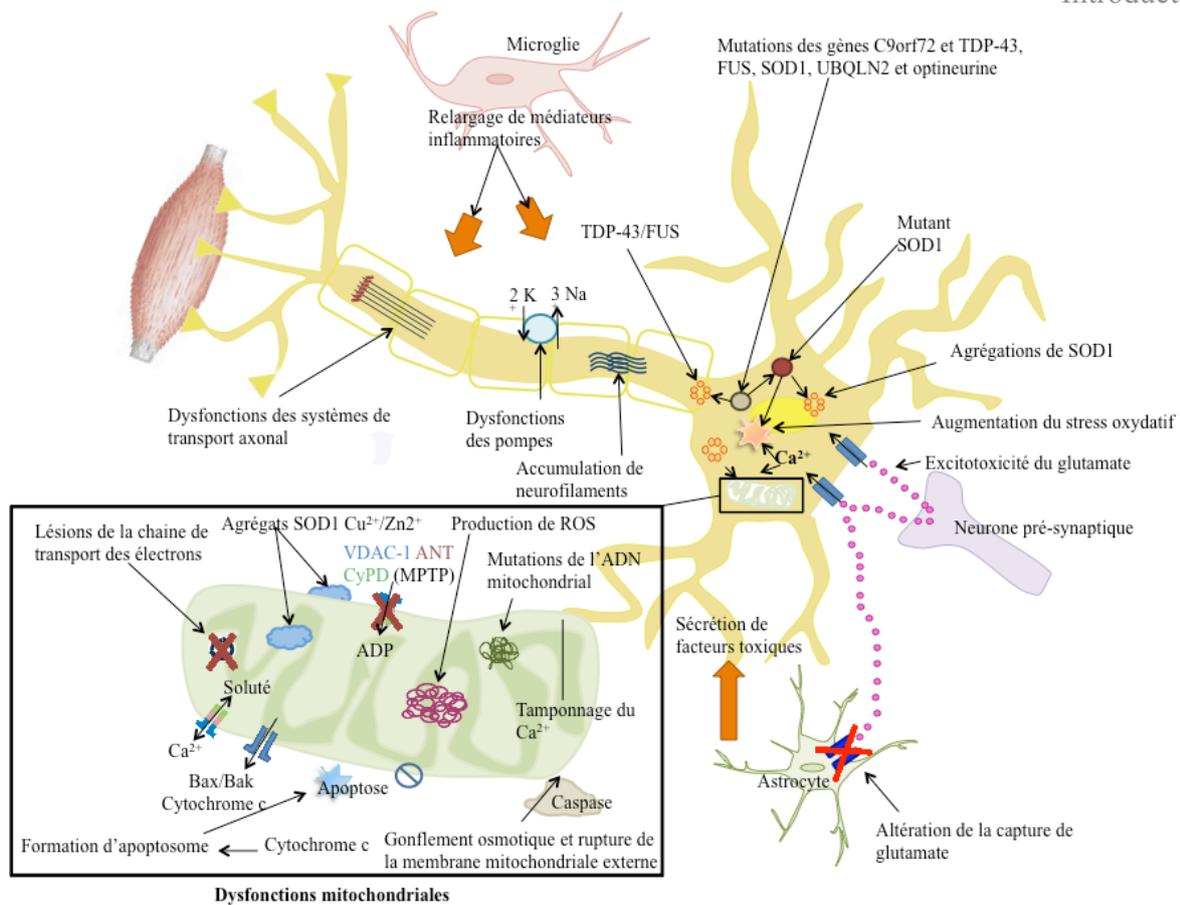


Figure 10 : Vue d'ensemble des mécanismes de toxicité liée à la SOD1 mutée dans la SLA

Beaucoup de ces voies sont des mécanismes de la mort cellulaire commun à toute une gamme de troubles neurologiques, bien que dans le cas de la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la connaissance de ces mécanismes soit issue d'études menées principalement en utilisant le modèle de la souris SOD1. Les mécanismes physiopathologiques impliquant des découvertes génétiques plus récentes, notamment l'expansion de répétition hexanucléotide C9ORF72, n'ont pas encore été élucidés. La neurodégénérescence dans la SLA pourrait refléter une combinaison d'excitotoxicité au glutamate, la production de radicaux libres (ROS), ainsi que des dysfonctionnements mitochondriaux et la perturbation des processus de transport axonal par l'accumulation d'agrégats intracellulaires de neurofilaments. Des mutations dans plusieurs gènes liés à la SLA sont associées à la formation d'agrégats intracellulaires, qui apparaissent nocifs pour les neurones. L'activation de la microglie a comme conséquence la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires augmentant la toxicité. Les dysfonctionnements mitochondriaux induisent une susceptibilité accrue à l'excitotoxicité au glutamate, combinée avec des perturbations dans la production d'énergie des neurones moteurs, et l'apoptose. Les perturbations mitochondriales sont associées à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les agrégats cytoplasmiques de SOD1 pourraient inhiber directement la conductance de VDAC1, réduisant de ce fait la fourniture d'ADP aux mitochondries pour la production d'ATP. D'après (Turner et al., 2013).

IV - Mécanismes de mort cellulaire des motoneurones SOD1 mutants

Afin de comprendre le processus de la mort des motoneurones SOD1 mutants, il est nécessaire d'établir la chronologie d'intervention des différents éléments dans cet événement. Le processus de mort du motoneurone débiterait au niveau de la jonction neuromusculaire, ce qui provoque une dégénérescence axonale et une mort du corps cellulaire par un phénomène de « dying-back ». Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Fischer et collaborateurs (Fischer *et al.*, 2004), dans lesquelles ils ont quantifié à différents âges le nombre de motoneurones, d'axones dans les racines ventrales et le degré de dénervation, ce qui leur a permis d'établir que le processus de dégénérescence débutait par la dénervation musculaire, suivie par la perte d'axones moteurs, puis de motoneurones.

A – Une dénervation séquentielle des muscles dans la SLA

Le corps humain possède plus de trois cents paires de muscles bilatéraux qui contiennent plus de cent millions de fibres musculaires, ces dernières étant innervées par plus de cent vingt milles motoneurones dans la moelle épinière. Un motoneurone doit donc innerver au moyen de jonctions neuromusculaires, plusieurs fibres musculaires. L'ensemble formé par le motoneurone et les fibres qu'il innerve est appelé unité motrice. La jonction neuromusculaire comprend trois protagonistes qui contribuent à son maintien : le motoneurone, la cellule musculaire et la cellule de Schwann.

Cependant, les motoneurones ne sont pas tous égaux et peuvent différer pour les caractéristiques suivantes : le diamètre somatique, le calibre axonal, la capacité de décharge et les muscles qu'ils innervent. Ces différences permettent de les classer en catégories. Or, des études ont montré que les différentes classes de motoneurones ne présentent pas la même sensibilité au processus de dénervation au cours de la SLA.

1 – Diversité des fibres musculaires et des motoneurones

Les fibres musculaires peuvent être classées en différents types :

- Fibres de type I à contraction lente (fibres rouges) : elles sont de petit diamètre et très vascularisées. Elles contiennent de nombreuses mitochondries et peu de glycogène. Elles sont peu fatigables et sont utilisées pour les exercices peu puissants mais prolongés comme le maintien de la posture.

- Fibres intermédiaires ou fibres mixtes : elles contiennent un pourcentage variable de fibres de type I et de fibres de type II en fonction des muscles de l'organisme et de l'âge de l'individu.

- Fibres de type II à contraction rapide (fibres blanches) : elles sont de grand diamètre et peu vascularisées. Elles contiennent peu de mitochondries mais sont riches en glycogène. Elles sont très fatigables et sont utilisées pour les exercices brefs mais intenses et puissants.

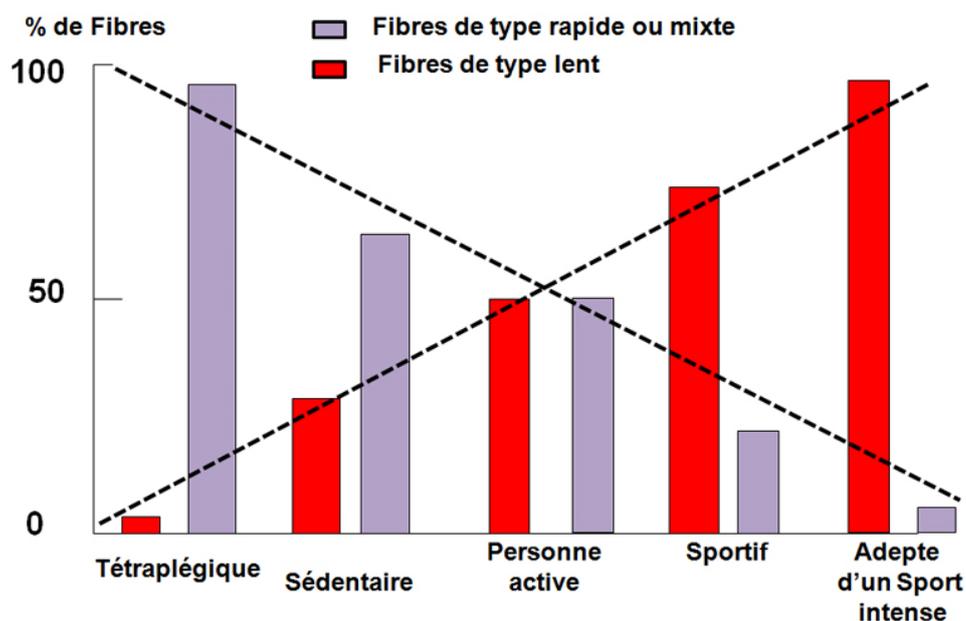


Figure 11 : Diagramme de la distribution des types rapide ou lent de fibres musculaires en fonction de l'activité physique de l'individu.

La proportion des différents types de fibres varie en fonction de l'activité physique des individus (Figure 11).

Chez l'adulte, les motoneurones peuvent être séparés en plusieurs classes fonctionnelles et sous-types. Une division en motoneurones alpha, bêta et gamma est faite selon le type de fibres musculaires que chaque classe innerve. Les motoneurones alpha sont les plus abondants et les plus gros en taille. Ils innervent les muscles squelettiques extra-fuseaux et sont responsables de la contraction des muscles dynamiques. Les motoneurones gamma ou motoneurones fusiformes sont de petite taille. Ils innervent les fibres musculaires intra-fusales du faisceau neuromusculaire et jouent un rôle important dans la proprioception statique et le contrôle moteur. Les motoneurones bêta sont moins bien définis et innervent des fibres intra et extra-fusales (Kanning *et al.*, 2010). Seuls les motoneurones de type alpha semblent être impliqués dans la SLA.

Les motoneurones alpha sont divisés en trois sous-types fonctionnels, en fonction des propriétés contractiles que les unités motrices forment avec les fibres musculaires cibles : les unités motrices rapides et fatigables (« fast fatigable », FF), c'est-à-dire peu résistantes à un effort soutenu ; les unités motrices rapides, résistantes à un effort soutenu (« fast fatigue-resistant », FR) et les unités motrices lentes (« slow », S).

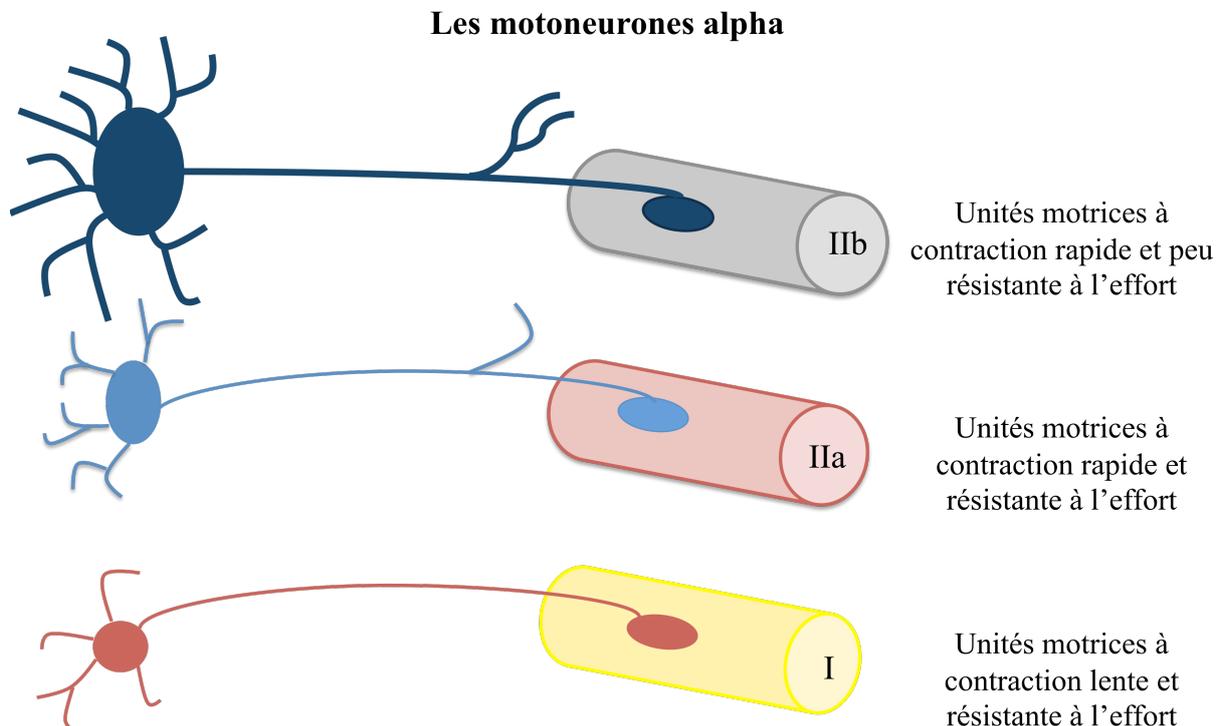


Figure 12 : Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des motoneurones alpha

Les motoneurones alpha se distinguent en sous-types selon la taille de leur soma, le diamètre de leur axone et le nombre de branchements. On distingue trois sous-types de motoneurones alpha en fonction du type d'unités motrices, c'est-à-dire l'ensemble composé par le motoneurone et la fibre musculaire innervée. On distingue alors les unités motrices FF (« Fast-twitch Fatigable ») à fibres de type IIb ; les unités motrices FR (« Fast-twitch Resistant ») à fibres de type IIa et les unités motrices S (« Slow-twitch ») à fibres de type I. L'ordre, d'un point de vue taille et complexité morphologique est FF > FR > S. *D'après (Kanning et al., 2010).*

Les motoneurones S possèdent un petit corps cellulaire et un axone de petit diamètre. D'un point de vue fonctionnel, ils contribuent peu à la force musculaire lorsqu'ils sont activés mais sont très résistants à la fatigue. Les motoneurones FF, au contraire, sont des cellules de grande taille, dont les neurites sont très branchés et permettent des conceptions rapides. Lorsqu'ils sont stimulés, ils permettent de mobiliser une force musculaire puissante mais s'épuisent rapidement. Les motoneurones FR possèdent des propriétés intermédiaires (Frey *et al.*, 2000).

Par leur petite taille, les motoneurones S, à l'inverse des motoneurones FF, ont besoin de moins d'activation synaptique pour déclencher des potentiels d'action. Ils seront donc activés en premier lors d'une contraction et les motoneurones FF en dernier. Les motoneurones FF sont recrutés pour des tâches intenses de courte durée qui nécessitent une forte contraction (courir ou sauter), alors que les motoneurones S sont recrutés pour des tâches posturales comme le maintien de la station debout, qui nécessitent une faible activité musculaire (Kanning *et al.*, 2010).

2 – Une dénervation sélective dans la SLA

La dénervation correspond à la destruction de la jonction neuromusculaire, suivie par une dégénérescence axonale. Dans la SLA, la dénervation est un élément précoce qui apparaît bien avant la mort des motoneurones (Fischer *et al.*, 2004). Des données morphologiques, immunohistochimiques et électrophysiologiques ont montré une perte sélective et synchrone des unités motrices FF du muscle gastrocnemius des pattes arrière chez les souris SOD1^{G93A} entre quarante-deux et cinquante jours post-nataux (Frey *et al.*, 2000; Pun *et al.*, 2006). Étant les premiers touchés, ces motoneurones sont appelés « vulnérables ». La dénervation des unités motrices FR a été observée plus tardivement, autour du quatre-vingtième jour, et enfin, celle des unités motrices S n'apparaît qu'aux stades finaux de la maladie, leurs motoneurones sont donc dits « résistants » (Frey *et al.*, 2000; Pun *et al.*, 2006). Cette sensibilité des motoneurones FF à la dénervation est encore mal comprise, mais certaines hypothèses sont proposées et des données apportées. Tout d'abord, les motoneurones FF sont les plus gros tant au niveau du diamètre de leur corps cellulaire qu'au niveau du calibre de leur axone et assurent des fonctions très coûteuses en énergie. Or, comme cela a été décrit, la SOD1 mutée perturbe à la fois le fonctionnement de la mitochondrie, source d'énergie en ATP importante, et le fonctionnement du transport axonal, qui permet d'apporter des nutriments aux axones. Les neurones pourraient alors se retrouver en situation de dénutrition. Les motoneurones FF étant les plus demandeurs en énergie, ils dégénéraient en premier. Deuxièmement, contrairement aux motoneurones de type FR ou S, les motoneurones FF possèdent de faibles capacités de bourgeonnement, après un écrasement ou une section de l'axone, les rendant plus vulnérables par manque d'adaptabilité à ce type de stress. A l'inverse, les motoneurones FR et S, présentant cette faculté de bourgeonnement, seraient capables de ré-innover les plaques motrices laissées vacantes par la dégénérescence des motoneurones FF (Duchen, 1973; Frey *et al.*, 2000; Schaefer *et al.*, 2005).

vingt jours, par rapport à la perte des motoneurones FF, qui a lieu vers quarante-cinq jours. La dénervation des motoneurones de type FR correspond à l'âge de déclenchement de la maladie chez les souris SOD1^{G93A}. Ces données ont par ailleurs été confirmées chez des patients SLA (Fischer *et al.*, 2004).

3 - Participation de candidats locaux à la dénervation musculaire dans la SLA

La mort des motoneurones SOD1 mutants est dépendante de processus cellule-autonome et non-autonome. On peut donc supposer que le processus de dénervation lui-même serait induit par différents facteurs produits par des cellules environnantes comme les muscles ou les cellules de Schwann.

a) L'hypermétabolisme du muscle squelettique

Des études du groupe de Dupuis et Loeffler (Dupuis & Loeffler, 2008) ont suggéré que des anomalies dans le métabolisme énergétique du muscle pouvaient être une cause directe de la dénervation (*cf* III – D). Les souris SOD1 mutées présentent une perte de poids par rapport aux souris sauvages, avant le déclenchement de la maladie. Cet effet serait dû à une augmentation du taux métabolique basal, appelé hypermétabolisme. Leur hypothèse est que l'hypermétabolisme des muscles chez ces souris entraînerait un déficit chronique en énergie, précédant l'amyotrophie et la dénervation. Lorsque les souris SOD1 mutantes sont soumises à un régime alimentaire riche en acides gras insaturés (« High Fat Diet », HFD), leur espérance de vie est augmentée et elles présentent une diminution de la dénervation musculaire et de la perte motoneuronale (Dupuis *et al.*, 2004b; Mattson *et al.*, 2007). Cependant, bien que ces résultats prouvent un lien entre un déficit énergétique et la dénervation, ils ne montrent pas si la source du déficit énergétique provient des muscles.

b) Candidats moléculaires pouvant participer à la dénervation

Les protéines du guidage axonal

Au cours du développement, les protéines de guidage axonal assurent le contrôle de l'extension d'un axone vers ses cibles. Pour cela, elles fonctionnent comme des agents répulsifs ou attractifs, et peuvent être soit sécrétées, soit associées aux membranes. Une fonction ou une expression aberrante de ces molécules pourrait contribuer à des changements pathologiques précoces dans la connectivité des motoneurones des souris SOD1 mutantes

(Pasterkamp & Giger, 2009). Plus précisément, trois types moléculaires ont suscité un intérêt grandissant dans cette pathologie, Nogo-A, Semaphorine 3A et les molécules CRMPs (« Collapsin Response Mediator Protein »).

Nogo-A (réticulons-4A, « Neurite Outgrowth Inhibitor »)

La protéine Nogo-A, se définissant comme un inhibiteur de la croissance axonale, est exprimée de manière prédominante dans les muscles squelettiques de l'embryon et décroît chez l'adulte. De manière intéressante, Nogo-A est surexprimée dans les muscles squelettiques de patients SLA et chez des souris transgéniques SOD1^{G93A} avant les premiers symptômes de la maladie (Dupuis *et al.*, 2002). Son augmentation s'intensifie avec la sévérité de la maladie et cette augmentation est plus prononcée dans les fibres S (Jokic *et al.*, 2006). Le croisement des souris SOD1^{G86R} avec des souris déficientes en protéine Nogo-A augmente la survie de ces souris d'une vingtaine de jours, et diminue la dénervation musculaire (Jokic *et al.*, 2006), bien qu'une étude a récemment montré des résultats inverses (Yang *et al.*, 2009). Bien que nécessitant une confirmation, la majorité des études vont jusqu'à présent dans le sens d'un rôle pro-dénervation de Nogo-A.

Sémaphorine 3A

La protéine Sémaphorine 3A (Sema3A) est une glycoprotéine sécrétée qui joue un rôle de facteur de répulsion chez les motoneurones. Cette protéine peut être exprimée et sécrétée par les cellules de Schwann au niveau des jonctions neuromusculaires (De Winter *et al.*, 2006). Des études ont montré que l'expression de la Sema3A dans les cellules de Schwann augmentait chez les souris SOD1^{G93A} à des stades asymptomatiques (entre cinq et huit semaines postnatales). Plus intéressant encore, cette augmentation est restreinte aux sous-populations des jonctions musculaires innervées par les motoneurones FF, et son augmentation est concomitante à la dénervation de ces motoneurones (De Winter *et al.*, 2006). La Sema3A pourrait alors agir directement sur les terminaisons nerveuses et induire leur rétraction des jonctions neuromusculaires. De plus, la présence de Sema3A pourrait empêcher la faculté de bourgeonnement de ces axones FF, ce qui participerait à leur dégénérescence (Kanning *et al.*, 2010).

Les molécules CRMPs (« Collapsin Response Mediator Protein »)

Les molécules CRMPs sont des phosphoprotéines cytosoliques qui ont été caractérisées comme composants de la voie de traduction du signal Sema3A (Charrier *et al.*, 2003). Cinq CRMPs ont été identifiées et réguleraient la croissance axonale de manière positive ou négative selon le type de CRMP. Ces protéines sont surtout exprimées dans le système nerveux au cours du développement chez l'embryon et dans la première semaine de vie. Leur expression est inhibée chez l'adulte. Or, les protéines CRMPs peuvent être réexprimées ou activées dans les maladies neurodégénératives telles que l'encéphalopathie spongiforme bovine (Auvergnon *et al.*, 2009) et la maladie d'Alzheimer (Yoshida *et al.*, 1998).

B – La mort cellulaire par apoptose

Il existe plusieurs mécanismes de mort cellulaire :

- ◆ La nécrose, processus de mort cellulaire accidentelle, consistant schématiquement en un gonflement des organelles, une rupture de la membrane et au déversement de son contenu (Kim *et al.*, 2006) ;
- ◆ L'autophagie, processus d'autodigestion partielle du contenu d'une cellule par fusion avec le lysosome, pouvant conduire à la mort de la cellule (Kim *et al.*, 2006) ;
- ◆ L'apoptose, processus de mort cellulaire programmée, déclenchée à la suite de l'activation d'un signal et mettant en place une séquence d'évènements génétiquement définis.

Parmi ces trois types de morts cellulaires, nous allons détailler l'apoptose qui semble jouer un rôle primordial dans le processus de mort des motoneurones au cours de la SLA.

1 – Généralités sur l'apoptose

L'apoptose est également appelée mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire. Il s'agit d'un programme d'autodestruction déclenché suite à l'activation d'un signal. Ce processus met en place une séquence d'évènements génétiquement définis. D'un point de vue cellulaire, elle se manifeste par un rétrécissement cellulaire et nucléaire, une compaction et marginalisation de la chromatine nucléaire et, plus tardivement dans le processus, une circonvolution de la surface membranaire. L'apoptose n'entraîne pas de réponse inflammatoire (Hotchkiss *et al.*, 2009). Il est possible de distinguer trois catégories principales de voies apoptotiques : la sécrétion dépendante d'un récepteur, la voie mitochondrie-dépendante, et la voie dépendante du réticulum endoplasmique. Ces différentes voies font intervenir à la fois des effecteurs communs aux trois voies et des effecteurs spécifiques. Dans

tous les cas, la finalité sera l'activation des caspases. Ces protéines sont des cystéines protéases, se divisant en caspases initiatrices et effectrices. Elles ne sont activées qu'après clivage, et s'activent en chaîne pour former une cascade de mort. Les caspases 2, 8, 9 et 10 composent le groupe des caspases initiatrices et les caspases 3, 6 et 7 sont des caspases effectrices. Les substrats des caspases incluent des protéines du cytosquelette, des protéines structurales du noyau et des enzymes. On peut noter que certaines caspases sont quant à elles impliquées dans des processus d'inflammation, comme les caspases 1, 4, 5, 12 et 14 (Guegan & Przedborski, 2003).

a) La voie extrinsèque de mort : les récepteurs de mort

(Figure 14)

Présentation des récepteurs de mort et de leurs ligands

Les récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs TNFR (« Tumor Necrosis Factor Receptor »). Il s'agit de protéines transmembranaires de type I qui possèdent une partie C-terminale intracellulaire, une région transmembranaire et un domaine de liaison N-terminal extracellulaire. Leur domaine extracellulaire présente des domaines riches en cystéines (« Cysteine Rich Domain » ou CRD), dont le nombre, de un à six, déterminera leur affinité pour un ligand donné. Les récepteurs de mort se distinguent des autres récepteurs par la présence d'une séquence cytoplasmique appelée domaine de mort (« Death Domain », DD), essentielle pour l'induction de l'apoptose. Les récepteurs de mort sont activés par leurs ligands, des cytokines appartenant à la famille de protéines TNF. Ce sont en majorité des protéines transmembranaires de type II qui possèdent un domaine N-terminal intracellulaire, une région transmembranaire, et une partie C-terminale extracellulaire (Ashkenazi, 2002; Guicciardi & Gores, 2009).

L'apoptose liée aux récepteurs de mort

L'initiation du signal de transduction nécessite l'oligomérisation du récepteur et la juxtaposition des domaines intracellulaires. Initialement, il était pensé que la liaison du ligand sous forme trimérique conduisait à la trimérisation du récepteur. Cependant, il a été montré la présence d'oligomères de récepteurs préassemblés à la surface cellulaire par leurs domaines CRD. La liaison du ligand entraînerait un changement de conformation du récepteur préassemblé, conduisant au recrutement de différentes protéines adaptatrices, interagissant avec les domaines de mort des récepteurs. Plusieurs protéines adaptatrices ont été identifiées,

les plus communes étant FADD (« Fas-Associated protein with Death Domain »), TRADD (« TNF Receptor-Associated protein with Death Domain »), et DAXX (« Death Domain-associated protein ») (Guicciardi & Gores, 2009). Ces protéines font le lien entre le récepteur et les effecteurs de la mort cellulaire par des interactions au niveau de leur domaine effecteur de mort (« Death Effector Domain », ou DED).

La signalisation de mort cellulaire la mieux établie est celle du récepteur Fas. Son activation se fait préférentiellement au niveau des microdomaines de la membrane plasmique, appelés « radeaux lipidiques » (Ashkenazi, 2002; Andera, 2009). Ce complexe s'associe aux caspases initiatrices 8 ou 10 et promeut leur activation. Selon les cellules, ces caspases activeront directement les caspases effectrices 3, 6 et 7, regroupées dans la famille des cellules de type I, ou bien la caspase 8 pourra cliver la protéine Bid et l'activer (cellules de type II), amplifiant ainsi la mort induite par la voie mitochondriale (Sathasivam & Shaw, 2005; Guicciardi & Gores, 2009).

b) La voie intrinsèque de mort par apoptose

(Figure 14)

La voie intrinsèque dépendante de la mitochondrie

La mort engagée par la mitochondrie peut être initiée suite à l'agression par des espèces oxygénées, à des dommages de l'ADN ou à une libération excessive de calcium dans le cytoplasme. La voie principale de mort induite à travers la mitochondrie est celle dépendante du cytochrome c et de l'activation des caspases. Des conditions de surcharge en calcium dans la mitochondrie ou de stress oxydatif excessif peuvent favoriser une situation de perméabilisation de la mitochondrie, impliquant la création d'un pore de transition à la membrane mitochondriale (mPTP). Le mPTP est un canal transmembranaire poly-protéique, formé par l'association de VDAC, de l'ANT (« Adenine Nucleotide Translocator ») et de la cyclophiline, qui libère des molécules pro-apoptotiques telles que le cytochrome c (Martin, 2010). Une fois libéré dans le cytoplasme, le cytochrome c va s'associer avec APAF-1 (« Assembly from apoptotic Protease-Activating Factor-1 ») et la procaspase 9, formant ainsi un complexe appelé apoptosome. Ce complexe permet l'activation de la caspase 9, qui activera à son tour les caspases effectrices 3 et 7, conduisant *in fine* à une fragmentation de l'ADN (Kim *et al.*, 2006; Nagley *et al.*, 2010). La mitochondrie peut libérer d'autres facteurs pro-apoptotiques en plus du cytochrome c, comme AIF (« Apoptosis-Inducing Factor ») et smac/DIABLO (« Second Mitochondria-derived Activator of Caspase / Direct Inhibitor of

Apoptosis-Binding Protein with LOw pI »), qui déclencheront des voies apoptotiques caspase-dépendantes et indépendantes.

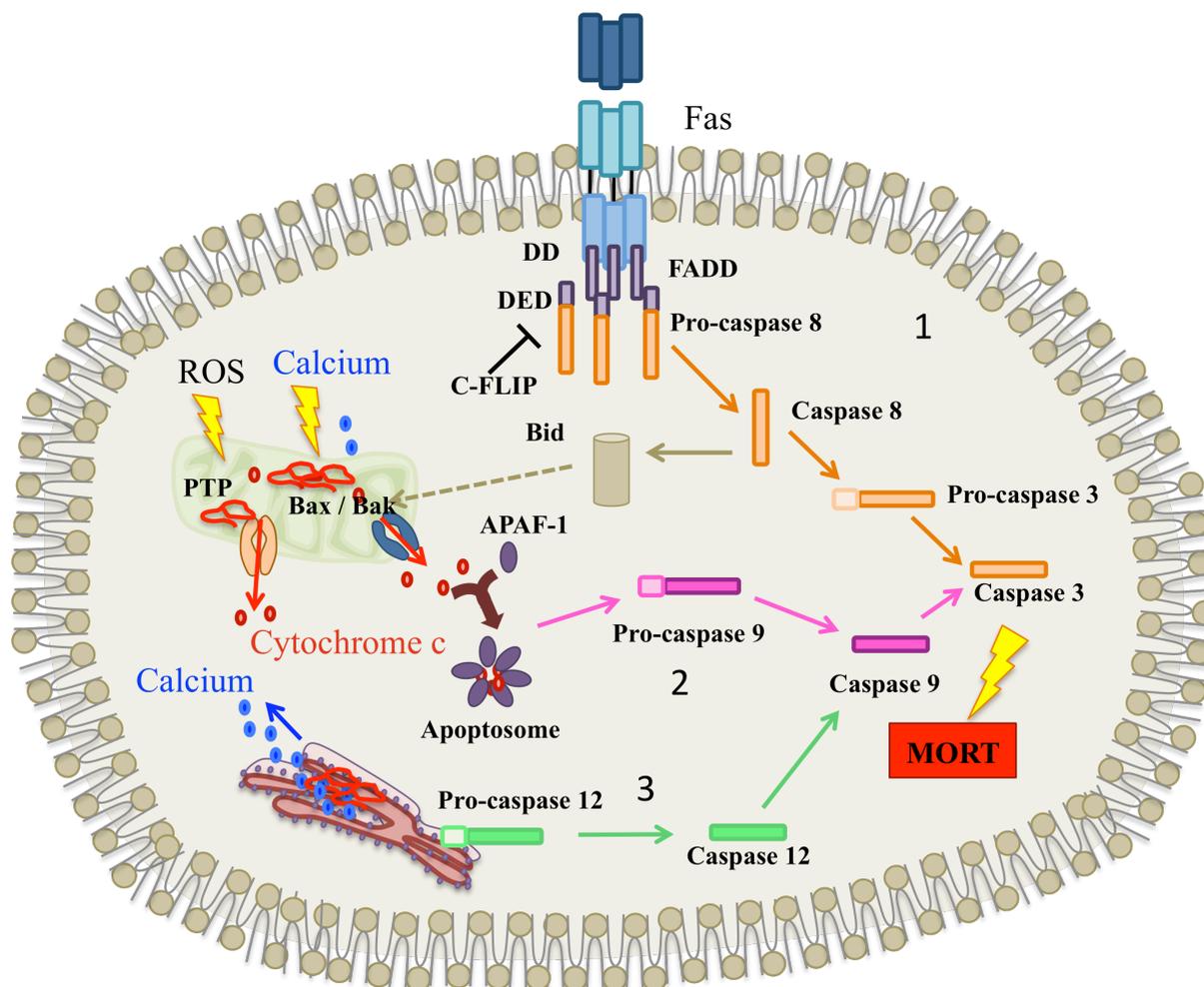


Figure 14 : Les voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques dans la SLA

La voie apoptotique extrinsèque (1) est la voie des récepteurs de mort (ici Fas). La liaison du ligand FasL au récepteur Fas entraîne son activation. Au niveau de ces domaines de mort (« Death Domain », DD) cytoplasmiques, il recrute la protéine adaptatrice FADD (« Fas-Associated protein with Death Domain ») qui interagit ensuite avec la pro-caspase 8 au niveau de son domaine effecteur de mort (« Death Effector Domain », DED). Ce complexe, appelé DISC (« Death Inducing Signal Complex ») permettra de cliver la caspase 8 qui clivera à son tour la caspase 3. La voie apoptotique intrinsèque de mort implique à la fois la mitochondrie (2) et le RE (3). La perméabilisation de la mitochondrie, pouvant être due à des ROS ou à une forte concentration calcique, va promouvoir la libération de molécules pro-apoptiques, dont le cytochrome c. Des pores transitoires perméables mitochondriaux (« Mitochondrial Pore Transition Permeability », mPTP) ou ceux formés par l'oligomérisation de Bax et Bak vont permettre la sortie du cytochrome c, pouvant ainsi s'associer au facteur APAF-1 (« Assembly from apoptotic Protease-Activating Factor-1 ») et former l'apoptosome. Ce dernier activera la pro-caspase 9, qui à son tour activera la caspase 3. La caspase 8 impliquée dans la voie extrinsèque peut cliver et activer la protéine Bid, qui activera les protéines Bax et Bak, qui pourront alors s'oligomériser. Enfin, en condition de stress prolongé, le RE peut activer la caspase 12 qui activera ensuite la caspase 9 puis la caspase 3. *D'après (Bernard-Marissal, 2011).*

L'activation de cette voie est finement régulée en amont par des protéines de la famille Bcl-2 (« B-Cell Lymphoma 2 »), classables selon leur fonction et leurs domaines d'homologie, BH1-4. Les protéines pro-survie, telles que Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1 et Bcl-W, conservent leurs quatre domaines BH1 à 4. Les protéines Bcl-2 et Bcl-xL empêchent l'activation de protéines pro-apoptotiques, comme Bax et Bak, dans la membrane mitochondriale. Parmi les protéines pro-apoptotiques, on peut distinguer deux groupes : le premier comportant Bax et Bak, possédant une séquence de conservation des domaines BH1 à 3, et le second contenant les protéines Bid, Bad, Bim, Noxa et Puma (ou protéines BH3), possédant une séquence de conservation uniquement pour le domaine BH3 (Tsujimoto, 1998; Kim *et al.*, 2006). Les facteurs Bax et Bak sont également impliqués dans la libération du cytochrome c de la mitochondrie. Une fois activées, ces deux protéines s'oligomérisent et forment des pores dans la membrane mitochondriale. Cette étape est rendue possible par l'intervention des protéines BH3, qui interagissent d'une part avec les protéines Bcl-2, piégeant Bax et Bak, ce qui a comme conséquence de les libérer, et d'autre part, activent Bax et Bak pour favoriser leur oligomérisation (Rodriguez *et al.*, 2011). Enfin, l'apoptose peut être inhibée par des protéines de la famille des IAP (« Inhibitor of Apoptosis Proteins »). Cette famille de protéines comprend les protéines XIAP (« X-linked- IAP »), c-IAP et survivine.

Ces protéines peuvent se lier aux caspases 3, 7 et 9 par leur domaine CARD (« CASpase Recruitment Domain »), et ainsi empêcher leur activation et donc, *in fine*, la mort cellulaire (Altieri, 2010).

La voie intrinsèque dépendante du Réticulum Endoplasmique ; en interaction avec la mitochondrie

Lors d'un stress prolongé du RE, une signalisation pro-apoptotique peut être initiée par cette organelle. L'engagement vers l'apoptose implique deux protagonistes principaux : la caspase 12, qui, une fois clivée peut à son tour activer les caspases 3 et 9, indépendamment de la voie mitochondriale, et CHOP et p53, des facteurs de transcription. Ces derniers vont activer la synthèse de protéines pro-apoptotiques dans le noyau, dont la synthèse de protéines de type BH3 (Galehdar *et al.*, 2010), qui, une fois dans le cytoplasme, vont activer Bax et Bak, qui transiteront ensuite vers la mitochondrie. Par ailleurs, certaines protéines BH3, et notamment Puma, sont localisées dans le RE et elles peuvent induire une activation des récepteurs IP₃R, conduisant ainsi à une libération de calcium (Shibue & Taniguchi, 2006). Ce calcium en excès

sera en partie capturé par la mitochondrie, pouvant contribuer à sa perméabilisation. Ceci pourra conduire à la libération de protéines pro-apoptotiques (Kim *et al.*, 2006).

2 – L'apoptose dans la SLA

a) Aspects morphologiques et marqueurs apoptotiques

Aspects morphologiques

Afin de déterminer si les motoneurones meurent par apoptose dans la SLA, des cellules apoptotiques ont été recherchées sur la base de critères tels qu'une condensation cytoplasmique et nucléaire, une compaction de la chromatine et une préservation de la structure des organelles. Chez les patients SLA et chez les souris modèles de la maladie, la plupart des motoneurones « malades » sont atrophiés, avec un cytoplasme vacuolisé (dilatation d'organelle), un noyau condensé et une irrégularité de la surface membranaire. Au stade final, les motoneurones ne mesurent plus que 20% de leur taille initiale et sont de forme ronde ou fusiforme (Martin, 1999; Guegan & Przedborski, 2003). Ces critères ne correspondent toutefois pas à ceux caractérisant exclusivement l'apoptose, notamment à cause de l'absence de condensation de la chromatine. Au stade final de la maladie chez les souris, un faible nombre de cellules en apoptose a pu être mis en évidence (Figure 15) dans des coupes de moelles épinières de souris transgéniques SLA.

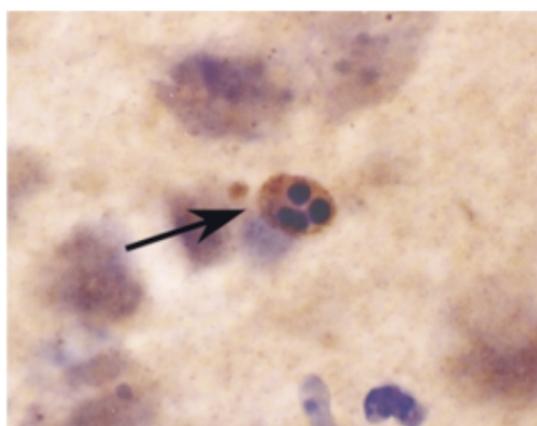


Figure 15 : Cellule apoptotique à un stade avancé de la maladie chez les souris SOD1^{G93A}

Illustration d'une cellule en apoptose identifiée morphologiquement, dans la moelle épinière de souris SOD1^{G93A} à un stade final de la maladie. La flèche indique la compaction de la chromatine en masses rondes dans le noyau. On peut également remarquer une condensation du cytoplasme de la cellule. *D'après la revue (Guegan & Przedborski, 2003).*

Ces résultats sont le reflet de la difficulté à détecter les cellules apoptotiques au stade final, car 50% des motoneurons sont déjà perdus. Le taux de mort par jour est très faible, estimé à 0,6%, à un niveau donné de la moelle épinière, et les cellules apoptotiques disparaissent très vite, probablement phagocytées (Chiu *et al.*, 1995; Guegan & Przedborski, 2003). L'étude morphologique a donc dû être complétée par l'expression de marqueurs apoptotiques, pour indiquer que les voies de mort par apoptose étaient mises en œuvre.

Expression de marqueurs apoptotiques

Une des caractéristiques de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN. Ce phénomène peut être évalué en marquant les extrémités 3' libres par deux techniques, le TUNEL (« Terminal transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling ») et l'ISEL (« In Situ End Labelling »). Ces marquages chez des patients SLA et des souris transgéniques modèles de la maladie ont abouti à des résultats contradictoires (Migheli *et al.*, 1994; Migheli *et al.*, 1999; He & Strong, 2000). De plus, ces techniques présentent l'inconvénient de pouvoir également marquer des cellules en nécrose. D'autres marqueurs plus fiables ont alors été testés. Le premier est l'antigène carbohydre Le^Y. Il est exprimé lors de changement de glycosylation à la surface de la cellule, traduisant des changements morphologiques de la surface membranaire. Il est fortement exprimé chez les patients SLA et chez les souris transgéniques (Hiraishi *et al.*, 1993; Yoshiyama *et al.*, 1994). Le second est le marqueur Fractine. Il s'agit d'un produit de clivage de la β -actine par la caspase 3 permettant d'identifier les cellules en apoptose. Son expression est augmentée dans la moelle épinière des souris SOD1 mutantes et non chez les sauvages (Vukosavic *et al.*, 2000). Enfin, des niveaux élevés de la protéine liée à l'apoptose Par-4 (« Prostate Apoptosis Response 4 ») ont été observés à la fois chez des patients SLA et chez des souris SOD1 mutées et non chez les contrôles (Rangnekar, 1998). L'ensemble de ces observations suggère fortement que les motoneurons meurent par apoptose. Afin d'évaluer le rôle de l'apoptose dans la SLA, des médiateurs moléculaires de mort cellulaire programmée ont été étudiés.

b) Activation de l'apoptose dans la SLA

Activation des caspases

Afin de démontrer une implication des caspases dans la SLA, des injections intraventriculaires d'un inhibiteur général des caspases, z-VAD fmk, ont été réalisées. L'inhibition des cascades atténue la mort induite chez les souris SOD1^{G93A} (Li *et al.*, 2000) et

prolonge la survie des animaux en retardant le déclenchement de la maladie. D'autres études ont montré une activation de la caspase 9 concomitante à la translocation de Bax à la mitochondrie, et une distribution cytoplasmique du cytochrome c chez les souris SLA (Guegan *et al.*, 2001). Chez des patients SLA, la caspase 9 activée et la libération du cytochrome c ont également été observées (Guegan *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2003). Ces données mettent en évidence l'implication de la voie mitochondriale dans la SLA. L'activation des caspases effectrices 3, 7 et de la caspase 8 survient à des stades plus tardifs chez les souris (Spooren & Hengerer, 2000; Sathasivam & Shaw, 2005), la caspase 3 étant active également dans les motoneurones de patients SLA (Martin, 2010). D'autres études ont montré que la caspase 12, rattachée au RE, était fortement exprimée chez les patients SLA et chez les souris symptomatiques SLA (Guegan & Przedborski, 2003; Atkin *et al.*, 2008). Enfin, des caspases impliquées dans des réponses inflammatoires, les caspases 1 et 11, sont surexprimées dans la moelle épinière des souris SOD1^{G93A} et leur augmentation coïncide avec le développement de la réponse gliale (Pasinelli *et al.*, 1998; Pasinelli *et al.*, 2000; Vukosavic *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2003). De plus, l'utilisation d'un dominant négatif de la caspase 1 retarde la progression de la maladie, mais non son déclenchement (Friedlander *et al.*, 1997).

Diminution des protéines pro-survie au profit de l'augmentation de molécules pro-apoptotiques

L'expression des protéines pro-survie Bcl-2 et Bcl-xL est diminuée chez les patients SLA et chez les souris SOD1^{G93A} symptomatiques au profit d'une augmentation des protéines pro-apoptotiques Bad et Bax (Mu *et al.*, 1996; Vukosavic *et al.*, 1999). La diminution de Bcl-2 pourrait être due à sa séquestration dans des agrégats de la SOD1 mutée de grande taille, notamment dans la mitochondrie (Pasinelli *et al.*, 2004). La surexpression de Bcl-2 chez les souris transgéniques retarde le déclenchement de la maladie et prolonge la survie d'environ deux semaines (Kostic *et al.*, 1997). La protéine XIAP, inhibant l'activation des caspases, diminue également, à des stades symptomatiques chez les souris SOD1^{G93A}. Sa surexpression chez ces souris diminue la perte des motoneurones et ralentit la progression de la maladie d'environ douze jours, sans affecter son déclenchement (Inoue *et al.*, 2003; Wootz *et al.*, 2006). Plusieurs équipes ont étudié les effets d'une diminution de l'expression de protéines pro-apoptotiques. Il a ainsi été mis en évidence que la délétion de la protéine Puma chez les souris SOD1^{G93A}, jouant un rôle à la fois au niveau de l'apoptose de la mitochondrie et du RE, retarde le déclenchement de la maladie d'une vingtaine de jours, ainsi que la perte des

motoneurones (Kieran *et al.*, 2007). Plus récemment, des travaux ont montré que la délétion génétique de Bax et Bak dans les neurones retardait le déclenchement de la maladie et augmentait la survie des souris SOD1^{G93A} d'environ un mois (Reyes *et al.*, 2010). La délétion de ces protéines diminue également la perte motoneuronale et notamment la proportion de cellules apoptotiques, évaluées dans cette étude par un marquage de la caspase 3 clivée. D'une manière plus surprenante, cette délétion diminue fortement la dénervation, ce qui va de pair avec l'amélioration des résultats aux tests moteurs de ces souris effectués par le rotarod. La voie apoptotique dépendante de la mitochondrie jouerait donc un rôle direct dans les processus de mort des motoneurones comprenant à la fois les processus dégénératifs, la dénervation de ces cellules et l'exécution de la mort (Reyes *et al.*, 2010).

3 – L'apoptose dans la SLA : implication de la voie extrinsèque

Une composante importante de l'apoptose est assurée par l'activation des récepteurs de mort. De nombreuses études ont porté sur l'implication de ces récepteurs dans la SLA et ont montré que quatre d'entre eux, p75, TNFR, LIGHTR et Fas, pourraient participer à des processus cellule-autonome ou non-autonome de toxicité liée à la SOD1 mutée.

a) Le récepteur au NGF : p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR})

Le NGF (« Nerve Growth Factor ») est une neurotrophine pouvant jouer sur différentes fonctions cellulaires selon le récepteur auquel elle se lie. Elle jouerait un rôle dans la survie et la différenciation neuronale par activation de son récepteur à haute affinité TrKA, ou un rôle dans la mort neuronale par activation du récepteur à basse affinité p75^{NTR} (Pehar *et al.*, 2004). Les motoneurones expriment le récepteur p75^{NTR} au cours du développement embryonnaire, notamment pendant la période de mort développementale et l'activation de ce récepteur serait à l'origine de la mort d'une partie des motoneurones au cours de la SLA. Son expression diminue chez l'adulte (Yan *et al.*, 1988), mais augmente à nouveau dans les motoneurones des patients SLA et des souris modèles de la maladie. Des études ont montré que les motoneurones exprimant p75^{NTR} étaient entourés par des astrocytes qui exprimaient le ligand du récepteur p75^{NTR}, le NGF (Pehar *et al.*, 2004). Leurs auteurs ont mis en évidence que des astrocytes rendus « réactifs » par de l'oxyde nitrique sécrétaient du NGF et pouvaient entraîner la mort des motoneurones « sauvages » mis en co-culture, par un processus de mort dépendant de p75 (Pehar *et al.*, 2004; Domeniconi *et al.*, 2007). De plus, l'ajout de NGF aboutit à la mort des motoneurones SOD1 mutants, alors qu'il faut y ajouter de l'oxyde

nitrique pour induire la mort des motoneurones sauvages (Pehar *et al.*, 2007). Enfin, des travaux réalisés afin de tester l'effet du blocage de p75^{NTR} sur l'évolution de la maladie, montrent que la diminution du récepteur p75 au moyen d'un peptide anti-sens ou par ablation génétique chez les souris SOD1^{G93A} améliore modestement la survie des souris (Kust *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2003). De plus, ces résultats modérés ne sont pas retrouvés par un autre groupe utilisant un antagoniste de la liaison du ligand à son récepteur (Turner *et al.*, 2004).

b) Le récepteur au TNF α

Le TNF α est une des principales cytokines pro-inflammatoires. Il exerce son effet par l'activation des récepteurs TNFR1 et TNFR2, dont seul TNFR1 est impliqué dans une voie apoptotique. Le TNF α , TNFR1 et TNFR2 sont tous les trois exprimés par les neurones, les astrocytes et la microglie dans tout le système nerveux (Park & Bowers, 2010). Le processus d'inflammation dans la SLA implique l'activation des astrocytes et de la microglie qui vont produire des cytokines, et notamment le TNF α , en présence de la SOD1 mutée (Zou & Crews, 2005). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le TNF α était capable de provoquer la mort des motoneurones en culture (Ugolini *et al.*, 2003), mais les mécanismes ne sont pas connus, bien que des travaux aient montré que le TNF α pourrait provoquer une augmentation du transport rétrograde des mitochondries conduisant à leur accumulation dans le soma (Stommel *et al.*, 2007). En étudiant le rôle potentiel du TNF α dans la SLA, il a été observé que l'expression du TNF α et des caspases pro-inflammatoires 1 et 11 augmentait de manière concomitante à l'activation gliale à partir de soixante-quinze jours chez les souris SOD1^{G93A} (Yoshihara *et al.*, 2002). De même, une augmentation du récepteur TNFR1 est observée à partir du déclenchement de la maladie et durant toute sa progression (Elliott, 2001; Hensley *et al.*, 2002; Hensley *et al.*, 2003). De plus, des niveaux élevés de TNF α et de ses récepteurs ont été trouvés dans le plasma de patients SLA (Cereda *et al.*, 2008), confortant ainsi l'idée d'une implication potentielle de ces récepteurs dans la maladie. Divers traitements tels que la thalidomide, l'acide folique, l'IGF-1 et des chélateurs de métaux, qui aboutissent à une réduction des niveaux de TNF α , ont des effets bénéfiques chez les animaux transgéniques modèles de la maladie (Kiaei *et al.*, 2006; Petri *et al.*, 2007; Dodge *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Cependant, ces études n'ont pas montré directement l'implication du couple TNF α /TNFR dans la neurodégénérescence, et les effets bénéfiques pourraient être dus, non pas à un effet de ces agents pharmaceutiques sur le TNF α , mais à une diminution globale de l'inflammation par d'autres mécanismes. Par ailleurs, le croisement de souris SOD1^{G93A} ou

SOD1^{G37R} avec des souris déficientes en TNF α n'affecte pas la survie de ces souris ni la perte des motoneurones, ce qui apporte un doute sur un rôle majeur de TNF α dans la dégénérescence des motoneurones liée à l'inflammation dans la SLA.

c) Le récepteur à LIGHT : LT- β R

La protéine LIGHT est une protéine transmembranaire de type II de la famille TNF, pouvant se lier à trois récepteurs différents, le récepteur lymphotoxin- β (LT- β -R), le récepteur HVEM (« Herpes Virus Entry Mediator ») et le récepteur Dcr3 (decoy 3). La protéine LIGHT joue un rôle important dans les processus de l'immunité adaptative et innée (Ware, 2005). Des études ont démontré l'existence d'une nouvelle voie de mort sélective des motoneurones impliquant un mécanisme cellule-non-autonome. Il a été montré que le ligand LIGHT pouvait induire 50% de mort des motoneurones sauvages en activant le récepteur LT- β -R. De plus, cette mort peut être potentialisée par la cytokine INF γ (interféron gamma). Cette voie de mort, indépendante de la mitochondrie, impliquerait l'activation de la kinase p38 et des caspases 6 et 9 comme effecteurs de mort. Le modèle de pathogénicité liée à SOD1 mutée *in vitro* repose sur le fait, tout d'abord, que les motoneurones SOD1 mutants ne présentent pas de susceptibilité accrue à la mort induite par LIGHT ou INF γ comparés aux motoneurones contrôles, réduisant la possibilité d'un processus cellule-autonome. Deuxièmement, les astrocytes SOD1 mutants sécrètent des toxines et notamment l'INF γ . Et enfin, les motoneurones cultivés sur un tapis astrocytaire SOD1 mutant meurent, et cette mort est bloquée par l'ajout d'anticorps neutralisants anti-INF γ ou par inhibition de la voie LIGHT-LT- β -R. *In vivo*, l'expression de LIGHT n'est pas différente entre les souris sauvages et les souris SOD1^{G93A} aux différents stades de la maladie. En revanche, l'expression d'INF γ augmente au déclenchement de la maladie (autour de quatre-vingt dix jours), d'abord dans les astrocytes (Aebischer *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011b), puis plus tardivement dans les motoneurones (entre quatre-vingt dix et cent dix jours). L'augmentation des niveaux d'INF γ va donc sensibiliser les motoneurones à mourir par LIGHT. La délétion génétique de LIGHT chez les souris SOD1^{G93A} retarde la progression de la maladie mais pas son déclenchement. Ceci confirme l'implication d'un mécanisme de pathogénicité de type cellule non-autonome de l'association INF γ -LIGHT (Aebischer *et al.*, 2011). De plus, une augmentation des niveaux d'INF γ a été retrouvée dans le sérum et le fluide cérébrospinal des patients SLA, indiquant un rôle potentiel de cette cytokine dans le processus de mort des motoneurones SOD1 mutants (Tateishi *et al.*, 2010).

d) Le récepteur Fas et son ligand FasL

(Figure 16)

Au cours du développement des motoneurones de la moelle épinière, la moitié d'entre eux meurent après avoir établi un contact avec leur cible, selon un processus de mort cellulaire programmée développementale (Pettmann & Henderson, 1998). De plus, il a été montré une implication du récepteur Fas dans la mort développementale des motoneurones. En effet, en cas d'absence de facteurs de survie ou en conditions de stress, les motoneurones activent une voie de mort programmée au cours de laquelle la moitié meurt *in vitro*, un jour après ensemencement. Cette mort est inhibée par le blocage de l'interaction Fas/Fas ligand (FasL). Par ailleurs, la privation de facteurs trophiques entraîne une activation de Fas, une production active de FasL et une mort impliquant la caspase 8. De plus, ces auteurs ont montré que la mort par Fas pouvait être un processus actif car l'ajout de FasL ou l'activation du récepteur Fas par des anticorps anti-Fas agonistes aboutit à 50% de mort des motoneurones en présence de facteurs trophiques. Cette voie de mort requiert l'activation de la caspase 8, dépendante de l'activation de la voie mitochondriale. L'activation de Fas induit une mort maximale de 50% à quarante-huit heures, un pourcentage qui n'est pas augmenté les jours suivants. Ceci suggère la présence d'une population résistante à cette mort. Dans ce sens, les auteurs ont montré que cette résistance était due à une synthèse accrue de la molécule cFLIP (« cellular FLICE/caspase 8-Like Inhibitory Protein ») au bout de trois jours de culture. La molécule c-FLIP est un inhibiteur intracellulaire de la caspase 8 qui s'associe à la protéine FADD, empêchant son interaction avec la caspase 8, et donc la mort des motoneurones (Raoul *et al.*, 1999). Cette même équipe a ensuite découvert l'existence d'une deuxième composante dans la voie de mort des motoneurones activés par Fas. Ils ont ainsi montré que Fas active, dans les motoneurones seulement, une autre voie de mort parallèle à la voie classique, et impliquant comme partenaires la protéine adaptatrice DAXX, recrutant la kinase ASK-1, qui active en aval la kinase p38, laquelle stimule la transcription de la nNOS (« neuronal Nitric Oxide Synthase »), et donc augmente la production de NO. Les deux voies de mort agissent en synergie pour induire la mort des motoneurones. La kinase p38 peut activer aussi bien la voie mitochondriale que la voie NO. L'implication de cette voie dans la pathologie liée à la SOD1 mutée a été étudiée. D'une manière intéressante, les motoneurones SOD1 mutants présentent une sensibilité accrue à la mort induite par FasL ou NO, mourant à des doses de cent fois inférieures à celles nécessaires pour tuer les motoneurones sauvages.

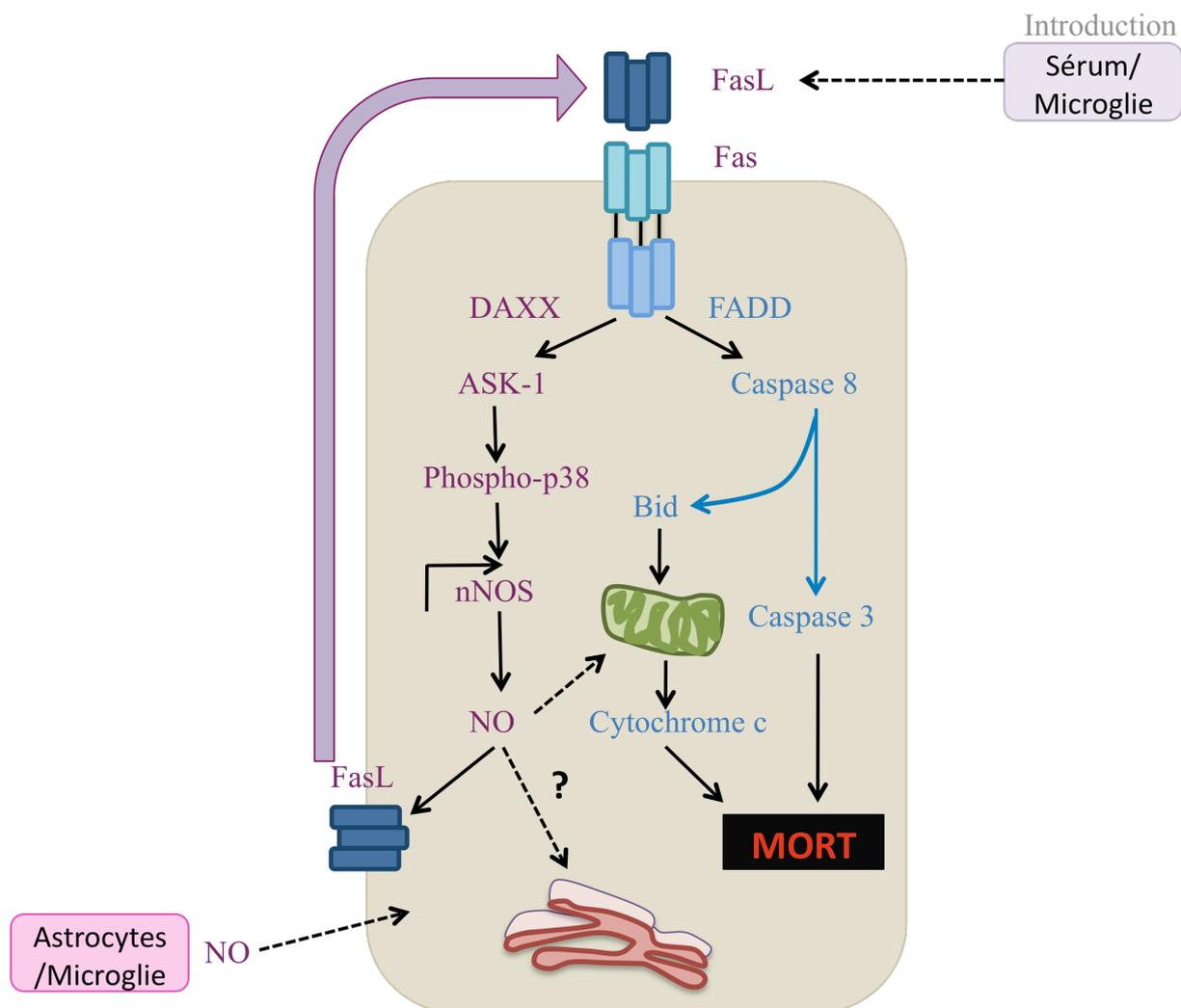


Figure 16 : Les motoneurones SOD1 mutants sont vulnérables *in vitro* à la voie de mort Fas/NO

Les motoneurones meurent suite à l'activation du récepteur Fas en empruntant la voie de la caspase 8 mais aussi la voie de la mitochondrie. Une nouvelle voie de mort a été identifiée : le récepteur Fas, suite à son activation, va interagir avec la protéine adaptatrice DAXX, qui recrutera la protéine ASK-1, activant ensuite en aval la kinase p38. Cette dernière va augmenter transcriptionnellement la nNOS (« neuronal Nitric Oxide Synthase »), ce qui va permettre la production d'oxyde nitrique (NO). Le NO, en retour, va activer la synthèse du ligand Fas, ce qui formera la boucle d'amplification Fas → NO → FasL → Fas. Le NO pourrait perturber le fonctionnement de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique, ou encore produire du peroxynitrite, l'ensemble étant toxique pour la cellule. Les cellules environnantes des motoneurones peuvent sécréter des agonistes à Fas (son ligand FasL) et du NO. D'après (Raoul *et al.*, 2002a; Raoul *et al.*, 2006).

De plus, la production de NO provoque une synthèse de FasL et une phosphorylation de la kinase p38 dans les motoneurones mutants, entraînant l'activation d'une boucle d'amplification de mort (Raoul *et al.*, 2002b; Raoul *et al.*, 2006). Cette voie est aussi activée *in vivo*, puisque de nombreux composants tels que FasL, DAXX, ASK-1 et phospho-p38

augmentent chez les souris SOD1^{G93A} à partir des stades asymptomatiques (Holasek *et al.*, 2005; Raoul *et al.*, 2006; Ranganathan & Bowser, 2010). D'ailleurs, le croisement de souris SOD1^{G93A} avec des souris exprimant une forme dominante négative de DAXX diminue le nombre de motoneurons FasL positifs dans la moelle épinière de souris, montrant que la boucle d'amplification existe également *in vivo* (Raoul *et al.*, 2006). L'importance de cette voie a été confirmée lorsque ses acteurs moléculaires ont été retrouvés augmentés chez les patients SLA. Ainsi, le sérum d'un quart des patients SLA sporadiques et familiaux contient des niveaux anormaux d'anticorps anti-Fas (Sengun & Appel, 2003). Le récepteur Fas lui-même est augmenté dans les cornes ventrales de la moelle épinière des patients SLA (de la Monte *et al.*, 1998). Une expression plus intense de nNOS et de la phospho-p38 a également été observée dans la moelle épinière des patients SLA (Phul & Smith, 2000; Catania *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2001; Bendotti *et al.*, 2004).

Enfin, l'implication de cette voie Fas dans la maladie a pu être mise en évidence *in vivo* en inhibant l'expression de certains de ses composants chez les souris SOD1^{G93A}. Deux études se sont intéressées à cibler Fas. La première étude a consisté à croiser des souris SOD1^{G93A} avec des souris FasL^{gld} homozygotes, présentant une mutation ponctuelle aboutissant à une perte de fonction de la protéine. Les résultats obtenus sont modestes mais significatifs, les souris SOD1^{G93A}/FasL^{gld} affichant une meilleure résistance au test moteur du rotarod, une extension de la survie de sept jours et une perte de motoneurons plus faible (Petri *et al.*, 2006). Dans la seconde étude, des ARN interférents ciblant le messenger de Fas sont injectés en intrathécal au moment du déclenchement de la maladie, à l'aide d'une mini-pompe osmotique qui permet une libération régulière du produit pendant un mois. Ces travaux sont particulièrement intéressants car ils s'inscrivent d'une manière appliquée dans le cadre d'une approche thérapeutique. Les souris transgéniques modèles de la SLA injectées avec un ARN interférent ciblant Fas présentent une diminution de la mort des motoneurons, un retard dans le déclenchement de la maladie, mais peu d'effet sur sa progression. Les auteurs mettent en cause la limitation de leur système qui ne peut délivrer les ARN interférents que pendant quatre semaines (Locatelli *et al.*, 2007). Dans ces deux études, une diminution des composants de la voie Fas/NO lorsque Fas est inhibé a également été mise en évidence. Les deux voies de mort identifiées représentent deux processus de mort des motoneurons. La voie Fas implique un processus cellulaire-autonome, la présence même de la SOD1 mutée dans le motoneuron conduisant à une sensibilité accrue à la voie de mort Fas/NO et à une boucle d'amplification du système. La voie LIGHT, au contraire, dépend plus d'une toxicité

induite par la présence de SOD1 mutée dans les astrocytes qui sécrètent de l'IFN γ et sensibilisent les motoneurones à la mort par LIGHT. Ces deux voies sont ainsi complémentaires et leur activation simultanée conduit à un effet additif, aboutissant à la mort d'environ 70% de motoneurones *in vitro* (Aebischer *et al.*, 2011). Les nombreux travaux *in vivo* et chez les patients SLA ont démontré l'implication de la voie Fas dans la maladie, confirmant que le modèle *in vitro* des motoneurones en culture constitue une bonne approche expérimentale dans l'étude de la SLA.

V - Les mitochondries

A - Présentation générale

Les mitochondries (du grec *mitos* : fil et *chondros* : grain) sont des organites présents à l'intérieur des cellules eucaryotes, dont la taille est de l'ordre du micromètre. Leur rôle physiologique est primordial puisque c'est dans les mitochondries que l'énergie fournie par les molécules organiques est récupérée sous forme d'ATP (énergie contenue dans la liaison phosphate – phosphate), la source principale d'énergie pour la cellule eucaryote par le processus de phosphorylation oxydative.

1 - Origine et historique

Selon la théorie endosymbiotique énoncée par Margulis (1966), l'endosymbiose d'une α -protéobactérie dans les cellules eucaryotes primitives, il y a environ deux milliards d'années, serait à l'origine des mitochondries. Cette hypothèse a été suggérée grâce à la découverte de similarités biochimiques et génétiques entre les bactéries et les mitochondries et notamment grâce aux études portant sur l'ADN mitochondrial, dès 1980, suggérant que ce dernier dériverait du génome procaryote primitif. Il semble qu'au cours de l'évolution, l'ADN originel de la bactérie ait subi diverses évolutions, perdu un grand nombre de gènes, parfois transférés dans l'ADN de la cellule hôte. Parallèlement à ce report de la synthèse de certaines protéines vers l'hôte, ce dernier a développé un arsenal enzymatique (translocases) permettant le transfert de ces protéines vers la matrice mitochondriale.

La découverte des mitochondries est attribuée à Kölliker, en 1857. Il décrivit pour la première fois leur morphologie dans le tissu musculaire. La présence de ces organites dans toutes les cellules fut démontrée en 1890 par Altmann qui mit au point une technique de coloration des mitochondries et suggéra leur autonomie métabolique et génétique. En 1937, Krebs construisit un modèle métabolique siégeant dans la mitochondrie chez les eucaryotes. Il l'appela cycle de l'acide citrique. L'isolement de mitochondries fut réalisé pour la première fois par Claude en 1940, qui effectua un fractionnement cellulaire à partir de cellules hépatiques. Cette technique fut ensuite améliorée par Hogeboom et Schneider qui utilisèrent du sucrose isotonique pour préserver l'intégrité et la morphologie mitochondriale. Ceci permit d'observer la structure mitochondriale au microscope électronique et ainsi de les décrire comme des organites délimités par deux membranes, la membrane interne présentant des invaginations appelées crêtes.

En 1948, Kennedy et Lehninger démontrèrent que le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs, la β -oxydation des acides gras et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) ont lieu dans la mitochondrie.

En 1978, Peter Mitchell obtint le Prix Nobel pour la théorie chimio-osmotique postulant que le couplage entre la chaîne d'oxydo-réduction et le mécanisme de phosphorylation repose sur la formation d'un gradient de protons à travers la membrane interne servant de réservoir d'énergie pour la synthèse d'ATP. La structure génétique de l'ADN mitochondrial humain fut découverte en 1981, par Andersen et la première mutation pathogène fut identifiée par Wallace en 1988. Enfin, Boyer et Walker obtinrent le Prix Nobel en 1997 pour leurs travaux sur la structure et le fonctionnement de l'ATP synthase.

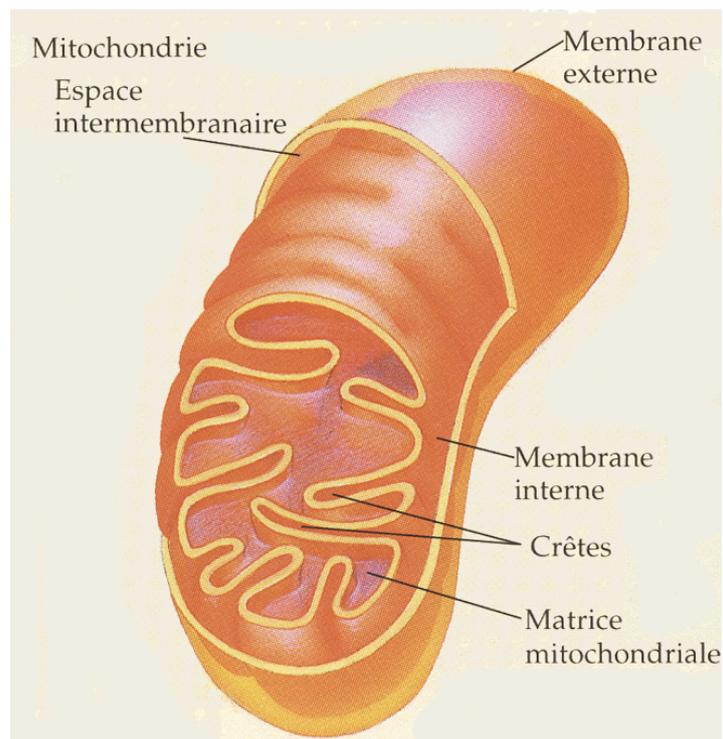


Figure 17 : Schéma général d'une mitochondrie

2 - Structure

Les mitochondries sont des organites retrouvés dans la plupart des cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes. Elles mesurent entre 0,5 et 1 μm de diamètre et peuvent atteindre plus de 10 μm de long. Les mitochondries sont constituées d'une membrane externe et d'une membrane interne, délimitant deux compartiments, l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale. Les études de tomographie électronique ont révélé l'existence d'un

compartiment supplémentaire constitué par la fermeture des crêtes mitochondriales au niveau de leur collet ainsi que la très grande variabilité de la structure interne des mitochondries en fonction de leur état métabolique (Mannella *et al.*, 2001).

La membrane externe constitue une membrane semi-perméable aux ions et aux petites molécules, ce qui fait que l'espace inter-membranaire a une composition proche de celle du cytoplasme. Cette perméabilité est assurée en partie par la présence d'une protéine formant un canal transmembranaire, VDAC (« Voltage Dependent Anion Channel »). Cette protéine permet le passage des molécules d'une taille inférieure à 10 kDa (anions, cations, acides gras, pyruvate et nucléotides). Les molécules dont la taille est supérieure à 10 kDa, lorsqu'elles possèdent un signal d'adressage mitochondrial, sont prises en charge par les complexes d'importation TOM et TIM (« Translocase of the Outer Membrane » ; « Translocase of the Inner Membrane »), localisés au niveau d'une zone d'accolement entre les membranes externe et interne. La membrane interne a une composition qui diffère des autres membranes biologiques avec environ 80% de protéines pour seulement 20% de phospholipides. De plus, sa composition lipidique est particulière puisqu'elle est riche en cardiolipine. Ainsi, la membrane interne est beaucoup moins perméable que la membrane externe et constitue une barrière sélective entre la matrice et l'environnement cytosolique. Le passage des molécules nécessite donc la présence de transporteurs tels que le transporteur des nucléotides adényliques (ANT), qui réalise l'échange ATP/ADP entre le cytosol et la matrice mitochondriale, le transporteur du phosphate inorganique (PiC), le transporteur du pyruvate, la navette glycérol-3-phosphate et la navette malate-aspartate. La membrane interne s'invagine et forme des crêtes mitochondriales qui permettent d'augmenter la surface membranaire. Elle contient la machinerie enzymatique des phosphorylations oxydatives (OXPHOS) qui assure la synthèse mitochondriale d'ATP. La matrice mitochondriale contient l'ADN mitochondrial ainsi que les éléments nécessaires à sa réplication et son expression. C'est également le siège de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras.

La forme et le nombre de mitochondries par cellule dépendent du type cellulaire et des besoins énergétiques. De plus, au sein des cellules, les mitochondries ne sont pas isolées mais forment un réseau dynamique qui subit des phénomènes de fusion et de fission très régulés (Karbowski & Youle, 2003).

3 - Fission Mitochondriale et Fusion Mitochondriale

L'hétérogénéité de la morphologie des mitochondries peut être expliquée par leur nature dynamique (Liesa *et al.*, 2009). La forme globale du réseau mitochondrial est régie par des phénomènes de fusion et fission (Hales, 2004; Frazier *et al.*, 2006; Cervený *et al.*, 2007). Chez les mammifères, la fission des mitochondries est réalisée principalement par Drp1 («Dynamamin-related protein 1»), et la fusion des mitochondries par l'intermédiaire de la mitofusine 2 (Mfn2) et d'OPA 1 («Dynamamin-related guanosine triphosphate mutated in dominant optic atrophy»). Ces processus sont régulés et coordonnés en fonction des différents stades cellulaires, notamment la croissance, la mitose et l'apoptose (Cervený *et al.*, 2007). Le lien entre l'activité métabolique des mitochondries et les processus de fission et fusion reste ambigu. Il a été montré qu'une perturbation du réseau dynamique mitochondrial, *via* une perturbation des processus de fission et de fusion, entraîne une diminution de la production d'énergie mitochondriale, ce qui suggère que la dynamique mitochondriale peut elle-même contrôler le métabolisme mitochondrial (Liesa *et al.*, 2009). Des défauts dans les processus de fission et de fusion sont associés dans les cellules humaines à une altération de la respiration mitochondriale (Benard *et al.*, 2011). L'équilibre entre ces deux processus opposés semble majeur pour maintenir les propriétés fonctionnelles des mitochondries. Pich et collaborateurs (Pich *et al.*, 2005b), ont démontré que l'hyperfusion du réseau mitochondrial *via* une suractivation de Mfn2 augmentait l'oxydation du glucose et le potentiel membranaire mitochondrial, tandis que la perte de fonction de Mfn2 entraînait le phénomène inverse, à savoir une diminution de l'oxydation du glucose et du potentiel membranaire, par une répression de certaines sous-unités des complexes OXPHOS. Une autre étude a montré que le blocage de la fission mitochondriale, par l'inhibition de l'expression de Drp1, entraîne une perte d'ADN mitochondrial ainsi qu'une diminution de la respiration couplée à une augmentation de la production d'espèces oxygènes réactives (ROS). Au niveau cellulaire, ces altérations mitochondriales dues à un manque de fission, mènent à une chute du niveau d'ATP cellulaire, à une inhibition de la prolifération des cellules et à une augmentation de l'autophagie (Parone *et al.*, 2008). Enfin, il est intéressant de noter que le déplacement des mitochondries dans l'axone des neurones se fait grâce aux phénomènes de fission et de fusion, ce qui permet aux mitochondries de se rendre dans les zones de forte demande énergétique (Hollenbeck & Saxton, 2005; Saxton & Hollenbeck, 2012).

4 - Le transport mitochondrial

(Figure 18)

La mobilité mitochondriale est indissociable des phénomènes de fission et de fusion. Le transport mitochondrial permet de répartir le réseau mitochondrial au niveau des sites sub-cellulaires les plus demandeurs en ATP. Il joue un rôle très important dans les cellules hautement polarisées tels que les neurones.

Dans les neurones, deux principaux types de transport ont été décrits. Le transport antérograde s'effectue du corps cellulaire vers les terminaisons axonales tandis que le transport rétrograde s'effectue dans le sens inverse. La migration des mitochondries semble dépendante de leur fonction énergétique puisqu'il a été montré que les mitochondries dépolarisées sont surtout transportées dans le sens rétrograde alors que celles dont le potentiel de membrane est maintenu sont transportées dans le sens antérograde (Miller & Sheetz, 2004).

Ainsi, le transport antérograde interviendrait pour apporter des mitochondries à leur site d'action tandis que le transport rétrograde permettrait le retour des organites au niveau du corps cellulaire pour leur dégradation et leur recyclage.

Le transport des mitochondries fait intervenir l'architecture du cytosquelette et plus particulièrement les microtubules. Deux grandes familles de protéines motrices, les dynéines et les kinésines, forment de petits moteurs moléculaires qui tractent les mitochondries le long des microtubules. Les kinésines sont classiquement décrites comme étant impliquées dans le transport antérograde, alors que les dynéines interviendraient dans le transport rétrograde. Cependant, il semble y avoir une interdépendance entre ces protéines et entre les deux types de transport (Ligon *et al.*, 2004). Les kinésines et les dynéines sont capables d'hydrolyser l'ATP pour permettre leur déplacement le long des microtubules. Deux membres de la famille des kinésines, KIF1B (Nangaku *et al.*, 1994) et KIF5B (Tanaka *et al.*, 1998) sont plus particulièrement impliqués dans le transport des mitochondries. L'interaction des mitochondries avec les protéines motrices se fait par l'intermédiaire de protéines adaptatrices. La syntabuline est associée à la membrane externe mitochondriale par son extrémité carboxy-terminale et permet l'accrochage des mitochondries à KIF5B. L'inhibition de l'expression de la syntabuline ou de son interaction avec KIF5B affecte le transport antérograde mitochondrial, mais n'a pas d'effet sur le transport rétrograde (Cai *et al.*, 2005b). La protéine KBP (« Kinesin Binding Protein ») est également impliquée dans le transport mitochondrial antérograde par son interaction avec la kinésine KIF1B (Wozniak *et al.*, 2005). Chez les mammifères, les protéines adaptatrices les mieux caractérisées sont les protéines Milton et

Miro. Milton s'associe à la chaîne lourde des kinésines pour former un complexe dans lequel la chaîne légère n'est pas retrouvée (Glater *et al.*, 2006). Bien que cette protéine ne présente pas de séquence d'adressage mitochondrial, elle est localisée à la mitochondrie. Des expériences de criblage double-hybride chez la levure (Giot *et al.*, 2003) ou de co-immunoprécipitation dans les lignées cellulaires de rein COS7 et HEK293T (Glater *et al.*, 2006) ont montré une interaction entre la protéine Milton et une protéine de la membrane externe mitochondriale, Miro. La délétion du domaine membranaire de Miro conduit à la localisation cytosolique du complexe Milton-Miro. En plus de sa fonction d'adaptateur, Miro semble jouer un rôle de régulateur du transport mitochondrial puisqu'elle possède une activité GTPase, deux sites de fixation au GTP et deux motifs de fixation du calcium (Rice & Gelfand, 2006). Il a d'ailleurs été montré que le calcium intervient dans la régulation du transport mitochondrial, puisque l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium dans des myocytes cardiaques diminue le transport mitochondrial (Yi *et al.*, 2004).

Les filaments d'actine sont majoritairement impliqués dans le transport mitochondrial chez la levure mais interviennent également chez les mammifères en assistant les microtubules pour les migrations de courte distance (Hollenbeck & Saxton, 2005; Saxton & Hollenbeck, 2012). Les myosines sont des protéines motrices impliquées dans ce type de transport. Les microfilaments d'actine sont également impliqués dans l'immobilisation des mitochondries au niveau de leur site d'action. La latrunculine B, un inhibiteur chimique de la polymérisation des filaments d'actine, inhibe l'accumulation des mitochondries induite par la présence de microbilles libérant le NGF, facteur de croissance neuronale (Chada & Hollenbeck, 2004). Cependant, les filaments intermédiaires interviendraient également en interagissant directement ou indirectement avec les mitochondries, les dissociant des réseaux d'actine et de tubuline (Anesti & Scorrano, 2006).

Il semble y avoir des connexions entre le transport mitochondrial et les phénomènes de fusion et de fission. En effet, les dynéines contribuent à la localisation mitochondriale de la protéine Drp1 impliquée dans la fission. L'altération de la fonction des dynéines dans les cellules HeLa empêche la localisation mitochondriale de Drp1 et conduit à la formation de longs tubules mitochondriaux et à une accumulation péri-nucléaire des mitochondries (Varadi *et al.*, 2004a; Varadi *et al.*, 2004b).

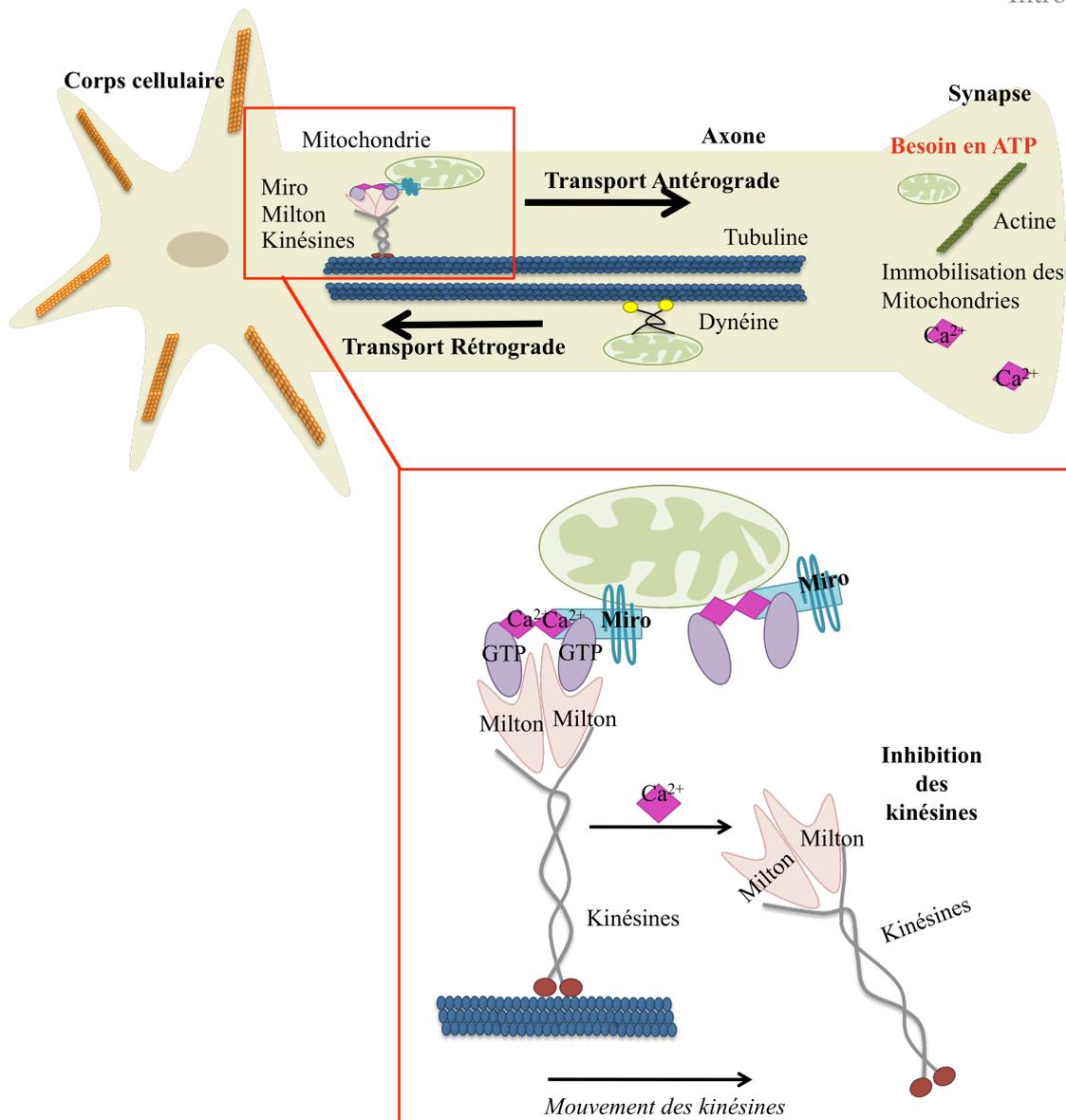


Figure 18 : Organisation du transport axonal mitochondrial

Les mitochondries sont transportées le long des microtubules dans le sens antérograde par les kinésines et dans le sens rétrograde par les dynéines. Leur interaction avec ces deux types de protéines motrices se fait par l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles que Milton et Miro. Le transport mitochondrial est inhibé par le calcium au niveau des filaments d'actine, ce qui permet l'immobilisation des mitochondries dans les zones de fort besoin en ATP (synapses, cônes de croissance). *D'après (Guillet, 2009).*

B - La fonction énergétique mitochondriale

Les mitochondries sont des organites impliqués dans un grand nombre de voies métaboliques et de processus physiologiques tels que la β -oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, la synthèse des hormones stéroïdes, certaines étapes de la néoglucogenèse, du cycle de l'urée et de la synthèse de l'hème, la thermogénèse, l'homéostasie calcique, la production de ROS et

l'apoptose. Cependant, leur principale fonction consiste à produire de l'ATP, molécule énergétique utilisable par la cellule. Cette production d'énergie se fait par le système des phosphorylations oxydatives qui se déroulent au niveau de la membrane interne mitochondriale.

1 - Les phosphorylations oxydatives

a) Fonctionnement

Les phosphorylations oxydatives (Figure 19) assurent la production d'ATP (environ 70 kg par jour pour un homme au repos) à partir de l'oxygène et des nutriments. Le catabolisme des glucides, acides gras et acides aminés va permettre la réduction de coenzymes, le NAD^+ et le FAD. Les équivalents réduits sous forme de $\text{NADH} + \text{H}^+$ et FADH_2 vont être fournis à une chaîne d'oxydoréduction constituée de quatre complexes protéiques :

- le complexe I : NADH-Ubiquinone Oxydoréductase
- le complexe II : Succinate-Ubiquinone Oxydoréductase
- le complexe III : Ubiquinone-Cytochrome c Oxydoréductase
- le complexe IV : Cytochrome c Oxydase

et de deux transporteurs d'électrons mobiles, l'ubiquinone et le cytochrome c. Ces coenzymes réduits sont alors réoxydés par transfert de leurs électrons le long de cette chaîne vers un accepteur final, l'oxygène moléculaire (O_2). Le NADH cède ses électrons au complexe I et le FADH_2 au complexe II. Les électrons sont ensuite transportés par l'ubiquinone jusqu'au complexe III. Finalement, les électrons sont pris en charge par le cytochrome c (Cyt c) puis libérés au niveau du complexe IV, où ils sont utilisés pour la réduction de l'oxygène en eau (H_2O). Ce transfert d'électrons repose donc sur une série de réactions d'oxydoréduction au niveau de la chaîne respiratoire où les électrons vont transiter du composé ayant le plus faible potentiel redox (NAD^+) vers des molécules à plus fort potentiel pour arriver jusqu'à l'oxygène ayant le potentiel le plus élevé (Figure 20).

Le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage de protons dans la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire au niveau des complexes I, III et IV. Ce mouvement de protons crée un gradient de pH (la matrice devient plus basique) et engendre un potentiel de membrane (la face matricielle de la membrane interne est chargée négativement) au travers de la membrane interne d'environ -180 mV.

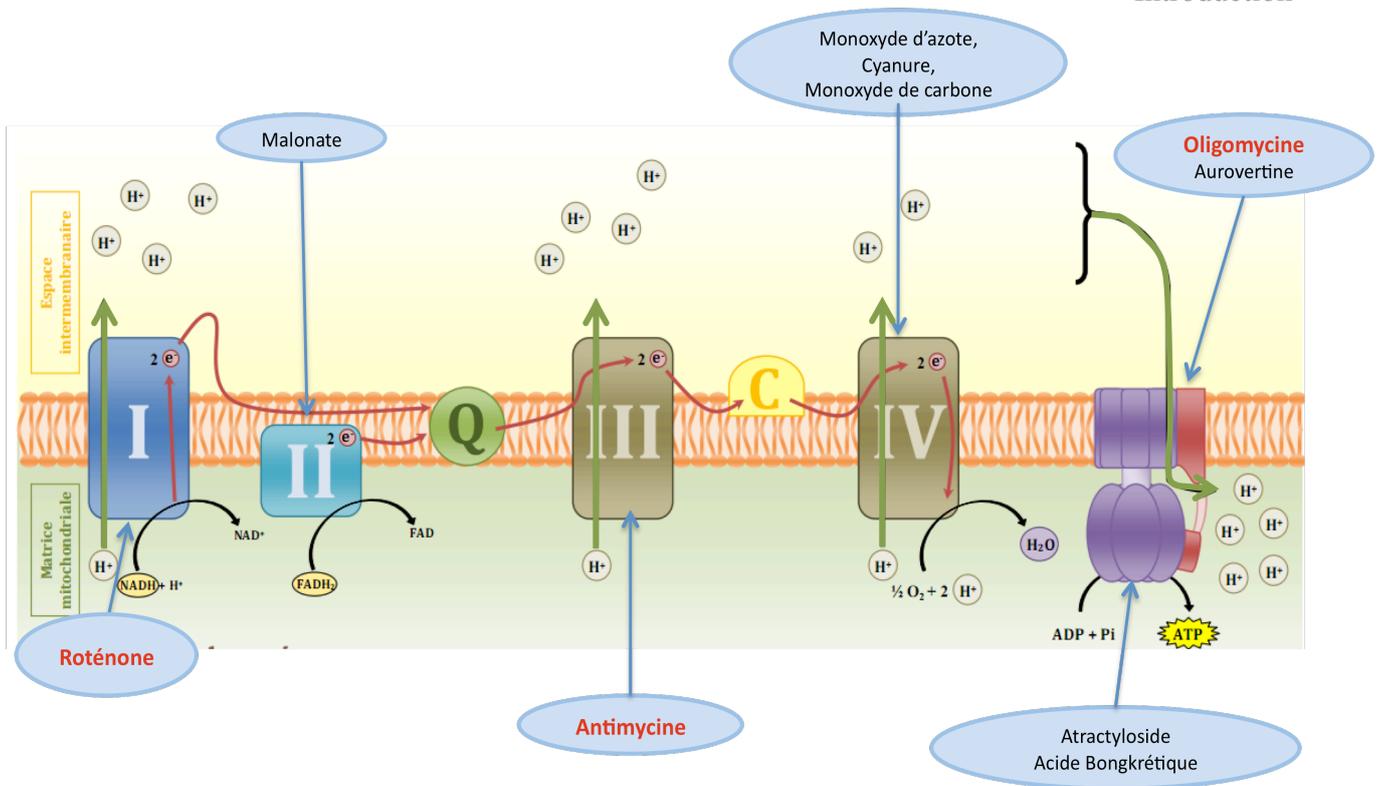


Figure 19 : Les phosphorylations oxydatives.

Le système des phosphorylations oxydatives est constitué de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexes I à IV) et du complexe de phosphorylation, l'ATP synthase. La dégradation des nutriments permet la formation d'équivalents réduits qui vont fournir leurs électrons à la chaîne respiratoire. Ces derniers seront transportés du complexe I au complexe IV pour réduire l'oxygène en eau. Ce transport d'électrons s'accompagne, au niveau des complexes I, III et IV, d'un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire à l'origine de la formation d'un gradient de protons et d'une force protonmotrice. Cette force est utilisée par l'ATP synthase pour synthétiser l'ATP. Il y a donc un couplage entre oxydation et phosphorylation à la base de la théorie chimio-osmotique énoncée par Mitchell en 1961.

Les flèches rouges représentent le trajet des électrons et les vertes celui des protons.

La résultante de ces deux forces constitue un gradient électrochimique de protons, la force protonmotrice, qui permet le retour des protons dans la matrice au travers du complexe F_0-F_1 ATP synthase (aussi appelé complexe V), et ainsi la phosphorylation de l'ADP en ATP. Ce couplage entre l'oxydation des substrats et la synthèse d'ATP par la force protonmotrice est la base de la théorie chimio-osmotique émise par Mitchell en 1961 (Mitchell, 1961).

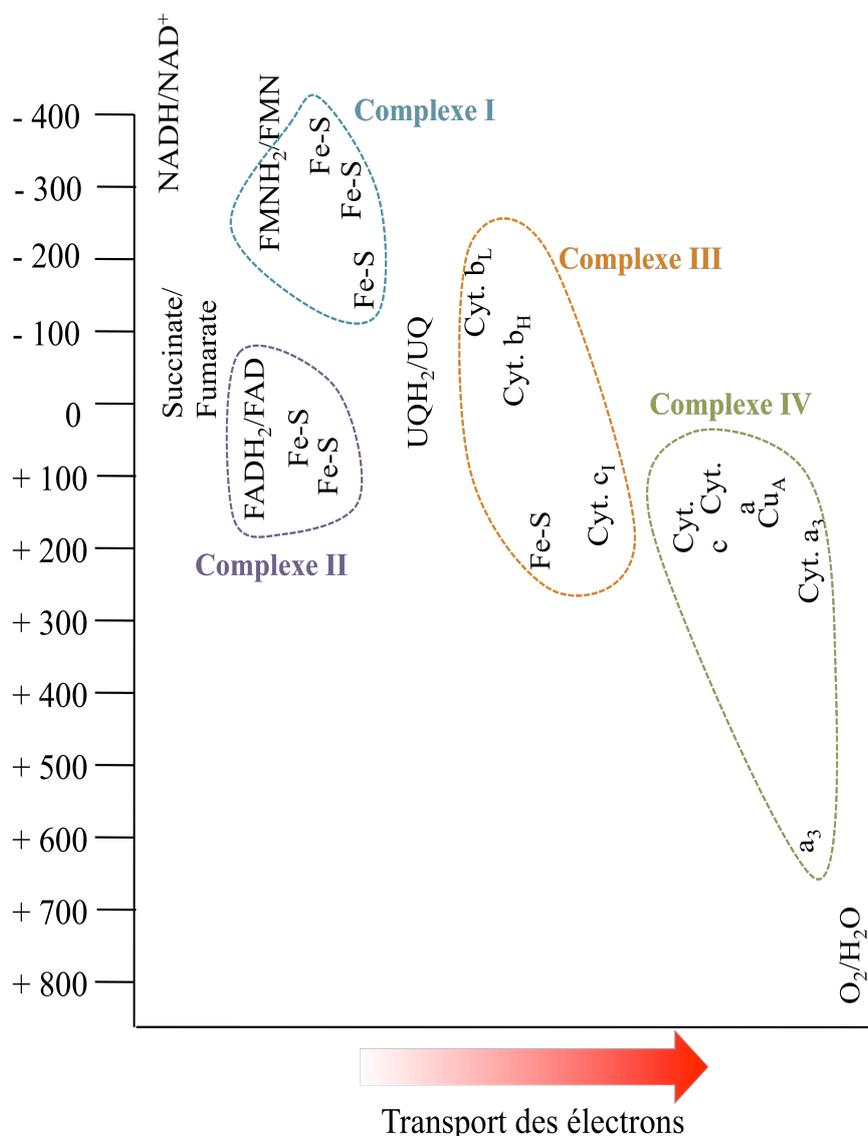


Figure 20 : Potentiels d'oxydoréduction des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale

Le transport d'électrons se fait au travers de protéines ayant un potentiel d'oxydoréduction croissant. L'énergie libérée par les électrons lors des réactions catalysées par les complexes I, III et IV est utilisée pour transporter les protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. En effet, il y a une chute du potentiel redox importante au niveau des composés des complexes I, III et IV qui n'est pas retrouvée au niveau du complexe II. Le couple redox de chaque cytochrome est le couple $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ du groupement prosthétique hémunique. UQ : ubiquinone, Fe-S : centres fer/soufre, Cyt. : cytochrome.

b) Composition

Le système des phosphorylations oxydatives est constitué d'une chaîne d'oxydo-réduction et d'un complexe de phosphorylation. Les treize gènes de l'ADNmt ne codent que 16% de la totalité des constituants de ce système. Ainsi, les soixante-seize sous-unités restantes sont

codées par le génome nucléaire et transférées à la mitochondrie grâce à une séquence d'adressage spécifique à la localisation mitochondriale.

La chaîne respiratoire mitochondriale

Elle est constituée de quatre complexes enzymatiques enchâssés dans la membrane interne de la mitochondrie et des deux transporteurs d'électrons mobiles, l'ubiquinone (ou coenzyme Q) et le cytochrome c (Figure 19).

le complexe I : NADH-Ubiquinone Oxydoréductase

Le complexe I est le plus gros des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale avec une masse moléculaire d'environ 980 kDa. Il est composé de 45 sous-unités dont 38 sont codées par le génome nucléaire et 7 par le génome mitochondrial (Carroll *et al.*, 2006). L'assemblage de ces sous-unités constitue deux domaines majeurs. Le domaine hydrophile, codé par le génome nucléaire, contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide et huit ou neuf centres fer/soufre constituant le centre catalytique de l'enzyme. Le domaine hydrophobe est constitué de sept sous-unités NADH déshydrogénase (ND) codées par le génome mitochondrial et contient le site de réduction des quinones et la machinerie de pompage des protons. Ce complexe catalyse le transfert des électrons du NADH vers l'ubiquinone par l'intermédiaire de la flavine mononucléotide et des centres fer/soufre. Pour chaque paire d'électrons transférée, quatre protons sont pompés de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. L'inhibiteur du complexe I habituellement utilisé est la roténone. Elle agit au niveau du domaine hydrophobe du complexe, vraisemblablement au niveau du site de fixation de l'ubiquinone (Degli Esposti, 1998).

le complexe II : Succinate-Ubiquinone Oxydoréductase

Le complexe II a une masse moléculaire d'environ 200 kDa. Il est composé de quatre sous-unités codées par le génome nucléaire. Les sous-unités succinate déshydrogénase (SDH) A et B constituent le domaine hydrophile localisé dans la matrice mitochondriale tandis que les sous-unités SDH C et D permettent d'ancrer le complexe à la membrane interne (Figure 21). Ce complexe catalyse l'oxydation du succinate en fumarate. Bien que la réaction inverse soit rare chez l'homme, elle a été mise en évidence dans des conditions d'hypoxie, où elle semble jouer un rôle dans la production d'espèces oxygènes réactives (ROS) dans les vaisseaux pulmonaires (Paddenberg *et al.*, 2003). La sous-unité SDH A contient un groupement prosthétique FAD (flavine adénine dinucléotide) et fixe les substrats (succinate et fumarate)

ainsi que les régulateurs physiologiques (oxaloacétate et ATP). Les électrons sont ensuite transférés de la SDH A vers les centres fer/soufre au niveau de la sous-unité SDH B puis vers les sous-unités SDH C (CybL) et D (CybS) et enfin vers l'ubiquinone.

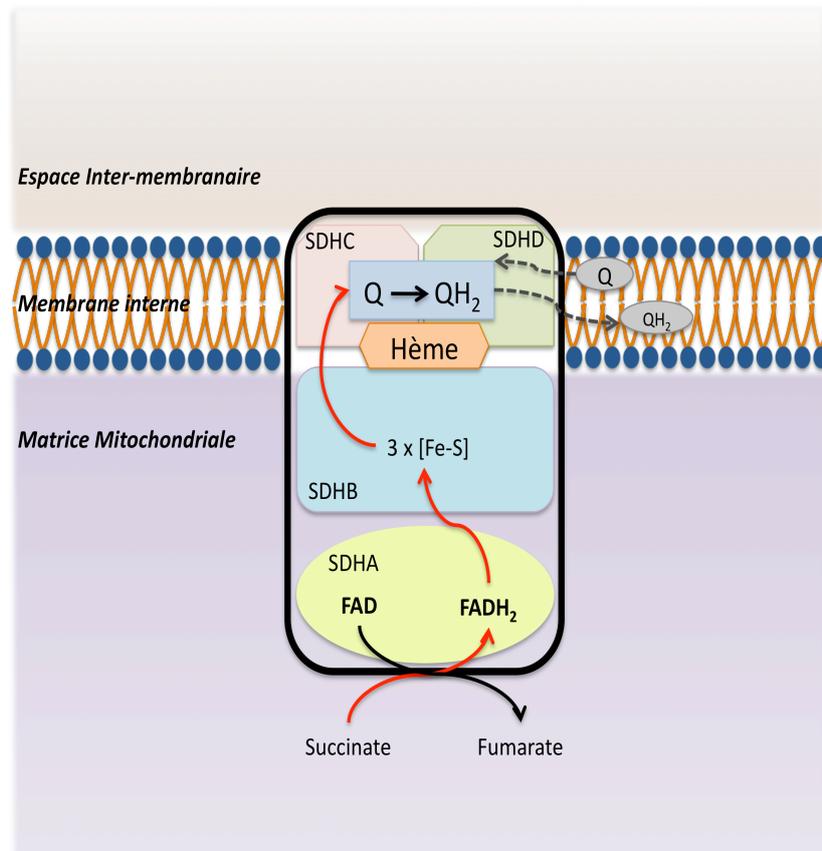


Figure 21 : Structure du complexe II : Succinate-Ubiquinone Oxydoréductase

La sous-unité SDHA qui contient un groupement prosthétique FAD fixe le succinate et transfère les électrons vers les centres fer/soufre au niveau de la sous-unité SDHB. Les électrons sont ensuite dirigés vers les sous-unités SDHC et SDHD où l'ubiquinone sera réduite. Les sous-unités SDHA et SDHB portent donc l'activité succinate déshydrogénase (SDH) du complexe tandis que l'ensemble du complexe porte l'activité succinate-ubiquinone réductase (SUR).

Le trajet des électrons est représenté en rouge. Q : ubiquinone, QH₂ : ubiquinol, Fe-S : centres fer/soufre. *D'après (Guillet, 2009).*

Ce complexe présente certaines particularités par rapport aux autres complexes de la chaîne respiratoire. Il ne transloque pas de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire mais joue un rôle important dans la mitochondrie puisqu'il fait partie à la fois de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. De plus, ce complexe est capable de contrôler l'état d'oxydo-réduction du pool de quinones et ainsi d'avoir une action pro- ou antioxydante

(Rustin *et al.*, 2002). Ce complexe est également le seul à pouvoir fonctionner lorsque le statut redox de la chaîne respiratoire est fortement réduit (Briere *et al.*, 2005). Des défauts d'activité de ce complexe ont été corrélés au développement de pathologies neurodégénératives telles que l'ataxie de Friedreich (Rotig *et al.*, 1997), la chorée de Huntington (Butterworth *et al.*, 1985) ou certaines encéphalopathies infantiles rares (Bourgeron *et al.*, 1995). Contrairement aux autres acides organiques pouvant être métabolisés par plusieurs enzymes, le succinate s'accumule lorsque l'activité succinate déshydrogénase (SDH) du complexe II diminue. Ainsi, même des déficits partiels en SDH peuvent être délétères et provoquer des pathologies neurodégénératives (Birch-Machin *et al.*, 2000). Des mutations des gènes codant les sous-unités B, C et D du complexe II sont impliquées dans la tumorigénèse puisqu'elles conduisent au développement de paraganglions et phéochromocytomes, deux types de tumeurs neuroendocrines (Favier *et al.*, 2005). Il a été suggéré que la perte de la capacité antioxydante du pool de quinones suite à l'inactivation de la SDH puisse intervenir dans la formation de ces tumeurs (Rustin & Rötig, 2002). Le complexe II est inhibé par le malonate et le thényltrofluoroacétone (TTFA). Le malonate empêche l'utilisation du succinate et le TTFA inhibe le transfert d'électrons des centres fer/soufre vers l'ubiquinone (Hatefi, 1985).

le complexe III : Ubiquinone-Cytochrome c Oxydoréductase

Le complexe III a une masse moléculaire de 240 kDa. Il est constitué de 11 sous-unités dont trois portent les quatre groupements prosthétiques. Ainsi, les deux cytochromes b (b_L et b_H) sont associés à la sous-unité 3, le cytochrome c1 appartient à la sous-unité 4 et le centre fer/soufre est contenu dans la sous-unité 5. Seule la sous-unité 3 comprenant les cytochromes b est codée par le génome mitochondrial. Ce complexe catalyse le transfert de deux électrons de l'ubiquinol au cytochrome c associé au transfert de quatre protons au travers de la membrane interne. Ce complexe est inhibé par l'antimycine ou le myxothiazol.

le complexe IV : Cytochrome c Oxydase

Le complexe IV a une masse moléculaire d'environ 200 kDa. Il contient treize sous-unités, les cytochromes a (cyt a) et a_3 (cyt a_3) ainsi que deux atomes de cuivre CuA et CuB. Les sous-unités COX I, COX II et COX III sont codées par le génome mitochondrial et forment le site actif du complexe ou centre binucléaire composé d'un noyau hème (cyt a_3) associé à un atome de cuivre (CuB). Ce complexe catalyse le transfert des électrons du cytochrome c vers

l'oxygène et participe, comme les complexes I et III, à la translocation des protons. Les électrons du cytochrome c entrent dans le complexe par le centre CuA et le cyt a et sont transférés au centre binucléaire. Après réduction totale du complexe (4 électrons), l'oxygène se lie au niveau du site actif et est réduit en eau. La réduction du dioxygène en eau consomme quatre protons et l'énergie cédée par les électrons permet de transloquer quatre protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. L'activité de ce complexe est inhibée par le cyanure de potassium (KCN) ou l'azide de sodium (NaN₃).

Le complexe de phosphorylation : l'ATP synthase

Le complexe V (ATP synthase) a une masse moléculaire d'environ 600 kDa. Il est composé de deux sous-complexes F₀ et F₁. Il est également appelé F₀-F₁ ATPase. La partie F₀ est ancrée dans la membrane interne mitochondriale et forme un canal qui permet le passage des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale (Fillingame, 1999). La partie F₀ est composée de cinq sous-unités, les sous-unités a₆, b, c, d et OSCP (« Oligomycin Sensitivity Conferral Protein »). Le domaine catalytique F₁ se trouve dans la matrice mitochondriale au contact de la membrane interne. Il utilise le gradient de protons pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. Ce domaine est composé de cinq types de sous-unités (α_3 , β_3 , δ_1 , γ_1 , ϵ_1). Les sous-unités α et β sont agencées alternativement autour de la sous-unité γ (Abrahams *et al.*, 1994). Des protéines accessoires (e, f, g et F6) sont associées à ce complexe. Les dix sous-unités c du domaine F₀ sont connectées à la sous-unité γ du domaine F₁ et forment un rotor tandis que les sous-unités α , β , a₆, b, d et OSCP forment un stator. Le passage des protons à travers le stator va permettre la rotation des sous-unités c qui entraînent la sous-unité γ . C'est la rotation de cette dernière qui provoque un changement de conformation des sous-unités α et β du domaine F₁ conduisant à la production d'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique (Sambongi *et al.*, 1999). Le domaine catalytique F₁ est également capable d'hydrolyser l'ATP (Wang & Oster, 1998). Dans ce cas, il existe un peptide, IF1, capable de fixer et d'inhiber l'ATP synthase (Corvest *et al.*, 2005). L'activité de ce complexe est inhibée par l'oligomycine.

Une fois synthétisée, l'ATP⁴⁻ matriciel va être échangée contre l'ADP³⁻ cytosolique par le transporteur des nucléotides adényliques (ANT). Ce dernier est localisé dans la membrane interne mitochondriale et est composé de deux monomères de 30 kDa, chacun constitué de 6 hélices α transmembranaires. Chez l'homme, il existe trois isoformes d'ANT codées par trois gènes nucléaires distincts. L'isoforme ANT1 est tissu-spécifique et est majoritairement

exprimée dans les muscles squelettiques et le cœur. L'ANT2 est exprimé dans les cellules en forte prolifération tandis que l'ANT3 est ubiquitaire (Stepien *et al.*, 1992). Comme pour l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire, l'importance physiologique de l'ANT est soulignée par l'existence de myopathies et d'ophtalmoplégies liées à des mutations entraînant un dysfonctionnement de l'ANT (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2006). L'atractyloside est un inhibiteur compétitif de l'ANT tandis que le carboxyatractyloside et l'acide bongkrélique sont des inhibiteurs non compétitifs.

Le canal potassium sensible à l'ATP

Le mK_{ATP} fait partie de la famille des canaux potassiques à rectification entrante (« K^+ inward rectifier »), c'est-à-dire qu'il favorise les flux potassiques entrants par rapport aux flux sortants. Il est inhibé par l'ATP ce qui lui confère un rôle de senseur métabolique. Des canaux K_{ATP} sont également retrouvés à la membrane plasmique des cellules et constituent les K_{ATP} de surface. Ces canaux sont beaucoup mieux caractérisés sur le plan structural que les mK_{ATP} . Ils forment un complexe octamérique composé de sous-unités Kir 6.x (« K^+ inward-rectifying ») et d'un récepteur membranaire aux sulfonyles (SUR) appartenant à la famille des protéines ABC (« ATP-binding cassette »). Ces canaux K_{ATP} furent d'abord découverts au niveau du cœur (Noma, 1983) puis retrouvés dans de nombreux tissus tels que les cellules β -pancréatiques (Rorsman & Trube, 1985), le rein (Hunter & Giebisch, 1988), les muscles lisses et striés squelettiques (Standen *et al.*, 1989), le système nerveux central (Ashford *et al.*, 1988). Ils interviennent dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que la sécrétion d'insuline, l'excitabilité musculaire, cardiaque et neuronale. Les canaux K_{ATP} furent par la suite retrouvés au niveau mitochondrial (Inoue *et al.*, 1991) et plus récemment au niveau nucléaire (Zhuo *et al.*, 2005).

Depuis leur découverte en 1991, de nombreuses études ont permis de caractériser ces canaux K_{ATP} mitochondriaux sur le plan fonctionnel et pharmacologique, mais leur structure exacte n'a toujours pas été clairement établie. Ce canal est donc sujet à controverse malgré les travaux supportant son existence (Foster *et al.*, 2008). Il a été proposé que leur structure soit identique à celle des canaux K_{ATP} de surface. Cependant, aucune sous-unité SUR n'a été localisée sur les mitochondries et malgré la localisation de sous-unités KIR6.1 dans les mitochondries de plusieurs tissus (muscles, foie, cerveau et cœur), leur implication dans le fonctionnement du canal reste discutée (Seharaseyon *et al.*, 2000). Ces canaux ont été découverts grâce à des expériences de patch clamp réalisées sur des mitoplastes

(mitochondries sans membrane externe) de foie de rat. Un courant sélectif aux ions K^+ et inhibable par la présence d'ATP dans la matrice mitochondriale a été identifié. Ce courant possède les mêmes caractéristiques que le courant généré par les canaux K_{ATP} de la membrane plasmique et est bloqué par l'inhibiteur des canaux potassiques 4-aminopyridine (4-AP) et par le glibenclamide (Inoue *et al.*, 1991). Le 5-hydroxydécanoate de sodium (5-HD) est un inhibiteur spécifique des canaux mK_{ATP} tandis que le diazoxide est un activateur.

L'intérêt porté aux mK_{ATP} est surtout lié à leur implication dans le mécanisme de préconditionnement ischémique tant au niveau du cœur (Garlid & Paucek, 2003) que du cerveau (Liu *et al.*, 2003) ou de la rétine (Roth *et al.*, 2006). Ce préconditionnement ischémique correspond au fait qu'une brève ischémie induit une protection endogène qui s'exprime lors d'une ischémie prolongée consécutive, en limitant les effets délétères de cette seconde ischémie. Le rôle du mK_{ATP} dans le préconditionnement a été mis en évidence grâce à l'utilisation de bloqueurs des canaux qui abolissent la protection procurée par le préconditionnement ischémique (Munch-Ellingsen *et al.*, 2000). En revanche, de nombreuses études ont montré que leurs activateurs, notamment le diazoxide, miment les effets du préconditionnement ischémique (Liu *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2002; Ala-Rami *et al.*, 2003). Les signaux impliqués dans l'ouverture des canaux mK_{ATP} conduisent à l'activation de la voie PI3-kinase/Akt et à la phosphorylation de la NO synthase endothéliale (eNOS). Une fois phosphorylée, la eNOS produit du NO, ce qui active la guanylyl cyclase et entraîne la production de GMPc. Ce dernier active ensuite la protéine kinase G (PKG) (Oldenburg *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008). La PKG transmet alors le signal protecteur du cytosol à la membrane interne mitochondriale et ouvre le mK_{ATP} via la protéine kinase C epsilon (PKC ϵ) (Hassouna *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005; Jaburek *et al.*, 2006; Raval *et al.*, 2007).

Le mécanisme de protection induit par l'ouverture du mK_{ATP} n'est pas encore élucidé. Cependant, trois hypothèses majeures ont été proposées (Ardehali & O'Rourke, 2005). L'ouverture du mK_{ATP} provoque la production de ROS (Pain *et al.*, 2000; Forbes *et al.*, 2001). La première hypothèse suggère que l'augmentation des ROS constitue un signal protecteur dépendant des PKC (Oldenburg *et al.*, 2003). La deuxième hypothèse est liée au fait que l'ouverture du mK_{ATP} limite l'accumulation de calcium dans la mitochondrie (Holmuhamedov *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001) et de ce fait, prévient l'ouverture du pore de transition de perméabilité (Murata *et al.*, 2001). Ceci expliquerait l'effet anti-apoptotique du mK_{ATP} . La troisième hypothèse est liée au gonflement de la matrice mitochondriale suite à l'ouverture du mK_{ATP} . Le gonflement matriciel empêcherait la contraction de la matrice,

phénomène délétère pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Kowaltowski *et al.*, 2001) et favoriserait le rapprochement des membranes mitochondriales interne et externe, permettant l'augmentation du transport d'ADP et de la synthèse d'ATP nécessaires à la reperfusion (Garlid, 2000; Dos Santos *et al.*, 2002; Wakahara *et al.*, 2004).

2 - Relation structure – fonction énergétique mitochondriale

Depuis plusieurs années, les premiers éléments concernant le rapport entre la structure du réseau mitochondrial et la fonction énergétique mitochondriale ont été mis en évidence. Les modifications du fonctionnement des phosphorylations oxydatives (OXPHOS) ont des répercussions sur l'architecture mitochondriale. Par exemple, la morphologie des mitochondries subit des modifications en fonction des substrats énergétiques fournis aux cellules (Rossignol *et al.*, 2004). L'inhibition de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase, la modification du potentiel de membrane mitochondrial et la présence de mutations affectant le fonctionnement des OXPHOS influencent également la structure du réseau (Koopman *et al.*, 2005; Benard *et al.*, 2007). La relation structure – fonction mitochondriale a été mise en évidence pour la première fois grâce aux travaux de Hackenbrock montrant que la mitochondrie passe d'une configuration relâchée à une forme condensée, suite à l'activation de la production d'ATP par l'ajout d'ADP (Hackenbrock, 1981). Depuis lors, de nombreux travaux ont permis de clarifier ce lien. Le réseau mitochondrial des cellules de la lignée 143B dépourvues d'ADN mitochondrial (lignées ρ^0) est fragmenté (Gilkerson *et al.*, 2000). C'est également le cas des cellules HeLa ρ^0 . Des modifications du potentiel de membrane mitochondrial ont également été corrélées à une fragmentation du réseau aussi bien lorsqu'il est diminué (Legros *et al.*, 2002; Ishihara *et al.*, 2003; Benard *et al.*, 2007) qu'augmenté en présence d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase (De Vos *et al.*, 2005). L'inhibition chimique de l'activité des complexes I, III et V est également responsable de la fragmentation du réseau (De Vos *et al.*, 2005; Benard *et al.*, 2007).

D'autres éléments viennent compléter ces études. En effet, par des analyses bioénergétiques associées aux modifications de l'expression des gènes impliqués dans les phénomènes de fission-fusion, il a été montré que l'inhibition de l'expression de *MFN2* dans des cellules musculaires de la lignée L6E9 diminue l'oxydation du glucose, le potentiel de membrane mitochondrial et l'expression des complexes I, II, III et V (Bach *et al.*, 2003; Pich *et al.*, 2005a). L'inhibition de l'expression du gène *OPA1* dans les cellules HeLa conduit à une

fragmentation du réseau mitochondrial et à une dissipation du potentiel de membrane mitochondrial (Olichon *et al.*, 2003). De plus, l'inhibition de l'expression de Drp1 dans des cellules HeLa diminue la respiration endogène des cellules et la synthèse d'ATP (Benard *et al.*, 2007). Fait intéressant, il a été montré que la fusion mitochondriale nécessite le maintien du potentiel de membrane mitochondrial (Legros *et al.*, 2002; Ishihara *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces données suggère que la relation entre la structure du réseau mitochondrial et la fonction énergétique mitochondriale est une relation bi-directionnelle.

3 - Régulation des phosphorylations oxydatives

Le système des phosphorylations oxydatives requiert l'expression coordonnée de gènes mitochondriaux et nucléaires. Cette coordination fait intervenir des facteurs de transcription tels que NRF1 et NRF2, et des co-activateurs transcriptionnels, qui régulent l'expression de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales mais également des facteurs impliqués dans la réplication et la transcription mitochondriale. Ces voies de régulations transcriptionnelles ne seront pas développées ici, mais il est important de noter que parmi les co-activateurs, PGC-1 α (« PPAR γ -co-activator 1 ») est un facteur essentiel dans la régulation coordonnée du programme de biogénèse mitochondriale et du métabolisme cellulaire. Une voie de signalisation impliquant ce co-activateur et un membre de la famille des sirtuines, SIRT1, a été mis en évidence (Nemoto *et al.*, 2005). SIRT1 est une désacétylase NAD-dépendante. La désacétylation de PGC-1 α par SIRT1 va augmenter son activité transactivatrice.

En plus de cette régulation transcriptionnelle, les phosphorylations oxydatives sont régulées au niveau de la respiration mitochondriale et du taux de synthèse d'ATP mais également au niveau de l'efficacité de cette synthèse d'ATP.

a) Contrôle de la respiration mitochondriale

Dès les années 1950, les travaux de Chance et Williams ont permis d'établir une relation entre vitesse de respiration et concentration en ADP (Chance & Williams, 1956). La dépendance de la vitesse de consommation d'oxygène vis-à-vis de la disponibilité en ADP et donc de l'utilisation de l'ATP est appelé « contrôle respiratoire ». Ce contrôle permet aux mitochondries d'adapter leur fonctionnement à la demande énergétique cellulaire. Ce mécanisme a été mis en évidence par le fait que la respiration de mitochondries isolées est stimulée en présence d'ADP (état 3) puis diminue au fur et à mesure de la conversion de

l'ADP en ATP. Le rapport de contrôle respiratoire est donc défini par le rapport entre la vitesse de respiration en présence d'ADP et la respiration avant son ajout. En plus du taux d'ADP, d'autres substrats de la chaîne respiratoire mitochondriale exercent un contrôle sur la respiration. Ainsi, le ratio NADH/NAD^+ et la concentration en oxygène ont été montrés comme étant des facteurs importants (Erecinska & Wilson, 1982). D'après le principe selon lequel les étapes fonctionnant au voisinage de l'équilibre thermodynamique sont dépourvues de tout contrôle, il a été proposé que le complexe IV et l'ANT, au niveau desquels se déroulent les étapes les plus limitantes pour le fonctionnement des OXPHOS, soient les sites majeurs de contrôle respiratoire. Cependant, les mécanismes de contrôle des phosphorylations oxydatives sont beaucoup plus complexes et impliquent plusieurs étapes de ce système susceptible de varier en fonction des conditions métaboliques (Groen *et al.*, 1982).

b) Régulation du rendement des phosphorylations oxydatives

Il existe un couplage chimio-osmotique par la force protonmotrice entre la respiration et la phosphorylation mitochondriale (Mitchell, 1961). Ce couplage n'est cependant pas parfait. Il détermine l'efficacité des phosphorylations oxydatives, appréciée par la mesure du rapport entre le taux de synthèse d'ATP et la quantité d'oxygène consommée (ATP/O). L'efficacité peut être diminuée par une baisse de la force protonmotrice liée à une augmentation de la conductance de la membrane interne aux protons (« découplage extrinsèque »), par une baisse d'efficacité des pompes à protons (« découplage intrinsèque ») ou varier en fonction de la nature des substrats fournis à la chaîne respiratoire mitochondriale (Rigoulet *et al.*, 1998).

Le découplage extrinsèque

Le découplage extrinsèque implique tous les mécanismes qui augmentent la perméabilité de la membrane interne aux protons ou aux cations, provoquant ainsi une dissipation du gradient de protons. Dans ces conditions, une partie des protons retourne dans la matrice mitochondriale sans passer par l'ATP synthase et donc sans participer à la synthèse d'ATP. Le gradient de protons est alors dissipé sous forme de chaleur et participe à la thermogénèse. La consommation d'oxygène est donc augmentée afin de compenser cette « fuite de protons » et ainsi maintenir la force protonmotrice. Il existe deux types de fuites de protons : la fuite basale et la fuite inductible.

La fuite de protons basale

La fuite de protons basale est présente dans les mitochondries de tous les tissus et varie selon les espèces (Brand *et al.*, 1991). Elle semble jouer un rôle physiologique très important puisqu'elle représente environ 20% de la respiration cellulaire totale dans les hépatocytes de mammifères (Porter & Brand, 1995). Bien que les causes de cette fuite ne soient pas totalement élucidées, elle semble liée aux propriétés physico-chimiques de la membrane interne. Ainsi, il existe une corrélation entre la perméabilité membranaire aux protons et sa composition lipidique, l'intensité de la fuite étant plus faible en présence d'acides gras mono-insaturés, alors qu'elle croît avec l'index d'insaturation des acides gras composant les phospholipides de la membrane (Porter *et al.*, 1996; Brookes *et al.*, 1998). Il a été montré que la fuite basale est proportionnelle à la quantité de cardiolipines (Bobyleva *et al.*, 1997). La surface de la membrane mitochondriale interne est également un paramètre déterminant l'intensité de la fuite, puisque cette dernière augmente avec la surface membranaire (Brand *et al.*, 1992). En plus des propriétés physico-chimiques de la membrane, l'hypothèse que des protéines soient impliquées dans la fuite basale a été émise. Une étude réalisée chez la levure a permis de montrer que l'inactivation de 21 des 35 transporteurs de la membrane interne n'a pas d'influence sur la fuite de protons (Roussel *et al.*, 2002). Cependant, il a ensuite été démontré que la quantité d'ANT influence l'intensité de la fuite de protons indépendamment de son activité de transport d'ADP et d'ATP. En effet, la conductance de la membrane interne aux protons est diminuée de 50% dans le muscle de souris knockout ANT^{-/-}. Inversement, la surexpression de l'ANT chez la drosophile augmente la conductance aux protons, même lorsque son activité est inhibée par le carboxyatractyloside (Brand *et al.*, 2005). Enfin, il a été montré qu'une partie de la fuite basale de protons des mitochondries du tissu adipeux brun est liée à l'ANT et que l'ANT1 serait responsable de cette fuite (Shabalina *et al.*, 2006).

La fuite de protons inductible :

La fuite de protons inductible est liée à la présence, dans la membrane interne, de protéines qui catalysent la translocation de protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. A la différence de la fuite de protons basale, elle n'est présente que dans les mitochondries de certains tissus. Cette fuite de protons inductible a initialement été décrite dans le mécanisme de thermogénèse du tissu adipeux brun, par la présence de la protéine UCP1 (Uncoupling Protein 1) (Nicholls & Locke, 1984). Des isoformes UCP2 à 5 ont par la suite été identifiées sur la base de leur homologie avec UCP1 (Boss *et al.*, 1997; Fleury *et al.*, 1997; Sanchis *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 1999). Les UCPs sont régulées au niveau

transcriptionnel mais également au niveau de leur activité. Il a d'ailleurs été montré des divergences entre le contenu en ARNm et en protéine (Pecqueur *et al.*, 2001). Les acides gras sont des activateurs du découplage induit par les UCPs alors que les nucléotides phosphate l'inhibent. Cependant, le mode d'action de la protéine UCP1 n'a pas encore été clairement établi. Cette protéine fonctionnerait soit comme un canal protonique prenant en charge le proton grâce à un acide gras ionisé (Klingenberg, 1999; Klingenberg *et al.*, 1999; Rial *et al.*, 2004), soit comme un transporteur d'acides gras anioniques prenant en charge un proton, ce dernier leur permettant de franchir la bicouche lipidique dans l'autre sens (Skulachev, 1991; Jezek *et al.*, 1994; Breen *et al.*, 2006). Les UCP 2 et 3 possèdent une activité comparable à celle d'UCP1 (Jaburek *et al.*, 1999). Elles interviennent dans le transport de protons activé par les acides gras et inhibé par les nucléotides phosphates (Echtay *et al.*, 2001; Jaburek & Garland, 2003). De plus, leur surexpression chez la levure induit un découplage partiel qui se traduit par une baisse du potentiel de membrane mitochondrial (Fleury *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999). Cependant, d'autres études montrent qu'il n'y a pas de relation entre l'expression de ces protéines et un découplage des OXPHOS (Stuart *et al.*, 2001; Cadenas *et al.*, 2002; Hesselink *et al.*, 2003). Il a donc été suggéré que leur implication dans le découplage soit liée à leur surexpression dans des proportions supérieures aux niveaux physiologiques. Ce rôle reste donc à être démontré *in vivo*. De plus, contrairement à UCP1, les protéines UCP2 et 3 ne semblent pas impliquées dans la thermogénèse (Arsenijevic *et al.*, 2000; Vidal-Puig *et al.*, 2000). En revanche, de nombreuses études montrent un rôle de ces protéines dans la régulation de la production de ROS. Ce rôle est basé sur le fait qu'un découplage léger entraînant une faible diminution du potentiel membranaire mitochondrial diminue fortement la production de ROS sans affecter la production énergétique (Starkov, 2006). Ce rôle a d'abord été mis en évidence pour la protéine UCP 2 (Negre-Salvayre *et al.*, 1997). Par la suite, il a été montré que l'inactivation des gènes UCP 2 et 3 chez la souris knockout augmente la production des ROS (Arsenijevic *et al.*, 2000; Vidal-Puig *et al.*, 2000). Finalement, il a été proposé que la régulation des ROS par les UCPs fonctionne par rétrocontrôle négatif, les ROS activant les UCP 2 et 3 qui vont en retour limiter leur production (Brand *et al.*, 2004). Il a d'ailleurs été montré que l'augmentation du taux d'anions superoxyde endogènes stimule la peroxydation des lipides et conduit à la production de 4-hydroxynonanal, activateur des UCP 2 et 3 (Echtay & Brand, 2007).

D'autres protéines ont été impliquées dans la fuite de protons inductible. Le rôle de l'ANT a été mis en évidence pour la première fois en 1990 dans des mitochondries de foie

(Brustovetsky *et al.*, 1990). Il a récemment été montré qu'une partie de la fuite de protons des mitochondries du tissu adipeux brun est liée à l'ANT et que l'ANT 2 serait impliquée dans la fuite induite par les acides gras (Shabalina *et al.*, 2006). La fuite de protons inductible par les acides gras a été mise en évidence pour l'ANT mais également pour le transporteur glutamate/aspartate (Samartsev *et al.*, 1997a; Samartsev *et al.*, 1997b; Wojtczak & Wieckowski, 1999).

Le découplage intrinsèque

Le découplage intrinsèque implique tous les mécanismes entraînant une diminution de l'efficacité des pompes à protons, c'est-à-dire une diminution de la stœchiométrie proton/électron (H^+/e^-) ou une augmentation de la stœchiométrie protons/ATP (H^+/ATP). Ce découplage est également appelé « patinage » des pompes à protons ou « slipping ».

Stœchiométrie H^+/e^-

La translocation des protons par les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale se fait avec une stœchiométrie variable, c'est-à-dire avec une variation du nombre de protons pompés par électron transféré (Kadenbach, 2003). Le patinage des pompes à protons entraîne une diminution du nombre de protons transloqués vers l'espace intermembranaire pour le transfert d'un même nombre d'électrons vers l'oxygène à travers la chaîne respiratoire. Cette baisse du nombre de protons transloqués entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène pour maintenir un même potentiel de membrane. Bien que ce patinage soit théoriquement possible au niveau de chacune des pompes à protons, il semble qu'*in vivo*, seul le complexe IV soit impliqué dans ce type de découplage (Capitanio *et al.*, 1991; Papa *et al.*, 1991). Plusieurs facteurs interviennent dans ce patinage du complexe IV. L'augmentation du potentiel de membrane (Murphy & Brand, 1987) ou du ratio ATP/ADP (Frank & Kadenbach, 1996) diminue la stœchiométrie H^+/e^- . De plus, les isoformes tissu-spécifiques des sous-unités composant le complexe IV (Huttemann *et al.*, 2000) ou le nombre de cytochromes dans ce complexe influencent ce patinage (Nogueira *et al.*, 2001).

Stœchiométrie H^+/ATP

Le nombre de molécules d'ADP phosphorylées par proton passant dans le complexe ATP synthase (stœchiométrie H^+/ATP) n'est pas constant (Kadenbach, 2003). Par conséquent, pour une même consommation d'oxygène, l'efficacité de phosphorylation est diminuée puisqu'il faut un retour plus important de protons pour synthétiser la même quantité d'ATP. Ce

patinage a été montré *in vitro* dans des mitochondries de foie de rat (Rigoulet, 1990) mais son importance physiologique reste méconnue.

Nature des substrats fournis à la chaîne respiratoire

Les électrons nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire sont fournis au niveau du complexe I par le $\text{NADH} + \text{H}^+$ et au niveau du complexe II par le FADH_2 . Les électrons issus de l'oxydation du NADH sont transférés au travers de trois sites où les réactions d'oxydoréduction sont couplées à un transport de protons au travers de la membrane mitochondriale interne (site de couplage), les complexes I, III et IV. En revanche, le complexe II n'intervient pas dans la translocation des protons. Les électrons issus de l'oxydation du FADH_2 sont donc transférés au travers de deux sites de couplage, les complexes III et IV. Ainsi, lors de l'oxydation du FADH_2 la stœchiométrie H^+/e^- pour l'ensemble de la chaîne respiratoire est inférieure à celle de l'oxydation du NADH (Leverve *et al.*, 2007). La nature des substrats cellulaires influence également l'efficacité des phosphorylations oxydatives en modulant le ratio $\text{NADH}/\text{FADH}_2$. L'oxydation des glucides fournit essentiellement du NADH alors que l'oxydation des acides gras fournit au final plus de FADH_2 que de NADH (Leverve *et al.*, 2007). Le cycle de Krebs, commun aux métabolismes glucidique et lipidique fournit 3 NADH pour 1 FADH_2 . Le ratio $\text{NADH}/\text{FADH}_2$ et donc l'efficacité de synthèse d'ATP sont supérieurs pour l'oxydation des glucides que pour l'oxydation des lipides. Ainsi, dans des conditions limitantes en oxygène, le glucose est préférentiellement utilisé pour permettre une meilleure efficacité de synthèse d'ATP. À l'inverse, les lipides sont préférentiellement utilisés dans des conditions saturantes en oxygène (Korvald *et al.*, 2000).

4 - Fonctions mitochondriales neuronales

Les mitochondries neuronales régulent la physiologie synaptique et la survie cellulaire. Une perturbation de leurs fonctions entraîne des maladies neurologiques (Misgeld *et al.*, 2007). La fonction mitochondriale est essentielle pour les processus neuronaux, comme la production d'énergie, la régulation du calcium, le maintien du potentiel de la membrane plasmique, le repliement des protéines par des chaperonnes, les transports axonaux et dendritiques et le relargage et la recapture de neurotransmetteurs au niveau des synapses (Knott *et al.*, 2008). La distribution sub-cellulaire des mitochondries est une composante importante de leur fonction. Elles sont principalement localisées dans les régions neuronales qui ont une forte demande en

énergie, comme les corps cellulaires, où se fait principalement la synthèse des protéines, et les nœuds de Ranvier (De Vos *et al.*, 2007).

Les neurones sont particulièrement vulnérables aux changements de la morphologie et de la connectivité des mitochondries. Les dysfonctions mitochondriales peuvent entraîner la mort des motoneurones en les prédisposant à l'excitotoxicité médiée par le calcium, en augmentant la production d'espèces oxygène réactives (ROS) et en initiant les voies apoptotiques intrinsèques (Manfredi & Xu, 2005).

En produisant de l'énergie, sous forme d'ATP et de NAD⁺, et en régulant le calcium sub-cellulaire et l'homéostasie redox, les mitochondries jouent un rôle important en contrôlant les processus fondamentaux de la neuroplasticité, incluant la différenciation neuronale, la croissance des neurites, le relargage des neurotransmetteurs et le remodelage dendritique. La neuroplasticité est le terme utilisé pour décrire l'assortiment des changements adaptatifs se produisant dans la structure et la fonction des cellules du système nerveux en réponse à des perturbations physiologiques ou pathologiques. La neuroplasticité inclut la germination (pousse) et la croissance des axones et des neurites, la formation des synapses, le renforcement des synapses en réponse à une activation répétée de la neurogénèse, correspondant à la formation de nouveaux neurones (Cheng *et al.*, 2010).

La base biologique de cette capacité d'adaptation structurelle et fonctionnelle englobe un ensemble varié de mécanismes cellulaires et moléculaires, comprenant les appareils pré- et post-synaptiques de neurotransmission, le remodelage du cytosquelette, le trafic membranaire, la transcription des gènes, la synthèse protéique et la protéolyse. De plus, les cellules gliales, astrocytes, microglies et oligodendrocytes jouent un rôle important dans la neuroplasticité en produisant des facteurs solubles et de surface qui influencent la croissance des neurites, la plasticité synaptique et la survie cellulaire (Cheng *et al.*, 2010).

Enfin, les mitochondries jouent un rôle important dans la polarisation neuronale et la régulation de la croissance axonale. Le comportement et les propriétés fonctionnelles des mitochondries diffèrent entre les axones et les dendrites. Les mitochondries des dendrites sont métaboliquement plus actives que les mitochondries des axones (Cheng *et al.*, 2010).

C - Dysfonctionnements mitochondriaux dans la SLA

La mitochondrie est une organelle cellulaire primordiale qui catalyse les processus énergétiques de la cellule via la production d'ATP. Elle participe également au stockage des ions calcium et peut participer à l'apoptose cellulaire en libérant le cytochrome c (*cf* IV - B).

Des dommages morphologiques (vacuolisation et dilatation) ainsi que fonctionnels de la mitochondrie ont été décrits dans les muscles et la moelle épinière de patients SLA (Vielhaber *et al.*, 1999; Chung & Suh, 2002; Echaniz-Laguna *et al.*, 2002; Wiedemann *et al.*, 2002; Dupuis *et al.*, 2003) et chez des souris surexprimant différentes mutations de la protéine SOD1 humaine, à des stades présymptomatiques (Mattiuzzi *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Vijayvergiya *et al.*, 2005; Bacman *et al.*, 2006; Vande Velde *et al.*, 2008). Les études de biopsies de patients SLA montrent des anomalies ultrastructurelles des mitochondries des muscles, comme des mitochondries géantes, des inclusions paracrystallines et des crêtes anormales (Dupuis *et al.*, 2004a). Les anomalies retrouvées concernent également le nombre et la localisation des mitochondries (Lin & Beal, 2006). De plus, des mutations de l'ADN mitochondrial ont été décrites chez des patients SLA. Par ailleurs, leurs mitochondries présentent un taux élevé de calcium et une diminution d'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire, impliqués dans un métabolisme énergétique défectueux (Wijesekera & Leigh, 2009).

La protéine SOD1 mutée mal repliée s'agrège dans la membrane mitochondriale et plus particulièrement au niveau de la face cytoplasmique de la membrane externe de la mitochondrie (Vande Velde *et al.*, 2008). Elle s'y associe au canal anionique dépendant du voltage, « VDAC », paralysant la conductance des canaux mitochondriaux. Par ailleurs, la perte de VDAC chez les souris SOD1^{G93A} réduit fortement leur survie (Israelson *et al.*, 2010). D'autres défauts fonctionnels dans les mitochondries sont associés à la présence de la protéine SOD1 mutée : une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire, et par conséquent, une diminution des niveaux d'ATP (Jung *et al.*, 2002; Mattiuzzi *et al.*, 2002; Browne *et al.*, 2006), une diminution de la capacité à tamponner le calcium, ce qui favorise une augmentation de la concentration calcique cytoplasmique, et par conséquent des processus d'excitotoxicité (Damiano *et al.*, 2006; Cousse *et al.*, 2011) et une production de produits oxygénés réactifs (ROS) (Paradies *et al.*, 2009). Enfin, la présence de la protéine SOD1 mutée peut également altérer le transport axonal des mitochondries (De Vos *et al.*, 2008).

D - Exemples de maladies neurodégénératives mitochondriales

1 - Pathologies de la dynamique mitochondriale

L'équilibre entre les processus de fission et de fusion semble critique pour la physiologie neuronale. Des mutations dans certains gènes composant la machinerie fission – fusion sont responsables de maladies neurodégénératives. De récentes études ont également permis

d'impliquer des défauts de la dynamique mitochondriale dans des maladies neurodégénératives plus fréquentes telles que la maladie de Parkinson. En effet, les protéines Pink et Parkin régulent négativement la fonction de fusion des mitofusines et de OPA1 alors qu'elles régulent positivement l'action de Drp1 provoquant une fragmentation mitochondriale (Deng *et al.*, 2008; Poole *et al.*, 2008). Ces données font de la dynamique mitochondriale un élément clef des recherches sur les mécanismes conduisant à une neurodégénérescence.

Les principales neuropathies liées à la dynamique mitochondriale impliquent des mutations des gènes codant pour les protéines GDAP1, MFN2 et OPA1. Les mutations des gènes GDAP1 et MFN2 sont impliquées dans certaines formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Baxter *et al.*, 2002; Cuesta *et al.*, 2002; Zuchner *et al.*, 2004), alors que les mutations du gène OPA1 sont responsables d'atrophies optiques autosomiques dominantes (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000). Un cas de neuropathie associé à une mutation du gène Drp1 a été décrit chez un nouveau né présentant une microencéphalie, une anomalie du développement cérébral, une atrophie optique avec hypoplasie, une acidose lactique persistante et une concentration plasmatique modérément élevée en acides gras à très longue chaîne. Cette mutation hétérozygote à effet dominant négatif est associée à un défaut de fission mitochondriale (Waterham *et al.*, 2007).

2 - Neuropathies liées à des mutations de l'ADN mitochondrial

Les mitochondries possèdent leur propre génome, l'ADN mitochondrial (ADNmt). L'ADNmt humain est une molécule d'ADN circulaire double brin de 16.569 paires de bases (Anderson *et al.*, 1981). Le génome mitochondrial comporte un brin lourd (H, heavy) et un brin léger (L, light). Il est localisé dans la matrice mitochondriale et comporte 37 gènes dont 13 codent des protéines impliquées dans les phosphorylations oxydatives, 22 codent des ARN de transfert et 2 codent des ARN ribosomiaux. L'information génétique mitochondriale est compacte puisque les séquences codantes sont contiguës et sans introns. La région non codante représente seulement 5% du génome. C'est une région régulatrice appelée boucle D ou « D-Loop » qui contient les régions promotrices des brins H et L et l'origine de réplication du brin H. La réplication de l'ADNmt est effectuée grâce à l'ADN polymérase γ qui est codée par le génome nucléaire. Elle est principalement bidirectionnelle et asynchrone (Clayton, 1982) commençant par le brin H puis par le brin L. Lors de la réplication, la fréquence d'erreurs provoquant des mutations est beaucoup plus importante que celle du génome nucléaire (Brown *et al.*, 1979). L'hétéroplasmie correspond à la coexistence de molécules d'ADNmt

mutées et non mutées au sein d'une même cellule alors que lorsque toutes les molécules sont identiques, on parle d'homoplasmie. La transmission de l'ADNmt se fait par voie maternelle compte tenu de la richesse mitochondriale des ovocytes et de l'élimination spécifique des quelques copies d'ADNmt apportées par le spermatozoïde lors de la fécondation (Sutovsky *et al.*, 2000).

Ainsi, les maladies dues à des mutations ponctuelles de l'ADNmt ont un mode de transmission maternel et leur expression est en relation avec le taux d'hétéroplasmie. Ce sont des pathologies le plus souvent multi-systémiques affectant les tissus les plus énergie-dépendants, tels que les muscles squelettiques et cardiaques, le système nerveux et neuro-sensoriel. Parmi ces pathologies, on retrouve la neuropathie optique héréditaire de Leber.

OBJECTIFS

OBJECTIFS DE LA THESE

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux dysfonctionnements mitochondriaux et aux perturbations de l'homéostasie bioénergétique dans un modèle murin de la sclérose latérale amyotrophique. Nous avons formulé l'hypothèse que les lésions énergétiques mitochondriales sont retrouvées très en amont des premiers symptômes de la maladie, dès le stade embryonnaire, et qu'elles pourraient être en partie responsables des processus de dégénérescence des motoneurones plus tardifs observés au cours de la maladie. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'étudier les dysfonctionnements du métabolisme mitochondrial en termes d'activité et de production d'ATP, ainsi que leurs conséquences en termes d'activité électrique dans les motoneurones embryonnaires modèles de la SLA. Nous avons pour cela combiné des approches biochimiques (concentration d'ATP intracellulaire), de biologie moléculaire (western blots, RT-PCR quantitative) et électrophysiologiques (en intracellulaire).

Nous sommes partis initialement de travaux théoriques basés sur la conception et l'étude d'un modèle détaillé d'un motoneurone, de son fonctionnement électrophysiologique et des voies métaboliques de synthèse et de consommation de l'ATP (Le Masson *et al*, 2013 *in press*). Ces travaux suggèrent qu'une réduction même faible de la production d'ATP peut conduire les neurones à un état instable, où la crise énergétique augmente paradoxalement la consommation, les conduisant ainsi à entrer dans une boucle délétère, entraînant une dépolarisation progressive, une entrée massive de calcium et une probable mort cellulaire. Ces travaux théoriques sont soutenus par l'idée que la concentration basale d'ATP intracellulaire est réduite du fait d'une réduction de la synthèse d'ATP mitochondrial.

De ce fait, nous avons dans un premier temps tenté de répondre à la question :

- Comment évolue la concentration intracellulaire d'ATP dans les motoneurones SOD1^{G93A} modèles de la SLA ? Si cette dernière est modifiée, comment sont altérées les voies de production d'ATP dans ce modèle pathologique ? Les résultats de cette première partie suggèrent fortement qu'il existe un découplage partiel entre respiration et production d'ATP dans les motoneurones SOD1^{G93A}.

Nous nous sommes donc demandés :

- Quels pourraient être les mécanismes responsables d'un tel découplage partiel observé dans les mitochondries des motoneurones SOD1^{G93A} ? Quelles sont les voies et les protéines mises en jeu ?

Enfin, nous avons souhaité avoir un aperçu des conséquences potentielles de ces perturbations :

- Comment évolue l'activité électrique des motoneurones SOD1^{G93A} ? Comment ces motoneurones réagissent-ils à une perturbation de la synthèse d'ATP ? Cette synthèse est-elle adaptative ou existe-t-il une perte de l'homéostasie énergétique aux conséquences potentiellement désastreuses pour les motoneurones ?

Les résultats seront présentés sous forme de trois chapitres. Le premier chapitre sera consacré à la mise en évidence du découplage mitochondrial dans notre modèle, puis, nous aborderons les mécanismes du découplage dans un second chapitre, avant de terminer par les conséquences de cette perte d'homéostasie énergétique dans les motoneurones.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels et Méthodes

I – Les animaux

Tous les protocoles utilisés au cours de ce projet sont en accord avec le Comité National d’Ethique, qui nous a accordé le numéro de saisine 50120146-A.

Les animaux utilisés au cours de cette étude sont des souris transgéniques possédant la mutation G93A, substituant une guanine par une arginine au niveau du codon 93 de l’enzyme superoxyde dismutase à cuivre et zinc (SOD1), avec un haut niveau d’expression (autour de vingt-cinq copies). Ce modèle a été mis au point par Gurney et collaborateurs en 1994 (Gurney *et al.*, 1994). Les souris utilisées sont des mutants sur fond génétique hybride SOD1^{G93A}/B6SJL obtenus par accouplements de femelles souches wild type (Wt) C57BL/6J et d’un mâle SOD1^{G93A}. Par ailleurs, nous avons également utilisé des souris transgéniques exprimant la GFP, une protéine fluorescente, sous le promoteur HB9, un gène homéoboîte permettant la spécification de l’identité motoneuronale au stade embryonnaire (Arber *et al.*, 1999). Les animaux sont obtenus par croisements entre des femelles HLX9/B6, wild type pour la SOD1 mais exprimant le gène de la GFP, et des mâles hétérozygotes pour SOD1. Les embryons sont utilisés à douze jours et demi après l’accouplement.

II - Cultures primaires de motoneurones embryonnaires de souris

A - Mise au point de la technique

Depuis les années 1970, différentes méthodes ont été proposées pour enrichir, identifier ou purifier les motoneurones. Ces différentes méthodes se basent sur trois propriétés majeures des motoneurones : leur localisation dans la partie ventrale de la moelle épinière, leur grande taille et le fait que leurs axones projettent sur les bourgeons des membres dès les premiers stades de développement. Les différentes méthodes proposées sont un compromis entre le degré de purification et le rendement cellulaire. La méthode de culture cellulaire utilisée dans ce projet a été mise au point par Henderson et collaborateurs au début des années 1990 (Henderson *et al.*, 1995). Elle a initialement été développée pour les embryons de poulet, entre quatre et sept jours embryonnaires, et les embryons de rats entre quatorze et quinze jours embryonnaires. Elle fait appel à un gradient de densité permettant de séparer les motoneurones de grande taille des autres cellules plus petites. La technique de culture embryonnaire primaire purifiée en motoneurones, et notamment la dissection a été acquise dans des laboratoires la pratiquant en routine.

B - Le « coating »

Les cultures de mes expériences s'effectuent sur différents supports : petites boîtes de Pétri, plaques de 12 ou 96 puits. Pour permettre la fixation des cellules au support de culture, il est nécessaire de réaliser au préalable sur les plaques et les boîtes un « coating » à base d'ornithine et de laminine (*Sigma*). Avant tout, 100 µl d'une solution de rinçage (composée de Leibovitz-L15, de bicarbonate au 40^{ème} et de Pénicilline Streptomycine à 1% ; *Invitrogen*) sont déposés dans chaque support de culture. Après une nuit ou un week-end d'incubation à 37°C et 5% de CO₂ le contenu des puits est aspiré et remplacé par 100 µl de solution de polyornithine que l'on laisse agir une heure à température ambiante avant d'aspirer et de laisser sécher sous la hotte une autre heure à température ambiante. La dernière étape du « coating » consiste à déposer une solution de laminine (1/500) avant d'incuber à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'à l'ensemencement.

C - La mise en culture

1 - Dissection

La culture primaire est réalisée à partir de moelles épinières d'embryons murins SOD1 wild-type (Wt) et SOD1^{G93A} (SOD) de 12.5 jours. La souris gestante est anesthésiée à l'isoflurane (*Belmont*) puis sacrifiée par décapitation. La poche placentaire est retirée et placée dans une solution d'HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution d'*Invitrogen*) complétée de glucose et d'HEPES. Sous loupe binoculaire, chaque embryon est extrait de sa poche puis placé dans une boîte de Pétri. Il est ensuite disséqué : la queue est prélevée pour le génotypage, la tête est sectionnée, le canal dorsal est ouvert, la moelle épinière est prélevée, retournée cornes ventrales vers l'expérimentateur, puis débarrassée des méninges. Enfin, la corne dorsale, contenant les neurones sensoriels, est sectionnée au scalpel. Le génotypage est effectué en parallèle de la dissection. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

Primers	Sequence	Orientation
GFP	AAGTTCATCTGCACCACCG	Forward
GFP	TCCTTGAAGAAGATGGTGCG	Reverse
SOD	CATCAGCCCTAATCCATCTGA	Forward
SOD	CGCGACTAACAATCAAAGTGA	Reverse

Tableau 6 : Séquence des amorces utilisées pour le génotypage des souris transgéniques

2 - Dissociation et purification

Selon les résultats du génotypage, les moelles de même génotype (SOD ou Wt) sont regroupées, coupées en une dizaine de morceaux puis soumises à deux dissociations différentes : enzymatique et mécanique. La dissociation enzymatique se fait dans un milieu HAMS F10 modified (*Invitrogen*) complété de 8 µl de trypsine (endoprotéase pancréatique d'*Invitrogen*) pendant 8 min à 37°C et 5% de CO₂. La trypsine hydrolyse les protéines membranaires qui permettent l'adhérence cellulaire, les cellules sont alors individualisées. Les moelles sont ensuite sorties et placées dans un milieu composé de 800 µl de milieu CCM (Leibovitz-L15 complété de glucose, de pénicilline-streptomycine, de progestérone, d'IPCS – I : Insuline, P : Putrescine, C : Conalbumine, S: Sodium sélénite - et de sérum de cheval inactivé ; *Invitrogen*), 100 µl de BSA à 4% (Bovin Serum Albumin *Sigma*) et 100 µl de DNase (*Sigma*) pour dégrader les cellules mortes ou abimées. Le milieu contenant les moelles est doucement agité environ une minute pour que les moelles se désagrègent. Elles sont ensuite mécaniquement dissociées par un protocole d'aspiration-refoulement de pipette, alterné avec des temps de sédimentation. Après l'ajout de 5 ml de Leibovitz-L15 (dont le pH a été préalablement ajusté grâce à une échelle de couleur) à la solution obtenue, un coussin de BSA est réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur. Celui-ci, par sa densité plus forte, a pour rôle de rester dans le fond du tube et donc d'empêcher les cellules de s'y déposer violemment lors de la centrifugation de 5 minutes à 470 g. Le culot est resuspendu dans 5 ml de milieu CCM et un gradient sélectif est créé grâce à de l'Optiprep (*Sigma*). Après 15 minutes de centrifugation à 1000 g, l'interface entre milieu Leibovitz-L15 et Optiprep, où il est possible d'observer des « flocons », est récupérée et resuspendue dans 5ml de milieu Leibovitz-L15 pHé. On réitère la centrifugation de 5 min avec coussin de BSA. Le culot obtenu est resuspendu dans 5 ml de milieu CCM avant d'être une dernière fois centrifugé pendant 5 min avec un coussin de BSA. Le culot obtenu est resuspendu dans 100 µl/moelle de milieu de culture NBM (Milieu Neurobasal *Invitrogen* complété de glutamine, glutamate, B27, β-mercaptoethanol et facteurs de croissance) et la concentration cellulaire est évaluée sur Cellule de Malassez.

3 - Ensemencement

En fonction du nombre de cellules obtenu, des dilutions sont effectuées de façon à déposer sur chaque support 100 µl de solution contenant le nombre de cellules souhaité. Après une heure et demi d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, chaque puits est complété avec du milieu de

culture NBM. Enfin, les boîtes sont mises à incuber à 37°C et 5% CO₂ pour une durée de quelques jours à plusieurs semaines en fonction de l'utilisation ultérieure. Afin d'éviter que le milieu ne s'assèche et que les cellules ne manquent d'éléments nécessaires à leur développement, le milieu de culture est changé une fois par semaine avec du NBM complémenté de glutamine, glutamate, B27, β-mercaptoethanol et facteurs de croissance.

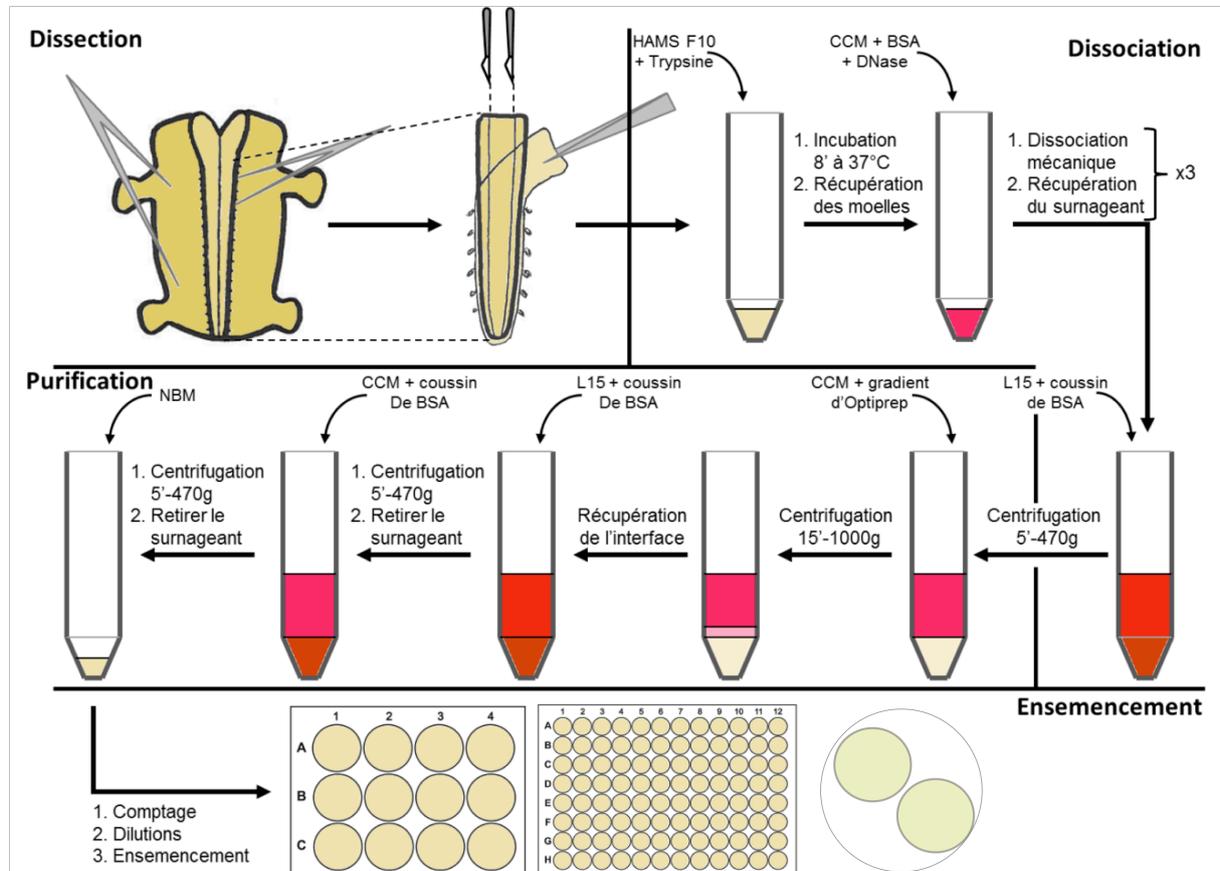


Figure 22 : Dissection, dissociation et purification de moelles épinières d'embryons murins à 12.5 jours

III – Concentration intracellulaire en ATP

A - Le kit de détection de l'ATP

La détection de l'ATP repose sur une réaction mettant en jeu l'ATP, la D-luciférine et la luciférase. Cette réaction émet une quantité de photons à 560 nm, proportionnelle à la quantité d'ATP contenue dans l'échantillon. Tous les réactifs nécessaires sont fournis dans un kit : ATP Determination Kit A22066 de *Molecular Probes, Invitrogen detection technologies*.

Cette quantité de photons est mesurée à l'aide d'un luminomètre en URL, unités relatives de lumière et est comparée à une gamme étalon. Cette gamme est réalisée avec des quantités connues en ATP soit 0, 0.5, 1.5, 7.5, 15, 75, 150, 350, 500 et 750 pmol par tube.



Équation 2 : Équation de la réaction catalysée par la luciférase

La réaction est lancée par l'injection d'une solution standard de réaction dans l'échantillon mesuré (gamme ou culture cellulaire après lyse). Cette solution se compose pour 10 mL réalisé de 8.9 ml d'eau distillée stérile, de 0.5 ml de tampon de réaction à 20X, de 0.1 ml de DTT à 100 nM, de 0.5 ml de D-luciférine à 10 mM et de 2.5 µl de luciférase à 5 mg.ml⁻¹. Ce mélange doit être protégé de la lumière et être conservé à 4°C pendant 5 jours maximum car il perd rapidement sa sensibilité.

B - L'extraction

Le but est d'extraire l'ATP des cellules après l'action ou non de drogues. Les drogues utilisées sont l'oligomycine (*Tocris*) à 50 µM et la roténone à 5 µM (bloqueurs de la chaîne respiratoire), l'ouabaine (*Tocris*) à 1 µM (inhibiteur des pompes Na/K), le sodium iodo-acétate à 100 µM (inhibiteur de la glycolyse), le FCCP à 6 µM (découplant de la chaîne respiratoire mitochondriale) et le KCl (*VWR*) à 1 mM (dépolarisation de la membrane) à raison de 50 µl par puits. Les drogues agissent à température ambiante pendant dix minutes puis sont aspirées afin de stopper leur action. L'ATP est ensuite extrait par lyse des cellules en culture, par application de 30 µl de tampon de lyse à base de détergent. Pour 10mL de tampon produit on mélange 400 µl d'EDTA à 50 mM, 2 ml de tampon Potassium Phosphate à 0.5 M, 100 µl de triton, 100 µl de DTT à 0.1 M et 7.4 ml d'eau MilliQ. Ce tampon peut être conservé à -20°C. Les puits sont ensuite « triturés » à l'aide d'un embout stérile de pipette puis le lysat est extrait et conservé rapidement à -20°C dans des tubes *Eppendorf*.

C - Les mesures

Les mesures sont effectuées à l'aide du luminomètre Lumat LB9507. Celui-ci doit avant tout être lavé et paramétré. Pour cela, on réalise deux séries de douze lavages à l'eau DNase,

RNase free (*Invitrogen*), suivies d'une série de deux lavages par la solution standard de réaction, toujours protégée de la lumière, tout en suivant les instructions de l'appareil.

On paramètre ensuite la machine en créant un nouveau protocole : 270 μl de solution standard de réaction sont injectés par mesure, le bruit de fond (50 URL.s⁻¹ maximum) est évalué pendant deux secondes et soustrait automatiquement par l'appareil, la URL est mesurée 0.5 s après l'injection, pendant 2 secondes à 2.5 et 24.5 secondes.

On place ensuite dans le luminomètre 30 μl d'échantillon (gamme ou lysat) dans un tube à hémolyse en polystyrène. On lance le protocole et on obtient pour chaque échantillon une mesure de luminométrie en URL.

IV – Respiration mitochondriale

L'analyseur Seahorse XF mesure le taux de consommation d'oxygène (OCR), indicateur de la respiration mitochondriale.

Les mesures en temps réel de l'OCR sont faites par l'isolement d'un volume extrêmement faible (environ 7 μl) du milieu au-dessus d'une monocouche de cellules dans une plaque de quatre-vingt seize puits. La consommation d'oxygène cellulaire (respiration) et les changements rapides sont facilement mesurables par la mesure des concentrations d'oxygène dissous et de protons libres dans cette « microchambre transitoire ». Ils sont évalués par des sondes de capteurs à semi-conducteurs se localisant juste au-dessus de la monocouche de cellules. L'appareil mesure la concentration jusqu'à ce que le taux de variation soit linéaire et calcule la pente pour déterminer l'OCR. Un système intégré d'administration de composés permet l'addition successive de deux solutions par puits, à des intervalles définis par l'utilisateur.

Avant le début de l'essai XF, les cellules sontensemencées dans des puits d'une plaque quatre-vingt seize puits de culture cellulaire XF. Chaque puits estensemencé avec 50 000 cellules et la concentration cellulaire est vérifiée avant chaque expérience. Le milieu de culture est changé environ une heure avant l'expérience, avec du milieu DMEM sans glucose, dans lequel il a été ajouté 1 mM de sodium-lactate et 1% de sérum de cheval. Le pH est ajusté entre 7,3 et 7,4 à 37°C. La plaque de culture de cellules est introduite dans l'appareil. Typiquement, le taux basal d'OCR est mesuré quatre fois avant d'ajouter des inhibiteurs, des stimulants, des substrats, ou des composés dans les chambres d'injection de composés. L'OCR est calculée en pmol/minute. Les composés préchargés dans les chambres d'injection de la plaque d'analyse sont ensuite injectés sous pression, successivement, dans chaque puits. Après le

mélange, de nouvelles mesures de l'OCR sont effectuées. Comme pour les mesures de concentrations d'ATP, nous avons utilisé différents composés : l'oligomycine à 50 μM , l'antimycine à 100 μM , la roténone à 5 μM , tous trois des inhibiteurs des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, et du KCl à 1 mM.

La durée totale de l'essai est généralement d'environ quatre-vingt à quatre-vingt-dix minutes. Pour maintenir la physiologie normale de la cellule, un système de commande de température maintient l'environnement interne de l'analyseur à 37 ° C.

V – Enregistrements électrophysiologiques intracellulaires

Les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués en intracellulaire, ou technique dite du « sharp ». Les microélectrodes de verre à pointes fines destinées aux enregistrements intracellulaires sont obtenues à partir de tubes capillaires de verre borosilicaté avec une fibre de verre interne, de 1 millimètre de diamètre externe et 0,5 millimètre de diamètre interne (*Harvard Apparatus*). Les électrodes sont étirées avec une étireuse horizontale programmable (*Flaming/Brown micropipette puller P-97, Sutter Instrument*). Les microélectrodes sont remplies avec une solution d'acétate de potassium à 2 M à l'aide d'une seringue. Les résistances des microélectrodes varient entre 100 et 180 M Ω . L'électrode est orientée à 45° environ vers la surface de la culture cellulaire en boîte de Petri, à l'aide d'un micromanipulateur à trois axes. Un courant oscillant bref et à haute fréquence est appliqué à travers la microélectrode afin de pénétrer dans la cellule. Les motoneurons ont été identifiés par fluorescence, grâce au marqueur GFP. Pendant toute la durée de l'expérience, les cellules sont perfusées en circuit ouvert avec un milieu extracellulaire (ACSF) contenant 130,5 mM de NaCl, 2,4 mM de KCl, 1,3 mM de MgSO₄, 1,2 mM de KH₂PO₄, 19,5 mM de NaHCO₃, 2,4 mM de CaCl₂, 10 mM de glucose et 1,25 mM d'HEPES. Le pH de la solution est ajusté à 7,4 et son osmolarité se situe autour de 300 mOsmol. Par ailleurs, les cellules reçoivent du carbogène, qui bulle dans le milieu ACSF, perfusé jusqu'aux cellules. Le débit de perfusion des cellules est de 0,75 ml par minute pendant toute la durée de l'enregistrement. L'acquisition des données est réalisée à l'aide du logiciel Axoclamp-2A (*Molecular Devices*). Avant chaque enregistrement, la résistance de la microélectrode est compensée. Les différents paramètres étudiés sont la mesure du potentiel membranaire de repos, par simple lecture sur l'amplificateur quelques minutes après l'empalement du neurone, les caractéristiques des potentiels d'action, comme son amplitude et sa durée, et la fréquence de décharge des motoneurons empalés.

VI – PCR quantitative en temps réel

A - Extraction des ARN totaux et contrôle de leur qualité

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide d'une trousse commerciale (*Tri.reagent Fermentas*) selon la méthode dérivée du protocole de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). Ce protocole utilise une solution dénaturante contenant de l'isothiocyanate de guanidinium et du phénol (trizol). Cette solution dénature les acides nucléiques, dissocie les protéines et possède également une activité inhibitrice sur les ribonucléases endogènes. Après la lyse des cellules dans cette solution et addition de chloroforme, les échantillons sont centrifugés. Cette étape permet de séparer par solubilisation différentielle les acides nucléiques (les ARN sont insolubles dans le phénol) des protéines. La phase aqueuse contenant les ARN est prélevée puis transférée dans un tube neuf. Les ARN sont alors à nouveau purifiés par l'ajout d'un même volume de trizol et un volume de chloroforme correspondant, incubée 10 minutes à 4°C puis centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les ARN sont précipités par l'ajout d'un volume identique d'isopropanol et incubé 10 minutes à température ambiante puis une nuit à -20°C. Le précipité est récupéré par centrifugation à 12 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot d'ARN est lavé par 500 µl d'éthanol 75 %, séché à l'air et remis en suspension dans de l'eau. Chaque échantillon est alors digéré à la DNase (*Turbo DNA-free DNase AMBION*) pour éliminer les éventuelles présences d'ADN génomique contaminant.

La mesure de la qualité des ARN totaux de chaque échantillon est réalisée à l'aide du kit Agilent RNA 6000 du Bioanalyser Agilent. Il s'agit d'une technique d'électrophorèse microcapillaire. Les ARN totaux marqués par un agent fluorescent sont excités par un laser. Au cours de la migration, l'intensité de la fluorescence est enregistrée et rapportée à celle d'une solution de différents marqueurs de taille de concentration définie à 150 µg/l. Le logiciel d'analyse couplé au lecteur (*Agilent 2100 Bioanalyser Software*) permet d'obtenir un électrophorégramme pour chaque individu. Un facteur d'intégrité (RIN) correspondant à un calcul automatique d'un critère de qualité et intégrant l'ensemble du profil (pics ribosomaux, régions pré et post-pics et inter-régions) est généré par le logiciel du Bioanalyzer. Sa valeur comprise entre 1 et 10 renseigne sur la qualité des ARN, la valeur 10 correspondant à la meilleure qualité possible.

B - PCR quantitative en temps réel

1 - Principe et protocole

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent qui s'intercale dans l'ADN double brin (SYBR[®] Green) au cours du temps. La fluorescence est donc collectée après chaque cycle de PCR. L'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Ceci permet la quantification du produit de la PCRq à partir d'une courbe d'amplification qui montre la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

La réaction de PCRq débute par une étape à 95°C pendant 5 minutes permettant d'activer la DNA polymérase puis 45 cycles sont réalisés. Chaque cycle est constitué des deux étapes suivantes : une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, puis une étape à 61°C pendant 30 secondes associant l'hybridation des amorces et l'élongation. La mesure de la fluorescence est réalisée à la fin de l'élongation.

Chaque puits de la plaque contient un mélange réactionnel d'un volume total de 10 µl composé de 3 µl d'amorces à 2 µM, 2 µl d'ADNc à 2 ng/µl précédemment synthétisés et 5 µl d'un mélange contenant le réactif nécessaire à l'amplification (mix 2X, *LightCycler® 480 SYBR Green I Master, ROCHE*).

2 - Préparation des ADNc

Les ARN totaux (0,5 µg) sont ajoutés à un mélange composé de 300 ng de Random Hexamer Primer (*Fermentas*), de 200 ng d'oligo (dT) (*Fermentas*) puis dénaturés pendant 5 minutes à 65°C.

La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) est basée sur une trousse commerciale (*RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas*). La réaction de transcription inverse se réalise à 50°C pendant une heure. Une étape d'inactivation est réalisée pendant 15 minutes à 70°C. Chaque solution d'ADNc est conservée à -80°C.

3 - Sélection et validation des couples d'amorces pour la qPCR

Le choix des amorces est réalisé par le logiciel Primer Express 2.0 (*Applied Biosystems*). Les couples d'amorces sélectionnés sont validés d'après deux critères : leur spécificité et leur efficacité.

La spécificité est vérifiée à l'aide de la courbe de fusion représentant l'émission de fluorescence en fonction de la température. Cette étape est réalisée à la fin de la PCRq par une

étape (incrémentation de la température de 0.3°C toutes les 3 secondes entre 65°C et 95°C) qui dissocie le produit d'amplification.

L'efficacité est mesurée en réalisant une gamme étalon basée sur les concentrations d'ADNc (20 ; 10 ; 4 ; 0.8 ; 0.16 ng par puits). Une courbe étalon représentant le nombre de cycles en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADNc peut être tracée grâce à l'utilisation de cette gamme de concentrations d'ADNc. La pente de la courbe nous renseigne sur l'efficacité de la réaction ($E=10^{-1/\text{pente}} - 1$). Plusieurs contrôles sont réalisés pour vérifier l'absence de contamination.

Primers	Sequence	Orientation
UCP1	CGTGAAGGTCAGAATGCAAGC	Forward
UCP1	CATTGTAGGTCCCCGTGTAGC	Reverse
UCP2	CTGCACCCCGATTTACTTCC	Forward
UCP2	CAGGCCTCCTCACTGTGAGTC	Reverse
UCP3	ACCCACATGGTGAAGGACA	Forward
UCP3	TGTATAGGGCGCTCAAATGGA	Reverse
UCP4	GAAGTCGTGTTTGGCAAAAGTG	Forward
UCP4	GCCATCATCCCTCCAATGAC	Reverse

Tableau 7 : Séquence des primers forward et reverse utilisés pour les qPCR

4 - Choix des gènes de référence

L'expression de 8 gènes, potentiellement gènes de référence, a été analysée par PCRq sur l'ensemble des individus. L'analyse des résultats s'effectue à l'aide du logiciel Genorm qui classe l'ensemble des gènes testés en fonction des différentes expressions entre tous les individus. Dans chacune des structures étudiées, deux gènes sont choisis pour les valeurs Genorm les plus faibles suggérant que leur expression est indépendante des conditions expérimentales.

5 - Analyse de l'expression des gènes

L'analyse de l'expression des gènes est basée sur une quantification relative. Elle se traduit par le calcul du facteur de variation (Fold Change, FC) entre les différentes conditions. Il est basé sur la formule proposée par Livak & Schmittgen : $FC = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Pour cela il faut d'abord calculer le ΔCt , égal à la différence d'expression entre le gène

d'intérêt (ici UCP1, UCP2, UCP3 ou UCP4) et les gènes de référence choisis : $\Delta Ct = Ct_{(\text{gène int\^er\^et})} - Ct_{(\text{g\^ene de r\^ef\^erence})}$. Puis on d\^etermine la valeur $\Delta\Delta Ct$ qui correspond \^a la diff\^erence d'expression entre la condition d'int\^er\^et et la condition de r\^ef\^erence (t\^emoi\^n, Wt) : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{condition d'int\^er\^et})} - \Delta Ct_{(\text{condition de r\^ef\^erence})}$.

VII – Western Blots

A – Extraction des prot\^eines

L'extraction des prot\^eines transmembranaires ou cytoplasmiques se fait \^a l'aide de 50 μl d'un tampon de lyse \^a base de d\^et\^er\^gent (*Cf* Mat\^er\^iels et M\^ethodes, III, B). Les cellules sont ensuite r\^ecup\^er\^ees par une centrifugation de 5 minutes \^a 2000 tours par minute, \^a une temp\^erature de 20°C. Le surnageant est ensuite aspir\^e. Le culot cellulaire ainsi obtenu est repris dans 200 μl de tampon d'extraction RIPA et 1 μl d'inhibiteurs de prot\^eases et de phosphatases. Les \^echantillons sont plac\^es 5 minutes sur la glace. La derni\^ere \^etape de l'extraction prot\^eique correspond \^a une sonication par pulses de 30 secondes avec un d\^elai de 30 secondes entre chaque pulse, pendant 1 heure, \^a 65° d'amplitude.

B – Dosage des prot\^eines

Le dosage des prot\^eines transmembranaires et cytoplasmiques est effectu\^e \^a l'aide d'un kit BCA (*Pierce*). La quantit\^e de prot\^eines dans nos \^echantillons est d\^etermin\^ee par une gamme \^etalon de BSA (Bovine Serum Albumine). Les diff\^erentes concentrations prot\^eiques de la gamme sont r\^epertori\^ees dans le tableau ci-dessous. Dans chaque puits est ajout\^e 160 μl de r\^eactif.

Les \^echantillons \^a doser sont pr\^epar\^es en ajoutant 37 μl d'eau distill\^ee et 160 μl de r\^eactif \^a 3 μl d'\^echantillon.

BSA (μg)	0	1	5	10	20	30	40
BSA (μL)	0	0.5	2.5	5	10	15	20
Tp RIPA (μL)	3	3	3	3	3	3	3
H2O qsp 40μL	37	36.5	34.5	32	27	22	17

La gamme est r\^ealis\^ee en duplicat et les \^echantillons \^a doser en un seul puits.

C – Western Blot Odyssey

1 – Préparation des échantillons

Les échantillons protéiques sont préparés en ajoutant un quart de volume de tampon d'échantillon 4X à un volume d'échantillon protéique. Les échantillons sont ensuite chauffés 15 minutes à 65°C, puis ils sont laissés à refroidir jusqu'à leur retour à température ambiante.

2 – Électrophorèse et transfert

Les échantillons sont déposés sur le gel d'électrophorèse en même temps qu'un marqueur de poids protéique (8 μ l, Biorad 161-0374). La migration se fait à 150 volts pendant 45 minutes. Le transfert des protéines se fait sur une membrane de nitrocellulose, à l'aide d'un turbo transfert de Biorad avec le kit RTA. Le transfert peut se faire pour deux gels en même temps et les paramètres sont 2,5 ampères et 25 volts pendant 7 minutes.

3 – Blocage de la membrane et incubation de l'anticorps primaire

Une fois le transfert terminé, la membrane est incubée pendant une heure à température ambiante dans un tampon de blocage Odyssey. La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage contenant en plus du tween 20. Le lendemain, la membrane est rincée trois fois pendant 5 minutes avec du PBST sous agitation à température ambiante.

4 – Incubation avec l'anticorps secondaire

Cette étape se fait à l'abri de la lumière. La membrane est incubée une heure sous agitation à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-rabbit 800, vert), dilué dans le tampon de blocage. La membrane est ensuite rincée trois fois cinq minutes avec du PBST sous agitation à température ambiante.

VIII – Analyses statistiques

La significativité de tous les résultats présentés est vérifiée selon les cas par une analyse de variance (ANOVA one way) ou un test de Student (apparié ou non) réalisés à l'aide du logiciel d'analyses statistiques SigmaPlot® (*Systat Software Inc*). Notons que pour p la probabilité de faire erreur, la relevance des résultats est représentée graphiquement par : * pour $p \leq 0.05$, ** pour $p \leq 0.01$, *** pour $p \leq 0.001$ et ns pour non significative.

RÉSULTATS

Chapitre I

Un découplage énergétique des motoneurones SOD1^{G93A}

I - Introduction

Une étude récente a montré qu'il existait un déficit en ATP cytosolique dans les cellules de neuroblastome de souris SOD1^{G37R} (Coussee *et al.*, 2011). Ces auteurs ont mis en évidence que le niveau d'ATP cytosolique était réduit d'environ 40% dans leur modèle de souris SOD1^{G37R}, en comparaison aux cellules sauvages. Ces résultats vont dans le sens d'une diminution d'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, il a été montré précédemment sur des mitochondries isolées de souris âgées de dix-sept semaines, que les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale présentaient une activité diminuée chez les souris SOD1^{G93A} en comparaison avec les souris wild-type (Mattiuzzi *et al.*, 2002). Ces auteurs ont également montré que le taux maximal d'oxygène pouvant être utilisé dans les mitochondries était significativement réduit chez les souris SOD1^{G93A} de dix-sept semaines en comparaison à des souris non transgéniques du même âge. D'autres auteurs ont également mis en évidence ces déficits d'activité mitochondriale chez des souris symptomatiques SOD1^{G93A} (Jung *et al.*, 2002). Cependant, ces études ont été effectuées soit dans des lignées cellulaires, soit sur les tissus isolés à partir de souris présymptomatiques ou symptomatiques. Cette étude a donc pour but d'apporter des éléments de comparaison dans une population de motoneurones en culture primaire, issus de moelles épinières de souris embryonnaires sauvages ou mutées SOD1^{G93A}. Aussi, notre travail a consisté à étudier la concentration intracellulaire d'ATP dans les cultures primaires de motoneurones, les voies de production d'ATP, ainsi que le taux de consommation d'oxygène dans ces mêmes cultures cellulaires.

II – Concentration intracellulaire d'ATP dans les motoneurones

Les résultats décrits dans cette étude ont été obtenus à partir de cultures primaires de motoneurones embryonnaires (E12.5) de souris wild-type, utilisées comme témoins, ou mutées SOD1^{G93A}. Les cellules ont étéensemencées à 20 000 motoneurones par puits, et utilisées après huit à dix jours de culture.

A – La concentration intracellulaire d'ATP est diminuée dans les motoneurones SOD1^{G93A}

Nous avons mesuré la concentration intracellulaire d'ATP à l'aide d'un kit basé sur la réaction de la luciférase (*cf* Matériels et Méthodes, III). Les mesures ont été effectuées sur 20 000 cellules après extraction.

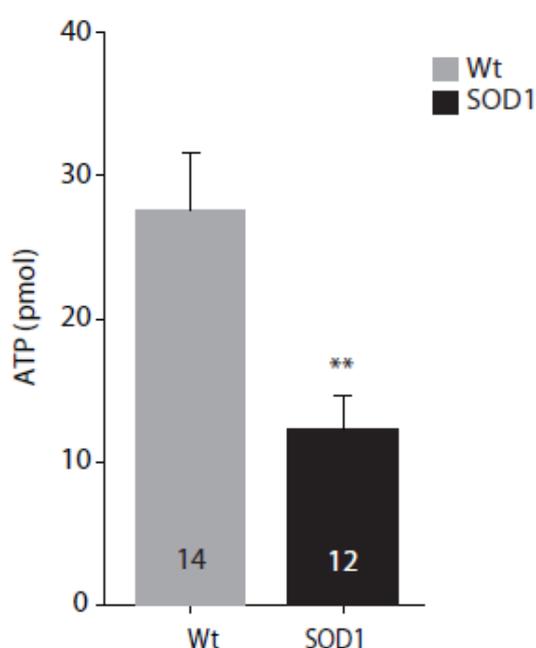


Figure 23 : Concentration intracellulaire d'ATP dans les motoneurones en condition contrôle

La concentration d'ATP intracellulaire des motoneurones SOD1^{G93A} après huit à dix jours de culture est réduite d'environ 55% par rapport aux motoneurones sauvages. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard à la moyenne. **: $p \leq 0,01$: différence significative. Analyse statistique par un t-test de Student.

La concentration d'ATP intracellulaire est fortement diminuée dans les motoneurones SOD1^{G93A} (n=12 ; moyenne \pm SEM : 12,2 \pm 2,4 pmol) en condition contrôle par rapport aux motoneurones wild-type (n=14 ; moyenne \pm SEM : 27,6 \pm 4,0 pmol) (Figure 23). Ceci montre qu'il existe un déficit dans la production ou l'utilisation de l'ATP intracellulaire chez les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones sauvages. Dans un premier temps, pour approfondir ce résultat, nous avons cherché à étudier la participation relative des différentes voies de production d'ATP sur la concentration intracellulaire totale.

B – La majorité de l'ATP intracellulaire des motoneurones est produit par les mitochondries

La concentration d'ATP intracellulaire provient à la fois d'une synthèse mitochondriale par le système des phosphorylations oxydatives (OXPHOS) et d'une synthèse glycolytique cytosolique. Afin d'évaluer la part relative de chacune de ces voies de synthèse dans la production de l'ATP intracellulaire total, nous avons bloqué chacune de ces voies par des inhibiteurs spécifiques. La production glycolytique est inhibée par le sodium iodoacétate (IO). Quant au système des phosphorylations oxydatives, il peut être inhibé à différents niveaux. Le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale est inhibé par la roténone, et le complexe V ou ATP synthase est inhibé par l'oligomycine. Les concentrations utilisées sont 100 μ M pour le sodium iodoacétate, 5 μ M pour la roténone et 50 μ M pour l'oligomycine. Les inhibiteurs sont dissous dans du PBS 1X aux concentrations souhaitées, et appliqués pendant dix minutes.

La voie majeure de production de l'ATP intracellulaire dans les motoneurones en culture est la voie mitochondriale des phosphorylations oxydatives. Les mesures de la concentration intracellulaire d'ATP en condition de blocage du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale montre une diminution drastique de la concentration intracellulaire d'ATP de 95%, $1,4 \pm 1,3$ pmol (moyenne \pm SEM ; n=3) dans les motoneurones wild-type et de 80%, $2,7 \pm 1,3$ pmol (moyenne \pm SEM ; n=4) dans les motoneurones SOD1^{G93A} (Figure 24, A). L'inhibition du complexe V montre également une diminution de la concentration intracellulaire d'ATP dans les motoneurones sauvages (40%) et mutés (35%), mais moins importante. En effet, la concentration intracellulaire d'ATP dans les motoneurones sauvages en condition basale est de $27,6 \pm 4,0$ pmol (moyenne \pm SEM ; n=14) et de $16,4 \pm 3,4$ pmol (moyenne \pm SEM ; n=4) après application d'oligomycine. Dans les motoneurons SOD1^{G93A}, la concentration intracellulaire d'ATP chute à $8,0 \pm 2,9$ pmol (moyenne \pm SEM ; n=8) suite à l'inhibition du complexe V par l'oligomycine alors que la valeur en condition basale est de $12,2 \pm 2,4$ pmol (moyenne \pm SEM ; n=12) (Figure 24, B). Nous remarquons par ailleurs que l'inhibition de la voie glycolytique de production d'ATP par le iodoacétate n'entraîne pas de diminution significative de la concentration intracellulaire d'ATP, que ce soit dans les motoneurones wild-type, $13,4 \pm 0,6$ pmol (moyenne \pm SEM ; n=3), malgré une tendance, mais non statistiquement significative, ou les motoneurones SOD1^{G93A}, $15,6 \pm 1,5$ pmol (moyenne \pm SEM ; n=3) (Figure 24, C).

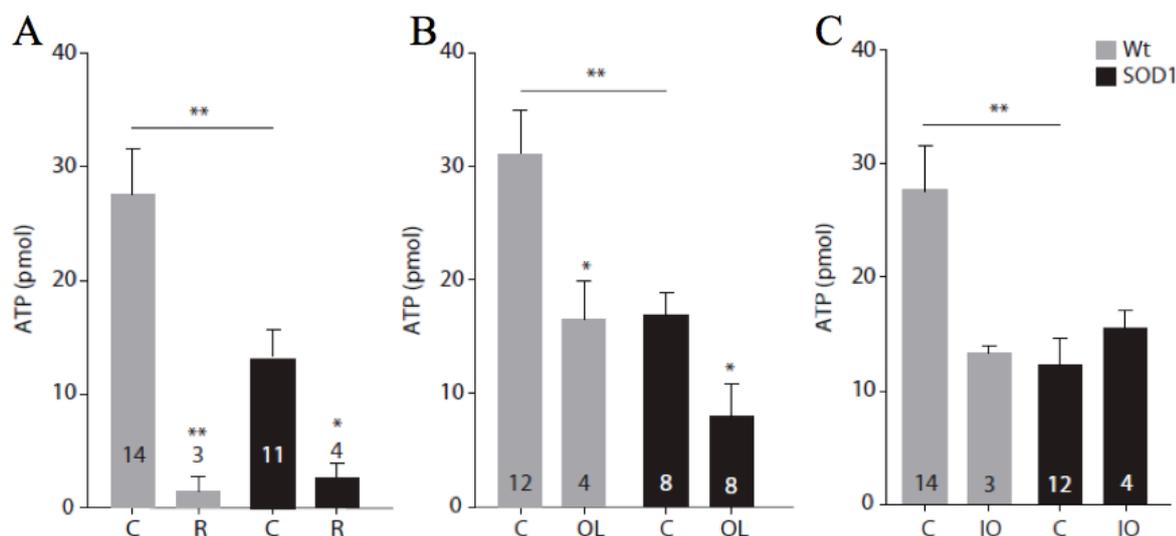


Figure 24 : Concentration intracellulaire d'ATP en condition de blocage des voies de production

La concentration intracellulaire d'ATP est fortement diminuée en cas de blocage de la voie de synthèse mitochondriale mais pas lors d'une inhibition de la voie de production glycolytique, dans les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} en culture. **A.** L'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire par la roténone (R) entraîne une diminution de la concentration intracellulaire d'ATP plus importante, d'environ 95% dans les motoneurones wild-type et d'environ 80% dans les motoneurones SOD1^{G93A}. **B.** Le blocage du complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale par l'oligomycine (OL) entraîne une diminution d'environ 40% de la concentration intracellulaire en ATP dans les motoneurones sauvages et d'environ 35% dans les motoneurones SOD1^{G93A}. **C.** L'inhibition de la voie glycolytique par le sodium iodoacétate (IO) n'entraîne pas de diminution de la concentration intracellulaire en ATP que ce soit dans les motoneurones sauvages (malgré une tendance non statistiquement significative) ou les motoneurones mutés. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne. Analyses statistiques par des t-test de Student, appariés et non-appariés. * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$.

Pour contrôler que la majorité de l'ATP intracellulaire est effectivement majoritairement produite par les phosphorylations oxydatives mitochondriales, et que les deux voies majeures de production d'ATP intracellulaire sont la voie mitochondriale et la voie glycolytique, nous avons appliqué un cocktail d'inhibiteurs spécifiques à chacune de ces voies, à savoir du sodium iodoacétate à 100 μ M et de l'oligomycine à 50 μ M.

La concentration intracellulaire d'ATP est réduite de 99% dans les motoneurones sauvages et SOD1 mutants lors de l'application des inhibiteurs de la glycolyse et du complexe de l'ATP synthase de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 25). Ceci montre bien qu'il s'agit des deux voies majeures de production de l'ATP intracellulaire. La concentration d'ATP chez les motoneurones wild-type est réduite de $27,6 \pm 4,0$ pmol (moyenne \pm SEM ; n=14) à $0,6 \pm$

0,08 pmol (moyenne \pm SEM ; n=3). Dans les motoneurones SOD1^{G93A}, la concentration d'ATP intracellulaire diminue de $12,2 \pm 2,4$ pmol (moyenne \pm SEM ; n=12) à $0,9 \pm 0,05$ (moyenne \pm SEM ; n=3). Remarquons qu'il y a une diminution statistiquement moindre de la concentration d'ATP intracellulaire des motoneurones SOD1 mutés par rapport aux motoneurones sauvages. Ceci montre bien que les deux voies de production d'ATP dans les motoneurones sont les voies mitochondriale et glycolytique. La voie des phosphorylations oxydatives joue le rôle majeur dans la production de l'ATP intracellulaire, et la production d'ATP par la glycolyse est anecdotique. Il s'agit essentiellement d'une voie de production alternative dans les motoneurones, pouvant relayer la mitochondrie dans le cas de dysfonctionnements, afin d'assurer le maintien d'un niveau correct d'ATP dans la cellule.

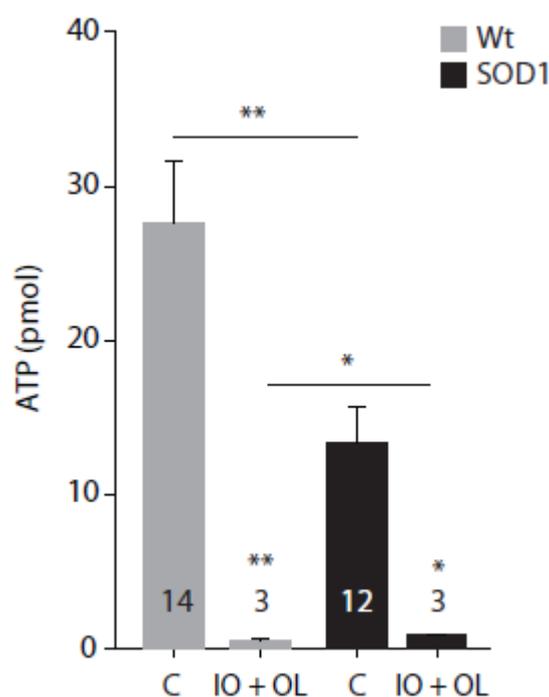


Figure 25 : Concentration intracellulaire d'ATP en condition de blocage des voies de production

La concentration intracellulaire d'ATP est inhibée par le blocage de la voie de production glycolytique par le sodium iodoacetate (IO, 100 μ M) et de la voie de production mitochondriale par l'oligomycine (OL, 50 μ M). La concentration d'ATP intracellulaire est diminuée de plus de 99% dans les motoneurones sauvages et SOD1^{G93A} en conditions de blocage total de la production d'ATP. * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$. Analyse statistique par des tests de Student apparié et non-apparié.

Ces résultats montrent que la majorité de la synthèse d'ATP intracellulaire est réalisée par la voie des phosphorylations oxydatives. Nous avons donc orienté nos études sur les

dysfonctionnements possibles au niveau de cette voie de production d'ATP dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison aux motoneurones sauvages.

Nous avons ensuite cherché à mesurer l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale à la fois dans les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A}.

III – La consommation d'oxygène des motoneurones SOD1^{G93A} est augmentée

La mesure du taux de consommation d'oxygène sur les motoneurones en culture nous donne des informations sur l'état métabolique de la chaîne respiratoire mitochondriale et sur sa capacité à produire de l'ATP. Comme elle est la source majeure d'énergie dans les motoneurones, un dysfonctionnement de cette voie productrice d'ATP aurait des conséquences majeures sur le fonctionnement des motoneurones, cellules très demandeuses en énergie. Les mesures du taux de consommation d'oxygène ont été réalisées sur 50 000 motoneurones en culture, à l'aide de l'appareil XF-Analyseur. Ces données sont issues de huit expériences indépendantes (chacune contenant environ une quinzaine de puits) sur des cultures entre un et trois jours après ensemencement. Nous pourrions nous attendre, du fait de la réduction de la concentration intracellulaire d'ATP, à une diminution de la respiration et de la consommation d'oxygène. Paradoxalement, et c'est là un résultat surprenant et fondamental, les mesures de la consommation d'oxygène dans les motoneurones SOD1^{G93A} montrent une augmentation d'environ 125%, ($68,9 \pm 4,5$ pmol/min (moyenne \pm SEM ; n=116)) en comparaison avec les motoneurones sauvages ($55,3 \pm 3,1$ pmol/min (moyenne \pm SEM ; n=123)) (Figure 26).

Afin de mieux évaluer l'implication de certains complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sur les cultures primaires de motoneurones wild-type et SOD1^{G93A}, nous avons appliqué différentes substances inhibitrices. Nous avons utilisé la roténone à 5 μ M pour inhiber le complexe I NADH-Ubiquinone Oxydoréductase, l'antimycine à 100 μ M pour bloquer le complexe III Ubiquinone-Cytochrome c Oxydoréductase et l'oligomycine à 50 μ M pour agir spécifiquement sur le complexe V de l'ATP synthase (Figure 27). Nous remarquons que les complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} réagissent de la même manière à l'application de ces inhibiteurs. En effet, sous l'effet de la roténone, inhibiteur du complexe I, qui agit au niveau du domaine hydrophobe du complexe, et vraisemblablement au niveau de site de fixation de l'ubiquinone, la consommation d'oxygène diminue de 40% environ dans les motoneurones wild-type et de 35% environ dans les motoneurones SOD1^{G93A}.

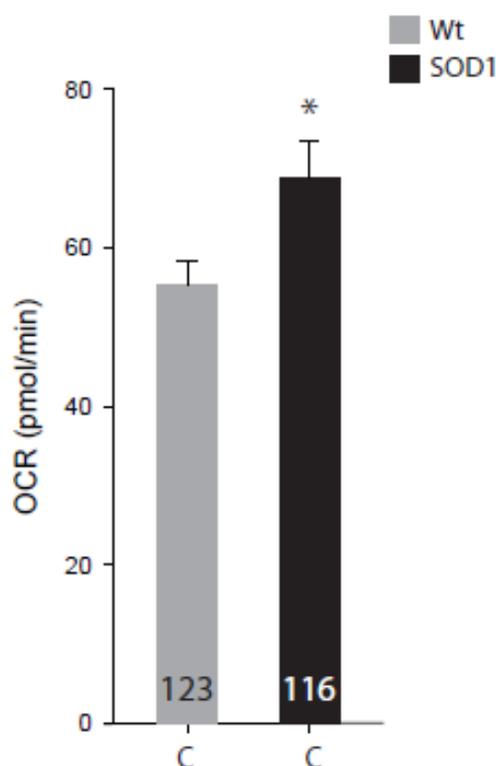


Figure 26 : Taux de consommation d'oxygène dans les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} en condition contrôle

La mesure du taux de consommation d'oxygène est exprimée en pmol par minute. La respiration mitochondriale par le système des phosphorylations oxydatives est augmentée dans les motoneurones SOD1^{G93A} de 125% en comparaison avec les motoneurones wild-type. Analyse statistique par un test de Student, * : $p \leq 0,05$.

Le taux de consommation d'oxygène dans les motoneurones wild-type passe de $53,7 \pm 9,7$ pmol/min (moyenne \pm SEM) en condition basale à $31,9 \pm 5,3$ pmol/min (moyenne \pm SEM) après application de la roténone. Dans les motoneurones SOD1^{G93A}, la consommation d'oxygène est réduite à $43,6 \pm 7,5$ pmol/min (moyenne \pm SEM) après ajout de la roténone alors que sa valeur basale est à $68,3 \pm 10,4$ pmol/min (moyenne \pm SEM) (Figure 27, A). En condition de blocage du complexe III par l'antimycine, les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} réagissent de la même manière en termes de consommation d'oxygène. En effet, le taux moyen de la respiration mitochondriale est diminué d'environ 70% dans les motoneurones wild-type et les motoneurones SOD1^{G93A}. La consommation d'oxygène passe de $55,3 \pm 3,2$ pmol/min (moyenne \pm SEM) en condition basale dans les motoneurones wild-type à $21,4 \pm 3,2$ pmol/min (moyenne \pm SEM) après inhibition du complexe III par l'antimycine. Dans les motoneurones SOD1^{G93A}, le taux de consommation d'oxygène après

application d'antimycine est de $25,0 \pm 2,6$ pmol/min (moyenne \pm SEM), alors qu'il était initialement de $68,9 \pm 4,5$ pmol/min (moyenne \pm SEM) en condition contrôle.

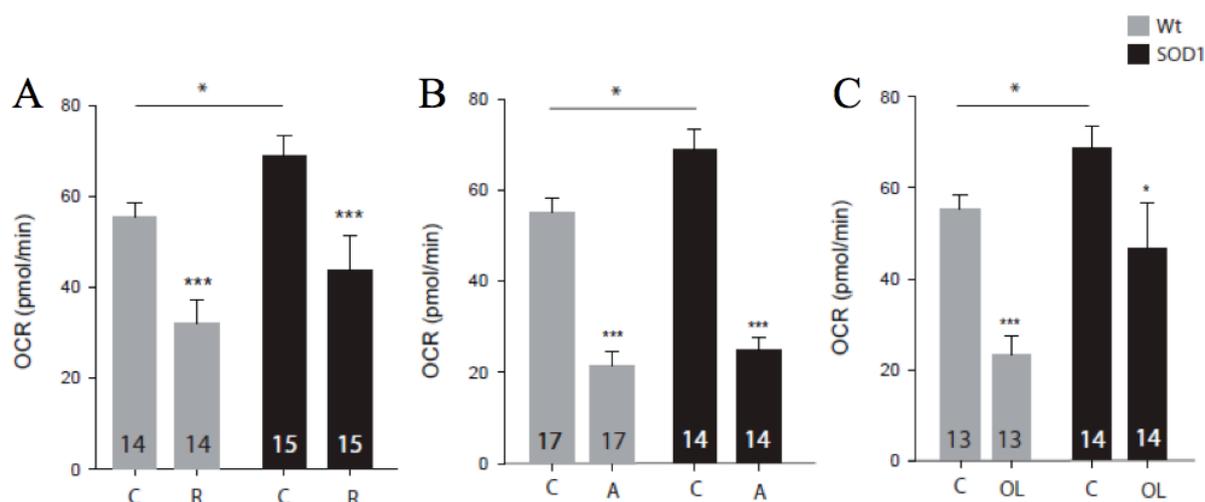


Figure 27 : Taux de consommation d'oxygène dans les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} en présence d'inhibiteurs des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les motoneurones wt et SOD1^{G93A} en culture réagissent de la même manière en cas de blocage des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale respectivement par la rotenone (R, 5 μ M) et l'antimycine (A, 100 μ M). L'inhibition du complexe V par l'oligomycine montre une réaction différente des motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones wild-type. **A.** La consommation d'oxygène est réduite de 40% dans les motoneurones wild-type en cas d'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale par la rotenone, et d'environ 35% dans les motoneurones SOD1^{G93A}. **B.** En cas d'inhibition du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale par l'antimycine, le taux de consommation d'oxygène est diminué d'environ 70% que ce soit dans les motoneurones wild-type ou SOD1^{G93A}. **C.** Dans le cas de l'inhibition du complexe V par l'oligomycine (OL, 50 μ M), la consommation d'oxygène est diminuée d'environ 60% dans les motoneurones wild-type et de seulement 30% dans les motoneurones SOD1^{G93A}. Analyses statistiques par des tests de Student appariés et non-appariés. * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

Dans le cas d'une inhibition du complexe V par l'oligomycine, les motoneurones SOD1^{G93A} semblent moins perturbés par l'application de cette drogue que les motoneurones wild-type, puisque leur consommation d'oxygène n'est diminuée que d'environ 30% alors que le taux de consommation d'oxygène dans les motoneurones wild-type est réduit de 60% environ. En effet, la consommation d'oxygène dans les motoneurones wild-type est de $23,2 \pm 4,1$ pmol/min (moyenne \pm SEM) après application d'oligomycine alors que la valeur contrôle est de $54,9 \pm 9,2$ pmol/min (moyenne \pm SEM). Dans les motoneurones SOD1^{G93A}, la consommation d'oxygène après application d'oligomycine est de $46,7 \pm 10,0$ pmol/min (moyenne \pm SEM) et de $68,9 \pm 4,5$ pmol/min (moyenne \pm SEM) en condition contrôle. Ce

résultat montre que les motoneurones SOD^{G93A} sont perturbés au niveau du complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale par rapport aux motoneurones wild-type. En effet, la consommation d'oxygène n'est que peu diminuée dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones wild-type suite à l'application d'oligomycine, ce qui nous laisse entrevoir l'hypothèse d'un découplage partiel des motoneurones SOD1^{G93A} modèles de SLA.

IV - Discussion

Nous avons montré dans cette étude que la concentration intracellulaire d'ATP est significativement diminuée dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones sauvages. Paradoxalement, l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, estimée par la mesure du taux de consommation d'oxygène est augmentée dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones wild-type. L'effet de l'oligomycine sur la consommation d'oxygène dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones wild-type laisse entrevoir un argument d'un découplage partiel de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les motoneurones SOD1^{G93A}, modèles de SLA. Le découplage partiel de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les motoneurones SOD1^{G93A} à lieu dès le stade embryonnaire, très en amont des premiers symptômes de la maladie. Les perturbations de la bioénergétique sont donc établies bien avant le déclenchement de la maladie dans ce modèle murin de la sclérose latérale amyotrophique.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la concentration intracellulaire d'ATP est réduite de 55% dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison à la concentration d'ATP intracellulaire observée dans les cultures de motoneurones wild-type. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Cousse et collaborateurs (Cousse *et al.*, 2011) qui ont montré une diminution de 40% environ de la concentration d'ATP cytosolique dans un modèle cellulaire de neuroblastomes de souris SOD1^{G37R}. Par ailleurs, ces auteurs ont mis en évidence une perturbation de l'activité du complexe I des phosphorylations oxydatives mais pas de différence dans l'activité des complexes II, III et IV dans leur modèle cellulaire de la sclérose latérale amyotrophique. Ces défauts dans l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ont également été retrouvés par d'autres auteurs sur des mitochondries isolées de souris SOD1^{G93A} (Mattiuzzi *et al.*, 2002). D'autres travaux ont mis en évidence une diminution d'activité des complexes I, II et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale chez

des souris SOD1^{G93A} à un stade symptomatique, uniquement dans la corne ventrale de la moelle épinière, mais pas dans la corne dorsale (Jung *et al.*, 2002). De plus, une étude récente (Richardson *et al.*, 2013) sur des lignées cellulaires motoneuronales NSC34 n'a pas mis en évidence de différence significative dans la consommation d'oxygène basale des cellules G93A en comparaison aux cellules WtSOD. Dans cette étude, nous avons mis en évidence une suractivation de la chaîne respiratoire mitochondriale en condition basale, évaluée par la mesure de la consommation d'oxygène dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison aux motoneurones wild-type. L'application de différents inhibiteurs des complexes I et III n'a permis de mettre en évidence aucune différence dans l'activité de ces différents complexes des phosphorylations oxydatives entre les motoneurones wild-type et les motoneurones SOD1^{G93A}. En effet, les taux de consommation d'oxygène en condition de blocage de ces différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale varient de façon similaire dans les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A}. Cependant, cette étude a permis de montrer que les motoneurones SOD1^{G93A} répondaient de manière différente à l'application d'un inhibiteur du complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, la chaîne respiratoire consomme plus d'oxygène dans les motoneurones SOD1^{G93A} que dans les motoneurones wild-type, mais cet oxygène consommé n'est pas utilisé pour la production d'ATP. Il s'agit d'un découplage partiel du système des phosphorylations oxydatives. En effet, l'oxygène consommé va servir à d'autres fonctions essentielles pour la survie des motoneurones comme par exemple, le maintien du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), mais ne servira pas à la production d'ATP. Par ailleurs, les différences apparentes entre nos résultats sur l'activité du système des phosphorylations oxydatives et les études antérieures peuvent être imputables tout d'abord à la tranche d'âge des souris étudiées. En effet, différentes études utilisent des souris à un stade symptomatique (après quatorze semaines) (Jung *et al.*, 2002; Mattiazzi *et al.*, 2002). Par ailleurs, les méthodes d'étude de l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont très différentes. Dans notre étude, nous mesurons la consommation d'oxygène sur les cultures de motoneurones alors que d'autres auteurs utilisent des préparations de mitochondries isolées (Coussee *et al.*, 2011). Ces auteurs proposent que la diminution d'ATP cytosolique soit induite par la baisse de la capture mitochondriale de calcium (Ca^{2+}), ce qui aurait pour conséquence d'altérer l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire et donc de limiter la production d'ATP intracellulaire global. Enfin, une étude récente sur des cellules portant la mutation VCP, responsable de 1 à 2% des cas familiaux de SLA, montre que le niveau d'ATP est diminué, avec une augmentation de la consommation

mitochondriale d'oxygène, et une diminution du potentiel de membrane mitochondrial. Les auteurs montrent qu'il existe un découplage mitochondrial dans ce modèle, le rendant vulnérable à une forte demande énergétique (Bartolome *et al.*, 2013).

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude montrent dans un premier temps que la concentration d'ATP intracellulaire est fortement diminuée dans une population de motoneurones embryonnaires SOD1^{G93A} en culture en comparaison à des motoneurones wild-type. Par ailleurs, la voie de production majeure d'ATP dans ces cultures cellulaires est le système des phosphorylations oxydatives localisé dans les mitochondries. Contrairement à ce à quoi nous pourrions nous attendre, la diminution de la concentration cytosolique d'ATP n'est pas due à une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, mais au contraire, cette dernière consomme plus d'oxygène. Cependant, cette consommation d'oxygène ne sert manifestement pas à produire de l'ATP, ce qui nous fait proposer l'hypothèse d'un découplage partiel mitochondrial dans les motoneurones SOD1^{G93A} en culture en comparaison à leurs homologues wild-type. Nous nous sommes donc intéressés par la suite aux mécanismes de découplage qui seraient utilisés par les motoneurones SOD1^{G93A}, modèles de la SLA.

Chapitre II

Mécanismes du découplage dans les motoneurones SOD1

I – Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les motoneurones SOD1^{G93A} étaient partiellement découplés en comparaison avec les motoneurones sauvages. Ceci a donc orienté notre étude sur les protéines UCPs. Ce sont des protéines de découplage endogènes, liées à la résistance au stress oxydatif, aux fonctions mitochondriales et *in fine*, à la survie cellulaire. Les premières études dans le tissu adipeux brun, tissu spécialisé dans la régulation de la thermogénèse, ont permis de mettre en évidence que la production de chaleur est due à une activité régulée et à la synthèse d'un transporteur particulier de protons dans la membrane interne des mitochondries de ce tissu, la protéine de découplage 1 (« Uncoupling Protein 1 » ou UCP1)(Pecqueur *et al.*, 2001). Les autres protéines UCPs, UCP2, UCP3 et UCP4 ont été identifiées par leurs homologues avec UCP1. Des études antérieures ont montré que le gène UCP2 jouait un rôle dans la limitation des ROS ainsi que dans la réponse immunitaire dont les médiateurs sont les macrophages (Arsenijevic *et al.*, 2000). De plus, ces auteurs ont mis en évidence qu'il existait un mécanisme de régulation entre les niveaux d'ARNm d'UCP1 et d'UCP2, à savoir qu'il y a une augmentation du niveau d'ARNm d'UCP1 dans le tissu adipeux en proportion inverse à la diminution du niveau d'expression d'UCP2. Inversement, cette régulation avait été mise en évidence dans l'autre sens, avec une augmentation du niveau d'ARNm d'UCP2 dans des souris déficientes pour UCP1 (McGoldrick *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été postulé qu'un léger découplage de la respiration par les UCPs pourrait réguler la production de ROS en modulant les fuites de protons à travers la membrane mitochondriale interne (Nicholls & Budd, 2000). De plus, une diminution du niveau d'ARNm d'UCP2 est associée à une stimulation de la production de ROS et une augmentation du niveau d'ARNm d'UCP2 semble contrer l'augmentation des ROS. UCP2 est actif dans la régulation de la production des ROS et joue un rôle de défenseur antioxydant (Arsenijevic *et al.*, 2000). Enfin, il a été mis en évidence que les mitochondries des muscles squelettiques des souris modèles de SLA sont plus découplées que celles de leurs homologues wild-type (Dupuis *et al.*, 2003). Les niveaux d'ARNm et de protéines des UCPs sont régulés par le niveau de stress oxydatif, ce qui supporte l'hypothèse que les mitochondries des souris SOD1 gagnent un effet toxique par une fonction catalytique aberrante conduisant à la production de radicaux libres. En d'autres termes, les cellules SOD1^{G93A} se trouveraient devant un dilemme où l'excès de ROS aurait un effet de feedback négatif sur la production d'ATP. Produire de l'ATP en quantité ou

limiter la production de ROS semble être un équilibre difficile à trouver, ce qui conduirait à une fragilité et une susceptibilité particulière à tout stress énergétique.

Dans ce contexte, le but de cette étude a été d'évaluer les niveaux protéiques et d'ARNm des protéines UCPs dans les cultures primaires de motoneurones embryonnaires de souris SOD1^{G93A} et wild-type. Nous avons également mesuré la concentration d'ATP intracellulaire globale en présence d'un découplant de la chaîne respiratoire mitochondriale dans ces mêmes cultures, pour confirmer notre hypothèse d'un découplage partiel des mitochondries motoneuronales dans un modèle cellulaire de SLA.

II – Les protéines de découplages UCPs sont perturbées dans les motoneurones SOD1^{G93A}

Les résultats ci-dessous ont été obtenus à partir de cultures primaires de motoneurones embryonnaires de souris wild-type et SOD1^{G93A}. Les cellules ont étéensemencées à 50 000 motoneurones par puits et récoltées après huit jours d'incubation à 37°C et 5% de CO₂ pour les expériences de western blot et de qPCR.

Nous avons cherché à voir comment évoluaient les niveaux d'ARNm des protéines de découplage UCPs. Nous avons mesuré le niveau d'expression des gènes, basée sur une quantification relative par le calcul du facteur de variation (Fold Change, FC), entre les différentes conditions, calcul basé sur la méthode du $2\Delta\Delta Ct$ (Figure 28). Nous avons mis en évidence qu'il y a une augmentation significative de l'expression des ARNm d'UCP1 dans les motoneurones SOD1^{G93A} ($1,59 \pm 0,003$; moyenne \pm erreur standard à la moyenne, n = 3) en comparaison aux motoneurones wild-type ($1,01 \pm 0,07$; moyenne \pm erreur standard à la moyenne, n = 4). Par ailleurs, le niveau d'expression des ARNm d'UCP2 est statistiquement diminué dans les motoneurones SOD1^{G93A} ($0,51 \pm 0,02$; moyenne \pm erreur standard à la moyenne, n = 3) à environ la moitié du niveau observé dans les motoneurones wild-type ($1,01 \pm 0,08$; moyenne \pm erreur standard à la moyenne, n = 4). Nous observons également que le niveau d'expression d'UCP3 est environ trois fois et demi plus important dans les motoneurones SOD1^{G93A} ($3,66 \pm 0,41$; moyenne \pm erreur standard à la moyenne, n = 3) en comparaison avec les motoneurones wild-type ($1,08 \pm 0,22$; moyenne \pm erreur standard à la moyenne, n = 4). Enfin, le niveau d'expression d'UCP4 n'est pas modifié dans les motoneurones SOD1^{G93A} ($1,22 \pm 0,17$; moyenne \pm erreur standard à la moyenne, n = 3) en comparaison avec les motoneurones wild-type ($1,03 \pm 0,11$; moyenne \pm erreur standard à la moyenne, n = 4).

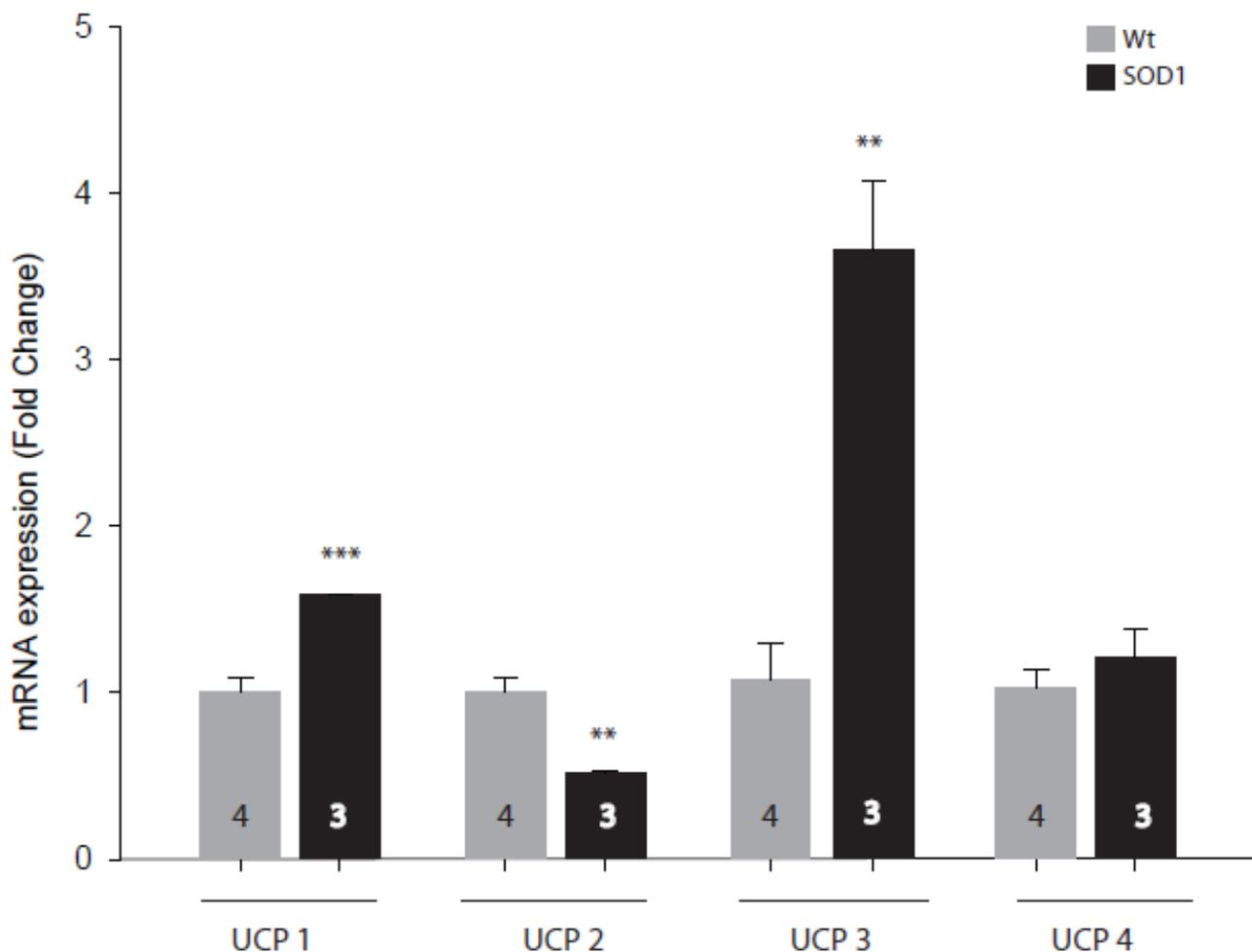


Figure 28 : Niveaux d'expression en ARNm des UCPs dans les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A}

Le niveau d'expression des ARNm des protéines UCPs est exprimé en facteur de variation ou fold change. Le niveau d'expression des ARNm d'UCP1 et d'UCP3 est statistiquement augmenté dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones wild-type. Le niveau d'expression des ARNm d'UCP2 est diminué dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones wild-type. Quant au niveau d'expression d'UCP4, il n'est pas modifié dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison aux motoneurones wild-type. Analyses statistiques par test de Student. * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$.

L'étude du niveau protéique d'UCP2 montre que la densité protéique est très fortement augmentée dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones wild-type. En effet, la densité protéique normalisée par rapport à la quantité totale de protéines est augmentée de $0,05 \pm 0,01$ (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 11$) dans les motoneurones wild-type à $0,38 \pm 0,06$ (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 7$) dans

les motoneurones SOD1^{G93A}. La quantité de protéines UCP2 est environ 8 fois plus importante dans les cultures de motoneurones SOD1^{G93A} que dans les cultures de motoneurones wild-type (Figure 29).

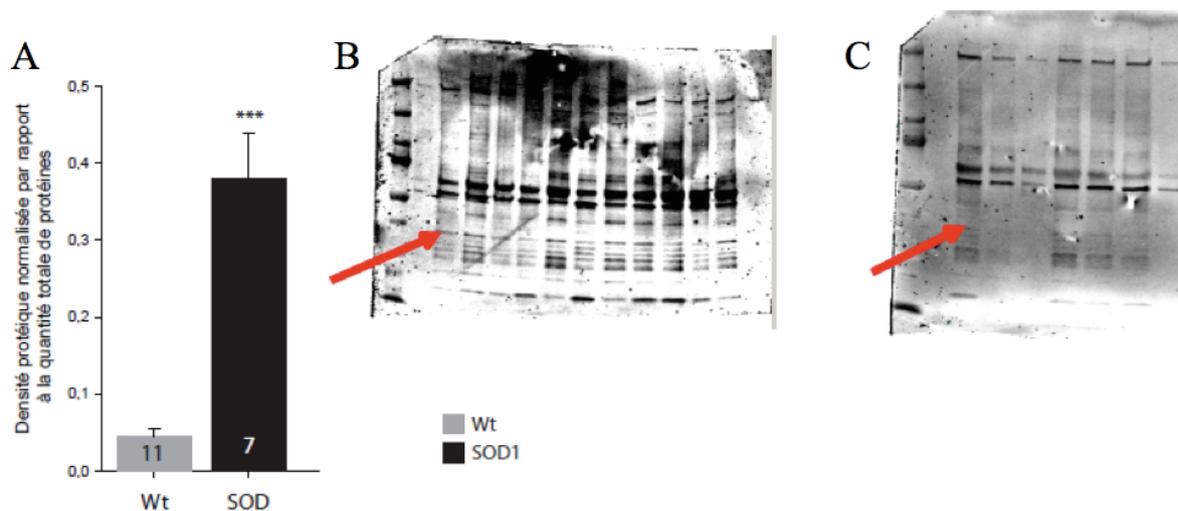


Figure 29 : Niveaux d'expression en protéines de découplage UCPs dans les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A}

Dans les motoneurones SOD1^{G93A}, le niveau d'expression de la protéine UCP2 est significativement augmenté en comparaison avec le niveau d'expression d'UCP2 dans les motoneurones wild-type. **A.** Histogramme représentant la densité de protéines UCP2 par rapport à la quantité totale de protéines dans les échantillons. La concentration protéique d'UCP2 est environ 8 fois plus importante dans les motoneurones SOD1^{G93A} que celle mesurée dans les motoneurones wild-type. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard à la moyenne. Analyse statistique par un test de Student. **B.** Gel de western blot des protéines des cultures de motoneurones wild-type. La flèche rouge indique la bande correspondant à la protéine UCP2. **C.** Gel de western blot des protéines des cultures de motoneurones SOD1^{G93A}. La flèche rouge indique la bande correspondant à la protéine UCP2.

III – La concentration intracellulaire d'ATP des motoneurones SOD1^{G93A} n'est pas modifiée en présence d'un découplant de la chaîne respiratoire

Nous avons ensuite étudié comment évoluait la concentration d'ATP intracellulaire dans les motoneurones SOD1^{G93A} suite à l'application d'un découplant, en comparaison avec les motoneurones wild-type (Figure 30). Les motoneurones en culture ont été soumis à l'action d'un découplant exogène de la chaîne respiratoire mitochondriale, le FCCP (Carbonyl cyanide-4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone), à une concentration de 6 μ M. Dans le cas d'un découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale, la concentration d'ATP est

fortement réduite dans les motoneurones wild-type, de $27,6 \pm 4,0$ pmol (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 14$) à $7,7 \pm 1,7$ pmol (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$). Dans les motoneurones SOD1^{G93A} en culture, le FCCP ne semble pas avoir d'effet sur la concentration intracellulaire d'ATP, la concentration d'ATP étant de $12,9 \pm 1,1$ pmol (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) après application de FCCP contre à $12,2 \pm 2,4$ pmol (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 12$) en condition contrôle. Ce résultat confirme l'hypothèse d'un découplage partiel de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'application d'un découplant exogène étant sans effet car la chaîne respiratoire des motoneurones SOD1^{G93A} est déjà découplée par les découplants endogènes UCP1, UCP2 et UCP3.

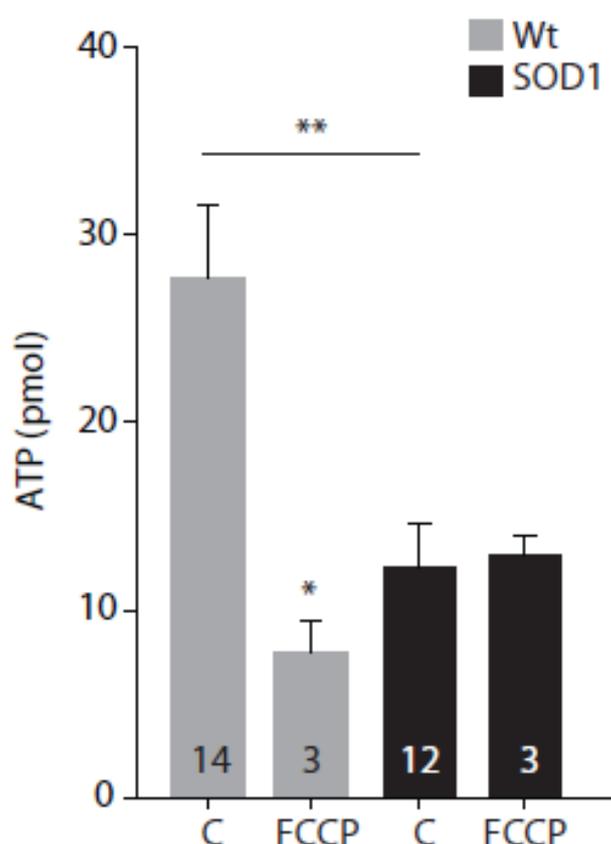


Figure 30 : Concentration intracellulaire d'ATP en présence d'un découplant

La concentration intracellulaire d'ATP est significativement diminuée de 72% dans les motoneurones wild-type en présence d'un découplant de la chaîne respiratoire mitochondriale, le FCCP (Carbonyl cyanide-4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazine). La concentration intracellulaire d'ATP n'est pas modifiée dans les motoneurones SOD1^{G93A} en présence de FCCP. Analyse statistique par un t-test de Student apparié. * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$.

IV - Discussion

Dans ce chapitre, nous avons montré que le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale passe par les protéines UCPs. En effet, les niveaux en ARNm et en protéines des UCPs sont modifiés dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones sauvages. Il semblerait que ce soit principalement UCP3 qui joue un rôle prédominant dans le découplage mitochondrial des motoneurones SOD1^{G93A}. En effet, son niveau d'expression en ARNm est augmenté d'environ trois fois et demie dans notre modèle murin de SLA en comparaison à des souris wild-type. Ces résultats sont en accord avec les données de Dupuis et collaborateurs (Dupuis *et al.*, 2003), sur des muscles de souris SOD1^{G86R} symptomatiques à quatre-vingt dix jours. De plus, ces auteurs ont mis en évidence une augmentation du niveau d'ARNm d'UCP2 à cent cinq jours dans le muscle gastrocnemius. Notre étude quant à elle s'est intéressée essentiellement aux motoneurones de la moelle épinière à un stade embryonnaire, très en amont des premiers symptômes. Nous avons mis en évidence que la régulation des protéines UCPs était perturbée bien avant les prémices de la maladie. En effet, les niveaux d'ARNm d'UCP1 et d'UCP3 sont augmentés dès le stade embryonnaire, alors que le niveau d'ARNm d'UCP2 est diminué. Notons par ailleurs que le niveau protéique d'UCP2 est augmenté, alors que son niveau d'ARNm est diminué. Cette divergence entre le contenu en protéines et en ARNm a été précédemment mis en évidence, car les UCPs sont régulés au niveau transcriptionnel mais aussi au niveau de leur activité (Pecqueur *et al.*, 2001). La protéine UCP1 découple la respiration en dissipant le gradient mitochondrial de protons et fonctionne comme un système de fuite de protons, non couplé à un processus consommateur d'énergie. Par ailleurs, UCP2 et UCP3 peuvent découpler la respiration par des systèmes recombinants. De plus, UCP3, de part son activité de découplage, peut limiter la production d'espèces oxygène réactives.

Chapitre III

Les conséquences du découplage dans les motoneurones SOD

I – Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons mis en évidence dans notre modèle murin de SLA, qu'il existe un découplage partiel de la chaîne respiratoire mitochondriale, dont les protéines UCPs, et notamment UCP3 servent d'intermédiaires. Ce découplage partiel mitochondrial a comme conséquence une moindre disponibilité intracellulaire d'ATP, carburant cellulaire. Ce déficit énergétique peut avoir des conséquences majeures dans les motoneurones, cellules très demandeuses en énergie, de part leur activité électrique importante et leur grande taille. Des études antérieures ont mis en évidence qu'il n'existait pas de différence dans le potentiel de membrane, dans la conductance d'entrée, dans les formes des potentiels d'action et des hyperpolarisations dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison aux motoneurones contrôles (Kuo *et al.*, 2004). Ces auteurs ont mis en évidence que seule la relation entre la fréquence de décharge en fonction du courant injecté (relation I-f) était altérée dans les motoneurones SOD1^{G93A}. Ils ont démontré que l'augmentation de l'excitabilité des motoneurones SOD1^{G93A} n'était pas due aux seules propriétés synaptiques spontanées. Ces auteurs ont par la suite confirmé qu'il n'y avait pas de changements des propriétés passives des motoneurones SOD1^{G93A} en culture (Kuo *et al.*, 2005). Cependant, Kuo et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation significative du courant sodique persistant dans les motoneurones SOD1^{G93A}. D'autres auteurs ont montré que la fréquence de décharge est augmentée et que la durée de décharge est diminuée dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison aux motoneurones wild-type en condition de stimulation par différentes intensités de courant. Par ailleurs, les propriétés passives des neurones SOD1^{G93A} sont équivalentes à celles observées dans les motoneurones wild-type (Pieri *et al.*, 2003). Quelques années plus tard, ces mêmes auteurs ont montré que le seuil de déclenchement du potentiel d'action ainsi que le moment du premier potentiel d'action diminuent significativement et que la fréquence de décharge des motoneurones SOD1^{G93A} est augmentée en comparaison avec les motoneurones contrôles. L'analyse des courants sodiques voltage-dépendant montre que le courant sodique rapide transitoire n'est pas affecté par la mutation SOD1^{G93A} alors que le courant sodique persistant est significativement augmenté dans les neurones mutés (Pieri *et al.*, 2009). Ces perturbations de la composante persistante du courant sodique avaient précédemment été mises en évidence dans des cultures de moelles épinières de souris présymptomatiques (Kuo *et al.*, 2005). Enfin, en 2012, Pieri et collaborateurs ont montré que les motoneurones SOD1^{G93A} présentaient un excès d'expression des canaux calciques de type

N dans les neurones corticaux SOD1^{G93A} ce qui induit une mortalité plus élevée suite à la dépolarisation de la membrane (Pieri *et al.*, 2012).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux propriétés passives des motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison à des motoneurones sauvages, après trois à quatre semaines de culture. Nous nous sommes également intéressés au comportement électrique des motoneurones SOD1^{G93A} et wild-type en condition de blocage des certains complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Enfin, nous avons mesuré la concentration intracellulaire d'ATP ainsi que l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} en condition d'activation de l'activité, et donc de la demande en ATP, par l'application exogène de KCl.

II – L'activité électrique spontanée des motoneurones SOD1^{G93A} embryonnaires n'est pas perturbée

Les résultats présentés ci-après ont été obtenus sur des cultures cellulaires primaires de motoneurones issus de moelles épinières de souris à un stade embryonnaire. L'ensemencement des cellules a été fait sur des petites boîtes de Pétri à une densité de cent milles cellules par boîte. Les cultures sont utilisées entre vingt-et-un et trente-cinq jours d'incubation à 37°C et 5% de CO₂. Les motoneurones sont identifiés par fluorescence à l'aide du marquage GFP sous le promoteur HB9.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux propriétés électrophysiologiques des motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec des motoneurones wild-type. Nous avons étudié différents paramètres : le potentiel membranaire de repos, la résistance membranaire cellulaire, la fréquence de décharge spontanée ainsi que la courant nécessaire à injecter pour déclencher un potentiel d'action. Nous avons également mesuré la résistance de l'électrode (Tableau 8). Dans un premier temps, nous pouvons dire que les électrodes utilisées pour empaler les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} sont équivalentes, puisque leurs résistances ne sont pas différentes. En effet, la résistance moyenne des électrodes ayant servies à empaler les motoneurones wild-type est de $147 \pm 5,4 \text{ M}\Omega$ (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 29$) et la résistance moyenne des électrodes utilisées pour sharper les motoneurones SOD1^{G93A} est de $149 \pm 4,9 \text{ M}\Omega$ (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 46$). Par ailleurs, sur l'ensemble des motoneurones empalés, nous n'avons pas mis en évidence de différence du potentiel membranaire de repos des motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison aux motoneurones wild-type. En effet, le potentiel membranaire des motoneurones SOD1^{G93A}

est de $-63,7 \pm 1,6$ mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 35$) et celui des motoneurones wild-type de $-64,2 \pm 2,3$ mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 21$). Les motoneurones SOD1^{G93A} semblent très légèrement dépolarisés par rapport aux motoneurones sauvages. De plus, la fréquence de décharge spontanée des motoneurones SOD1^{G93A} n'est pas modifiée $8,7 \pm 1,1$ Hz (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 36$) par rapport à la fréquence de décharge spontanée des motoneurones wild-type $8,6 \pm 1,2$ (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 19$). D'autre part, le courant nécessaire d'injecter pour le déclenchement d'un potentiel d'action (PA) n'est pas différent dans les motoneurones wild-type $129,2 \pm 30,5$ pA (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 7$) et SOD1^{G93A} $147,6 \pm 17,4$ pA (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 7$). Seule la résistance membranaire semble perturbée dans les motoneurones SOD1^{G93A} empalés en comparaison aux motoneurones wild-type. En effet, la résistance membranaire est significativement diminuée dans les motoneurones SOD1^{G93A} à 65 ± 6 M Ω (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 14$) en comparaison aux motoneurones wild-type dont la résistance membranaire est de 92 ± 11 M Ω (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 13$).

	Wt	SOD1 ^{G93A}
n	21	35
Potentiel membranaire de repos (mV)	$-64,2 \pm 2,3$	$-63,7 \pm 1,6$
Résistance membranaire (M Ω)	92 ± 11	$65 \pm 6^*$
Fréquence de décharge (Hz)	$8,6 \pm 1,2$	$8,7 \pm 1,1$
Résistance électrode (M Ω)	$147 \pm 5,4$	$149 \pm 4,9$
Courant à injecter pour déclenchement de PA (pA)	$129,2 \pm 30,5$	$147,6 \pm 17,4$

Tableau 8 : Principales propriétés électriques des motoneurones de moelle épinière de souris wild-type et SOD1^{G93A} en culture

Les motoneurones sont identifiés par fluorescence. Les enregistrements s'effectuent vingt à trente-cinq jours après ensemencement (20 – 30 Days *In Vitro*, DIV). Les paramètres sont présentés en moyenne \pm erreur standard à la moyenne, n étant le nombre de motoneurones. * : $p \leq 0,05$. Analyses statistiques par t-test de Student.

La relation courant-potentiel des motoneurones SOD1^{G93A} est modifiée par rapport à celle des motoneurones wild-type (Figure 31). En effet, il faut injecter moins de courant dans les motoneurones SOD1^{G93A} pour obtenir la même dépolarisation que des les motoneurones wild-type. Par ailleurs, par l'équation $U=RI$ (U en Volt, R en Ω et I en Ampère), il est possible de calculer la résistance membranaire des motoneurones.

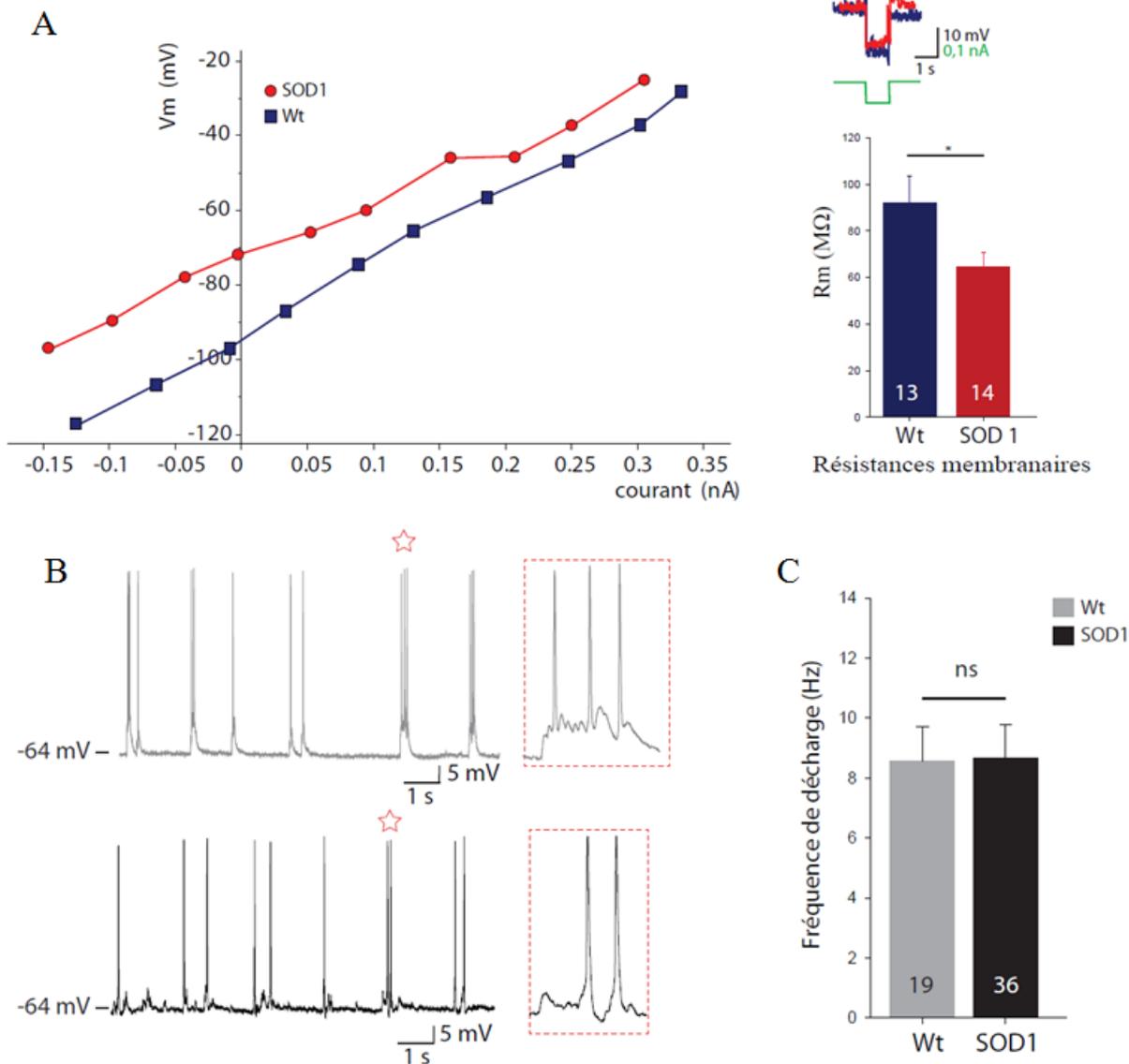


Figure 31 : Propriétés basales des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A}

Caractéristiques électrophysiologiques spontanées des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} après vingt-cinq à trente jours de culture. **A.** La relation courant-potential des motoneurones SOD1^{G93A} (en rouge) est plus dépolarisée que celle des motoneurones wild-type (en bleu) tout en lui restant parallèle. Les motoneurones SOD1^{G93A} sont plus dépolarisés que les motoneurones wild-type pour un même courant injecté. **B.** Activité électrique spontanée des motoneurones wild-type (en haut) et SOD1^{G93A} (en bas) des motoneurones embryonnaires après vingt-cinq à trente jours de culture. Les encadrés à droite des tracés électriques correspondent à des agrandissements de la partie des tracés surplombés d'une étoile rouge. **C.** Histogramme de la fréquence de décharge spontanée des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} après trois à quatre semaines de culture. La fréquence de décharge des motoneurones SOD1^{G93A} n'est pas modifiée par rapport à celle des motoneurones sauvages. Analyses statistiques par des test de Student ; ns : non significatif ; * : $p \leq 0,05$.

En effet, $R=U/I$. La résistance membranaire des motoneurones ainsi calculée montre qu'elle est moindre dans les motoneurones SOD1^{G93A}, $65 \pm 6 \text{ M}\Omega$ (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 14$) en comparaison avec les motoneurones wild-type, $92 \pm 11 \text{ M}\Omega$ (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 13$) (Figure 31, A).

Lorsque nous nous intéressons au profil de décharge des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A}, nous n'observons pas de différence majeure dans ce paramètre entre ces deux populations (Figure 31, B). Effectivement, le profil de décharge spontané des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} n'est pas modifié. La forme, l'amplitude et la fréquence de décharge (Figure 31) des potentiels d'action ne sont pas altérés dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones wild-type.

Dans cette étude, nous n'avons pas vu de différence quant à la résistance des électrodes, au potentiel membranaire de repos, au courant à injecter pour le déclenchement d'un potentiel d'action, et à la fréquence de décharge spontanée des motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec des motoneurones wild-type. Les seuls paramètres modifiés dans les motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones wild-type sont la relation courant-potentiel et la résistance membranaire des cellules.

III – L'activité électrique des motoneurones SOD1^{G93A} n'est que peu modifiée en condition de blocage des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale

Par la suite, nous avons cherché à voir comment réagissent les motoneurones SOD1^{G93A} en condition de blocage de différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale en comparaison avec les motoneurones wild-type. Dans cette étude, nous avons appliqué les inhibiteurs des complexes III (antimycine, A, à $100 \mu\text{M}$) et V (oligomycine, OL, à $50 \mu\text{M}$) dans le milieu de perfusion, en circuit ouvert. Les drogues sont appliquées entre vingt et trente minutes, et les cellules en culture sont ensuite rincées avec de l'ACSF. Les motoneurones empalés sont identifiés grâce au marquage fluorescent GFP sous le promoteur HB9.

Dans les motoneurones wild-type, l'oligomycine (Figure 32) appliquée à $50 \mu\text{M}$ va avoir comme effet d'augmenter la fréquence de décharge, de $7,1 \pm 1,2 \text{ Hz}$ (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) à $9,4 \pm 2,1 \text{ Hz}$ (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$). L'augmentation n'est cependant pas significative. Dans les motoneurones SOD1^{G93A}, l'oligomycine ne va pas augmenter la fréquence de décharge.

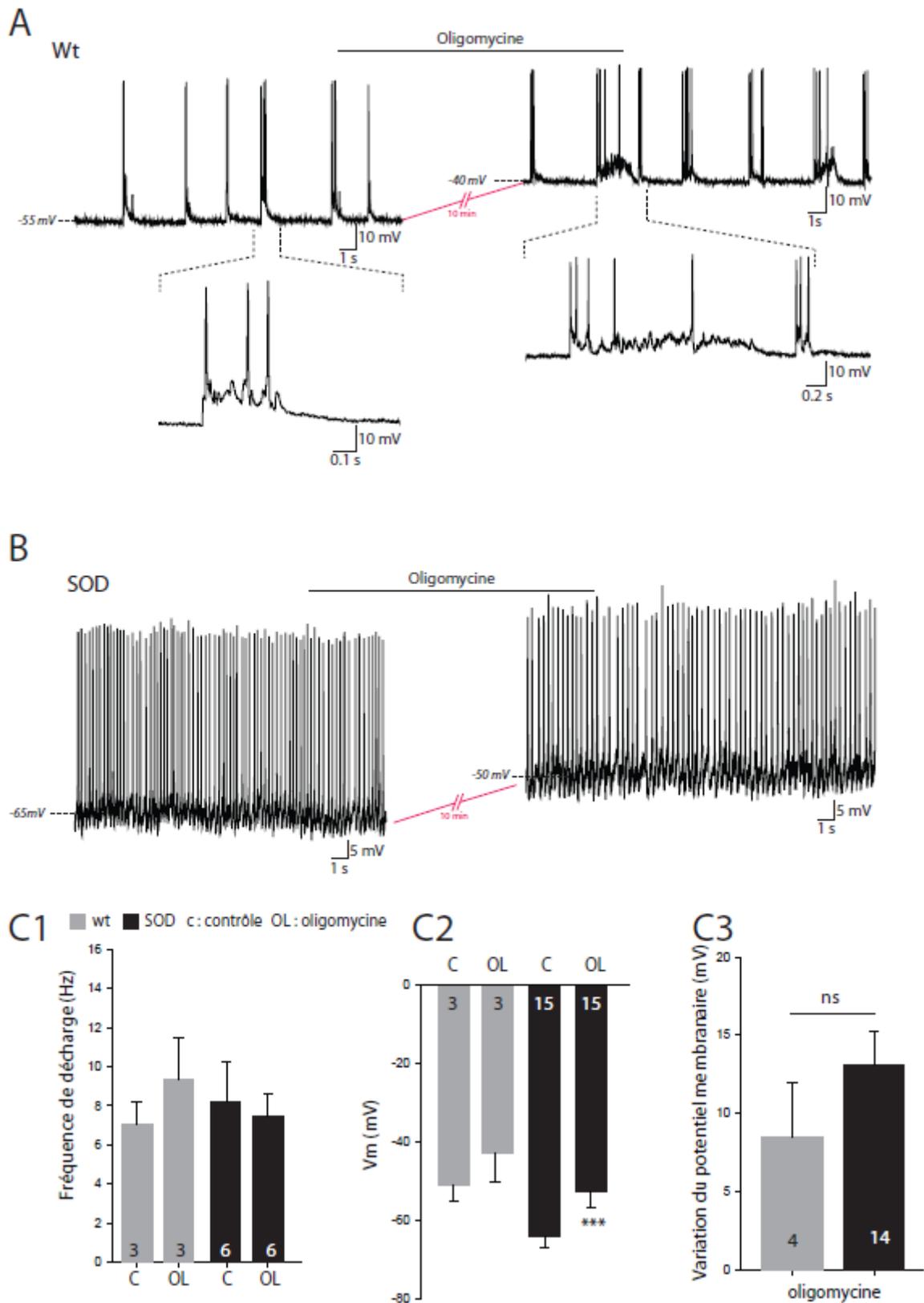


Figure 32 : Caractéristiques électrophysiologiques des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} sous l'action de l'oligomycine

Caractéristiques électrophysiologiques des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} empalés après trois à quatre semaines de culture, après application d'un inhibiteur du complexe V de la

chaîne respiratoire, l'oligomycine, à 50 μM . **A.** Profil de décharge des motoneurones wild-type avant et pendant l'application d'oligomycine. **B.** Profil de décharge des motoneurones SOD1^{G93A} avant et pendant l'application d'oligomycine. **C.** Histogrammes d'analyse des paramètres des motoneurones. **C1.** Fréquence de décharge des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} avant et pendant application d'oligomycine. La fréquence de décharge des motoneurones wild-type est augmentée (mais de manière non significative) après action de l'oligomycine. Il n'y a pas de différence de la fréquence de décharge des motoneurones SOD1^{G93A} après application d'oligomycine. **C2.** Le potentiel membranaire est statistiquement diminué dans les motoneurones SOD1^{G93A} après application d'oligomycine, contrairement à ce qui est observé dans les motoneurones wild-type. **C3.** La variation du potentiel membranaire avant et après application d'oligomycine des motoneurones SOD1^{G93A} n'est pas statistiquement différente de celle des motoneurones wild-type. Analyses statistiques par des tests de Student, appariés et non-appariés ; ns : non significatif ; *** : $p \leq 0,001$.

En effet, sous l'action de l'oligomycine, la fréquence de décharge est de $7,5 \pm 1,1$ Hz (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 6$) alors qu'elle est à $8,2 \pm 2,0$ Hz (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 6$) avant l'application de l'inhibiteur du complexe V.

Nous remarquons un effet inverse de l'oligomycine sur la fréquence de décharge spontanée des motoneurones SOD1^{G93A} en culture, en comparaison aux motoneurones wild-type. Cependant, ces différences n'étant pas significatives, il ne s'agit que de tendances observées. Par ailleurs, le potentiel membranaire avant et pendant l'application d'oligomycine est significativement dépolarisé dans les motoneurones SOD1^{G93A}, passant de $-64 \pm 3,0$ mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 15$) à $-53 \pm 4,1$ mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 15$). Dans les motoneurones wild-type, la dépolarisation observée suite à l'application d'oligomycine n'est pas significative. Sous l'action de l'inhibiteur du complexe V, le potentiel membranaire cellulaire est de $-49 \pm 5,2$ mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) alors que sa valeur en condition basale est de $-55 \pm 2,3$ mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$). Par ailleurs, la variation du potentiel membranaire avant et pendant l'application d'oligomycine semble plus importante dans les motoneurones SOD1^{G93A} ($13,1 \pm 2,1$ mV ; moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 14$) en comparaison aux motoneurones wild-type ($8,5 \pm 3,5$ mV ; moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 4$), mais il ne s'agit que d'une tendance non significative.

Nous avons ensuite regardé la réaction des motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison aux motoneurones wild-type lors de l'application d'antimycine, inhibiteur du complexe III des phosphorylations oxydatives (Figure 33). Tout d'abord, nous voyons que la fréquence de décharge des motoneurones wild-type n'est pas significativement modifiée après action de l'antimycine.

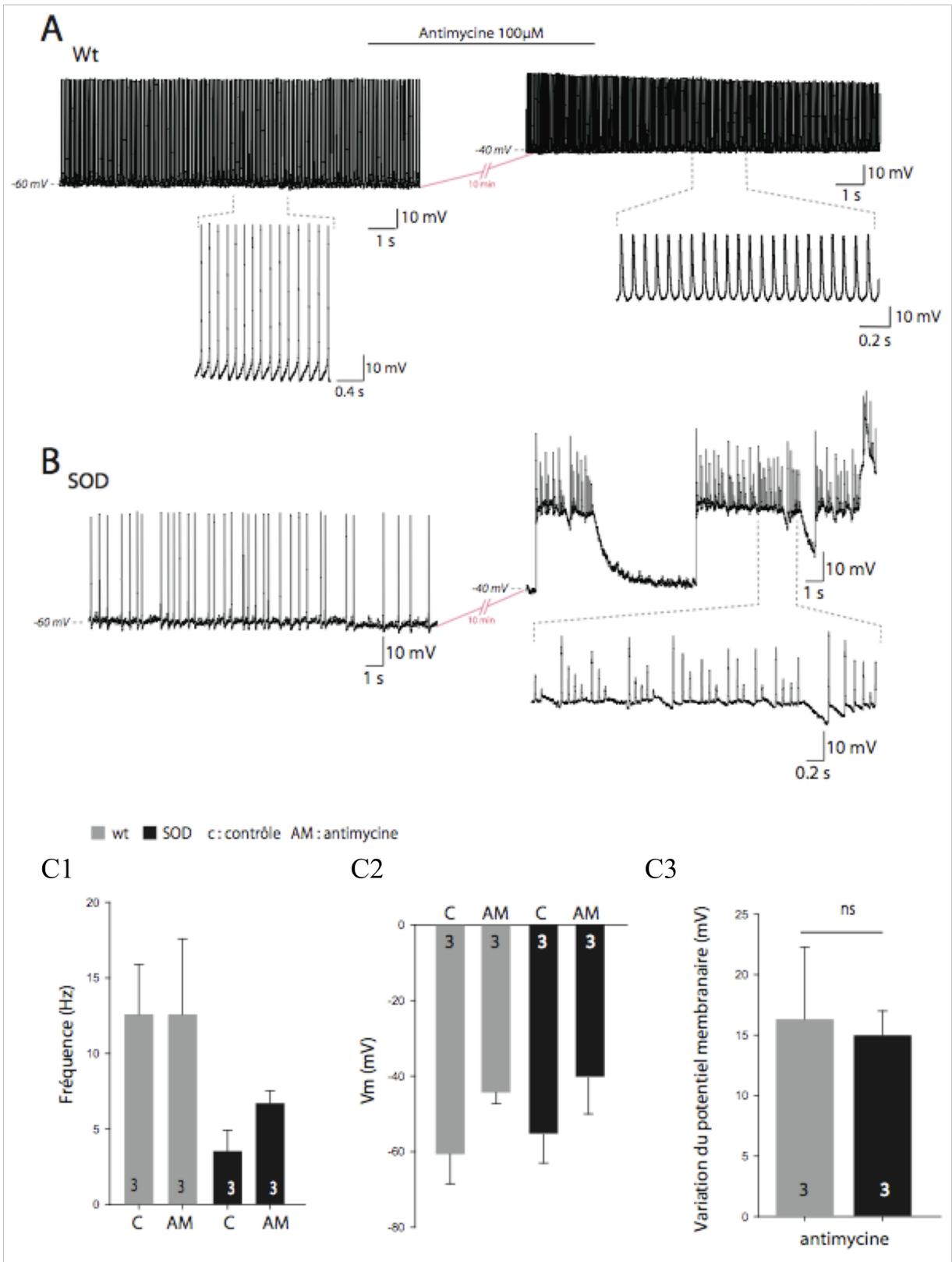


Figure 33 : Caractéristiques électrophysiologiques des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} sous l'action de l'antimycine

Caractéristiques électrophysiologiques des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} empalés après trois à quatre semaines de culture, après application d'un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire, l'antimycine, à 100 µM. **A.** Profil de décharge des motoneurones wild-

type avant et pendant l'application d'antimycine. **B.** Profil de décharge des motoneurones SOD1^{G93A} avant et pendant l'application d'antimycine. **C.** Histogrammes d'analyse des paramètres des motoneurones. **C1.** Fréquence de décharge des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} avant et pendant application d'antimycine. La fréquence de décharge des motoneurones wild-type n'est pas modifiée après action de l'antimycine. La fréquence de décharge des motoneurones SOD1^{G93A} est augmentée (mais de manière non significative) après application d'antimycine. **C2.** Le potentiel membranaire est diminué (non significativement) dans les motoneurones SOD1^{G93A} et wild-type après application d'antimycine. **C3.** La variation du potentiel membranaire avant et après application d'antimycine des motoneurones SOD1^{G93A} n'est pas statistiquement différente de celle des motoneurones wild-type. Analyses statistiques par des tests de Student, appariés et non-appariés ; ns : non significatif.

En effet, la fréquence de décharge est de $12,6 \pm 3,3$ Hz (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) avant application d'antimycine et de $12,6 \pm 5,0$ Hz (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) après action de l'inhibiteur. Remarquons cependant que l'échantillon n'est que de trois individus, ce qui peut lisser certains effets.

Dans le cas des motoneurones SOD1^{G93A}, la fréquence de décharge des motoneurones est augmentée mais de manière non significative.

Avant application d'antimycine, la fréquence de décharge est de $4,0 \pm 0,9$ Hz (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) et elle est augmentée à $7,0 \pm 0,5$ Hz (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) après ajout d'antimycine dans le liquide de perfusion. Lorsque nous regardons la variation du potentiel membranaire, avant et pendant application de l'inhibiteur du complexe III, nous remarquons que les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} réagissent de la même manière. En effet, la dépolarisation des motoneurones wild-type après ajout d'antimycine est de $16,3 \pm 5,9$ mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) et celle des motoneurones SOD1^{G93A} est de $14,3 \pm 1,3$ mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$). Le potentiel membranaire des motoneurones wild-type passe de -61 ± 8 mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) avant application d'antimycine à -44 ± 3 mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) après application de l'inhibiteur. Dans les motoneurones SOD1^{G93A}, le potentiel membranaire est dépolarisé à $-40,5 \pm 9,5$ mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$) après action de l'antimycine, alors que sa valeur contrôle est de $-55,5 \pm 7,5$ mV (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 3$). Cependant, notons que du fait du faible nombre d'échantillons, les résultats ne sont pas significatifs. Il ne s'agit que de tendances.

Nous avons ensuite étudié la réaction des motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison aux motoneurones wild-type en terme de concentration intracellulaire d'ATP et de respiration mitochondriale sous l'effet d'un activateur exogène de l'activité électrique, le KCl.

IV – Perte de l'homéostasie énergétique face à une augmentation de la demande

Dans cette étude, nous travaillons sur des populations de 20 000 et 50 000 motoneurones. Pour les expériences de concentration intracellulaire d'ATP, les expériences sont réalisées après huit à dix jours de culture, et pour ce qui est de la consommation d'oxygène, les expérimentations sont réalisées après un à trois jours *in vitro*.

Dans un premier temps, nous voyons que la concentration d'ATP intracellulaire est moins impactée par la présence d'un activateur exogène dans les motoneurones SOD1^{G93A} que dans les motoneurones wild-type (Figure 34, A). En effet, la concentration intracellulaire d'ATP est diminuée d'environ 88% dans les motoneurones wild-type passant de $27,6 \pm 4,0$ pmol (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 14$) en condition basale à $3,2 \pm 1,0$ pmol (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 7$) après application de KCl. Dans les motoneurones SOD1^{G93A}, l'application de KCl ne diminue la concentration intracellulaire d'ATP que de 73 % environ. En effet, la concentration intracellulaire d'ATP après action du KCl est de $3,3 \pm 1,0$ pmol (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 7$) en comparaison à la valeur basale de $12,2 \pm 2,4$ pmol (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 12$).

Lorsque l'on s'intéresse à l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale par la mesure du taux de consommation d'oxygène, on remarque que dans les motoneurones SOD1^{G93A}, les mitochondries sont incapables d'augmenter leur activité pour répondre à une augmentation de l'activité synaptique, alors que les mitochondries des motoneurones wild-type augmentent leur activité pour répondre à la hausse d'activité, ce qui augmente la demande en ATP (Figure 34, B). En effet, dans les motoneurones wild-type, la consommation d'oxygène est augmentée à $73,7 \pm 3,8$ pmol/min (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 8$) en comparaison de la valeur basale, $47,8 \pm 6,1$ pmol/min (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 8$). Dans les motoneurones SOD1^{G93A}, la valeur de consommation d'oxygène en réponse à l'application de KCl est très proche de la valeur contrôle. Effectivement, en réponse au KCl, le taux de consommation d'oxygène dans les motoneurones SOD1^{G93A} est de $68,8 \pm 9,6$ pmol/min (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 8$) et le taux de consommation basal d'oxygène dans ces mêmes cellules est de $67,8 \pm 11,3$ pmol/min (moyenne \pm erreur standard à la moyenne, $n = 8$). Les mitochondries des motoneurones SOD1^{G93A} sont incapables

d'augmenter leur activité en fonction de la demande, ce qui confirme l'hypothèse d'un découplage partiel des mitochondries des motoneurones de moelles épinières dans ce modèle murin de la maladie, très en amont des premiers symptômes.

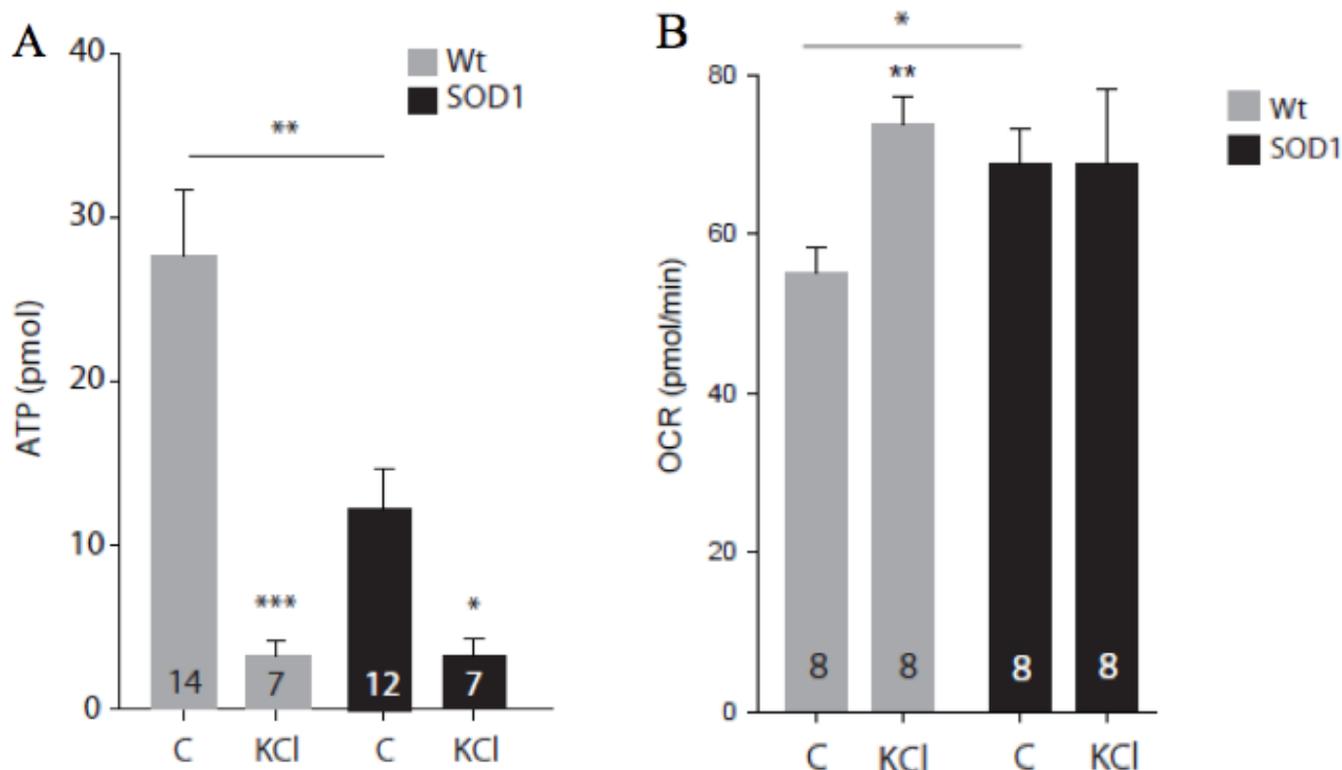


Figure 34 : Concentration intracellulaire d'ATP et consommation d'oxygène dans les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} en cas d'activation avec du KCl

A. La concentration intracellulaire d'ATP en présence d'un activateur synaptique est exprimée en pmol. La concentration d'ATP en présence de KCl dans les motoneurones wild-type est diminuée d'environ 88% par rapport à la concentration intracellulaire d'ATP en condition basale. Dans les motoneurones SOD1^{G93A}, la concentration d'ATP intracellulaire est également diminuée par rapport au contrôle en condition basale, mais en moins forte proportion (70%). **B.** La consommation d'oxygène mitochondrial en présence de KCl est exprimée en pmol par minute. En présence de KCl, les motoneurones wild-type sont capables d'augmenter leur respiration (155% de la valeur contrôle), pour adapter leur production d'ATP, alors que les motoneurones SOD1^{G93A} en sont incapables. Analyses statistiques par des test de Student appariés et non-appariés. * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

V - Discussion

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence que les propriétés électriques spontanées des motoneurones SOD1^{G93A} ne sont pas modifiées au stade embryonnaire dans des cultures primaires de motoneurones. En effet, le potentiel de membrane des motoneurones SOD1^{G93A}

n'est pas différent de celui observé pour les motoneurones wild-type. De plus, nous n'avons pas mis en évidence de différence dans la fréquence de décharge spontanée des motoneurones SOD1^{G93A} après trois à quatre semaines de culture en comparaison avec les motoneurones wild-type. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues par Kuo et collaborateurs (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2005). De plus, le profil de décharge des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} est similaire. Le seul paramètre électrique spontané perturbé dans les motoneurones SOD1^{G93A} est la résistance d'entrée dans les motoneurones en comparaison aux motoneurones wild-type. En effet, la résistance d'entrée est plus faible dans les motoneurones wild-type, ce qui fait que la dépolarisation est plus importante pour un même courant injecté en comparaison aux motoneurones sauvages. Par ailleurs, nous n'avons mis en évidence que peu de différences significatives dans la réponse électrique suite à l'application de différents inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, les fréquences de décharge avant et pendant application des inhibiteurs dans les motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} ne sont pas modifiées significativement, même si des tendances sont observables. Il en est de même pour la variation du potentiel membranaire des motoneurones wild-type et SOD1^{G93A} suite à l'application d'oligomycine ou d'antimycine. Seul le potentiel de membrane après action de l'oligomycine dans les motoneurones SOD1^{G93A} est modifié en comparaison aux motoneurones wild-type. Remarquons cependant que nos échantillons sont de petites tailles ce qui peut avoir pour effet de masquer certains effets, qui seraient visibles dans des populations plus larges. Par exemple, l'augmentation de la fréquence de décharge des motoneurones SOD1^{G93A} pendant l'application d'antimycine est à la limite de la significativité ($p = 0,059$) en comparaison avec la fréquence observée dans ces mêmes neurones en condition spontanée.

Dans cette étude, nous avons également mis en évidence que les motoneurones SOD1^{G93A} répondent de manière différente des motoneurones wild-type à l'application de KCl. En effet, lors d'ajout de KCl, la concentration intracellulaire d'ATP est moins diminuée dans les motoneurones SOD1^{G93A} que dans les motoneurones wild-type. Cependant, pour les cellules SOD1^{G93A} comme pour les cellules wild-type, une activation électrique au KCl fait chuter de manière drastique la concentration intracellulaire d'ATP. Par ailleurs, lorsque l'on s'intéresse à la consommation d'oxygène, marqueur de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, en présence de KCl, on remarque que les mitochondries des motoneurones SOD1^{G93A} sont incapables d'augmenter leur activité pour répondre à une augmentation de la demande, comme le font les mitochondries des motoneurones wild-type. Ces résultats confirment bien

le découplage partiel des motoneurones SOD1^{G93A} en comparaison avec les motoneurones wild-type.

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'en condition basale, spontanée, les motoneurones SOD1^{G93A} ne différaient pas dans leurs propriétés électriques passives des motoneurones wild-type. Cependant, les motoneurones SOD1^{G93A} sont incapables d'adapter leur production d'énergie sous forme d'ATP lors d'une augmentation de la demande.

DISCUSSION GÉNÉRALE

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans ce travail, nous avons cherché à mettre en évidence des modifications des propriétés bioénergétiques, métaboliques et électrophysiologiques intrinsèques des motoneurones de moelle épinière de souris possédant la mutation $SOD1^{G93A}$, modèle de la sclérose latérale amyotrophique, dès le stade embryonnaire. L'hypothèse de travail a été que des modifications bioénergétiques seraient des signes précoces du processus pathologique qui conduira à la mort des motoneurones à l'âge adulte au cours de la SLA.

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux modifications mitochondriales, notamment de part le fait que les mitochondries sont les « centrales énergétiques » des motoneurones, produisant la quasi-totalité de l'ATP nécessaire aux fonctions cellulaires. De part leur grande taille et leur forte activité, les motoneurones sont des cellules particulièrement sensibles à des variations de l'ATP disponible, pour assurer leurs fonctions et maintenir leur stabilité vitale.

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence qu'il existe des perturbations de l'homéostasie énergétique dès la période embryonnaire. En effet, dans notre modèle de SLA, nous avons observé une diminution de la quantité d'ATP intracellulaire, ce qui fait que les cellules disposent de moins d'énergie utilisable. Par ailleurs, cette réduction d'énergie dans les cellules ne provient pas d'une diminution d'activité de la voie de production, essentiellement mitochondriale. Effectivement, l'activité de la chaîne respiratoire évaluée par la mesure de la consommation d'oxygène, n'est pas diminuée ; paradoxalement, elle est augmentée de manière significative. Ces éléments sont en faveur d'un découplage partiel de la chaîne des phosphorylations oxydatives. En effet, la mitochondrie consomme de l'oxygène, mais ce dernier n'est pas utilisé pour produire de l'ATP. L'oxygène consommé peut servir à différentes fonctions, comme le maintien du potentiel membranaire mitochondrial, paramètre essentiel pour la survie cellulaire. Dans ce travail, nous avons mis en évidence que ce découplage mitochondrial partiel passe par les protéines de découplage, les UCPs. Ces protéines, et notamment UCP3 découplent la chaîne respiratoire mitochondriale principalement pour lutter contre les ROS. Nous nous sommes ensuite intéressés à la consommation énergétique dans notre modèle. En effet, un déficit d'ATP provient soit de modifications de la production, soit de modifications de sa consommation. Lorsque nous avons étudié les processus consommateurs d'énergie, et notamment l'activité électrique spontanée des motoneurones, leur fonction essentielle, nous n'avons pas mis en évidence de

différences entre les cellules modèles de SLA et les cellules contrôles. Par ailleurs, lorsque nous stimulons l'activité électrique chimiquement, nous remarquons que les motoneurones SOD1m sont incapables d'adapter leur production énergétique à l'inverse des motoneurones sauvages. Ces différents éléments sont en faveur de l'hypothèse d'un découplage mitochondrial partiel, dès le stade embryonnaire, responsable des perturbations de l'homéostasie énergétique très en amont des premiers symptômes.

Au cours de cette discussion, nous allons aborder dans un premier temps les perturbations mitochondriales mises en évidence dans les modèles d'étude de la SLA et chez les patients. Nous aborderons ensuite le découplage partiel des mitochondries motoneuronales en proposant des explications du mécanisme mis en jeu. Enfin, nous aborderons les conséquences des perturbations observées sur l'activité et les processus pathologiques, avant de mettre en relation les données observées sur la SLA avec d'autres maladies neurodégénératives.

I – Des perturbations homéostasiques et mitochondriales dans le modèle murin de la SLA

Depuis plus de 40 ans après sa première description par Irwin Fridovich (McCord & Fridovich, 1969), la fonction de la SOD1 sauvage a été étudiée en relation avec sa localisation cytosolique prédominante. Cependant, une petite fraction de cette enzyme abondante et ubiquitaire est localisée dans les mitochondries (Weisiger & Fridovich, 1973; Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001; Mattiazzi *et al.*, 2002). Beaucoup de SOD1m sont également localisées dans différents sous-compartiments mitochondriaux dans une proportion semblable ou même plus large que l'enzyme de type sauvage (Liu *et al.*, 2004; Pasinelli *et al.*, 2004; Vijayvergiya *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2006; Vande Velde *et al.*, 2008; Israelson *et al.*, 2010). Ainsi, en raison de la multiplicité des tâches effectuées par les mitochondries dans le métabolisme énergétique, l'homéostasie du calcium et la régulation de la voie apoptotique intrinsèque et parce que la mutation provoque une augmentation de la quantité de SOD1 associée à la mitochondrie, il est probable que la liaison de SOD1m aux mitochondries soit au centre de la pathogénicité de la SLA. Par ailleurs, les mitochondries, par leurs rôles essentiels dans les mécanismes physiologiques de mort cellulaire, sont des acteurs centraux dans diverses conditions pathologiques comme les cancers, le diabète, l'obésité, l'ischémie, ou les maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, ainsi que dans le vieillissement.

A - Une augmentation des ROS

La mitochondrie est la source principale de production des espèces oxygènes réactives (ROS). Ces ROS regroupent des molécules et des radicaux libres (espèces chimiques possédant un électron non-apparié) dérivés du métabolisme de l'oxygène. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), produit de l'élimination d'un électron de l'oxygène, est le précurseur de la plupart des ROS et est un médiateur des réactions de la chaîne oxydative. La dismutation de l'anion superoxyde, spontanément ou sous l'action de la superoxyde dismutase, produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui à son tour peut être totalement réduit en eau ou en présence d'ions ferreux ou cuivreux, peut former un radical hydroxyle hautement réactif ($\cdot OH$). De plus, l' $O_2^{\cdot-}$ peut réagir de manière non enzymatique avec d'autres radicaux comme l'oxyde nitrique (NO). Le produit de cette réaction, le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) est également un oxydant très puissant. Les espèces oxygènes dérivées du NO sont appelées espèces réactives nitrogènes (RNS).

Dans les cellules vivantes, le site principal non-enzymatique de production des ROS est la chaîne respiratoire mitochondriale, contenant plusieurs centres redox, comme les centres flavines et les centres fer-soufre, capable de transférer un électron à l'oxygène, formant l' $O_2^{\cdot-}$. Une proportion de SOD1m est localisée au niveau de l'espace inter-membranaire mitochondrial, le site de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Mattiuzzi *et al.*, 2002). En effet, des vacuoles provenant de l'espace inter-membranaire mitochondrial, contiennent des agrégats protéiques SOD1m à la fois chez les souris transgéniques SOD1^{G37R} et SOD1^{G93A} (Wong *et al.*, 1995; Jaarsma *et al.*, 2001; Higgins *et al.*, 2002). En outre, il semble que la SOD1m soit préférentiellement recrutée au niveau de l'espace inter-membranaire mitochondrial, où elle agit paradoxalement pour augmenter la production de ROS toxiques (Ahtoniemi *et al.*, 2008; Goldsteins *et al.*, 2008).

De plus, il a été constaté que la SOD1m associée à la mitochondrie a une tendance accrue à former des oligomères, semblables à ceux formés par la protéine β -amyloïde dans la maladie d'Alzheimer (Pasinelli *et al.*, 2004). La formation de ces assemblages protéiques permet à la SOD1m de se lier à la membrane mitochondriale interne, décalant ainsi l'état d'oxydoréduction des mitochondries (Ferri *et al.*, 2006). Ce changement prédispose les organelles à un environnement plus oxydant, portant ainsi atteinte à l'activité des complexes respiratoires (Bruijn *et al.*, 2004; Ferri *et al.*, 2006; Ahtoniemi *et al.*, 2008). Un changement de l'état redox de l'organelle peut aggraver cette oligomérisation, conduisant à une production accrue de ROS.

Depuis plusieurs années, des marqueurs de stress oxydatif comme les niveaux protéiques de carbonyle, la peroxydation des lipides et des protéines de glycoxydation ont été mis en évidence chez des patients SLA (Shaw *et al.*, 1995; Shibata, 2001; Shibata *et al.*, 2002). Une étude systématique des dommages oxydatifs des protéines, des lipides et de l'ADN dans plusieurs régions du système nerveux central (cortex moteur, cortex pariétal et cervelet) appuie l'hypothèse d'un accroissement de la production de ROS dans la moelle épinière des SLAs et SLAf, c'est-à-dire dans la zone qui est la plus touchée dans la maladie (Ferrante *et al.*, 1997; Bogdanov *et al.*, 2000). Ces observations ont été confirmées par des expériences sur les souris transgéniques surexprimant le mutant SOD1, qui servent de modèle pour la SLA (Andrus *et al.*, 1998; Bogdanov *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004), et sont corrélées avec la progression de la maladie (Hall *et al.*, 1998). Les marqueurs de stress oxydatif ont également été détectés dans le muscle squelettique de ces souris (Mahoney *et al.*, 2006).

B - Perturbation de l'homéostasie protéique

Les perturbations de l'homéostasie protéique sont une des caractéristiques des maladies se développant à l'âge adulte, ce qui les définit comme des « protéinopathies » (Saxena & Caroni, 2011). Dans les conditions physiologiques, le maintien de l'homéostasie protéique dépend du bon fonctionnement de trois modules cellulaires : le module de synthèse, par les ribosomes et le contrôle de la traduction, le module d'assemblage par le système des protéines chaperonnes et les modifications post-traductionnelles, ainsi que le module de dégradation par le système ubiquitine-protéasome, l'autophagie par la voie des lysosomes et les protéases (Morimoto & Cuervo, 2009; Powers *et al.*, 2009). L'ensemble de ces systèmes présente une plasticité afin de pouvoir répondre à des conditions de stress ou à une demande physiologique importante comme le besoin de sécrétion. Ces processus sont donc eux-mêmes régulés par des voies de signalisation comme la réponse « Heat Shock », la réponse UPR, la concentration de calcium dans les différents compartiments ou encore les réponses inflammatoires (Powers *et al.*, 2009; Schuck *et al.*, 2009). Par ailleurs, des mutations de protéines, des stress environnementaux ou encore le vieillissement peuvent modifier ces composants et perturber ce réseau. Or, dans la SLA, les modules d'assemblage et de dégradation sont sévèrement touchés. Les activités du protéasome et des chaperonnes cytosoliques diminuent (Kabashi *et al.*, 2004; Tummala *et al.*, 2005).

Des mutations dans un gène, comme celui de la SOD1, peut d'une part altérer la stabilité de la protéine en modifiant ses propriétés conformationnelles, et d'autre part altérer le fonctionnement de certains processus cellulaires, comme les chaperonnes ou le protéasome, et donc aggraver la proportion d'agrégats (Robberecht & Philips, 2013). Il est intéressant de savoir si les mauvais assemblages protéiques sont nécessairement liés à la présence d'une mutation. Environ un tiers des protéines, de part leur structure moléculaire complexe, ont une tendance au mauvais repliement (Roth & Balch, 2011). L'accumulation de sources de stress intrinsèques, comme le contexte génétique ou l'âge, et environnementales comme les toxines, les infections ou les traumatismes physiques, peuvent influencer l'état de repliement d'une protéine au cours du temps. Par exemple, la SOD1 sauvage, une fois oxydée, présente des défauts de conformation semblables à ceux observés pour la SOD1 mutée. Par ailleurs, elle acquiert des propriétés toxiques comme une inhibition du transport axonal (Bosco *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que le vieillissement entraîne une baisse des systèmes de maintien de l'homéostasie protéique. Par exemple, les chaperonnes HSP90 et la CRT diminuent dans le cerveau de souris dès l'âge de trois mois (Gray *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008). Certains composants du système ubiquitine-protéasome, comme des sous-unités du protéasome et des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine, sont également diminués. Par ailleurs, les niveaux d'expression de VCP (« Valosin-Containing-Protein »), une protéine participant à des processus de l'homéostasie protéique comme la dégradation de protéines ou l'autophagie, diminuent (Yang *et al.*, 2008). Plusieurs mutations de ce gène ont d'ailleurs été associées à la SLA. Il est possible de considérer que les cas sporadiques de ces maladies peuvent être initiés par des perturbations liées au vieillissement ou à l'environnement, ce qui favoriserait la fragilisation du fonctionnement de facteurs importants dans l'homéostasie protéique. Ces dysfonctionnements favoriseraient de mauvais repliements protéiques, comme peuvent le faire les mutations liées à la SLA. Ces protéines présentant une mauvaise conformation se comporteraient comme des cofacteurs toxiques en affaiblissant et/ou en inhibant les processus d'homéostasie protéique. Par ailleurs, elles augmenteraient les niveaux de stress cellulaire, jusqu'à enclencher un point de non-retour. Ainsi, ce facteur cryptogénique, c'est-à-dire lié à l'âge ou à l'environnement, déclencherait les mêmes voies de mort qu'au cours de la SLA initiée par des facteurs génétiques.

La perturbation des composants critiques de l'homéostasie cellulaire peut contribuer à la vulnérabilité des motoneurones. Ces perturbations dans l'hyperexcitabilité, la régulation du calcium et les agrégations, peuvent amplifier de manière chronique et *in fine*, dépasser le seuil

de tolérance des cellules. Ces dysfonctionnements peuvent se propager et être amplifiés par les cellules environnantes, comme la microglie ou les astrocytes. En effet, la sécrétion de la SOD1m extracellulaire par les motoneurones active les cellules microgliales. Elles peuvent à leur tour sécréter des facteurs toxiques pour les motoneurones, comme les cytokines et favoriser le stress oxydatif. Elles permettent ainsi l'amplification des niveaux de stress cellulaire des motoneurones (Urushitani *et al.*, 2006).

C - Perturbation de l'homéostasie calcique

Une diminution de la capacité des mitochondries de la moelle épinière à tamponner le calcium (Ca^{2+}) a été observée chez les souris exprimant une mutation SOD1 liée à la SLA, qui développent une maladie du motoneurones avec de nombreux marqueurs pathologiques retrouvés chez les patients SLA. Une augmentation de calcium intracellulaire peut devenir fatale pour des cellules qui sont à la base peu armées pour tamponner une concentration excessive de calcium. Plusieurs travaux ont corrélé la vulnérabilité des motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral dans la SLA à leur faible capacité à tamponner le calcium, capacité cinq à six fois moindre que celle des motoneurones résistants, comme les neurones oculomoteurs qui ne meurent pas ou peu dans la SLA (Lips & Keller, 1998; Palecek *et al.*, 1999). Cette diminution de la capacité mitochondriale à tamponner le calcium peut s'expliquer par la diminution de protéines tampons du calcium cytoplasmique, comme la parvalbumine et la calbindine, dans les populations de motoneurones vulnérables, et non chez les résistants (Alexianu *et al.*, 1994; Palecek *et al.*, 1999). Chez les souris SOD1m, la diminution de la parvalbumine et de la calbindine a été observée dès le stade présymptomatique (Sasaki *et al.*, 2006).

Le calcium semble jouer un rôle essentiel dans la vulnérabilité des motoneurones. Cependant, il n'a pas été déterminé si, au sein des motoneurones de la moelle épinière, les motoneurones FF, les premiers touchés dans la maladie, présentent des défauts de surcharge de calcium ou de déficience dans leurs système de tamponnage en amont de leur dégénérescence. L'excès de calcium peut être délétère pour le fonctionnement des organelles comme le RE ou la mitochondrie. En effet, dans le cas de la mitochondrie, le calcium entraîne une dépolarisation de la membrane mitochondriale, la production de ROS (Petrosillo *et al.*, 2004) et favorise le processus de perméabilisation transitoire de la mitochondrie, ce qui conduit à la libération de facteurs pro-apoptotiques (Petrosillo *et al.*, 2004). En ce qui concerne le RE, des défauts d'homéostasie calcique peuvent en partie activer le stress du RE. Effectivement, la déplétion

en calcium du RE peut entraîner une diminution de l'activité des chaperonnes (Berridge, 2002), ce qui conduit à un repliement moins efficace, à des agrégations et à une activation des capteurs de stress. Précédemment, des études avaient montré qu'il y avait une diminution d'activité globale des chaperonnes en présence de la SOD1 mutée dès le stade asymptotique (Tummala *et al.*, 2005). Plusieurs études ont par ailleurs corrélé la perturbation de l'homéostasie calcique avec la formation d'agrégats, et notamment une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Ce mécanisme serait dépendant de la surexpression de NO (Kim *et al.*, 2007). L'augmentation du calcium et du stress oxydatif peut entraîner un mauvais repliement de la SOD1m (Tateno *et al.*, 2004). Par ailleurs, il a été montré que l'augmentation du calcium intracellulaire était responsable de l'inhibition de l'activité du protéasome (Realini & Rechsteiner, 1995), qui diminue dans les modèles de SLA (Kabashi *et al.*, 2004).

Les défauts d'homéostasie calcique jouent un rôle important dans la vulnérabilité à la mort des motoneurones SOD1 mutés. Les perturbations du tamponnage du calcium dans certains sous-types de motoneurones favorisent l'augmentation de la concentration cytoplasmique calcique, ce qui peut augmenter la production de stress oxydatif et perturber le fonctionnement d'organelles comme la mitochondrie.

D - Perturbation de l'homéostasie énergétique

Il a été suggéré que des modifications du métabolisme musculaire pourraient être la cause directe de la destruction de la jonction neuromusculaire. L'observation initiale était que les souris SOD1m avaient un déficit pondéral par rapport aux souris sauvages. Ce déficit énergétique n'est pas causé par une diminution de la prise alimentaire, mais par une augmentation du métabolisme basal et du métabolisme énergétique, en particulier lipidique, qui sont extrêmement perturbés chez les souris SOD1m (Dupuis *et al.*, 2004b; Fergani *et al.*, 2007). De plus, le profil d'expression des gènes dans le muscle ainsi que l'augmentation de la capture de glucose par le muscle suggèrent une augmentation du métabolisme énergétique dans ce tissu. Ainsi, chez la souris SOD1m, le métabolisme musculaire augmenté provoque une fonte des réserves adipeuses et un hypermétabolisme de l'animal qui entraîne un déficit énergétique chronique. Ces anomalies très précoces précèdent l'amyotrophie et les défauts électromyographiques, et qui ne sont, de ce fait, que des conséquences.

Le déficit énergétique chronique et l'hypermétabolisme musculaire contribuent-ils à la maladie du motoneurone ? Pour le savoir, la ration calorique des souris SOD1m a été augmentée en les nourrissant avec un régime enrichi en lipides. Cette manipulation nutritionnelle a corrigé le déficit énergétique et a permis d'observer une nette augmentation de la survie des animaux. De plus, la survie des motoneurons était augmentée et la dénervation musculaire diminuée. Cet effet protecteur du régime hyperlipidique est dose-dépendant puisque des données du laboratoire de Mark Mattson confirment ces résultats et montrent qu'une ration énergétique plus élevée que celle utilisée précédemment est encore plus efficace en terme d'accroissement de la survie des souris SOD1m (Mattson *et al.*, 2007).

Les souris SOD1m sont donc en déficit énergétique et la correction nutritionnelle de ce déficit améliore le phénotype clinique. À l'inverse, aggraver le déficit énergétique, en soumettant les souris SOD1m à une restriction calorique, exacerbe le phénotype clinique, ce qui confirme que le déficit énergétique est un déterminant important de la pathologie de ces souris. Ces études semblent distinguer la SLA des autres maladies neurodégénératives. En effet, les modèles transgéniques de maladie d'Alzheimer ou de maladie de Huntington ont un phénotype métabolique opposé à celui des souris SOD1m, avec une tendance à l'obésité et à l'insulino-résistance, et sont protégés par la restriction calorique (Maswood *et al.*, 2004; Rasouri *et al.*, 2007) et aggravés par le régime hyperlipidique. Les causes de ces différences entre maladies neurodégénératives sont à l'heure actuelle inconnues, mais leur élucidation pourrait permettre de comprendre les bases de la sélectivité neuronale de ces pathologies.

Le déficit énergétique et l'hypermétabolisme existent-ils chez les patients ? Plusieurs études du Pr Couratier avaient montré que les patients SLA étaient, tout comme les souris SOD1m, hypermétaboliques (Desport *et al.*, 1999; Desport *et al.*, 2001; Desport *et al.*, 2006), ce qui suggérait une certaine conservation des mécanismes pathologiques. Afin de déterminer si ces altérations du métabolisme énergétique étaient aussi retrouvées chez les patients, les taux de lipides circulants chez plusieurs centaines de patients SLA et de patients contrôles ont été comparés. Les patients ayant une SLA de type sporadique présentaient des niveaux anormalement élevés de lipides circulants (Dupuis *et al.*, 2008). Ainsi, près d'un patient SLA sur deux a des niveaux de LDL-cholestérol considérés comme trop élevés. De plus, les patients SLA présentant un rapport LDL/HDL anormalement élevé, facteur de risque cardiovasculaire bien caractérisé, avaient une survie plus élevée de quinze mois, signifiant donc que la dyslipidémie est un facteur protecteur dans la SLA. En conclusion, souris SOD1m et patients SLA développent une maladie métabolique, avec un hypermétabolisme et un

déficit énergétique. Les détails du tableau clinique sont cependant différents, ainsi, les patients SLA sont hyperlipidémiques, alors que les souris SOD1m ont une tendance marquée à l'hypolipidémie. Cependant, dans les deux cas, l'augmentation des lipides circulants ralentit la progression de la maladie. À l'heure actuelle, les arguments expérimentaux chez les patients SLA sont purement corrélatifs et la correction du déficit énergétique chez les patients SLA une piste thérapeutique encore inexplorée. Ces résultats suggèrent déjà que l'utilisation d'agents hypolipémiants comme les statines chez les patients SLA pourrait être néfaste.

Ces perturbations mitochondriales observées à la fois dans des modèles murins de la SLA et chez des patients ont orienté nos recherches sur les dysfonctions mitochondriales et notamment les perturbations énergétiques.

II – Un découplage mitochondrial partiel dans le modèle murin de SLA

A – Une diminution d'ATP intracellulaire

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que l'homéostasie énergétique était un facteur particulièrement perturbé dans la SLA. Nos études de la concentration intracellulaire d'ATP, carburant cellulaire, ont mis en évidence qu'il y a un déficit énergétique marqué dans les motoneurones SOD1m d'environ 55% comparés aux motoneurones sauvages. Ce déficit d'ATP avait précédemment été montré dans d'autres modèles de la maladie, comme dans des lignées neuronales exprimant la mutation SOD1^{G37R} (Cousse *et al.*, 2011). Cependant dans leur modèle, la diminution d'ATP intracellulaire n'était que d'environ 40%. La différence observée entre cette étude et la notre provient de plusieurs facteurs ; tout d'abord nous utilisons des souris mutantes SOD1 portant la mutation G93A fortement exprimée (SOD1^{G93Ahigh}), alors que leur modèle exprime une autre mutation de la SOD1. De plus, le matériel utilisé dans ces deux études est différent, puisque nous travaillons sur des motoneurones de moelle épinière cultivés à un stade embryonnaire, alors qu'ils utilisent des lignées de neuroblastomes de souris. Par ailleurs, une étude récente portant sur un modèle cellulaire de SLA, exprimant la mutation VCP et sur des fibroblastes de patients SLA présentant la mutation VCP, montre une diminution du niveau d'ATP intracellulaire soit par une méthode d'étude en FRET, basée sur le ratio YFP/CFP soit par une étude en bioluminescence, basée sur un principe similaire à la méthode que nous avons utilisée (Bartolome *et al.*, 2013). Chez les patients SLA, le niveau d'ATP est diminué de 32% environ comparé aux patients contrôles. L'ensemble de ces données permet d'avancer l'hypothèse

d'une perturbation des niveaux d'ATP chez les modèles animaux de SLA ou chez les patients, et ce, quelle que soit la mutation retrouvée.

Plusieurs études dans différents modèles de SLA ont mis en relation des dysfonctions mitochondriales et l'altération du niveau d'ATP au cours du processus pathologique de la maladie (Mattiuzzi *et al.*, 2002; Ghiasi *et al.*, 2012). Browne et collaborateurs ont suggéré en 2006 que la diminution du niveau d'ATP observé dans les souris transgéniques modèles de la SLA pouvait être due à un découplage (Browne *et al.*, 2006). Ces auteurs ont montré que le niveau d'ATP intracellulaire des souris SOD1^{G93A} diminuait progressivement avec l'évolution de la maladie. Dans cette étude, nous avons confirmé que la mutation SOD1^{G93A} réduit le niveau d'ATP de cultures primaires de motoneurones dès le stade embryonnaire. Nous avons par la suite montré que cette baisse d'ATP était due à une diminution de la production plutôt qu'à une augmentation de la consommation. Enfin, il a été montré qu'une diminution d'ATP pouvait induire des processus de cytotoxicité, les cellules n'étant plus capables de maintenir leur homéostasie ionique et leur flux calcique (Abramov & Duchen, 2010; Bolanos *et al.*, 2010).

B – Une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale

Pour confirmer l'hypothèse d'un découplage partiel mitochondrial dans notre modèle de SLA, nous avons cherché à vérifier dans un premier temps que cette altération avait pour cause un déficit de la production. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'activité de la chaîne respiratoire, dont nos résultats ont confirmé qu'il s'agissait du principal producteur d'ATP dans les motoneurones embryonnaires SOD1m ou wild-type. Nous avons mis en évidence que l'activité du système des phosphorylations oxydatives n'était pas diminuée dans notre modèle. Au contraire, la chaîne respiratoire mitochondriale voit son activité augmentée de 125% dans les motoneurones SOD1m en comparaison avec les motoneurones wild-type. Ce résultat confirme l'hypothèse d'un découplage partiel mitochondrial. La respiration mitochondriale est augmentée, mais l'oxygène consommé ne sert pas à produire de l'ATP. Plusieurs études antérieures avaient montré une diminution de l'activité de différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, par des méthodes d'étude différentes et/ou à des stades plus avancés de la maladie (Jung *et al.*, 2002; Mattiuzzi *et al.*, 2002; Coussee *et al.*, 2011). De plus, une étude récente sur des lignées cellulaires motoneurales NSC34 ne montrait pas de différences entre la consommation d'oxygène basale en présence de la mutation SOD1 ou en son absence (Richardson *et al.*, 2013). Nous proposons que notre modèle de culture cellulaire

primaire soit plus proche de ce qui se passe physiologiquement *in vivo*, et permette de mieux mettre en évidence des différences entre les cellules portant une mutation SOD1 et les cellules sauvages. Enfin, remarquons qu'une étude récente sur un modèle VCP de SLA a permis de mettre en évidence une diminution d'ATP intracellulaire ainsi qu'une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (Bartolome *et al.*, 2013). Cette étude ainsi que nos travaux soulignent l'existence de processus pathologiques communs aux différentes mutations génétiques à l'origine des SLA.

C – Mécanismes mis en jeu

La progression de la maladie chez les souris SOD1^m est dépendante des cellules environnantes aux motoneurones, comme les astrocytes et la microglie, bien que cette hypothèse soit dépendante du type de SOD1^m. Cependant, le déclenchement de la SLA semble dépendant d'un processus cellule-autonome, dicté par la présence même de la SOD1 mutée dans les motoneurones (Boillee *et al.*, 2006). Le déclenchement de la maladie serait la conséquence de l'activation chronique d'un certain nombre de stress cellulaires, imputables à la présence de la protéine SOD1 mutée, atteignant un seuil critique pour la survie des motoneurones.

Comme nous l'avons vu précédemment, la mauvaise localisation des protéines SOD1 mutées perturberait le fonctionnement des phosphorylations oxydatives. Nous avons cherché à déterminer par quel(s) mécanisme(s) passait le découplage partiel des mitochondries des motoneurones SOD1^m. Nous nous sommes intéressés aux protéines de découplage, les UCPs. En effet, plusieurs éléments précédents proposaient l'hypothèse de l'implication des protéines UCPs dans le découplage mitochondrial dans différents modèles de SLA. Les travaux de Dupuis et collaborateurs ont permis de mettre en évidence qu'il y avait une augmentation des protéines UCP2 et UCP3 à un stade symptomatique dans le muscle de patients SLA (Dupuis *et al.*, 2003). Par ailleurs, il a été montré précédemment qu'un léger découplage mitochondrial avait un effet antioxydant naturel. En effet, il existe une forte corrélation entre la production d'espèces oxygène réactives et le potentiel membranaire mitochondrial. Un découplage partiel de la chaîne respiratoire mitochondrial permet de diminuer le potentiel membranaire mitochondrial et de lutter contre la production de ROS (Echtay, 2007). Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation des niveaux d'ARNm des protéines UCP1 et UCP3 ainsi qu'une augmentation du niveau protéique d'UCP2. Les protéines UCP2 et UCP3 ont comme fonction principale d'atténuer la production mitochondriale de ROS, toxique pour la

cellule, notamment du fait que les espèces oxygènes réactives entraînent des dommages cellulaires importants.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse nous font proposer l'hypothèse qu'une mutation de la superoxyde dismutase 1, de part sa mauvaise localisation mitochondriale et la formation d'agrégats entraîne une augmentation de la production de ROS. Afin de lutter contre ces espèces oxydantes, un découplage partiel de la chaîne respiratoire mitochondriale se met en place, *via* les protéines UCPs, ce qui permet un effet antioxydant. Le système des phosphorylations oxydatives fonctionne alors sans produire de l'ATP, ce qui explique la diminution globale du niveau intracellulaire cellulaire d'ATP. En effet, les protéines UCPs vont permettre une fuite de protons, ayant pour effet de maintenir le potentiel membranaire mitochondrial à un niveau viable pour la cellule. Cependant, la nature exacte du mécanisme par lequel les ROS permettent l'activation des protéines UCPs reste inconnue. Notons par ailleurs qu'une conséquence évidente de ce feedback négatif des ROS sur la production d'ATP est la réduction de la disponibilité de l'ATP pour la cellule.

III – Conséquences des perturbations homéostasiques et bioénergétiques en terme pathologique

A - Conséquences sur l'activité neuronale

Au cours de cette thèse, nous avons montré que le niveau d'ATP intracellulaire est diminué dans notre modèle de SLA. Nous avons mis en évidence des déficits dans la production énergétique, au niveau mitochondrial, permettant de confirmer l'hypothèse d'un découplage mitochondrial. Nous avons ensuite cherché à voir ce qu'il se passait au niveau de la consommation d'énergie. Nos études électrophysiologiques de l'activité des motoneurones ne nous ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives des propriétés électriques spontanées des motoneurones SOD1m en culture en comparaison avec des motoneurones wild-type. Ces données électrophysiologiques sont en accord avec ce qui avait été précédemment montré. En effet, plusieurs auteurs ont mis en évidence qu'il n'y a pas de différences des propriétés électriques passives des motoneurones SOD1m (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2005; Pieri *et al.*, 2009). L'hyperexcitabilité des motoneurones m SOD1m n'est pas imputable à une différence des propriétés synaptiques spontanées. Cependant, en condition d'activation par l'injection de courant, la fréquence de décharge des motoneurones SOD1m est altérée. En effet, il semblerait que les modifications des propriétés électriques des motoneurones SOD1m ne se manifestent qu'en cas d'augmentation de la

demande énergétique par une stimulation de l'activité. Kuo et collaborateurs ont mis en évidence qu'il existe une augmentation de la composante persistante du courant sodique (Na^+) dans les motoneurones SOD1m en comparaison aux motoneurones wild-type (Kuo *et al.*, 2005). Ces données ont ensuite été confirmées par Pieri et collaborateurs (Pieri *et al.*, 2009). De plus, ces auteurs ont mis en évidence que les canaux calciques voltage-dépendants (VGCCs : « Voltage-Gated Ca^{2+} Channels »), responsables de l'entrée de calcium dans les cellules neuronales en réponse à une dépolarisation membranaire, étaient surexprimés dans les cultures de neurones corticaux SOD1^{G93A} en comparaison aux neurones contrôles (Pieri *et al.*, 2012). Ces auteurs proposent qu'un excès d'expression de ces canaux calciques voltage-dépendants dans les neurones corticaux SOD1m induit une mortalité plus élevée après dépolarisation de la membrane en comparaison avec les neurones contrôles. Il semblerait donc que les différences en termes d'hyperexcitabilité des motoneurones SOD1m ne soient pas observables en conditions spontanées. Les neurones SOD1m seraient cependant incapables d'adapter leur niveau électrique en cas de stimulation. Ces mécanismes d'hyperexcitabilité en situation de stimulation auraient comme intermédiaires des perturbations de la composante persistante des canaux sodiques, ainsi que des perturbations des canaux calciques voltage-dépendants. De plus, il a par ailleurs été mis en évidence qu'un autre type de canal, le canal anionique voltage-dépendant (VDAC, « Voltage-Dependant Anion Channel ») était inhibé par un mauvais repliement des protéines SOD1m. En effet, une réduction de l'activité de VDAC est responsable d'une diminution de la survie des souris modèles de SLA, en accélérant le début de la maladie ainsi que la paralysie fatale (Israelson *et al.*, 2010). Cette réduction ne semble donc pas avoir d'influence directe sur le phénotype électrique des motoneurones mais nous constatons tout de même une impossibilité à faire face à une augmentation de la demande en ATP lorsque l'activité électrique est stimulée par du KCl extracellulaire. Il est donc possible, comme le suggèrent les études théoriques réalisées au laboratoire (Le Masson *et al.*, 2013), que l'effet délétère de cette perte d'homéostasie n'affecte les cellules uniquement quand elles dépassent leur capacité de réserve. Cette situation a plus de risques de se produire sur des cellules très actives sur le plan électrique (comme les motoneurones, ce qui pourraient donner des indices importants sur la spécificité de l'atteinte motoneuronale dans la SLA) mais aussi au sein des sous-groupes de motoneurones, dans des cellules amenées à décharger de façon plutôt phasique à hautes fréquences comme les motoneurone FF, qui sont les premiers touchés par les processus pathologiques dans la SLA. Il est aussi possible que ces anomalies ne s'expriment dans un premier temps que dans des régions subcellulaires du motoneurones,

comme l'axone dans sa partie distale. En effet, il existe de nombreuses évidences de perturbations de la répartition des mitochondries au sein de la géométrie cellulaire avec une relative déplétion en mitochondries dans l'axone distal au profit d'une accumulation dans le compartiment somatique. Nous pouvons donc nous attendre à un effet délétère dans cette extrémité distale, ce que semble confirmer de nombreuses études qui considère la SLA comme une axonopathie motrice avec une dégénérescence distale et un « dying back » de l'axone vers le soma. L'ensemble de ces éléments va dans le sens d'une impossibilité d'adaptation des motoneurones SOD1m que nous allons développer dans la partie suivante.

B – Une impossibilité d'adaptation énergétique

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence par des mesures de consommation d'oxygène que les motoneurones SOD1m ne pouvaient pas augmenter l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale en cas de stimulation de l'activité électrique, contrairement aux motoneurones wild-type, augmentant l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale de 155% environ dans ces mêmes conditions (*cf*, Résultats, chapitre 3, IV). En effet, le découplage partiel du système des phosphorylations oxydatives des neurones SOD1m l'empêche d'augmenter son activité en condition de stimulation. Ces résultats sont en accord avec les données électrophysiologiques présentées dans la partie précédente, montrant qu'en cas de stimulation de l'activité électrique, les motoneurones SOD1m présentaient un profil hyperexcitable (Kuo *et al.*, 2004). Les motoneurones SOD1m semblent donc incapables d'adapter leur activité mitochondriale pour répondre à une augmentation des besoins énergétiques dès le stade embryonnaire. Les modifications mitochondriales, dont le mauvais repliement des protéines SOD1m ainsi que la perturbation de leur localisation, entraînent de nombreuses altérations notamment dans les échanges ioniques et métaboliques avec le compartiment cytoplasmique. Les perturbations de ces échanges semblent fragiliser les mitochondries motoneuronales, dont la finalité n'est plus de produire de l'ATP pour répondre aux besoins cellulaires, mais semble plutôt destinée à maintenir ses paramètres vitaux comme son potentiel membranaire. Le découplage, par l'action des protéines UCPs est un des paramètres permettant de diminuer la production de ROS, mais également de limiter les variations du potentiel membranaire des mitochondries.

C - Une maladie de l'âge adulte ?

Dans ce contexte, la question se pose de savoir si la SLA peut effectivement être considérée comme une maladie de l'âge adulte, sachant que les perturbations de l'homéostasie énergétique et métabolique apparaissent très en amont des premiers symptômes, dès le stade embryonnaire de développement dans notre modèle murin. En effet, il semblerait que les lésions mitochondriales observées soient bien antérieures aux premiers signes pathologiques. Nous pouvons formuler l'hypothèse qu'une faible demande énergétique au cours de la vie des souris SOD1m ou des patients SLA ralentirait le déclenchement des premiers symptômes. Remarquons que la moyenne d'âge du déclenchement de la maladie se situe entre cinquante et soixante-cinq ans. Cependant, dans des populations de sportifs, il semble y avoir un facteur de risque plus élevé que dans la population générale de développer une SLA. Il a été mis en évidence plusieurs cas de SLA se développant de manière plus précoce en moyenne chez des sportifs notamment dans une population de joueurs de football italiens (Belli & Vanacore, 2005). La question reste ouverte quand à l'origine de l'augmentation de ce facteur de risque. L'utilisation de pesticides sur les terrains de football ainsi que l'usage de produits dopants pourraient en partie être responsables de l'augmentation du risque de développer une SLA. Cependant, à la vue de nos travaux, nous pouvons également émettre l'hypothèse que l'augmentation de ce risque est en partie due à une augmentation importante de la demande énergétique lors des entraînements physiques. Une sollicitation importante des besoins énergétiques en ATP tout au long de la vie pourrait anticiper l'âge de déclenchement de la maladie. Un autre exemple de sportif touché par la SLA est Lou Gehrig, dont la SLA porte le nom aux Etats-Unis. En effet, ce joueur de football américain est décédé relativement jeune (trente-huit ans) des suites de la SLA. Les dysfonctions énergétiques semblent donc un élément central dans le processus pathologique de la SLA, mais ces perturbations sont présentes bien en amont des premiers symptômes de la maladie. De plus, plusieurs études ont mis en évidence qu'une augmentation d'apports énergétiques par l'alimentation permettait de limiter la progression de la maladie (Mattson *et al.*, 2007; Marin *et al.*, 2011; Lehericey *et al.*, 2012). De manière tout à fait spéculative, nous pouvons supposer que plus les demandes énergétiques sont importantes, plus le déclenchement de la maladie sera précoce. Nous pouvons conclure sur ce point que la SLA est une maladie se déclenchant à l'âge adulte, mais présente de manière silencieuse d'un point de vue symptomatique, dès le plus jeune âge.

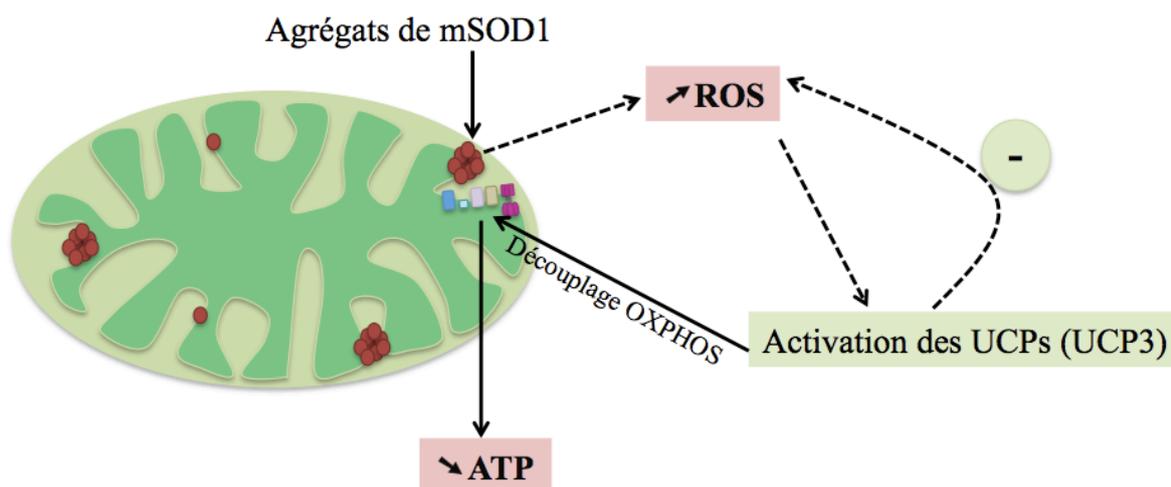


Figure 35 : Schéma récapitulatif des dysfonctions énergétiques dans les motoneurones SOD1^{G93A}

Les motoneurones SOD1m présentent des agrégats protéiques de SOD1m mal repliés, et mal localisés. Ces agrégats sont présents au niveau mitochondrial. Ils vont, par la perturbation de plusieurs mécanismes, comme la translocation métabolique par les canaux VDAC, augmenter la production des ROS. Ces derniers étant toxiques pour la cellule, cette dernière va mettre en place un système de protection via les protéines UCPs, afin de limiter la présence des ROS. Cependant, l'activation de ces protéines de découplage va également avoir comme effet un découplage partiel de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant une diminution de la synthèse d'ATP.

IV - Autres exemples de maladies neurodégénératives dans lesquelles interviennent des dysfonctions mitochondriales

De plus en plus de preuves étayent amplement les dysfonctions mitochondriales comme un facteur causal central de la pathogenèse des maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer, l'ataxie de Friedreich, la maladie de Charcot-Marie Tooth et bien sûr, la sclérose latérale amyotrophique. Dans cette partie, nous allons faire le lien entre les modifications mitochondriales observées dans notre étude au cours de la SLA, et les perturbations mitochondriales mises en évidence dans d'autres maladies neurodégénératives.

Les dysfonctions mitochondriales occupent une place centrale dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives chroniques. Les mitochondries, petites et dynamiques organelles sont souvent mentionnées comme «centrales électriques des cellules» et «réservoirs d'ATP», et sont nécessaires pour les demandes énergétiques considérables des cellules cérébrales, y compris les neurones. Tout défaut de fonctionnement des mitochondries du cerveau peut

conduire à intensifier le déficit énergétique ainsi qu'à augmenter la production de ROS dans les neurones et en fin de compte, provoquer la mort neuronale.

A – Maladie de Parkinson et mitochondries

La maladie de Parkinson est une maladie chronique, progressive et associée à l'âge, caractérisée par une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques et la présence de corps de Lewy, inclusions d'agrégats protéiques d' α -synucléine dans les neurones nigrostriataux. Plusieurs études ont mis en évidence des dysfonctions mitochondriales dans les neurones dopaminergiques au cours de la maladie de Parkinson. Ces travaux impliquent les dysfonctions mitochondriales dans la pathogénicité de la maladie de Parkinson (Lin & Beal, 2006). Il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, comme la roténone, entraîne une dégénérescence des neurones dopaminergiques et des symptômes parkinsoniens, dans plusieurs modèles animaux et cellulaires, ce qui suggère fortement l'implication de perturbations mitochondriales dans la pathogénèse de la maladie (Betarbet *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2003; Coulom & Birman, 2004; Keeney *et al.*, 2006; Inden *et al.*, 2007; Sherer *et al.*, 2007; Cannon *et al.*, 2009). De plus, la perfusion de roténone systémique provoque à court terme une diminution de l'activité respiratoire, augmente la perméabilité membranaire de la mitochondrie et la mort cellulaire concomitante des neurones de la substance noire dans le cerveau de rat (Panov *et al.*, 2005). Des analyses morphométriques et immunohistochimiques ont mis en évidence des défauts du complexe I du système des phosphorylations oxydatives dans la substance noire de patients parkinsoniens (Itoh *et al.*, 1997). En effet, les sous-unités du complexe I mitochondrial présentent des fonctions altérées, des perturbations d'assemblage ainsi que des dommages oxydatifs dans le cerveau de patients parkinsoniens *post mortem* (Keeney *et al.*, 2006). Des perturbations de la chaîne respiratoire mitochondriale ont également été observées dans les muscles de patients (Blin *et al.*, 1994). De plus, de nombreuses études ont fourni des preuves convaincantes de l'altération du trafic mitochondrial, de la diminution de la biogénèse mitochondriale ainsi que des perturbations de la balance fission-fusion dans la maladie de Parkinson. Plusieurs études ont montré que les protéines PINK1 et parkine régulent l'intégrité mitochondriale, les processus de mitophagie permettant d'éliminer les mitochondries dysfonctionnelles et régulent le transport mitochondrial axonal (Liu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Enfin, les protéines PINK1 et parkine sont directement impliquées dans les

perturbations de la dynamique mitochondriale dans différents modèles animaux de la maladie de Parkinson (Santos & Cardoso, 2012; Van Laar & Berman, 2013).

B – Maladie de Huntington et mitochondries

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative dévastatrice à transmission autosomale dominante, caractérisée par des lésions cérébrales au niveau du striatum, le développement progressif de mouvements choréiformes, c'est-à-dire dyskinésiques, de troubles comportementaux et cognitifs et de symptômes neuropsychiatriques entraînant une mort prématurée. La maladie de Huntington est causée par la répétition anormale d'un triplet CAG dans l'exon-1 du gène HD (Beal & Ferrante, 2004). L'évidence de dysfonctions mitochondriales et de perturbations bioénergétiques dans la pathogénèse de la maladie de Huntington provient d'une remarquable perte de poids chez les patients atteints malgré le maintien d'une alimentation normale (Browne & Beal, 2004). Les dysfonctions mitochondriales et bioénergétiques sont présentes avant le stade symptomatique de la maladie, ce qui fait suggérer qu'ils pourraient être responsables de son déclenchement. Une diminution du niveau d'ATP et des perturbations de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi que la réduction du ratio ATP/phosphocréatine ont été mis en évidence dans des muscles de patients à des stades présymptomatiques et symptomatiques suggérant des perturbations bioénergétiques (Koroshetz *et al.*, 1997; Arenas *et al.*, 1998; Lodi *et al.*, 2000; Mochel & Haller, 2011). Le mutant Htt, modèle de la maladie de Huntington, semble affecter des cellules très demandeuses en énergie. La respiration mitochondriale ainsi que la production d'ATP sont significativement altérées dans les cellules striatales des embryons de souris Knock-in Htt mutantes (Milakovic & Johnson, 2005). De plus, le niveau d'ATP ainsi que la capture d'ADP sont perturbés dans les tissus périphériques (Seong *et al.*, 2005). Le mutant Htt joue un rôle important dans les dysfonctions mitochondriales de la maladie de Huntington à travers différents mécanismes. Les protéines mHtt peuvent se lier directement aux mitochondries. Elles ont été localisées sur la membrane externe mitochondriale (Panov *et al.*, 2002; Choo *et al.*, 2004), et notamment dans le cerveau de souris transgéniques modèles de la maladie de Huntington (Petrasch-Parwez *et al.*, 2007). De plus, l'homéostasie calcique est perturbée dans la maladie de Huntington (Panov *et al.*, 2002). Par ailleurs, le mutant Htt peut également bouleverser le trafic neuronal des mitochondries notamment en diminuant la motilité mitochondriale (Trushina *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2006; Orr *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2009). Enfin, une diminution d'expression d'UCP1 a été

montrée dans les mutants modèles de la maladie de Huntington (Cui *et al.*, 2006; Weydt *et al.*, 2006).

C – Maladie d’Alzheimer et mitochondries

La maladie d’Alzheimer est une maladie à développement tardif, progressive et dépendante de l’âge, caractérisée par un déclin cognitif progressif. La pathologie de la maladie d’Alzheimer implique l’accumulation intraneuronale de plaques amyloïdes (agrégats de A β) et un enchevêtrement neurofibrillaire (agrégats de tau). Plusieurs études suggèrent que les dysfonctions mitochondriales sont des facteurs de contribution au déclenchement de la maladie et à sa progression. Il a été proposé « l’hypothèse d’une cascade mitochondriale », faisant des perturbations mitochondriales l’événement initial de la pathogénèse de la maladie d’Alzheimer (Swerdlow *et al.*, 2013). La forme soluble des A β entraîne une diminution d’ATP dans le cerveau de souris transgéniques modèles de la maladie d’Alzheimer (Eckert *et al.*, 2008). De plus, chez des modèles animaux de la maladie, il a été mis en évidence des diminutions des niveaux de protéines mitochondriales principalement celles des complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant une diminution de la synthèse d’ATP (Rhein *et al.*, 2009). Il a également été mis en évidence une diminution de l’expression des gènes impliqués dans le transport du glucose, dans les phosphorylations oxydatives et dans la consommation énergétique au niveau de cerveaux de patients Alzheimer (Chandrasekaran *et al.*, 1996). Les niveaux d’ATP, l’activité de la cytochrome oxydase ainsi que la synthèse mitochondriale d’ATP sont diminués dans les plaquettes et les tissus cérébraux de patients Alzheimer (Aksenov *et al.*, 1999; Bosetti *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2004). Les mitochondries hippocampiques et corticales isolées de souris transgéniques A β modèles de la maladie d’Alzheimer présentent une altération de la respiration mitochondriale, de la production de ROS ainsi que de l’activité de la cytochrome c oxydase (Dragicevic *et al.*, 2010). Par ailleurs, une augmentation de la dégradation autophagique des mitochondries a été observée dans la maladie d’Alzheimer (Moreira *et al.*, 2007). Une étude récente a montré une augmentation de la fragmentation mitochondriale ainsi qu’une diminution de la biogénèse mitochondriale dans les souris transgéniques A β modèles de la maladie (Calkins & Reddy, 2011). De nombreuses études suggèrent des défauts des processus de fission et de fusion mitochondriales, des perturbations de la dynamique mitochondriale ainsi que des processus de mitophagie à la fois chez des souris transgéniques et chez des patients Alzheimer (Santos *et al.*, 2010; Calkins *et al.*, 2011; Manczak *et al.*, 2011). Il existe de fortes évidences suggérant

que les mitochondries sont les premières cibles des protéines précurseurs amyloïdes (APP : « Amyloid Precursor Protein »), affectant les canaux mitochondriaux d'import et conduit par l'interaction des A β avec de nombreuses protéines mitochondriales, aux perturbations de cette organelle (Pavlov *et al.*, 2009). Par ailleurs, différentes études ont proposé que des mutations de l'ADN mitochondrial (ADNmt) jouaient un rôle important dans les dysfonctions mitochondriales et la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Récemment, des variations de l'ADNmt ont été associées à la maladie d'Alzheimer (Lakatos *et al.*, 2010). Enfin, les dysfonctions mitochondriales et les troubles cognitifs dans les souris modèles de la maladie sont directement proportionnels au niveau de mitochondries A β (Dragicevic *et al.*, 2010).

D – Maladie de Charcot-Marie-Tooth et mitochondries

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est la forme la plus commune de neuropathie périphérique héréditaire, caractérisée par une perte du tissu musculaire et des perturbations sensitives. L'implication des mitochondries dans cette maladie est surtout évidente pour la forme axonale de la neuropathie, à savoir la forme de type 2A (CMT2A). Cette forme est principalement causée par une mutation du gène de la Mitofusine 2 (MFN2) qui code pour une protéine de la membrane mitochondriale impliquée dans la fusion des mitochondries (Amiott *et al.*, 2008). Dans les neurones de souris transgéniques porteuses de la mutation humaine de MFN2, l'activité des complexes mitochondriaux est réduite et la synthèse d'ATP est diminuée avec un phénotype similaire aux patients CMT2A (Cartoni *et al.*, 2010; Guillet *et al.*, 2011). D'autres mutations retrouvées dans les différentes formes de CMT affectent le transport, la dynamique et la production d'ATP mitochondrial (Cassereau *et al.*, 2009; Cassereau *et al.*, 2011).

De nombreuses études suggèrent que les perturbations bioénergétiques, l'altération de la dynamique mitochondriale, les dysfonctions du trafic des mitochondries ainsi que des dérégulations transcriptionnelles jouent un rôle important dans les troubles mitochondriaux qui surviennent au cours des maladies neurodégénératives. En effet, notre étude sur les perturbations mitochondriales et énergétiques au cours de la SLA montre des mécanismes communs aux différentes pathologies neurodégénératives. Ainsi, des traitements capables d'améliorer la bioénergétique mitochondriale auraient un potentiel thérapeutique attractif dans le traitement des maladies neurodégénératives.

Avant de conclure, il est important de relever que l'ensemble des données obtenues sur les modèles murins de la SLA, est issu de travaux portant sur des modèles présentant des modifications génétiques susceptibles de déclencher une pathologie semblable à celle observée dans le cas de patients SLA. Ces modèles sont apparentés à des SLAf, ne représentant que 5 à 10 % des SLA totales. La majorité des SLA est sporadique, mais du fait de l'ignorance des causes de déclenchement de la maladie, la modélisation de cette pathologie reste extrêmement complexe. La découverte récente de la répétition de l'héxanucléotide C9ORF72 sur le chromosome 9, identifié comme responsable à la fois de SLAs et de SLAf, pourrait ouvrir une perspective de modélisation englobant les formes familiales, génétiques de la maladie ainsi que les formes sporadiques. Ce nouveau modèle permettrait de mettre en évidence les points communs dans les processus pathologiques sous-tendant les SLA sporadiques et familiales. Cependant, la particularité de cette modification génétique est une difficulté majeure dans le processus de modélisation animale.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Comme l'ensemble des maladies neurodégénératives, la SLA est une maladie aux mécanismes complexes et encore mal définis. Depuis sa découverte en 1865 par Jean-Martin Charcot, il a fallu attendre presque cent trente années pour que les premières mutations génétiques soient identifiées. La découverte au début des années quatre-vingt dix de mutations dans le gène codant pour la superoxyde dismutase 1, liées au déclenchement d'une SLA a permis le développement des premiers modèles animaux de cette pathologie. L'étude des animaux SOD1m modèles de la maladie a permis de mettre en évidence de nombreux mécanismes impliqués dans la mort des motoneurones, mais les candidats thérapeutiques jusqu'alors identifiés n'ont pas montré d'efficacité chez les patients. La recherche des mécanismes précocement touchés au cours de la maladie permettra d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence dans notre modèle murin de SLA que les dysfonctions mitochondriales ainsi que les perturbations énergétiques sont des mécanismes touchés par une mutation de la SOD1m bien avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie. Nous avons démontré qu'il existe dans les motoneurones modèles de la SLA un déficit énergétique qui se traduit par une diminution de la concentration intracellulaire d'ATP. Cette altération n'est pas due à une augmentation de la consommation mais à une diminution de la production. Cependant, l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale n'est pas diminuée mais au contraire augmentée. L'hypothèse d'un découplage partiel de la chaîne respiratoire dans les motoneurones SOD1m a été confirmée par les modifications des niveaux protéiques et d'ARNm des protéines de découplage UCPs, connues notamment pour limiter les dommages oxydatifs causés par les espèces oxygènes réactives, et maintenir un potentiel membranaire mitochondrial à un niveau correct, processus permettant d'assurer la viabilité cellulaire. La perturbation de la bioénergétique mitochondriale entraîne une inadaptabilité des motoneurones SOD1m à une augmentation des besoins énergétiques, par une augmentation d'activité. Les motoneurones étant des cellules très énergivores, les altérations observées dans ce travail permettent de comprendre pourquoi elles sont les premières touchées par la dégénérescence au cours de la SLA. Nous aurions souhaité, au cours de ce travail, étudier dans un premier temps l'action d'un inhibiteur de la glycolyse sur la consommation d'oxygène, ainsi que l'action d'un découplant exogène. De plus, nous aurions également voulu vérifier les niveaux de protéines UCP1 et UCP3 dans les motoneurones. Enfin, nous aurions espéré pouvoir tester électrophysiologiquement les

motoneurones en conditions d'activation synaptique. Cependant, pour des contraintes d'ordre techniques et temporelles, ces études n'ont pu être menées au cours de cette thèse.

Les perspectives de ce projet sont tout d'abord de vérifier ces hypothèses de modifications bioénergétiques, dans d'autres modèles *in vivo* comme le modèle TDP-43. Dans un second temps, il serait intéressant de suivre l'évolution de marqueurs de la maladie, comme les niveaux d'ATP, l'activité du système des phosphorylations oxydatives, ou les niveaux d'ARNm et protéiques des protéines UCPs au cours du temps, afin de corrélérer la variation de certains facteurs avec des étapes clés de la maladie, comme le stade présymptomatique ou le déclenchement. Enfin, une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de ces perturbations énergétiques et mitochondriales permettrait de proposer de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, la capacité à pallier ces déficits énergétiques précoces pourrait être proposée comme stratégie thérapeutique dans le traitement de la SLA, en repoussant le déclenchement de la maladie et/ou en ralentissant son évolution.

ANNEXES

Liste des publications et communications

Publications :

Loss of energy homeostasis in mice SOD1 motor neurons due to mitochondrial uncoupling through the UCP protein pathway.

Allard L. J., Obre E., Bertot C., Farrugia F., Leger C., Rossignol R. and Le Masson G. H.
(manuscrit en cours de finalisation)

Résumés publiés:

Retrograde degeneration of motor neuron axons as a consequence of mitochondrial dysfunction: a modeling and experimental study.

Allard L., Le Masson G. H., Henderson C. E., Przedborski S., Abbott L. F.

Neuroscience 2011 SFN (Washington - Novembre 2011)

Communication Orale :

What is the role of energy metabolism in neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis?

Séminaire du Neurocentre Magendie (Bordeaux - Décembre 2011)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abalkhail, H., Mitchell, J., Habgood, J., Orrell, R. & de Bellerocche, J. (2003) A new familial amyotrophic lateral sclerosis locus on chromosome 16q12.1-16q12.2. *American journal of human genetics*, **73**, 383-389.
- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. & Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, 621-628.
- Abramov, A.Y. & Duchen, M.R. (2010) Impaired mitochondrial bioenergetics determines glutamate-induced delayed calcium deregulation in neurons. *Biochimica et biophysica acta*, **1800**, 297-304.
- Adalbert, R. & Coleman, M.P. (2012) Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. *Neuropathology and applied neurobiology*, n/a-n/a.
- Aebischer, J., Cassina, P., Otsmane, B., Moumen, A., Seilhean, D., Meininger, V., Barbeito, L., Pettmann, B. & Raoul, C. (2011) IFN γ triggers a LIGHT-dependent selective death of motoneurons contributing to the non-cell-autonomous effects of mutant SOD1. *Cell Death Differ*, **18**, 754-768.
- Ahtoniemi, T., Jaronen, M., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G. & Koistinaho, J. (2008) Mutant SOD1 from spinal cord of G93A rats is destabilized and binds to inner mitochondrial membrane. *Neurobiology of disease*, **32**, 479-485.
- Aksenov, M.Y., Tucker, H.M., Nair, P., Aksenova, M.V., Butterfield, D.A., Estus, S. & Markesbery, W.R. (1999) The expression of several mitochondrial and nuclear genes encoding the subunits of electron transport chain enzyme complexes, cytochrome c oxidase, and NADH dehydrogenase, in different brain regions in Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, **24**, 767-774.
- Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Nilsson, P., Chioza, B., Andersson, J.L., Russ, C., Shaw, C.E., Powell, J.F. & Leigh, P.N. (1999) Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, **8**, 157-164.
- Ala-Rami, A., Ylitalo, K.V. & Hassinen, I.E. (2003) Ischaemic preconditioning and a mitochondrial KATP channel opener both produce cardioprotection accompanied by F1F0-ATPase inhibition in early ischaemia. *Basic research in cardiology*, **98**, 250-258.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. & Wissinger, B. (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*, **26**, 211-215.
- Alexianu, M.E., Ho, B.K., Mohamed, A.H., La Bella, V., Smith, R.G. & Appel, S.H. (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*, **36**, 846-858.
- Altieri, D.C. (2010) Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *The Biochemical journal*, **430**, 199-205.
- Amendola, J., Gueritaud, J.P., Lamotte d'Incamps, B., Bories, C., Liabeuf, S., Allene, C., Pambo-Pambo, A. & Durand, J. (2007) Postnatal electrical and morphological abnormalities in lumbar motoneurons from transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Archives italiennes de biologie*, **145**, 311-323.
- Amiott, E.A., Lott, P., Soto, J., Kang, P.B., McCaffery, J.M., DiMauro, S., Abel, E.D., Flanigan, K.M., Lawson, V.H. & Shaw, J.M. (2008) Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp Neurol*, **211**, 115-127.

- Andera, L. (2009) Signaling activated by the death receptors of the TNFR family. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, **153**, 173-180.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. & Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465.
- Andrus, P.K., Fleck, T.J., Gurney, M.E. & Hall, E.D. (1998) Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry*, **71**, 2041-2048.
- Anesti, V. & Scorrano, L. (2006) The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta*, **1757**, 692-699.
- Aoki, M., Ogasawara, M., Matsubara, Y., Narisawa, K., Nakamura, S., Itoyama, Y. & Abe, K. (1993) Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation. *Nat Genet*, **5**, 323-324.
- Arber, S., Han, B., Mendelsohn, M., Smith, M., Jessell, T.M. & Sockanathan, S. (1999) Requirement for the Homeobox Gene Hb9 in the Consolidation of Motor Neuron Identity. *Neuron*, **23**, 659-674.
- Ardehali, H. & O'Rourke, B. (2005) Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **39**, 7-16.
- Arenas, J., Campos, Y., Ribacoba, R., Martin, M.A., Rubio, J.C., Ablanedo, P. & Cabello, A. (1998) Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Annals of neurology*, **43**, 397-400.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Goubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S. & Ricquier, D. (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*, **26**, 435-439.
- Ashford, M.L., Sturgess, N.C., Trout, N.J., Gardner, N.J. & Hales, C.N. (1988) Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **412**, 297-304.
- Ashkenazi, A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature reviews. Cancer*, **2**, 420-430.
- Atkin, J.D., Farg, M.A., Walker, A.K., McLean, C., Tomas, D. & Horne, M.K. (2008) Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, **30**, 400-407.
- Auvergnon, N., Reibel, S., Touret, M., Honnorat, J., Baron, T., Giraudon, P. & Bencsik, A. (2009) Altered expression of CRMPs in the brain of bovine spongiform encephalopathy-infected mice during disease progression. *Brain research*, **1261**, 1-6.
- Averill, D.R., Jr. (1973) Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **162**, 1045-1051.
- Avossa, D., Grandolfo, M., Mazzarol, F., Zatta, M. & Ballerini, L. (2006) Early signs of motoneuron vulnerability in a disease model system: Characterization of transverse slice cultures of spinal cord isolated from embryonic ALS mice. *Neuroscience*, **138**, 1179-1194.
- Awano, T., Johnson, G.S., Wade, C.M., Katz, M.L., Johnson, G.C., Taylor, J.F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P.A., Olby, N.J., Shelton, G.D., Khan, S., O'Brien, D.P., Lindblad-Toh, K. & Coates, J.R. (2009) Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 2794-2799.

B

- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacin, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M. & Zorzano, A. (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 17190-17197.
- Bacman, S., Bradley, W. & Moraes, C. (2006) Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular neurobiology*, **33**, 113-131.
- Bar, P.R. (2000) Motor neuron disease in vitro: the use of cultured motor neurons to study amyotrophic lateral sclerosis. *European journal of pharmacology*, **405**, 285-295.
- Barbeito, A.G., Mesci, P. & Boillee, S. (2010) Motor neuron-immune interactions: the vicious circle of ALS. *J Neural Transm*, **117**, 981-1000.
- Barber, S.C. & Shaw, P.J. (2010) Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free radical biology & medicine*, **48**, 629-641.
- Bartolome, F., Wu, H.-C., Burchell, Victoria S., Preza, E., Wray, S., Mahoney, Colin J., Fox, Nick C., Calvo, A., Canosa, A., Moglia, C., Mandrioli, J., Chiò, A., Orrell, Richard W., Houlden, H., Hardy, J., Abramov, Andrey Y. & Plun-Favreau, H. (2013) Pathogenic VCP Mutations Induce Mitochondrial Uncoupling and Reduced ATP Levels. *Neuron*, **78**, 57-64.
- Baxter, R.V., Ben Othmane, K., Rochelle, J.M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J.E., Gilbert, J.R., Pericak-Vance, M.A. & Vance, J.M. (2002) Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet*, **30**, 21-22.
- Beal, A.M. (1997) The effect of transport-blocking drugs on secretion of fluid and electrolytes by the mandibular gland of red kangaroos, *Macropus rufus*. *Archives of oral biology*, **42**, 705-716.
- Beal, M.F. & Ferrante, R.J. (2004) Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, **5**, 373-384.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A.A., Siklos, L., McKercher, S.R. & 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 of the United States of America*, **103**, 16021-16026.
- Beers, D.R., Ho, B.K., Siklos, L., Alexianu, M.E., Mosier, D.R., Mohamed, A.H., Otsuka, Y., Kozovska, M.E., McAlhany, R.E., Smith, R.G. & Appel, S.H. (2001) Parvalbumin overexpression alters immune-mediated increases in intracellular calcium, and delays disease onset in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, **79**, 499-509.
- Belli, S. & Vanacore, N. (2005) Proportionate mortality of Italian soccer players: is amyotrophic lateral sclerosis an occupational disease? *European journal of epidemiology*, **20**, 237-242.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. & Rossignol, R. (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci*, **120**, 838-848.
- Benard, G., Bellance, N., Jose, C. & Rossignol, R. (2011) Relationships Between Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics. In Lu, B. (ed) *Mitochondrial Dynamics and Neurodegeneration*. Springer Netherlands, pp. 47-68.
- Bendotti, C., Atzori, C., Piva, R., Tortarolo, M., Strong, M.J., DeBiasi, S. & Migheli, A. (2004) Activated p38MAPK is a novel component of the intracellular inclusions found in human amyotrophic lateral

- sclerosis and mutant SOD1 transgenic mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **63**, 113-119.
- Bendotti, C., Tortarolo, M., Suchak, S.K., Calvaresi, N., Carvelli, L., Bastone, A., Rizzi, M., Rattray, M. & Mennini, T. (2001) Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J Neurochem*, **79**, 737-746.
- Bensimon, G., Lacomblez, L. & Meininger, V. (1994) A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, **330**, 585-591.
- Bernard-Marissal, N. (2011) Implication de la Calréticuline et de CRMP4 dans la dégénérescence des motoneurons dans la Sclérose Latérale Amyotrophique *Université de la Méditerranée*. Université de la Méditerranée, Marseille, pp. 274.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V. & Greenamyre, J.T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, **3**, 1301-1306.
- Bichsel, P., Vandeveld, M., Lang, J. & Kull-Hachler, S. (1983) Degenerative myelopathy in a family of Siberian Husky dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **183**, 998-1000, 1965.
- Birch-Machin, M.A., Taylor, R.W., Cochran, B., Ackrell, B.A. & Turnbull, D.M. (2000) Late-onset optic atrophy, ataxia, and myopathy associated with a mutation of a complex II gene. *Annals of neurology*, **48**, 330-335.
- Blasco, H., Corcia, P., Veyrat-Durebex, C., Coutadeur, C., Fournier, C., Camu, W., Gordon, P., Praline, J., Andres, C.R. & Vourc'h, P. (2011) The P413L chromogranin B variation in French patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, **12**, 210-214.
- Blin, O., Desnuelle, C., Rascol, O., Borg, M., Peyro Saint Paul, H., Azulay, J.P., Bille, F., Figarella, D., Coulom, F., Pellissier, J.F. & et al. (1994) Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neurol Sci*, **125**, 95-101.
- Bobyleva, V., Bellei, M., Paziienza, T.L. & Muscatello, U. (1997) Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria. *Biochemistry and molecular biology international*, **41**, 469-480.
- Bogaert, E., Van Damme, P., Poesen, K., Dhondt, J., Hersmus, N., Kiraly, D., Scheveneels, W., Robberecht, W. & Van Den Bosch, L. (2010) VEGF protects motor neurons against excitotoxicity by upregulation of GluR2. *Neurobiology of aging*, **31**, 2185-2191.
- Bogdanov, M., Brown, R.H., Matson, W., Smart, R., Hayden, D., O'Donnell, H., Flint Beal, M. & Cudkovicz, M. (2000) Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free radical biology & medicine*, **29**, 652-658.
- Bogdanov, M.B., Ramos, L.E., Xu, Z. & Beal, M.F. (1998) Elevated "hydroxyl radical" generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry*, **71**, 1321-1324.
- Boillée, S., Vande Velde, C. & Cleveland, Don W. (2006) ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron*, **52**, 39-59.
- Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G. & Cleveland, D.W. (2006) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, **312**, 1389-1392.
- Bolanos, J.P., Almeida, A. & Moncada, S. (2010) Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in biochemical sciences*, **35**, 145-149.
- 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., Frosch, M.P., Agar, J.N., Julien, J.-P., Brady, S.T. & Brown, R.H.

- (2010) Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci*, **13**, 1396-1403.
- Bosetti, F., Brizzi, F., Barogi, S., Mancuso, M., Siciliano, G., Tendi, E.A., Murri, L., Rapoport, S.I. & Solaini, G. (2002) Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, **23**, 371-376.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. & Giacobino, J.P. (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS letters*, **408**, 39-42.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Pequignot, E., Munnich, A. & Rotig, A. (1995) Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet*, **11**, 144-149.
- Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L. & Parker, N. (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free radical biology & medicine*, **37**, 755-767.
- Brand, M.D., Couture, P., Else, P.L., Withers, K.W. & Hulbert, A.J. (1991) Evolution of energy metabolism. Proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile. *The Biochemical journal*, **275 (Pt 1)**, 81-86.
- Brand, M.D., Pakay, J.L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D.C., Brookes, P.S. & Cornwall, E.J. (2005) The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *The Biochemical journal*, **392**, 353-362.
- Brand, M.D., Steverding, D., Kadenbach, B., Stevenson, P.M. & Hafner, R.P. (1992) The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. *European journal of biochemistry / FEBS*, **206**, 775-781.
- Breen, E.P., Gouin, S.G., Murphy, A.F., Haines, L.R., Jackson, A.M., Pearson, T.W., Murphy, P.V. & Porter, R.K. (2006) On the mechanism of mitochondrial uncoupling protein 1 function. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 2114-2119.
- Briere, J.J., Favier, J., El Ghouzzi, V., Djouadi, F., Benit, P., Gimenez, A.P. & Rustin, P. (2005) Succinate dehydrogenase deficiency in human. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **62**, 2317-2324.
- Brookes, P.S., Buckingham, J.A., Tenreiro, A.M., Hulbert, A.J. & Brand, M.D. (1998) The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, **119**, 325-334.
- Brown, W.M., George, M., Jr. & Wilson, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 1967-1971.
- Browne, S.E. & Beal, M.F. (2004) The energetics of Huntington's disease. *Neurochemical research*, **29**, 531-546.
- Browne, S.E., Yang, L., DiMauro, J.-P., Fuller, S.W., Licata, S.C. & 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.
- Bruening, W., Roy, J., Giasson, B., Figlewicz, D.A., Mushynski, W.E. & Durham, H.D. (1999) Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, **72**, 693-699.
- Bruijn, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L. & Cleveland, D.W. (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates

- damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, **18**, 327-338.
- Bruijn, L.I., Houseweert, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W. & Cleveland, D.W. (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science (New York, N.Y.)*, **281**, 1851-1854.
- Bruijn, L.I., Miller, T.M. & Cleveland, D.W. (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annual review of neuroscience*, **27**, 723-749.
- Brustovetsky, N.N., Amerkanov, Z.G., Yegorova, M.E., Mokhova, E.N. & Skulachev, V.P. (1990) Carboxyatractylate-sensitive uncoupling in liver mitochondria from ground squirrels during hibernation and arousal. *FEBS letters*, **272**, 190-192.
- Bryson, H.M., Fulton, B. & Benfield, P. (1996) Riluzole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs*, **52**, 549-563.
- Buratti, E. & Baralle, F.E. (2008) Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **13**, 867-878.
- Butterworth, J., Yates, C.M. & Reynolds, G.P. (1985) Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *J Neurol Sci*, **67**, 161-171.
- ## C
- Cadenas, S., Echtay, K.S., Harper, J.A., Jekabsons, M.B., Buckingham, J.A., Grau, E., Abuin, A., Chapman, H., Clapham, J.C. & Brand, M.D. (2002) The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 2773-2778.
- Cai, H., Lin, X., Xie, C., Laird, F.M., Lai, C., Wen, H., Chiang, H.-C., Shim, H., Farah, M.H., Hoke, A., Price, D.L. & Wong, P.C. (2005a) Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knock-out mice but predisposes neurons to oxidative stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 7567-7574.
- Cai, Q., Gerwin, C. & Sheng, Z.-H. (2005b) Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. *The Journal of cell biology*, **170**, 959-969.
- Calkins, M.J., Manczak, M., Mao, P., Shirendeb, U. & Reddy, P.H. (2011) Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, **20**, 4515-4529.
- Calkins, M.J. & Reddy, P.H. (2011) Assessment of newly synthesized mitochondrial DNA using BrdU labeling in primary neurons from Alzheimer's disease mice: Implications for impaired mitochondrial biogenesis and synaptic damage. *Biochimica et biophysica acta*, **1812**, 1182-1189.
- Cannon, J.R., Tapias, V., Na, H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E. & Greenamyre, J.T. (2009) A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, **34**, 279-290.
- Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E., Villani, G. & Papa, S. (1991) H⁺/e⁻ stoichiometry of mitochondrial cytochrome complexes reconstituted in liposomes. Rate-dependent changes of the stoichiometry in the cytochrome c oxidase vesicles. *FEBS letters*, **288**, 179-182.
- Cardoso, S.M., Proenca, M.T., Santos, S., Santana, I. & Oliveira, C.R. (2004) Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiology of aging*, **25**, 105-110.

- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J. & Walker, J.E. (2006) Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 32724-32727.
- Cartoni, R., Arnaud, E., Medard, J.-J., Poirot, O., Courvoisier, D.S., Chrast, R. & Martinou, J.-C. (2010) Expression of mitofusin 2(R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Brain*, **133**, 1460-1469.
- Cashman, N.R., Durham, H.D., Blusztajn, J.K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I.T., Dahrouge, S. & Antel, J.P. (1992) Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **194**, 209-221.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Desquiret, V., Verny, C., Nicolas, G., Dubas, F., Amati-Bonneau, P., Reynier, P., Bonneau, D. & Procaccio, V. (2011) Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Exp Neurol*, **227**, 31-41.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Malinge, M.-C., Letournel, F., Nicolas, G., Richard, L., Ferre, M., Verny, C., Dubas, F., Procaccio, V., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D. & Reynier, P. (2009) Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics*, **10**, 145-150.
- Catania, M.V., Aronica, E., Yankaya, B. & Troost, D. (2001) Increased expression of neuronal nitric oxide synthase spliced variants in reactive astrocytes of amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **21**, RC148.
- Cellura, E., Spataro, R., Taiello, A.C. & La Bella, V. (2012) Factors affecting the diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery*, **114**, 550-554.
- Cereda, C., Baiocchi, C., Bongioanni, P., Cova, E., Guareschi, S., Metelli, M.R., Rossi, B., Sbalsi, I., Cuccia, M.C. & Ceroni, M. (2008) TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients. *Journal of neuroimmunology*, **194**, 123-131.
- Cervený, K.L., Tamura, Y., Zhang, Z., Jensen, R.E. & Sesaki, H. (2007) Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends in cell biology*, **17**, 563-569.
- Chada, S.R. & Hollenbeck, P.J. (2004) Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Current biology : CB*, **14**, 1272-1276.
- Chance, B. & Williams, G.R. (1956) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, **221**, 477-489.
- Chandrasekaran, K., Hatanpaa, K., Brady, D.R. & Rapoport, S.I. (1996) Evidence for physiological down-regulation of brain oxidative phosphorylation in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, **142**, 80-88.
- Chang, D.T.W., Rintoul, G.L., Pandipati, S. & Reynolds, I.J. (2006) Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. *Neurobiology of disease*, **22**, 388-400.
- Charrier, E., Reibel, S., Rogemond, V., Aguera, M., Thomasset, N. & Honnorat, J. (2003) Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology*, **28**, 51-64.
- Chattopadhyay, M. & Valentine, J.S. (2009) Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS. *Antioxidants & redox signaling*, **11**, 1603-1614.
- Chen, H.-J., Anagnostou, G., Chai, A., Withers, J., Morris, A., Adhikaree, J., Pennetta, G. & de Bellerocche, J.S. (2010) Characterization of the properties of a novel mutation in VAPB in familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 40266-40281.

- Chen, S., Sayana, P., Zhang, X. & Le, W. (2013) Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol Neurodegener*, **8**, 28.
- 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., Nicholson, G.A., Auer-Grumbach, M., Wagner, K., De Jonghe, P., Griffin, J.W., Fischbeck, K.H., Timmerman, V., Cornblath, D.R. & Chance, P.F. (2004) DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *American journal of human genetics*, **74**, 1128-1135.
- Cheng, A., Hou, Y. & Mattson, M.P. (2010) Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro*, **2**, 243-256.
- Chiu, A.Y., Zhai, P., Dal Canto, M.C., Peters, T.M., Kwon, Y.W., Prattis, S.M. & Gurney, M.E. (1995) Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci*, **6**, 349-362.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, **162**, 156-159.
- Choo, Y.S., Johnson, G.V.W., MacDonald, M., Detloff, P.J. & Lesort, M. (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet*, **13**, 1407-1420.
- Chow, C.Y., Landers, J.E., Bergren, S.K., Sapp, P.C., Grant, A.E., Jones, J.M., Everett, L., Lenk, G.M., McKenna-Yasek, D.M., Weisman, L.S., Figlewicz, D., Brown, R.H. & Meisler, M.H. (2009) Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *American journal of human genetics*, **84**, 85-88.
- Chow, C.Y., Zhang, Y., Dowling, J.J., Jin, N., Adamska, M., Shiga, K., Szigeti, K., Shy, M.E., Li, J., Zhang, X., Lupski, J.R., Weisman, L.S. & Meisler, M.H. (2007) Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature*, **448**, 68-72.
- Chung, M.J. & Suh, Y.-L. (2002) Ultrastructural changes of mitochondria in the skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastructural pathology*, **26**, 3-7.
- Clayton, D.A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, **28**, 693-705.
- Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boillee, S., Rule, M., McMahon, A.P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R.J., Brown, R.H., Jr., Julien, J.-P., Goldstein, L.S. & Cleveland, D.W. (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*, **302**, 113-117.
- Cleveland, D.W. & Rothstein, J.D. (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature Reviews Neuroscience*, **2**, 806-819.
- Coates, J.R., Barone, G., Dewey, C.W., Vitale, C.L., Holloway-Azene, N.M. & Sessions, J.K. (2007a) Procarbazine as adjunctive therapy for treatment of dogs with presumptive antemortem diagnosis of granulomatous meningoencephalomyelitis: 21 cases (1998-2004). *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, **21**, 100-106.
- Coates, J.R., March, P.A., Oglesbee, M., Ruaux, C.G., Olby, N.J., Berghaus, R.D., O'Brien, D.P., Keating, J.H., Johnson, G.S. & Williams, D.A. (2007b) Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, **21**, 1323-1331.
- Corrado, L., Ratti, A., Gellera, C., Buratti, E., Castellotti, B., Carlomagno, Y., Ticozzi, N., Mazzini, L., Testa, L., Taroni, F., Baralle, F.E., Silani, V. & D'Alfonso, S. (2009) High frequency of TARDBP gene mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Human mutation*, **30**, 688-694.

- Corvest, V., Sigalat, C., Venard, R., Falson, P., Mueller, D.M. & Haraux, F. (2005) The binding mechanism of the yeast F1-ATPase inhibitory peptide: role of catalytic intermediates and enzyme turnover. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 9927-9936.
- Costa, A.D.T., Garlid, K.D., West, I.C., Lincoln, T.M., Downey, J.M., Cohen, M.V. & Critz, S.D. (2005) Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation research*, **97**, 329-336.
- Costa, A.D.T., Pierre, S.V., Cohen, M.V., Downey, J.M. & Garlid, K.D. (2008) cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovascular research*, **77**, 344-352.
- Coulom, H. & Birman, S. (2004) Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 10993-10998.
- Cousse, E., De Smet, P., Bogaert, E., Elens, I., Van Damme, P., Willems, P., Koopman, W., Van Den Bosch, L. & Callewaert, G. (2011) G37R SOD1 mutant alters mitochondrial complex I activity, Ca²⁺ uptake and ATP production. *Cell calcium*, **49**, 217-225.
- Cudkovicz, M.E., Warren, L., Francis, J.W., Lloyd, K.J., Friedlander, R.M., Borges, L.F., Kassem, N., Munsat, T.L. & Brown, R.H., Jr. (1997) Intrathecal administration of recombinant human superoxide dismutase 1 in amyotrophic lateral sclerosis: a preliminary safety and pharmacokinetic study. *Neurology*, **49**, 213-222.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., Garcia-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marin, I., Vilchez, J.J. & Palau, F. (2002) The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet*, **30**, 22-25.
- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C.N., Tanese, N. & Krainc, D. (2006) Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, **127**, 59-69.

D

- Dahout-Gonzalez, C., Nury, H., Trezeguet, V., Lauquin, G.J., Pebay-Peyroula, E. & Brandolin, G. (2006) Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Physiology (Bethesda)*, **21**, 242-249.
- Dal Canto, M.C. & 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 research*, **676**, 25-40.
- Dal Canto, M.C. & 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.
- Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M. & Manfredi, G. (2006) Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem*, **96**, 1349-1361.
- de Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J.D., Kaji, R., Kimura, J., Mills, K., Mitsumoto, H., Nodera, H., Shefner, J. & Swash, M. (2008) Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, **119**, 497-503.
- de la Monte, S.M., Sohn, Y.K., Ganju, N. & Wands, J.R. (1998) P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **78**, 401-411.

- De Vos, K.J., Allan, V.J., Grierson, A.J. & Sheetz, M.P. (2005) Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Current biology : CB*, **15**, 678-683.
- De Vos, K.J., Chapman, A.L., Tennant, M.E., Manser, C., Tudor, E.L., Lau, K.-F., Brownlee, J., Ackerley, S., Shaw, P.J., McLoughlin, D.M., Shaw, C.E., Leigh, P.N., Miller, C.C.J. & Grierson, A.J. (2007) Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet*, **16**, 2720-2728.
- De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S. & Miller, C.C.J. (2008) Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annual review of neuroscience*, **31**, 151-173.
- De Winter, F., Vo, T., Stam, F.J., Wisman, L.A.B., Bar, P.R., Niclou, S.P., van Muiswinkel, F.L. & Verhaagen, J. (2006) The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Molecular and cellular neurosciences*, **32**, 102-117.
- Degli Esposti, M. (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et biophysica acta*, **1364**, 222-235.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R.A., Boeve, Bradley F., Boxer, Adam L., Baker, M., Rutherford, Nicola J., Nicholson, Alexandra M., Finch, NiCole A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.-Yuek R., Karydas, A., Seeley, William W., Josephs, Keith A., Coppola, G., Geschwind, Daniel H., Wszolek, Zbigniew K., Feldman, H., Knopman, David S., Petersen, Ronald C., Miller, Bruce L., Dickson, Dennis W., Boylan, Kevin B., Graff-Radford, Neill R. & Rademakers, R. (2011) Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*, **72**, 245-256.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquellerie, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. & Hamel, C.P. (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*, **26**, 207-210.
- 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., Lukas, T., Dal Canto, M.C., O'Halloran, T.V. & Siddique, T. (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 of the United States of America*, **103**, 7142-7147.
- Deng, H., Dodson, M.W., Huang, H. & Guo, M. (2008) The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 14503-14508.
- Desport, E., Leroy, J., Nanadoumgar, H., Chatellier, D. & Robert, R. (2006) [An unusual diagnostic of quadriparesia: hyperkalemic paralysis. Report of four non-familial cases]. *La Revue de medecine interne / fondee ... par la Societe nationale francaise de medecine interne*, **27**, 148-151.
- Desport, J.C., Preux, P.M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J.M., Beaufriere, B. & 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., Preux, P.M., Truong, T.C., Vallat, J.M., Sautereau, D. & Couratier, P. (1999) Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. *Neurology*, **53**, 1059-1063.
- Devon, R.S., Helm, J.R., Rouleau, G.A., Leitner, Y., Lerman-Sagie, T., Lev, D. & Hayden, M.R. (2003) The first nonsense mutation in alsin results in a homogeneous phenotype of infantile-onset ascending spastic paralysis with bulbar involvement in two siblings. *Clinical genetics*, **64**, 210-215.
- Devon, R.S., Orban, P.C., Gerrow, K., Barbieri, M.A., Schwab, C., Cao, L.P., Helm, J.R., Bissada, N., Cruz-Aguado, R., Davidson, T.L., Witmer, J., Metzler, M., Lam, C.K., Tetzlaff, W., Simpson, E.M.,

- McCaffery, J.M., El-Husseini, A.E., Leavitt, B.R. & Hayden, M.R. (2006) Als2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 9595-9600.
- Di Giorgio, F.P., Carrasco, M.A., Siao, M.C., Maniatis, T. & Eggan, K. (2007) Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nature neuroscience*, **10**, 608-614.
- Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., Wichterle, H., Henderson, C.E. & Eggan, K. (2008) Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Science (New York, N.Y.)*, **321**, 1218-1221.
- Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., Belia, S., Wannenes, F., Nicoletti, C., Del Prete, Z., Rosenthal, N., Molinaro, M., Protasi, F., Fano, G., Sandri, M. & Musaro, A. (2008) Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell metabolism*, **8**, 425-436.
- Dodge, J.C., Haidet, A.M., Yang, W., Passini, M.A., Hester, M., Clarke, J., Roskelley, E.M., Treleaven, C.M., Rizo, L., Martin, H., Kim, S.H., Kaspar, R., Taksir, T.V., Griffiths, D.A., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S. & Kaspar, B.K. (2008) Delivery of AAV-IGF-1 to the CNS extends survival in ALS mice through modification of aberrant glial cell activity. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **16**, 1056-1064.
- Doi, H., Kikuchi, H., Murai, H., Kawano, Y., Shigeto, H., Ohyagi, Y. & Kira, J. (2006) Motor neuron disorder simulating ALS induced by chronic inhalation of pyrethroid insecticides. *Neurology*, **67**, 1894-1895.
- Domeniconi, M., Hempstead, B.L. & Chao, M.V. (2007) Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. *Molecular and cellular neurosciences*, **34**, 271-279.
- Dos Santos, P., Kowaltowski, A.J., Laclau, M.N., Seetharaman, S., Paucek, P., Boudina, S., Thambo, J.-B., Tariosse, L. & Garlid, K.D. (2002) Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **283**, H284-295.
- Dragicevic, N., Mamcarz, M., Zhu, Y., Buzzeo, R., Tan, J., Arendash, G.W. & Bradshaw, P.C. (2010) Mitochondrial amyloid-beta levels are associated with the extent of mitochondrial dysfunction in different brain regions and the degree of cognitive impairment in Alzheimer's transgenic mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **20 Suppl 2**, S535-550.
- 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.
- Duffy, L.M., Chapman, A.L., Shaw, P.J. & Grierson, A.J. (2011) Review: The role of mitochondria in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology*, **37**, 336-352.
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J.L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., Seilhean, D., Hauw, J.J., Lacomblez, L., Loeffler, J.P. & Meininger, V. (2008) Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, **70**, 1004-1009.
- Dupuis, L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Oudart, H., Pradat, P.-F., Meininger, V. & Loeffler, J.-P. (2003) Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **17**, 2091-2093.
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.-L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Pradat, P.-F., Lacomblez, L., Seihlan, D., Prinjha, R., Walsh, F.S., Meininger, V. & Loeffler, J.-P. (2002) Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, **10**, 358-365.

- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Oudart, H., de Tapia, M., Barbeito, L. & Loeffler, J.-P. (2004a) Mitochondria in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Trigger and a Target. *Neurodegenerative Diseases*, **1**, 245-254.
- Dupuis, L. & Loeffler, J.-P. (2008) Sclérose latérale amyotrophique, jonction neuromusculaire et déficit énergétique. *Medecine Science (Paris)*, **24**, 1077-1082.
- Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L. & Loeffler, J.-P. (2004b) 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.

E

- Echaniz-Laguna, A., Zoll, J., Ribera, F., Tranchant, C., Warter, J.-M., Lonsdorfer, J. & Lampert, E. (2002) Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients. *Annals of neurology*, **52**, 623-627.
- Echtay, K.S. (2007) Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free radical biology & medicine*, **43**, 1351-1371.
- Echtay, K.S. & Brand, M.D. (2007) 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *Redox report : communications in free radical research*, **12**, 26-29.
- Echtay, K.S., Winkler, E., Frischmuth, K. & Klingenberg, M. (2001) Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 1416-1421.
- Eckert, A., Hauptmann, S., Scherping, I., Rhein, V., Muller-Spahn, F., Gotz, J. & Muller, W.E. (2008) Soluble beta-amyloid leads to mitochondrial defects in amyloid precursor protein and tau transgenic mice. *Neuro-degenerative diseases*, **5**, 157-159.
- Eggett, C.J., Crosier, S., Manning, P., Cookson, M.R., Menzies, F.M., McNeil, C.J. & Shaw, P.J. (2000) Development and characterisation of a glutamate-sensitive motor neurone cell line. *J Neurochem*, **74**, 1895-1902.
- Elliott, J.L. (2001) Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research. Molecular brain research*, **95**, 172-178.
- Epstein, C.J., Avraham, K.B., Lovett, M., Smith, S., Elroy-Stein, O., Rotman, G., Bry, C. & Groner, Y. (1987) Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 8044-8048.
- Erecinska, M. & Wilson, D.F. (1982) Regulation of cellular energy metabolism. *The Journal of membrane biology*, **70**, 1-14.
- Estes, P.S., Boehringer, A., Zwick, R., Tang, J.E., Grigsby, B. & Zarnescu, D.C. (2011) Wild-type and A315T mutant TDP-43 exert differential neurotoxicity in a Drosophila model of ALS. *Hum Mol Genet*, **20**, 2308-2321.
- Eymard-Pierre, E., Yamanaka, K., Haeussler, M., Kress, W., Gauthier-Barichard, F., Combes, P., Cleveland, D.W. & Boespflug-Tanguy, O. (2006) Novel missense mutation in ALS2 gene results in infantile ascending hereditary spastic paralysis. *Annals of neurology*, **59**, 976-980.
- Ezzi, S.A., Urushitani, M. & Julien, J.-P. (2007) Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J Neurochem*, **102**, 170-178.

F

- Fang, F., Bellocco, R., Hernan, M.A. & Ye, W. (2006) Smoking, snuff dipping and the risk of amyotrophic lateral sclerosis--a prospective cohort study. *Neuroepidemiology*, **27**, 217-221.
- Favier, J., Briere, J.-J., Strompf, L., Amar, L., Filali, M., Jeunemaitre, X., Rustin, P. & Gimenez-Roqueplo, A.-P. (2005) Hereditary paraganglioma/pheochromocytoma and inherited succinate dehydrogenase deficiency. *Hormone research*, **63**, 171-179.
- Feng, J., Li, H. & Rosenkranz, E.R. (2002) Diazoxide protects the rabbit heart following cardioplegic ischemia. *Molecular and cellular biochemistry*, **233**, 133-138.
- Fergani, A., Oudart, H., Gonzalez De Aguilar, J.-L., Fricker, B., Rene, F., Hocquette, J.-F., Meininger, V., Dupuis, L. & Loeffler, J.-P. (2007) Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of lipid research*, **48**, 1571-1580.
- Ferrante, R.J., Browne, S.E., Shinobu, L.A., Bowling, A.C., Baik, M.J., MacGarvey, U., Kowall, N.W., Brown, R.H., Jr. & Beal, M.F. (1997) Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry*, **69**, 2064-2074.
- Ferri, A., Cozzolino, M., Crosio, C., Nencini, M., Casciati, A., Gralla, E.B., Rotilio, G., Valentine, J.S. & Carri, M.T. (2006) Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 13860-13865.
- Ferrucci, M., Spalloni, A., Bartalucci, A., Cantafora, E., Fulceri, F., Nutini, M., Longone, P., Paparelli, A. & Fornai, F. (2010) A systematic study of brainstem motor nuclei in a mouse model of ALS, the effects of lithium. *Neurobiol Dis*, **37**, 370-383.
- Fillingame, R.H. (1999) Molecular rotary motors. *Science (New York, N.Y.)*, **286**, 1687-1688.
- Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A. & Glass, J.D. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental neurology*, **185**, 232-240.
- Fischer, L.R. & Glass, J.D. (2007) Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neuro-degenerative diseases*, **4**, 431-442.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D. & Warden, C.H. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*, **15**, 269-272.
- Flood, D.G., Reaume, A.G., Gruner, J.A., Hoffman, E.K., Hirsch, J.D., Lin, Y.G., Dorfman, K.S. & 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.
- Forbes, R.A., Steenbergen, C. & Murphy, E. (2001) Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circulation research*, **88**, 802-809.
- Foster, D.B., Rucker, J.J. & Marban, E. (2008) Is Kir6.1 a subunit of mitoK(ATP)? *Biochemical and biophysical research communications*, **366**, 649-656.
- Frank, V. & Kadenbach, B. (1996) Regulation of the H⁺/e⁻ stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. *FEBS letters*, **382**, 121-124.
- Fray, A.E., Ince, P.G., Banner, S.J., Milton, I.D., Usher, P.A., Cookson, M.R. & Shaw, P.J. (1998) The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *The European journal of neuroscience*, **10**, 2481-2489.

- Frazier, A.E., Kiu, C., Stojanovski, D., Hoogenraad, N.J. & Ryan, M.T. (2006) Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells. *Biological chemistry*, **387**, 1551-1558.
- Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W. & Caroni, P. (2000) Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**, 2534-2542.
- Friedlander, R.M., Brown, R.H., Gagliardini, V., Wang, J. & Yuan, J. (1997) Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature*, **388**, 31.
- Fukada, K., Nagano, S., Satoh, M., Tohyama, C., Nakanishi, T., Shimizu, A., Yanagihara, T. & Sakoda, S. (2001) Stabilization of mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) protein by coexpressed wild SOD1 protein accelerates the disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis mice. *The European journal of neuroscience*, **14**, 2032-2036.
- Furukawa, Y. (2012) Pathological Roles of Wild-Type Cu, Zn-Superoxide Dismutase in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Res Int*, **2012**, 6.
- Furukawa, Y., Fu, R., Deng, H.-X., Siddique, T. & O'Halloran, T.V. (2006) Disulfide cross-linked protein represents a significant fraction of ALS-associated Cu, Zn-superoxide dismutase aggregates in spinal cords of model mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 7148-7153.

G

- Galehdar, Z., Swan, P., Fuerth, B., Callaghan, S.M., Park, D.S. & Cregan, S.P. (2010) Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **30**, 16938-16948.
- Garlid, K.D. (2000) Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen. *Basic research in cardiology*, **95**, 275-279.
- Garlid, K.D. & Paucek, P. (2003) Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochimica et biophysica acta*, **1606**, 23-41.
- Gellera, C., Colombrita, C., Ticozzi, N., Castellotti, B., Bragato, C., Ratti, A., Taroni, F. & Silani, V. (2008) Identification of new ANG gene mutations in a large cohort of Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics*, **9**, 33-40.
- Ghiasi, P., Hosseinkhani, S., Noori, A., Nafissi, S. & Khajeh, K. (2012) Mitochondrial complex I deficiency and ATP/ADP ratio in lymphocytes of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurological research*, **34**, 297-303.
- Gilkerson, R.W., Margineantu, D.H., Capaldi, R.A. & Selker, J.M. (2000) Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells. *FEBS letters*, **474**, 1-4.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrola, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C.A., Finley, R.L., Jr., White, K.P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R.A., McKenna, M.P., Chant, J. & Rothberg, J.M. (2003) A protein interaction map of Drosophila melanogaster. *Science*, **302**, 1727-1736.
- Gitcho, M.A., Baloh, R.H., Chakraverty, S., Mayo, K., Norton, J.B., Levitch, D., Hatanpaa, K.J., White, C.L., Bigio, E.H., Caselli, R., Baker, M., Al-Lozi, M.T., Morris, J.C., Pestronk, A., Rademakers, R., Goate,

- A.M. & Cairns, N.J. (2008) TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Annals of neurology*, **63**, 535-538.
- Gitcho, M.A., Bigio, E.H., Mishra, M., Johnson, N., Weintraub, S., Mesulam, M., Rademakers, R., Chakraverty, S., Cruchaga, C., Morris, J.C., Goate, A.M. & Cairns, N.J. (2009) TARDBP 3'-UTR variant in autopsy-confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy. *Acta neuropathologica*, **118**, 633-645.
- Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S. & Schwarz, T.L. (2006) Axonal transport of mitochondria requires Milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *The Journal of cell biology*, **173**, 545-557.
- Goetz, C.G. & Bonduelle, M. (1995) Charcot as therapeutic interventionist and treating neurologist. *Neurology*, **45**, 2102-2106.
- Goldsteins, G., Keksa-Goldsteine, V., Ahtoniemi, T., Jaronen, M., Arens, E., Akerman, K., Chan, P.H. & Koistinaho, J. (2008) Deleterious role of superoxide dismutase in the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 8446-8452.
- Gong, Y.H., Parsadanian, A.S., Andreeva, A., Snider, W.D. & Elliott, J.L. (2000) Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**, 660-665.
- Govoni, V., Cesnik, E., Casetta, I., Tugnoli, V., Tola, M.R. & Granieri, E. (2012) Temporal trend of amyotrophic lateral sclerosis incidence in southern Europe: a population study in the health district of Ferrara, Italy. *J Neurol*, **259**, 1623-1631.
- Gray, D.A., Tsigiriotis, M. & Woulfe, J. (2003) Ubiquitin, proteasomes, and the aging brain. *Science of aging knowledge environment : SAGE KE*, **2003**, RE6.
- Griffiths, I.R. & Duncan, I.D. (1975a) Age changes in the dorsal and ventral lumbar nerve roots of dogs. *Acta neuropathologica*, **32**, 75-85.
- Griffiths, I.R. & Duncan, I.D. (1975b) Chronic degenerative radiculomyelopathy in the dog. *The Journal of small animal practice*, **16**, 461-471.
- Groen, A.K., Wanders, R.J., Westerhoff, H.V., van der Meer, R. & Tager, J.M. (1982) Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *The Journal of biological chemistry*, **257**, 2754-2757.
- Gros-Louis, F., Andersen, P.M., Dupre, N., Urushitani, M., Dion, P., Souchon, F., D'Amour, M., Camu, W., Meininger, V., Bouchard, J.-P., Rouleau, G.A. & Julien, J.-P. (2009) Chromogranin B P413L variant as risk factor and modifier of disease onset for amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 21777-21782.
- Gros-Louis, F., Gaspar, C. & Rouleau, G.A. (2006) Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et biophysica acta*, **1762**, 956-972.
- Gros-Louis, F., Kriz, J., Kabashi, E., McDearmid, J., Millecamps, S., Urushitani, M., Lin, L., Dion, P., Zhu, Q., Drapeau, P., Julien, J.-P. & Rouleau, G.A. (2008) Als2 mRNA splicing variants detected in KO mice rescue severe motor dysfunction phenotype in Als2 knock-down zebrafish. *Hum Mol Genet*, **17**, 2691-2702.
- Gros-Louis, F., Meijer, I.A., Hand, C.K., Dube, M.-P., MacGregor, D.L., Seni, M.-H., Devon, R.S., Hayden, M.R., Andermann, F., Andermann, E. & Rouleau, G.A. (2003) An ALS2 gene mutation causes hereditary spastic paraplegia in a Pakistani kindred. *Annals of neurology*, **53**, 144-145.
- Grosskreutz, J., Van Den Bosch, L. & Keller, B.U. (2010) Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell calcium*, **47**, 165-174.

- Guegan, C. & Przedborski, S. (2003) Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of clinical investigation*, **111**, 153-161.
- Guegan, C., Vila, M., Rosoklija, G., Hays, A.P. & Przedborski, S. (2001) Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **21**, 6569-6576.
- Guennoc, A.M., Camu, W. & Corcia, P. Les critères d'Awaji : les nouveaux critères diagnostiques de la sclérose latérale amyotrophique. *Revue Neurologique*.
- Guicciardi, M.E. & Gores, G.J. (2009) Life and death by death receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **23**, 1625-1637.
- Guillet, V. (2009) Métabolisme énergétique mitochondrial dans les neuropathies héréditaires associées aux mutations des gènes opal et mfn2 *Ecole Doctorale Biologie-Santé*. Université d'Angers, Angers, pp. 328.
- Guillet, V., Gueguen, N., Cartoni, R., Chevrollier, A., Desquiret, V., Angebault, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Martinou, J.-C. & Reynier, P. (2011) Bioenergetic defect associated with mKATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **25**, 1618-1627.
- Guo, H., Lai, L., Butchbach, M.E.R., Stockinger, M.P., Shan, X., Bishop, G.A. & Lin, C.-I.G. (2003) Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet*, **12**, 2519-2532.
- Gurney, M.E. (1997) Transgenic animal models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, **244 Suppl 2**, S15-20.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.-X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R.L. & Siddique, T. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science (New York, N.Y.)*, **264**, 1772-1775.

H

- Hackenbrock, C.R. (1981) Energy-linked condensed-orthodox ultrastructural transformations in mitochondria. *Chemotherapy*, **27 Suppl 2**, 21-26.
- Hadano, S., Benn, S.C., Kakuta, S., Otomo, A., Sudo, K., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Mizumura, H., Shefner, J.M., Cox, G.A., Iwakura, Y., Brown, R.H.J. & Ikeda, J.-E. (2006) Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet*, **15**, 233-250.
- Hadano, S., Hand, C.K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R.S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R., Figlewicz, D.A., Kwiatkowski, T., Hosler, B.A., Sagie, T., Skaug, J., Nasir, J., Brown, R.H., Jr., Scherer, S.W., Rouleau, G.A., Hayden, M.R. & Ikeda, J.E. (2001) A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet*, **29**, 166-173.
- Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., Rao, M., Eagle, A., Kammesheidt, A., Christensen, A., Mendell, J.R., Burghes, A.H.M. & Kaspar, B.K. (2011) Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotech*, **29**, 824-828.

- Hales, K.G. (2004) The machinery of mitochondrial fusion, division, and distribution, and emerging connections to apoptosis. *Mitochondrion*, **4**, 285-308.
- Haley, R.W., Billecke, S. & La Du, B.N. (1999) Association of low PON1 type Q (type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicology and applied pharmacology*, **157**, 227-233.
- Hall, E.D., Andrus, P.K., Oostveen, J.A., Fleck, T.J. & Gurney, M.E. (1998) Relationship of oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Journal of neuroscience research*, **53**, 66-77.
- Hardiman, O., van den Berg, L.H. & Kiernan, M.C. (2011) Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*, **7**, 639-649.
- Harraz, M.M., Marden, J.J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V.S., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., Schoneich, C. & Engelhardt, J.F. (2008) SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *The Journal of clinical investigation*, **118**, 659-670.
- Hassouna, A., Matata, B.M. & Galinanes, M. (2004) PKC-epsilon is upstream and PKC-alpha is downstream of mitoKATP channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium. *American journal of physiology. Cell physiology*, **287**, C1418-1425.
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual review of biochemistry*, **54**, 1015-1069.
- He, B.P. & Strong, M.J. (2000) Motor neuronal death in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is not apoptotic. A comparative study of ALS and chronic aluminium chloride neurotoxicity in New Zealand white rabbits. *Neuropathology and applied neurobiology*, **26**, 150-160.
- Heath, P.R. & Shaw, P.J. (2002) Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve*, **26**, 438-458.
- Henderson, C.E., Bloch-Gallego, E. & Camu, W. (1995) Purified Embryonic Motoneurons. In Cohen, J., Wilkin, G.P. (eds) *Nerve Cell Culture : A Practical Approach*. Oxford University Press, United States, New York, pp. 69-81.
- Henderson, C.E., Camu, W., Mettling, C., Gouin, A., Poulsen, K., Karihaloo, M., Rullamas, J., Evans, T., McMahon, S.B., Armanini, M.P. & et al. (1993) Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature*, **363**, 266-270.
- Henkel, J.S., Beers, D.R., Zhao, W. & Appel, S.H. (2009) Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, **4**, 389-398.
- Hensley, K., Fedynyshyn, J., Ferrell, S., Floyd, R.A., Gordon, B., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q.N., Stewart, C., West, M., West, S. & Williamson, K.S. (2003) Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, **14**, 74-80.
- Hensley, K., Floyd, R.A., Gordon, B., Mou, S., Pye, Q.N., Stewart, C., West, M. & Williamson, K. (2002) Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, **82**, 365-374.
- Hentati, A., Bejaoui, K., Pericak-Vance, M.A., Hentati, F., Speer, M.C., Hung, W.Y., Figlewicz, D.A., Haines, J., Rimmler, J., Ben Hamida, C. & et al. (1994) Linkage of recessive familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 2q33-q35. *Nat Genet*, **7**, 425-428.
- Hesselink, M.K.C., Greenhaff, P.L., Constantin-Teodosiu, D., Hultman, E., Saris, W.H.M., Nieuwlaet, R., Schaart, G., Kornips, E. & Schrauwen, P. (2003) Increased uncoupling protein 3 content does not affect

- mitochondrial function in human skeletal muscle in vivo. *The Journal of clinical investigation*, **111**, 479-486.
- Higgins, C.M.J., Jung, C., Ding, H. & Xu, Z. (2002) Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **22**, RC215.
- Hiraishi, K., Suzuki, K., Hakomori, S. & Adachi, M. (1993) Le(y) antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology*, **3**, 381-390.
- Ho, Y.S., Gargano, M., Cao, J., Bronson, R.T., Heimler, I. & Hutz, R.J. (1998) Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 7765-7769.
- Holasek, S.S., Wengenack, T.M., Kandimalla, K.K., Montano, C., Gregor, D.M., Curran, G.L. & Poduslo, J.F. (2005) Activation of the stress-activated MAP kinase, p38, but not JNK in cortical motor neurons during early presymptomatic stages of amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *Brain research*, **1045**, 185-198.
- Hollenbeck, P.J. & Saxton, W.M. (2005) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci*, **118**, 5411-5419.
- Holmuhamedov, E.L., Wang, L. & Terzic, A. (1999) ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *The Journal of physiology*, **519 Pt 2**, 347-360.
- Holzbaur, E.L.F., Howland, D.S., Weber, N., Wallace, K., She, Y., Kwak, S., Tchistiakova, L.A., Murphy, E., Hinson, J., Karim, R., Tan, X.Y., Kelley, P., McGill, K.C., Williams, G., Hobbs, C., Doherty, P., Zaleska, M.M., Pangalos, M.N. & Walsh, F.S. (2006) Myostatin inhibition slows muscle atrophy in rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, **23**, 697-707.
- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E. & Swanson, P.E. (2009) Cell death. *The New England journal of medicine*, **361**, 1570-1583.
- Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., DeGennaro, L.J., Cleveland, D.W. & Rothstein, J.D. (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 of the United States of America*, **99**, 1604-1609.
- Huang, C., Tong, J., Bi, F., Zhou, H. & Xia, X.-G. (2012) Mutant TDP-43 in motor neurons promotes the onset and progression of ALS in rats. *The Journal of clinical investigation*, **122**, 107-118.
- Huang, C., Zhou, H., Tong, J., Chen, H., Liu, Y.-J., Wang, D., Wei, X. & Xia, X.-G. (2011) FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *PLoS genetics*, **7**, e1002011.
- Hunter, M. & Giebisch, G. (1988) Calcium-activated K-channels of Amphiuma early distal tubule: inhibition by ATP. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **412**, 331-333.
- Huttemann, M., Muhlenbein, N., Schmidt, T.R., Grossman, L.I. & Kadenbach, B. (2000) Isolation and sequence of the human cytochrome c oxidase subunit VIIaL gene. *Biochimica et biophysica acta*, **1492**, 252-258.

I

- Igaz, L.M., Kwong, L.K., Xu, Y., Truax, A.C., Uryu, K., Neumann, M., Clark, C.M., Elman, L.B., Miller, B.L., Grossman, M., McCluskey, L.F., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M.-Y. (2008) Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *The American journal of pathology*, **173**, 182-194.

- Iida, A., Kamei, T., Sano, M., Oshima, S., Tokuda, T., Nakamura, Y. & Ikegawa, S. (2012) Large-scale screening of TARDBP mutation in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Neurobiology of aging*, **33**, 786-790.
- Ilieva, H., Polymenidou, M. & Cleveland, D.W. (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of cell biology*, **187**, 761-772.
- Inden, M., Kitamura, Y., Takeuchi, H., Yanagida, T., Takata, K., Kobayashi, Y., Taniguchi, T., Yoshimoto, K., Kaneko, M., Okuma, Y., Taira, T., Ariga, H. & Shimohama, S. (2007) Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *Journal of neurochemistry*, **101**, 1491-1504.
- Inoue, H., Tsukita, K., Iwasato, T., Suzuki, Y., Tomioka, M., Tateno, M., Nagao, M., Kawata, A., Saido, T.C., Miura, M., Misawa, H., Itoharu, S. & Takahashi, R. (2003) The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *The EMBO journal*, **22**, 6665-6674.
- Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K. & Higuti, T. (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*, **352**, 244-247.
- Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y. & Mihara, K. (2003) Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **301**, 891-898.
- Israelson, A., Arbel, N., Da Cruz, S., Ilieva, H., Yamanaka, K., Shoshan-Barmatz, V. & Cleveland, D.W. (2010) Misfolded Mutant SOD1 Directly Inhibits VDAC1 Conductance in a Mouse Model of Inherited ALS. *Neuron*, **67**, 575-587.
- Itoh, K., Weis, S., Mehraein, P. & Muller-Hocker, J. (1997) Defects of cytochrome c oxidase in the substantia nigra of Parkinson's disease: and immunohistochemical and morphometric study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **12**, 9-16.

J

- Jaarsma, D., Haasdijk, E.D., Grashorn, J.A., Hawkins, R., van Duijn, W., Verspaget, H.W., London, J. & Holstege, J.C. (2000) Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis*, **7**, 623-643.
- Jaarsma, D., Rognoni, F., van Duijn, W., Verspaget, H.W., Haasdijk, E.D. & Holstege, J.C. (2001) CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta neuropathologica*, **102**, 293-305.
- Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E.D., De Zeeuw, C.I. & Hoogenraad, C.C. (2008) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 2075-2088.
- Jaburek, M., Costa, A.D.T., Burton, J.R., Costa, C.L. & Garlid, K.D. (2006) Mitochondrial PKC epsilon and mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel copurify and coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes. *Circulation research*, **99**, 878-883.
- Jaburek, M. & Garlid, K.D. (2003) Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 25825-25831.
- Jaburek, M., Varecha, M., Gimeno, R.E., Dembski, M., Jezek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L.A. & Garlid, K.D. (1999) Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 26003-26007.

- Jahn, K., Grosskreutz, J., Haastert, K., Ziegler, E., Schlesinger, F., Grothe, C., Dengler, R. & Bufler, J. (2006) Temporospacial coupling of networked synaptic activation of AMPA-type glutamate receptor channels and calcium transients in cultured motoneurons. *Neuroscience*, **142**, 1019-1029.
- Jaiswal, M., Zech, W.-D., Goos, M., Leutbecher, C., Ferri, A., Zippelius, A., Carri, M., Nau, R. & Keller, B. (2009) Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci*, **10**, 64.
- Jezek, P., Orosz, D.E., Modriansky, M. & Garlid, K.D. (1994) Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 26184-26190.
- Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., Ding, J., McCluskey, L., Martinez-Lage, M., Falcone, D., Hernandez, D.G., Arepalli, S., Chong, S., Schymick, J.C., Rothstein, J., Landi, F., Wang, Y.-D., Calvo, A., Mora, G., Sabatelli, M., Monsurro, M.R., Battistini, S., Salvi, F., Spataro, R., Sola, P., Borghero, G., Galassi, G., Scholz, S.W., Taylor, J.P., Restagno, G., Chiò, A. & Traynor, B.J. (2010) Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS. *Neuron*, **68**, 857-864.
- Johnston, J.A., Dalton, M.J., Gurney, M.E. & Kopito, R.R. (2000) Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 12571-12576.
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Dimou, L., Lin, S., Fergani, A., Ruegg, M.A., Schwab, M.E., Dupuis, L. & Loeffler, J.-P. (2006) The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO reports*, **7**, 1162-1167.
- Jonsson, P.A., Ernhill, K., Andersen, P.M., Bergemalm, D., Brannstrom, T., Gredal, O., Nilsson, P. & Marklund, S.L. (2004) Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, **127**, 73-88.
- Jonsson, P.A., Graffmo, K.S., Brannstrom, T., Nilsson, P., Andersen, P.M. & Marklund, S.L. (2006) Motor neuron disease in mice expressing the wild type-like D90A mutant superoxide dismutase-1. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **65**, 1126-1136.
- Juneja, T., Pericak-Vance, M.A., Laing, N.G., Dave, S. & Siddique, T. (1997) Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu,Zn superoxide dismutase. *Neurology*, **48**, 55-57.
- Jung, C., Higgins, C.M.J. & Xu, Z. (2002) A quantitative histochemical assay for activities of mitochondrial electron transport chain complexes in mouse spinal cord sections. *Journal of Neuroscience Methods*, **114**, 165-172.

K

- Kaal, E.C., Joosten, E.A. & Bar, P.R. (1997) Prevention of apoptotic motoneuron death in vitro by neurotrophins and muscle extract. *Neurochem Int*, **31**, 193-201.
- Kaal, E.C.A., Vlug, A.S., Versleijen, M.W.J., Kuilman, M., Joosten, E.A.J. & Bär, P.R.D. (2000) Chronic Mitochondrial Inhibition Induces Selective Motoneuron Death In Vitro: A New Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of neurochemistry*, **74**, 1158-1165.
- Kabashi, E., Agar, J.N., Taylor, D.M., Minotti, S. & 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.
- Kabashi, E., Lin, L., Tradewell, M.L., Dion, P.A., Bercier, V., Bourgouin, P., Rochefort, D., Bel Hadj, S., Durham, H.D., Vande Velde, C., Rouleau, G.A. & Drapeau, P. (2010) Gain and loss of function of

- ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet*, **19**, 671-683.
- Kadenbach, B. (2003) Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta*, **1604**, 77-94.
- Kang, S.J., Sanchez, I., Jing, N. & Yuan, J. (2003) Dissociation between neurodegeneration and caspase-11-mediated activation of caspase-1 and caspase-3 in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 5455-5460.
- Kanning, K.C., Kaplan, A. & Henderson, C.E. (2010) Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci*, **33**, 409-440.
- Karbowski, M. & Youle, R.J. (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ*, **10**, 870-880.
- Karch, C.M., Prudencio, M., Winkler, D.D., Hart, P.J. & Borchelt, D.R. (2009) Role of mutant SOD1 disulfide oxidation and aggregation in the pathogenesis of familial ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 7774-7779.
- Kawahara, Y., Kwak, S., Sun, H., Ito, K., Hashida, H., Aizawa, H., Jeong, S.Y. & Kanazawa, I. (2003) Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *Journal of neurochemistry*, **85**, 680-689.
- Kawamata, H. & Manfredi, G. (2010) Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of ageing and development*, **131**, 517-526.
- Keeney, P.M., Xie, J., Capaldi, R.A. & Bennett, J.P.J. (2006) Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 5256-5264.
- Kiaei, M., Petri, S., Kipiani, K., Gardian, G., Choi, D.-K., Chen, J., Calingasan, N.Y., Schafer, P., Muller, G.W., Stewart, C., Hensley, K. & Beal, M.F. (2006) Thalidomide and lenalidomide extend survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 2467-2473.
- Kieran, D., Kalmar, B., Dick, J.R.T., Riddoch-Contreras, J., Burnstock, G. & Greensmith, L. (2004) Treatment with arimoclolmol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med*, **10**, 402-405.
- Kieran, D., Sebastia, J., Greenway, M.J., King, M.A., Connaughton, D., Concannon, C.G., Fenner, B., Hardiman, O. & Prehn, J.H.M. (2008) Control of motoneuron survival by angiogenin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 14056-14061.
- Kieran, D., Woods, I., Villunger, A., Strasser, A. & Prehn, J.H.M. (2007) Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 20606-20611.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Murakami, S., Uchida, Y. & Arihiro, K. (2006) Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *The Journal of pathology*, **208**, 319-326.
- Klingenberg, M. (1999) Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **31**, 419-430.
- Klingenberg, M., Echtay, K.S., Bienengraeber, M., Winkler, E. & Huang, S.G. (1999) Structure-function relationship in UCP1. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, **23 Suppl 6**, S24-29.

- Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R. & Bossy-Wetzell, E. (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, **9**, 505-518.
- Koopman, W.J.H., Visch, H.-J., Verkaart, S., van den Heuvel, L.W.P.J., Smeitink, J.A.M. & Willems, P.H.G.M. (2005) Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *American journal of physiology. Cell physiology*, **289**, C881-890.
- Koroshetz, W.J., Jenkins, B.G., Rosen, B.R. & Beal, M.F. (1997) Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. *Annals of neurology*, **41**, 160-165.
- Korvald, C., Elvenes, O.P. & Myrnes, T. (2000) Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **278**, H1345-1351.
- Kostic, V., Jackson-Lewis, V., de Bilbao, F., Dubois-Dauphin, M. & Przedborski, S. (1997) Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, **277**, 559-562.
- Kosuge, Y., Sekikawa-Nishida, K., Negi, H., Ishige, K. & Ito, Y. (2009) Characterization of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity in organotypic spinal cord culture prepared from ALS model mice. *Neuroscience letters*, **454**, 165-169.
- Kowaltowski, A.J., Seetharaman, S., Pauczek, P. & Garlid, K.D. (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **280**, H649-657.
- Kraemer, B.C., Schuck, T., Wheeler, J.M., Robinson, L.C., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y. & Schellenberg, G.D. (2010) Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta neuropathologica*, **119**, 409-419.
- Kuo, J.J., Schonewille, M., Siddique, T., Schults, A.N.A., Fu, R., Bar, P.R., Anelli, R., Heckman, C.J. & Kroese, A.B.A. (2004) Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J Neurophysiol*, **91**, 571-575.
- Kuo, J.J., Siddique, T., Fu, R. & Heckman, C.J. (2005) Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *The Journal of physiology*, **563**, 843-854.
- Kust, B.M., Brouwer, N., Mantingh, I.J., Boddeke, H.W. & Copray, J.C. (2003) Reduced p75NTR expression delays disease onset only in female mice of a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, **4**, 100-105.
- Kwiatkowski, T.J., Jr., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G.A., Hosler, B.A., Cortelli, P., de Jong, P.J., Yoshinaga, Y., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Horvitz, H.R., Landers, J.E. & Brown, R.H., Jr. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, **323**, 1205-1208.

L

- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M. & Cleveland, D.W. (2010) TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, **19**, R46-64.
- Lakatos, A., Derbeneva, O., Younes, D., Keator, D., Bakken, T., Lvova, M., Brandon, M., Guffanti, G., Reglodi, D., Saykin, A., Weiner, M., Macciardi, F., Schork, N., Wallace, D.C. & Potkin, S.G. (2010) Association between mitochondrial DNA variations and Alzheimer's disease in the ADNI cohort. *Neurobiology of aging*, **31**, 1355-1363.

- Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., Desmet, F., Marklund, S.L., Wyns, S., Thijs, V., Andersson, J., van Marion, I., Al-Chalabi, A., Bornes, S., Musson, R., Hansen, V., Beckman, L., Adolfsson, R., Pall, H.S., Prats, H., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Katayama, S., Awata, T., Leigh, N., Lang-Lazdunski, L., Dewerchin, M., Shaw, C., Moons, L., Vlietinck, R., Morrison, K.E., Robberecht, W., Van Broeckhoven, C., Collen, D., Andersen, P.M. & Carmeliet, P. (2003) VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet*, **34**, 383-394.
- Langou, K., Moumen, A., Pellegrino, C., Aebischer, J., Medina, I., Aebischer, P. & Raoul, C. (2010) AAV-mediated expression of wild-type and ALS-linked mutant VAPB selectively triggers death of motoneurons through a Ca²⁺-dependent ER-associated pathway. *J Neurochem*, **114**, 795-809.
- Lanson, N.A.J., Maltare, A., King, H., Smith, R., Kim, J.H., Taylor, J.P., Lloyd, T.E. & Pandey, U.B. (2011) A *Drosophila* model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43. *Hum Mol Genet*, **20**, 2510-2523.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. & Rojo, M. (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Molecular biology of the cell*, **13**, 4343-4354.
- Lehéricy, G., Le Forestier, N., Dupuis, L., Gonzalez-Bermejo, J., Meininger, V. & Pradat, P.-F. (2012) Nutritional management in amyotrophic lateral sclerosis: A medical and ethical stake. *Prise en charge nutritionnelle dans la sclérose latérale amyotrophique: Un enjeu médical et éthique*, **41**, 560-574.
- Leigh, P.N., Abrahams, S., Al-Chalabi, A., Ampong, M.-A., Goldstein, L.H., Johnson, J., Lyall, R., Moxham, J., Mustfa, N., Rio, A., Shaw, C. & Willey, E. (2003) The management of motor neurone disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **74**, iv32-iv47.
- Le Masson G., Henderson C. E., Przedborski S. & Abbott L. F. (2013) A computational model of motor neuron degeneration. *In press*
- Lever, T.E., Gorsek, A., Cox, K.T., O'Brien, K.F., Capra, N.F., Hough, M.S. & Murashov, A.K. (2009) An animal model of oral dysphagia in amyotrophic lateral sclerosis. *Dysphagia*, **24**, 180-195.
- Leverve, X., Batandier, C. & Fontaine, E. (2007) Choosing the right substrate. *Novartis Foundation symposium*, **280**, 108-121; discussion 121-107, 160-104.
- Li, M., Ona, V.O., Guegan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L.J., Olszewski, A.J., Stieg, P.E., Lee, J.P., Przedborski, S. & Friedlander, R.M. (2000) Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science (New York, N.Y.)*, **288**, 335-339.
- Li, X.-J., Du, Z.-W., Zarnowska, E.D., Pankratz, M., Hansen, L.O., Pearce, R.A. & Zhang, S.-C. (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, **23**, 215-221.
- Liesa, M., Palacin, M. & Zorzano, A. (2009) Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews*, **89**, 799-845.
- Ligon, L.A., Tokito, M., Finklestein, J.M., Grossman, F.E. & Holzbaur, E.L.F. (2004) A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin I may coordinate motor activity. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 19201-19208.
- Lin, M.T. & Beal, M.F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, **443**, 787-795.
- Lino, M.M., Schneider, C. & Caroni, P. (2002) Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **22**, 4825-4832.

- Lips, M.B. & Keller, B.U. (1998) Endogenous calcium buffering in motoneurons of the nucleus hypoglossus from mouse. *The Journal of physiology*, **511** (Pt 1), 105-117.
- Lips, M.B. & Keller, B.U. (1999) Activity-related calcium dynamics in motoneurons of the nucleus hypoglossus from mouse. *J Neurophysiol*, **82**, 2936-2946.
- Liu, D., Slevin, J.R., Lu, C., Chan, S.L., Hansson, M., Elmer, E. & Mattson, M.P. (2003) Involvement of mitochondrial K⁺ release and cellular efflux in ischemic and apoptotic neuronal death. *J Neurochem*, **86**, 966-979.
- Liu, D., Wen, J., Liu, J. & Li, L. (1999) The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **13**, 2318-2328.
- Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P.A., Vande Velde, C., Ward, C.M., Miller, T.M., Subramaniam, J.R., Rothstein, J.D., Marklund, S., Andersen, P.M., Brannstrom, T., Gredal, O., Wong, P.C., Williams, D.S. & Cleveland, D.W. (2004) Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron*, **43**, 5-17.
- Liu, J., Shinobu, L.A., Ward, C.M., Young, D. & Cleveland, D.W. (2005) Elevation of the Hsp70 chaperone does not effect toxicity in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, **93**, 875-882.
- Liu, S., Sawada, T., Lee, S., Yu, W., Silverio, G., Alapatt, P., Millan, I., Shen, A., Saxton, W., Kanao, T., Takahashi, R., Hattori, N., Imai, Y. & Lu, B. (2012) Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet*, **8**, e1002537.
- Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B. & Marban, E. (1998) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation*, **97**, 2463-2469.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lobsiger, C.S., Boillee, S., McAlonis-Downes, M., Khan, A.M., Feltri, M.L., Yamanaka, K. & 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 of the United States of America*, **106**, 4465-4470.
- Lobsiger, C.S. & Cleveland, D.W. (2007) Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci*, **10**, 1355-1360.
- Locatelli, F., Corti, S., Papadimitriou, D., Fortunato, F., Del Bo, R., Donadoni, C., Nizzardo, M., Nardini, M., Salani, S., Ghezzi, S., Strazzer, S., Bresolin, N. & Comi, G.P. (2007) Fas small interfering RNA reduces motoneuron death in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Annals of neurology*, **62**, 81-92.
- Lodi, R., Schapira, A.H., Manners, D., Styles, P., Wood, N.W., Taylor, D.J. & Warner, T.T. (2000) Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidolusian atrophy. *Annals of neurology*, **48**, 72-76.

M

- MacDonald, S.C., Fleetwood, I.G., Hochman, S., Dodd, J.G., Cheng, G.K.W., Jordan, L.M. & Brownstone, R.M. (2003) Functional motor neurons differentiating from mouse multipotent spinal cord precursor cells in culture and after transplantation into transected sciatic nerve. *Journal of neurosurgery*, **98**, 1094-1103.
- Mahoney, D.J., Kaczor, J.J., Bourgeois, J., Yasuda, N. & Tarnopolsky, M.A. (2006) Oxidative stress and antioxidant enzyme upregulation in SOD1-G93A mouse skeletal muscle. *Muscle & nerve*, **33**, 809-816.

- Manczak, M., Calkins, M.J. & Reddy, P.H. (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet*, **20**, 2495-2509.
- Manfredi, G. & Xu, Z. (2005) Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion*, **5**, 77-87.
- Mannella, C.A., Pfeiffer, D.R., Bradshaw, P.C., Moraru, II, Slepchenko, B., Loew, L.M., Hsieh, C.E., Buttle, K. & Marko, M. (2001) Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB life*, **52**, 93-100.
- Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S.W., Adams, S.H. & Pan, G. (1999) UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS letters*, **443**, 326-330.
- Marden, J.J., Harraz, M.M., Williams, A.J., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H. & Engelhardt, J.F. (2007) Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice. *The Journal of clinical investigation*, **117**, 2913-2919.
- Marin, B., Jésus, P., Preux, P.-M., Couratier, P. & Desport, J.-C. (2011) Nutritional troubles in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Troubles nutritionnels lors de la sclérose latérale amyotrophique (SLA)*, **25**, 205-216.
- Martin, L.J. (1999) Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **58**, 459-471.
- Martin, L.J. (2010) The mitochondrial permeability transition pore: a molecular target for amyotrophic lateral sclerosis therapy. *Biochimica et biophysica acta*, **1802**, 186-197.
- Martin, L.J., Liu, Z., Chen, K., Price, A.C., Pan, Y., Swaby, J.A. & Golden, W.C. (2007) Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *The Journal of comparative neurology*, **500**, 20-46.
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., Komure, O., Matsuura, S., Kobatake, K., Morimoto, N., Abe, K., Suzuki, N., Aoki, M., Kawata, A., Hirai, T., Kato, T., Ogasawara, K., Hirano, A., Takumi, T., Kusaka, H., Hagiwara, K., Kaji, R. & Kawakami, H. (2010) Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **465**, 223-226.
- Maswood, N., Young, J., Tilmont, E., Zhang, Z., Gash, D.M., Gerhardt, G.A., Grondin, R., Roth, G.S., Mattison, J., Lane, M.A., Carson, R.E., Cohen, R.M., Mouton, P.R., Quigley, C., Mattson, M.P. & Ingram, D.K. (2004) Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 18171-18176.
- Matthews, N.S. & de Lahunta, A. (1985) Degenerative myelopathy in an adult miniature poodle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **186**, 1213-1215.
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M.F. & 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. & Camandola, S. (2007) Energy intake and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromolecular medicine*, **9**, 17-20.
- Matusica, D., Fenech, M.P., Rogers, M.-L. & Rush, R.A. (2008) Characterization and use of the NSC-34 cell line for study of neurotrophin receptor trafficking. *Journal of neuroscience research*, **86**, 553-565.

- McCombe, P.A. & Henderson, R.D. (2010) Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gender Medicine*, **7**, 557-570.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1969) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *The Journal of biological chemistry*, **244**, 6056-6063.
- McGoldrick, P., Joyce, P.I., Fisher, E.M.C. & Greensmith, L. (2013) Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et biophysica acta*, **1832**, 1421-1436.
- Meininger, V. (2011) ALS, what new 144 years after Charcot? *Archives italiennes de biologie*, **149**, 29-37.
- Menzies, F.M., Ince, P.G. & Shaw, P.J. (2002) Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochemistry international*, **40**, 543-551.
- Migheli, A., Atzori, C., Piva, R., Tortarolo, M., Girelli, M., Schiffer, D. & Bendotti, C. (1999) Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nat Med*, **5**, 966-967.
- Migheli, A., Cavalla, P., Marino, S. & Schiffer, D. (1994) A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **53**, 606-616.
- Milakovic, T. & Johnson, G.V.W. (2005) Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 30773-30782.
- Millecamps, S., Boillée, S., Le Ber, I., Seilhean, D., Teyssou, E., Giraudeau, M., Moigneu, C., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Corcia, P., Pradat, P.-F., Le Forestier, N., Lacomblez, L., Bruneteau, G., Camu, W., Brice, A., Cazeneuve, C., LeGuern, E., Meininger, V. & Salachas, F. (2012) Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes. *Journal of medical genetics*, **49**, 258-263.
- Millecamps, S., Salachas, F., Cazeneuve, C., Gordon, P., Bricka, B., Camuzat, A., Guillot-Noel, L., Russaouen, O., Bruneteau, G., Pradat, P.-F., Le Forestier, N., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Guy, N., Thauvin-Robinet, C., Lacomblez, L., Couratier, P., Hannequin, D., Seilhean, D., Le Ber, I., Corcia, P., Camu, W., Brice, A., Rouleau, G., LeGuern, E. & Meininger, V. (2010) SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *Journal of medical genetics*, **47**, 554-560.
- Miller, K.E. & Sheetz, M.P. (2004) Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci*, **117**, 2791-2804.
- Miller, T.M., Smith, R.A. & Cleveland, D.W. (2006) Amyotrophic lateral sclerosis and gene therapy. *Nature clinical practice. Neurology*, **2**, 462-463.
- Misgeld, T., Kerschensteiner, M., Bareyre, F.M., Burgess, R.W. & Lichtman, J.W. (2007) Imaging axonal transport of mitochondria in vivo. *Nature methods*, **4**, 559-561.
- Mitchell, J.D. & Borasio, G.D. (2007) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, **369**, 2031-2041.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, **191**, 144-148.
- Mochel, F. & Haller, R.G. (2011) Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J Clin Invest*, **121**, 493-499.
- Morahan, J.M., Yu, B., Trent, R.J. & Pamphlett, R. (2007) A gene-environment study of the paraoxonase 1 gene and pesticides in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology*, **28**, 532-540.

- Moreira, P.I., Siedlak, S.L., Wang, X., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Tabaton, M., Nunomura, A., Szweda, L.I., Aliev, G., Smith, M.A., Zhu, X. & Perry, G. (2007) Increased autophagic degradation of mitochondria in Alzheimer disease. *Autophagy*, **3**, 614-615.
- Morimoto, R.I. & Cuervo, A.M. (2009) Protein homeostasis and aging: taking care of proteins from the cradle to the grave. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, **64**, 167-170.
- Moroianu, J. & Riordan, J.F. (1994) Nuclear translocation of angiogenic proteins in endothelial cells: an essential step in angiogenesis. *Biochemistry*, **33**, 12535-12539.
- Morrison, B.M., Gordon, J.W., Ripps, M.E. & Morrison, J.H. (1996) Quantitative immunocytochemical analysis of the spinal cord in G86R superoxide dismutase transgenic mice: neurochemical correlates of selective vulnerability. *J Comp Neurol*, **373**, 619-631.
- Mu, X., He, J., Anderson, D.W., Trojanowski, J.Q. & Springer, J.E. (1996) Altered expression of bcl-2 and bax mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord motor neurons. *Annals of neurology*, **40**, 379-386.
- Muller, F.L., Song, W., Liu, Y., Chaudhuri, A., Pieke-Dahl, S., Strong, R., Huang, T.-T., Epstein, C.J., Roberts, L.J.n., Csete, M., Faulkner, J.A. & Van Remmen, H. (2006) Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free radical biology & medicine*, **40**, 1993-2004.
- Munch-Ellingsen, J., Lokebo, J.E., Bugge, E., Jonassen, A.K., Ravingerova, T. & Ytrehus, K. (2000) 5-HD abolishes ischemic preconditioning independently of monophasic action potential duration in the heart. *Basic research in cardiology*, **95**, 228-234.
- Munch, C., Sedlmeier, R., Meyer, T., Homberg, V., Sperfeld, A.D., Kurt, A., Prudlo, J., Peraus, G., Hanemann, C.O., Stumm, G. & Ludolph, A.C. (2004) Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology*, **63**, 724-726.
- Murata, M., Akao, M., O'Rourke, B. & Marban, E. (2001) Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circulation research*, **89**, 891-898.
- Murphy, M.P. & Brand, M.D. (1987) Variable stoichiometry of proton pumping by the mitochondrial respiratory chain. *Nature*, **329**, 170-172.

N

- Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown, R.H., Jr. & Itoyama, Y. (2001) Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **21**, 9246-9254.
- Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H. & Przedborski, S. (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature neuroscience*, **10**, 615-622.
- Nagley, P., Higgins, G.C., Atkin, J.D. & Beart, P.M. (2010) Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochimica et biophysica acta*, **1802**, 167-185.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H. & Hirokawa, N. (1994) KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell*, **79**, 1209-1220.
- Nassif, M., Matus, S., Castillo, K. & Hetz, C. (2010) Amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a journey through the secretory pathway. *Antioxidants & redox signaling*, **13**, 1955-1989.

- Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Trolly, M., Salvayre, R., Penicaud, L. & Casteilla, L. (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **11**, 809-815.
- Nemoto, S., Fergusson, M.M. & Finkel, T. (2005) SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 {alpha}. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 16456-16460.
- 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., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H.A., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M.-Y. (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, **314**, 130-133.
- Nicholls, D.G. & Budd, S.L. (2000) Mitochondria and Neuronal Survival. *Physiological reviews*, **80**, 315-360.
- Nicholls, D.G. & Locke, R.M. (1984) Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological reviews*, **64**, 1-64.
- Nishimura, A.L., Mitne-Neto, M., Silva, H.C.A., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J.R.M., Gillingwater, T., Webb, J., Skehel, P. & Zatz, M. (2004) A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *American journal of human genetics*, **75**, 822-831.
- Nogueira, V., Rigoulet, M., Piquet, M.A., Devin, A., Fontaine, E. & Leverve, X.M. (2001) Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 46104-46110.
- Noma, A. (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*, **305**, 147-148.

O

- Okado-Matsumoto, A. & Fridovich, I. (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 38388-38393.
- Okado-Matsumoto, A. & Fridovich, I. (2002) Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 9010-9014.
- Oldenburg, O., Qin, Q., Krieg, T., Yang, X.-M., Philipp, S., Critz, S.D., Cohen, M.V. & Downey, J.M. (2004) Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **286**, H468-476.
- Oldenburg, O., Yang, X.-M., Krieg, T., Garlid, K.D., Cohen, M.V., Grover, G.J. & Downey, J.M. (2003) P1075 opens mitochondrial K(ATP) channels and generates reactive oxygen species resulting in cardioprotection of rabbit hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **35**, 1035-1042.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. & Lenaers, G. (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 7743-7746.
- Oosthuyse, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., Theilmeyer, G., Dewerchin, M., Laudénbach, V., Vermylen, P., Raat, H., Acker, T., Vleminckx, V., Van Den Bosch, L., Cashman, N., Fujisawa, H., Drost, M.R., Sciot, R., Bruyninckx, F., Hicklin, D.J., Ince, C., Gressens, P., Lupu, F., Plate, K.H., Robberecht, W., Herbert, J.M., Collen, D. & Carmeliet, P. (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*, **28**, 131-138.

- Orlacchio, A., Babalini, C., Borreca, A., Patrono, C., Massa, R., Basaran, S., Munhoz, R.P., Rogaeva, E.A., St George-Hyslop, P.H., Bernardi, G. & Kawarai, T. (2010) SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, **133**, 591-598.
- Orr, A.L., Li, S., Wang, C.-E., Li, H., Wang, J., Rong, J., Xu, X., Mastroberardino, P.G., Greenamyre, J.T. & Li, X.-J. (2008) N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 2783-2792.
- Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., Yasuda, M., Osuga, H., Nishimoto, T., Narumiya, S. & Ikeda, J.-E. (2003) ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet*, **12**, 1671-1687.
- Ozdinler, P.H., Benn, S., Yamamoto, T.H., Guzel, M., Brown, R.H.J. & Macklis, J.D. (2011) Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **31**, 4166-4177.
- P**
- Paddenberg, R., Ishaq, B., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Rose, F., Weissmann, N., Braun-Dullaeus, R.C. & Kummer, W. (2003) Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **284**, L710-719.
- Pain, T., Yang, X.M., Critz, S.D., Yue, Y., Nakano, A., Liu, G.S., Heusch, G., Cohen, M.V. & Downey, J.M. (2000) Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circulation research*, **87**, 460-466.
- Palecek, J., Lips, M.B. & Keller, B.U. (1999) Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *The Journal of physiology*, **520 Pt 2**, 485-502.
- Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Taylor, G., Sherer, T. & Greenamyre, J.T. (2005) Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 42026-42035.
- Panov, A.V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J. & Greenamyre, J.T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci*, **5**, 731-736.
- Panzeri, C., De Palma, C., Martinuzzi, A., Daga, A., De Polo, G., Bresolin, N., Miller, C.C., Tudor, E.L., Clementi, E. & Bassi, M.T. (2006) The first ALS2 missense mutation associated with JPLS reveals new aspects of alsin biological function. *Brain*, **129**, 1710-1719.
- Papa, S., Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E. & Minuto, M. (1991) The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H⁺/e⁻ stoichiometry. *FEBS letters*, **288**, 183-186.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V. & Ruggiero, F.M. (2009) Role of cardiolipin peroxidation and Ca²⁺ in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell calcium*, **45**, 643-650.
- Pardo, A.C., Wong, V., Benson, L.M., Dykes, M., Tanaka, K., Rothstein, J.D. & Maragakis, N.J. (2006) Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1(G93A) mice. *Experimental neurology*, **201**, 120-130.
- Park, K.M. & Bowers, W.J. (2010) Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cellular signalling*, **22**, 977-983.

- Parone, P.A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D.I., Maechler, P., Barja, F. & Martinou, J.-C. (2008) Preventing Mitochondrial Fission Impairs Mitochondrial Function and Leads to Loss of Mitochondrial DNA. *PLoS ONE*, **3**, e3257.
- Pasinelli, P., Belford, M.E., Lennon, N., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., Trotti, D. & Brown, R.H.J. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron*, **43**, 19-30.
- Pasinelli, P., Borchelt, D.R., Houseweart, M.K., Cleveland, D.W. & Brown, R.H., Jr. (1998) Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 15763-15768.
- Pasinelli, P. & Brown, R.H. (2006) Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature reviews Neuroscience*, **7**, 710-723.
- Pasinelli, P., Houseweart, M.K., Brown, R.H., Jr. & Cleveland, D.W. (2000) Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 13901-13906.
- Pasterkamp, R.J. & Giger, R.J. (2009) Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Current opinion in neurobiology*, **19**, 263-274.
- Patel, Y.J.K., Payne Smith, M.D., de Belleruche, J. & Latchman, D.S. (2005) Hsp27 and Hsp70 administered in combination have a potent protective effect against FALS-associated SOD1-mutant-induced cell death in mammalian neuronal cells. *Brain research. Molecular brain research*, **134**, 256-274.
- Paubel, A., Violette, J., Amy, M., Praline, J., Meininger, V., Camu, W., Corcia, P., Andres, C.R. & Vourc'h, P. (2008) Mutations of the ANG gene in French patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, **65**, 1333-1336.
- Pavlov, P.F., Hansson Petersen, C., Glaser, E. & Ankarcrone, M. (2009) Mitochondrial accumulation of APP and Abeta: significance for Alzheimer disease pathogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, **13**, 4137-4145.
- Pecqueur, C., Couplan, E., Bouillaud, F. & Ricquier, D. (2001) Genetic and physiological analysis of the role of uncoupling proteins in human energy homeostasis. *J Mol Med (Berl)*, **79**, 48-56.
- Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M.R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J.S., Estevez, A.G. & Barbeito, L. (2004) Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, **89**, 464-473.
- Pehar, M., Vargas, M.R., Robinson, K.M., Cassina, P., Diaz-Amarilla, P.J., Hagen, T.M., Radi, R., Barbeito, L. & Beckman, J.S. (2007) Mitochondrial superoxide production and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in p75 neurotrophin receptor-induced motor neuron apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 7777-7785.
- Petrasch-Parwez, E., Nguyen, H.-P., Lobbecke-Schumacher, M., Habbes, H.-W., Wiczorek, S., Riess, O., Andres, K.-H., Dermietzel, R. & Von Horsten, S. (2007) Cellular and subcellular localization of Huntingtin [corrected] aggregates in the brain of a rat transgenic for Huntington disease. *J Comp Neurol*, **501**, 716-730.
- Petri, S., Calingasan, N.Y., Alsaied, O.A., Wille, E., Kiaei, M., Friedman, J.E., Baranova, O., Chavez, J.C. & Beal, M.F. (2007) The lipophilic metal chelators DP-109 and DP-460 are neuroprotective in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, **102**, 991-1000.
- Petri, S., Kiaei, M., Wille, E., Calingasan, N.Y. & Flint Beal, M. (2006) Loss of Fas ligand-function improves survival in G93A-transgenic ALS mice. *J Neurol Sci*, **251**, 44-49.

- Pettmann, B. & Henderson, C.E. (1998) Neuronal cell death. *Neuron*, **20**, 633-647.
- Phul, R.K. & Smith, M.E. (2000) Expression of nitric oxide synthase in the spinal cord in C57BL/6J mice with congenital muscular dystrophy. *Muscle & nerve*, **23**, 63-72.
- Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacin, M. & Zorzano, A. (2005a) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet*, **14**, 1405-1415.
- Pieri, M., Albo, F., Gaetti, C., Spalloni, A., Bengtson, C.P., Longone, P., Cavalcanti, S. & Zona, C. (2003) Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*, **351**, 153-156.
- Pieri, M., Caioli, S., Canu, N., Mercuri, N.B., Guatteo, E. & Zona, C. (2012) Over-expression of N-type calcium channels in cortical neurons from a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Exp Neurol*.
- Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Mercuri, N.B. & Zona, C. (2009) Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental neurology*, **215**, 368-379.
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Andrews, L.A., McBride, H.M., Whitworth, A.J. & Pallanck, L.J. (2008) The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 1638-1643.
- Porter, R.K. & Brand, M.D. (1995) Causes of differences in respiration rate of hepatocytes from mammals of different body mass. *The American journal of physiology*, **269**, R1213-1224.
- Porter, R.K., Hulbert, A.J. & Brand, M.D. (1996) Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *The American journal of physiology*, **271**, R1550-1560.
- Powers, M.V., Clarke, P.A. & Workman, P. (2009) Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle*, **8**, 518-526.
- Pramatarova, A., Laganier, J., Roussel, J., Brisebois, K. & Rouleau, G.A. (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **21**, 3369-3374.
- Puls, I., Jonnakuty, C., LaMonte, B.H., Holzbaur, E.L.F., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M.K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S.J., Brown, R.H.J., Ludlow, C.L. & Fischbeck, K.H. (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet*, **33**, 455-456.
- Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L. & Caroni, P. (2006) Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nature neuroscience*, **9**, 408-419.

R

- Ranganathan, S. & Bowser, R. (2010) p53 and Cell Cycle Proteins Participate in Spinal Motor Neuron Cell Death in ALS. *The open pathology journal*, **4**, 11-22.
- Rangnekar, V.M. (1998) Apoptosis mediated by a novel leucine zipper protein Par-4. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, **3**, 61-66.
- Rao, S.D. & Weiss, J.H. (2004) Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends in neurosciences*, **27**, 17-23.

- Raoul, C., Buhler, E., Sadeghi, C., Jacquier, A., Aebischer, P., Pettmann, B., Henderson, C.E. & Haase, G. (2006) Chronic activation in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice of a feedback loop involving Fas, Daxx, and FasL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 6007-6012.
- Raoul, C., Estevez, A.G., Nishimune, H., Cleveland, D.W., deLapeyriere, O., Henderson, C.E., Haase, G. & Pettmann, B. (2002a) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron*, **35**, 1067-1083.
- Raoul, C., Henderson, C.E. & Pettmann, B. (1999) Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *The Journal of cell biology*, **147**, 1049-1062.
- Rasouri, S., Lagouge, M. & Auwerx, J. (2007) [SIRT1/PGC-1: a neuroprotective axis?]. *Medecine sciences : M/S*, **23**, 840-844.
- Ratnaparkhi, A., Lawless, G.M., Schweizer, F.E., Golshani, P. & Jackson, G.R. (2008) A Drosophila model of ALS: human ALS-associated mutation in VAP33A suggests a dominant negative mechanism. *PLoS ONE*, **3**, e2334.
- Raval, A.P., Dave, K.R., DeFazio, R.A. & Perez-Pinzon, M.A. (2007) epsilonPKC phosphorylates the mitochondrial K(+) (ATP) channel during induction of ischemic preconditioning in the rat hippocampus. *Brain research*, **1184**, 345-353.
- 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., Jr., Scott, R.W. & Snider, W.D. (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, P.H., Mao, P. & Manczak, M. (2009) Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease. *Brain research reviews*, **61**, 33-48.
- Renoncourt, Y., Carroll, P., Filippi, P., Arce, V. & Alonso, S. (1998) Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons. *Mechanisms of development*, **79**, 185-197.
- Renton, Alan E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, Jennifer C., Laaksovirta, H., van Swieten, John C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, Anne M., Kaganovich, A., Scholz, Sonja W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, Daniel W., Hernandez, Dena G., Johnson, Janel O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, Rita J., Orrell, Richard W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, Iris E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, Janis B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, Michael A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V.-M., Kaivorinne, A.-L., Hölttä-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chiò, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, Jeffrey D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, Evan E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, Svetlana D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, Nigel M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, Huw R., Tienari, Pentti J. & Traynor, Bryan J. (2011) A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron*, **72**, 257-268.
- Reyes, N.A., Fisher, J.K., Austgen, K., VandenBerg, S., Huang, E.J. & Oakes, S.A. (2010) Blocking the mitochondrial apoptotic pathway preserves motor neuron viability and function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of clinical investigation*, **120**, 3673-3679.
- Rhein, V., Song, X., Wiesner, A., Ittner, L.M., Baysang, G., Meier, F., Ozmen, L., Bluethmann, H., Drose, S., Brandt, U., Savaskan, E., Czech, C., Gotz, J. & Eckert, A. (2009) Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 20057-20062.
- Rial, E., Aguirregoitia, E., Jimenez-Jimenez, J. & Ledesma, A. (2004) Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1: implications for the transport mechanism. *Biochimica et biophysica acta*, **1608**, 122-130.

- Rice, S.E. & Gelfand, V.I. (2006) Paradigm lost: milton connects kinesin heavy chain to miro on mitochondria. *The Journal of cell biology*, **173**, 459-461.
- Richardson, K., Allen, S.P., Mortiboys, H., Grierson, A.J., Wharton, S.B., Ince, P.G., Shaw, P.J. & Heath, P.R. (2013) The Effect of SOD1 Mutation on Cellular Bioenergetic Profile and Viability in Response to Oxidative Stress and Influence of Mutation-Type. *PLoS ONE*, **8**, e68256.
- Rigoulet, M. (1990) Control processes in oxidative phosphorylation: kinetic constraints and stoichiometry. *Biochimica et biophysica acta*, **1018**, 185-189.
- Rigoulet, M., Leverve, X., Fontaine, E., Ouhabi, R. & Guerin, B. (1998) Quantitative analysis of some mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: dependence upon both fluxes and forces. *Molecular and cellular biochemistry*, **184**, 35-52.
- Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., Morrison, J.H. & 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.
- Robberecht, W. & Philips, T. (2013) The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews. Neuroscience*, **14**, 248-264.
- Rodriguez, D., Rojas-Rivera, D. & Hetz, C. (2011) Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: The BCL-2 protein family rheostat. *Biochimica et biophysica acta*, **1813**, 564-574.
- Rorsman, P. & Trube, G. (1985) Glucose dependent K⁺-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **405**, 305-309.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R. & Brown, R.H. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **362**, 59-62.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J. & Capaldi, R.A. (2004) Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer research*, **64**, 985-993.
- Roth, D.M. & Balch, W.E. (2011) Modeling general proteostasis: proteome balance in health and disease. *Current opinion in cell biology*, **23**, 126-134.
- Roth, S., Dreixler, J.C., Shaikh, A.R., Lee, K.H. & Bindokas, V. (2006) Mitochondrial potassium ATP channels and retinal ischemic preconditioning. *Investigative ophthalmology & visual science*, **47**, 2114-2124.
- Rothstein, J.D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M. & Kuncl, R.W. (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 6591-6595.
- Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A. & Rustin, P. (1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet*, **17**, 215-217.
- Roussel, D., Harding, M., Runswick, M.J., Walker, J.E. & Brand, M.D. (2002) Does any yeast mitochondrial carrier have a native uncoupling protein function? *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **34**, 165-176.
- Rowland, L.P. (2001) How amyotrophic lateral sclerosis got its name: The clinical-pathologic genius of jean-martin charcot. *Archives of Neurology*, **58**, 512-515.

- Ruddy, D.M., Parton, M.J., Al-Chalabi, A., Lewis, C.M., Vance, C., Smith, B.N., Leigh, P.N., Powell, J.F., Siddique, T., Meyjes, E.P., Baas, F., de Jong, V. & Shaw, C.E. (2003) Two families with familial amyotrophic lateral sclerosis are linked to a novel locus on chromosome 16q. *American journal of human genetics*, **73**, 390-396.
- Rustin, P., Munnich, A. & Rotig, A. (2002) Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *European journal of human genetics : EJHG*, **10**, 289-291.
- Rustin, P. & Rötig, A. (2002) Inborn errors of complex II – Unusual human mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1553**, 117-122.
- Rutherford, A.C., Traer, C., Wassmer, T., Pattni, K., Bujny, M.V., Carlton, J.G., Stenmark, H. & Cullen, P.J. (2006) The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *J Cell Sci*, **119**, 3944-3957.
- ## S
- Saeed, M., Siddique, N., Hung, W.Y., Usacheva, E., Liu, E., Sufit, R.L., Heller, S.L., Haines, J.L., Pericak-Vance, M. & Siddique, T. (2006) Paraoxonase cluster polymorphisms are associated with sporadic ALS. *Neurology*, **67**, 771-776.
- Salinas, S., Bilisland, L.G. & Schiavo, G. (2008) Molecular landmarks along the axonal route: axonal transport in health and disease. *Current opinion in cell biology*, **20**, 445-453.
- Samartsev, V.N., Mokhova, E.N. & Skulachev, V.P. (1997a) The pH-dependent reciprocal changes in contributions of ADP/ATP antiporter and aspartate/glutamate antiporter to the fatty acid-induced uncoupling. *FEBS letters*, **412**, 179-182.
- Samartsev, V.N., Smirnov, A.V., Zeldi, I.P., Markova, O.V., Mokhova, E.N. & Skulachev, V.P. (1997b) Involvement of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, **1319**, 251-257.
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. & Futai, M. (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F0F1): direct observation. *Science (New York, N.Y.)*, **286**, 1722-1724.
- Sanchis, D., Busquets, S., Alvarez, B., Ricquier, D., Lopez-Soriano, F.J. & Argiles, J.M. (1998) Skeletal muscle UCP2 and UCP3 gene expression in a rat cancer cachexia model. *FEBS letters*, **436**, 415-418.
- Santos, D. & Cardoso, S.M. (2012) Mitochondrial dynamics and neuronal fate in Parkinson's disease. *Mitochondrion*, **12**, 428-437.
- Santos, R.X., Correia, S.C., Wang, X., Perry, G., Smith, M.A., Moreira, P.I. & Zhu, X. (2010) A synergistic dysfunction of mitochondrial fission/fusion dynamics and mitophagy in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **20 Suppl 2**, S401-412.
- Sapp, P.C., Hosler, B.A., McKenna-Yasek, D., Chin, W., Gann, A., Genise, H., Gorenstein, J., Huang, M., Sailer, W., Scheffler, M., Valesky, M., Haines, J.L., Pericak-Vance, M., Siddique, T., Horvitz, H.R. & Brown, R.H.J. (2003) Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *American journal of human genetics*, **73**, 397-403.
- Sasaki, S., Komori, T. & Iwata, M. (2000) Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*, **100**, 138-144.
- Sasaki, S., Shibata, N. & Iwata, M. (2001) Neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*, **101**, 351-357.

- Sasaki, S., Takeda, T., Shibata, N. & Kobayashi, M. (2010) Alterations in subcellular localization of TDP-43 immunoreactivity in the anterior horns in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*, **478**, 72-76.
- Sathasivam, S. & Shaw, P.J. (2005) Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis--what is the evidence? *Lancet neurology*, **4**, 500-509.
- Saxena, S., Cabuy, E. & Caroni, P. (2009) A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci*, **12**, 627-636.
- Saxena, S. & Caroni, P. (2011) Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron*, **71**, 35-48.
- Saxton, W.M. & Hollenbeck, P.J. (2012) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci*, **125**, 2095-2104.
- Schaefer, A.M., Sanes, J.R. & Lichtman, J.W. (2005) A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of comparative neurology*, **490**, 209-219.
- Schnaar, R.I. & Schaffner, A.E. (1981) Separation of cell types from embryonic chicken and rat spinal cord: characterization of motoneuron-enriched fractions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **1**, 204-217.
- Schuck, S., Prinz, W.A., Thorn, K.S., Voss, C. & Walter, P. (2009) Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *The Journal of cell biology*, **187**, 525-536.
- Sebastian, J., Kieran, D., Breen, B., King, M.A., Netteland, D.F., Joyce, D., Fitzpatrick, S.F., Taylor, C.T. & Prehn, J.H. (2009) Angiogenin protects motoneurons against hypoxic injury. *Cell Death Differ*, **16**, 1238-1247.
- Seharaseyon, J., Sasaki, N., Ohler, A., Sato, T., Fraser, H., Johns, D.C., O'Rourke, B. & Marban, E. (2000) Evidence against functional heteromultimerization of the KATP channel subunits Kir6.1 and Kir6.2. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 17561-17565.
- Seifert, G., Schilling, K. & Steinhäuser, C. (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 194-206.
- Sengun, I.S. & Appel, S.H. (2003) Serum anti-Fas antibody levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, **142**, 137-140.
- Seong, I.S., Ivanova, E., Lee, J.-M., Choo, Y.S., Fossale, E., Anderson, M., Gusella, J.F., Laramie, J.M., Myers, R.H., Lesort, M. & MacDonald, M.E. (2005) HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Hum Mol Genet*, **14**, 2871-2880.
- Sephton, C.F., Good, S.K., Atkin, S., Dewey, C.M., Mayer, P.r., Herz, J. & Yu, G. (2010) TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 6826-6834.
- Shabalina, I.G., Kramarova, T.V., Nedergaard, J. & Cannon, B. (2006) Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively. *The Biochemical journal*, **399**, 405-414.
- Shaw, C.E. (2010) Capturing VCP: another molecular piece in the ALS jigsaw puzzle. *Neuron*, **68**, 812-814.
- Shaw, I.C., Fitzmaurice, P.S., Mitchell, J.D. & Lynch, P.G. (1995) Studies on cellular free radical protection mechanisms in the anterior horn from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration*, **4**, 391-396.

- Shefner, J.M., Reaume, A.G., Flood, D.G., Scott, R.W., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Upton-Rice, M. & Brown, R.H., Jr. (1999) Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology*, **53**, 1239-1246.
- Sherer, T.B., Betarbet, R., Testa, C.M., Seo, B.B., Richardson, J.R., Kim, J.H., Miller, G.W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A. & Greenamyre, J.T. (2003) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 10756-10764.
- Sherer, T.B., Richardson, J.R., Testa, C.M., Seo, B.B., Panov, A.V., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., Miller, G.W. & Greenamyre, J.T. (2007) Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, **100**, 1469-1479.
- Shibata, N. (2001) Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, **21**, 82-92.
- Shibata, N., Hirano, A., Hedley-Whyte, E.T., Dal Canto, M.C., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Kawaguchi, M., Yamamoto, T. & Kobayashi, M. (2002) Selective formation of certain advanced glycation end products in spinal cord astrocytes of humans and mice with superoxide dismutase-1 mutation. *Acta neuropathologica*, **104**, 171-178.
- Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Dal Canto, M.C., Gurney, M.E., Komori, T., Umahara, T. & 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.
- Shibue, T. & Taniguchi, T. (2006) BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **119**, 2036-2043.
- Shin, S., Dalton, S. & Stice, S.L. (2005) Human motor neuron differentiation from human embryonic stem cells. *Stem cells and development*, **14**, 266-269.
- Siddique, T. & Deng, H.X. (1996) Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, **5 Spec No**, 1465-1470.
- Siddique, T., Figlewicz, D.A., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Rouleau, G., Jeffers, A.J., Sapp, P., Hung, W.Y., Bebout, J., McKenna-Yasek, D. & et al. (1991) Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *The New England journal of medicine*, **324**, 1381-1384.
- Skulachev, V.P. (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS letters*, **294**, 158-162.
- Slowik, A., Tomik, B., Wolkow, P.P., Partyka, D., Turaj, W., Malecki, M.T., Pera, J., Dziedzic, T., Szczudlik, A. & Figlewicz, D.A. (2006) Paraoxonase gene polymorphisms and sporadic ALS. *Neurology*, **67**, 766-770.
- Smith, B.D. & Raines, R.T. (2006) Genetic selection for critical residues in ribonucleases. *Journal of molecular biology*, **362**, 459-478.
- Spooren, W.P. & Hengerer, B. (2000) DNA laddering and caspase 3-like activity in the spinal cord of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **46**, 63-69.
- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., Baralle, F., de Belleruche, J., Mitchell, J.D., Leigh, P.N., Al-Chalabi, A., Miller, C.C., Nicholson, G. & Shaw, C.E. (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, **319**, 1668-1672.
- Stallings, N.R., Puttapparthi, K., Luther, C.M., Burns, D.K. & Elliott, J.L. (2010) Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiol Dis*, **40**, 404-414.

- Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y. & Nelson, M.T. (1989) Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science (New York, N.Y.)*, **245**, 177-180.
- Starkov, A.A. (2006) Protein-mediated energy-dissipating pathways in mitochondria. *Chemico-biological interactions*, **163**, 133-144.
- Stepien, G., Torroni, A., Chung, A.B., Hodge, J.A. & Wallace, D.C. (1992) Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 14592-14597.
- Stommel, E.W., van Hoff, R.M., Graber, D.J., Bercury, K.K., Langford, G.M. & Harris, B.T. (2007) Tumor necrosis factor-alpha induces changes in mitochondrial cellular distribution in motor neurons. *Neuroscience*, **146**, 1013-1019.
- Stuart, J.A., Harper, J.A., Brindle, K.M., Jekabsons, M.B. & Brand, M.D. (2001) A mitochondrial uncoupling artifact can be caused by expression of uncoupling protein 1 in yeast. *The Biochemical journal*, **356**, 779-789.
- Subramanian, V., Crabtree, B. & Acharya, K.R. (2008) Human angiogenin is a neuroprotective factor and amyotrophic lateral sclerosis associated angiogenin variants affect neurite extension/pathfinding and survival of motor neurons. *Hum Mol Genet*, **17**, 130-149.
- Subramanian, V. & Feng, Y. (2007) A new role for angiogenin in neurite growth and pathfinding: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, **16**, 1445-1453.
- Suraweera, A., Becherel, O.J., Chen, P., Rundle, N., Woods, R., Nakamura, J., Gatei, M., Criscuolo, C., Filla, A., Chessa, L., Fusser, M., Epe, B., Gueven, N. & Lavin, M.F. (2007) Senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, is involved in the defense against oxidative DNA damage. *The Journal of cell biology*, **177**, 969-979.
- Sutedja, N.A., Sinke, R.J., Van Vught, P.W.J., Van der Linden, M.W., Wokke, J.H.J., Van Duijn, C.M., Njajou, O.T., Van der Schouw, Y.T., Veldink, J.H. & Van Den Berg, L.H. (2007) The association between H63D mutations in HFE and amyotrophic lateral sclerosis in a Dutch population. *Arch Neurol*, **64**, 63-67.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. & Schatten, G. (2000) Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of reproduction*, **63**, 582-590.
- Swerdlow, R.H., Burns, J.M. & Khan, S.M. (2013) The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis: Progress and Perspectives. *Biochimica et biophysica acta*.

T

- Takeuchi, H., Kobayashi, Y., Yoshihara, T., Niwa, J.-i., Doyu, M., Ohtsuka, K. & Sobue, G. (2002) Hsp70 and Hsp40 improve neurite outgrowth and suppress intracytoplasmic aggregate formation in cultured neuronal cells expressing mutant SOD1. *Brain research*, **949**, 11-22.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A. & Hirokawa, N. (1998) Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell*, **93**, 1147-1158.
- Tateishi, T., Yamasaki, R., Tanaka, M., Matsushita, T., Kikuchi, H., Isobe, N., Ohyagi, Y. & Kira, J.-i. (2010) CSF chemokine alterations related to the clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, **222**, 76-81.

- Tateno, M., Sadakata, H., Tanaka, M., Itohara, S., Shin, R.-M., Miura, M., Masuda, M., Aosaki, T., Urushitani, M., Misawa, H. & Takahashi, R. (2004) Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum Mol Genet*, **13**, 2183-2196.
- Ticozzi, N., Tiloca, C., Morelli, C., Colombrita, C., Poletti, B., Doretto, A., Maderna, L., Messina, S., Ratti, A. & Silani, V. (2011) Genetics of familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Archives italiennes de biologie*, **149**, 65-82.
- Tomkins, J., Usher, P., Slade, J.Y., Ince, P.G., Curtis, A., Bushby, K. & Shaw, P.J. (1998) Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuroreport*, **9**, 3967-3970.
- Towne, C., Raoul, C., Schneider, B.L. & Aebischer, P. (2008) Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **16**, 1018-1025.
- Trushina, E., Dyer, R.B., Badger, J.D.n., Ure, D., Eide, L., Tran, D.D., Vrieze, B.T., Legendre-Guillemin, V., McPherson, P.S., Mandavilli, B.S., Van Houten, B., Zeitlin, S., McNiven, M., Aebersold, R., Hayden, M., Parisi, J.E., Seeburg, E., Dragatsis, I., Doyle, K., Bender, A., Chacko, C. & McMurray, C.T. (2004) Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Molecular and cellular biology*, **24**, 8195-8209.
- Tsuda, H., Han, S.M., Yang, Y., Tong, C., Lin, Y.Q., Mohan, K., Haueter, C., Zoghbi, A., Harati, Y., Kwan, J., Miller, M.A. & Bellen, H.J. (2008) The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein VAPB is cleaved, secreted, and acts as a ligand for Eph receptors. *Cell*, **133**, 963-977.
- Tsujimoto, Y. (1998) Prevention of neuronal cell death by Bcl-2. *Results and problems in cell differentiation*, **24**, 137-155.
- Tudor, E.L., Galtrey, C.M., Perkinson, M.S., Lau, K.F., De Vos, K.J., Mitchell, J.C., Ackerley, S., Hortobagyi, T., Vamos, E., Leigh, P.N., Klasen, C., McLoughlin, D.M., Shaw, C.E. & Miller, C.C. (2010) Amyotrophic lateral sclerosis mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein-B transgenic mice develop TAR-DNA-binding protein-43 pathology. *Neuroscience*, **167**, 774-785.
- Tummala, H., Jung, C., Tiwari, A., Higgins, C.M.J., Hayward, L.J. & Xu, Z. (2005) Inhibition of chaperone activity is a shared property of several Cu,Zn-superoxide dismutase mutants that cause amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 17725-17731.
- Turner, B.J., Cheah, I.K., Macfarlane, K.J., Lopes, E.C., Petratos, S., Langford, S.J. & Cheema, S.S. (2003) Antisense peptide nucleic acid-mediated knockdown of the p75 neurotrophin receptor delays motor neuron disease in mutant SOD1 transgenic mice. *J Neurochem*, **87**, 752-763.
- Turner, B.J., Murray, S.S., Piccenna, L.G., Lopes, E.C., Kilpatrick, T.J. & Cheema, S.S. (2004) Effect of p75 neurotrophin receptor antagonist on disease progression in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of neuroscience research*, **78**, 193-199.
- Turner, B.J. & Talbot, K. (2008) Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Progress in neurobiology*, **85**, 94-134.
- Turner, M.R., Hardiman, O., Benatar, M., Brooks, B.R., Chio, A., de Carvalho, M., Ince, P.G., Lin, C., Miller, R.G., Mitsumoto, H., Nicholson, G., Ravits, J., Shaw, P.J., Swash, M., Talbot, K., Traynor, B.J., Van den Berg, L.H., Veldink, J.H., Vucic, S. & Kiernan, M.C. (2013) Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet neurology*, **12**, 310-322.

U

- Ugolini, G., Raoul, C., Ferri, A., Haenggeli, C., Yamamoto, Y., Salaun, D., Henderson, C.E., Kato, A.C., Pettmann, B. & Hueber, A.-O. (2003) Fas/tumor necrosis factor receptor death signaling is required for axotomy-induced death of motoneurons in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 8526-8531.
- Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R. & Julien, J.-P. (2006) Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*, **9**, 108-118.

V

- Van Damme, P., Bogaert, E., Dewil, M., Hersmus, N., Kiraly, D., Scheveneels, W., Bockx, I., Braeken, D., Verpoorten, N., Verhoeven, K., Timmerman, V., Herijgers, P., Callewaert, G., Carmeliet, P., Van Den Bosch, L. & Robberecht, W. (2007) Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 14825-14830.
- Van Damme, P., Braeken, D., Callewaert, G., Robberecht, W. & Van Den Bosch, L. (2005) GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **64**, 605-612.
- Van Damme, P. & Robberecht, W. (2009) Recent advances in motor neuron disease. *Curr Opin Neurol*, **22**, 486-492.
- Van Deerlin, V.M., Leverenz, J.B., Bekris, L.M., Bird, T.D., Yuan, W., Elman, L.B., Clay, D., Wood, E.M., Chen-Plotkin, A.S., Martinez-Lage, M., Steinbart, E., McCluskey, L., Grossman, M., Neumann, M., Wu, I.-L., Yang, W.-S., Kalb, R., Galasko, D.R., Montine, T.J., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Schellenberg, G.D. & Yu, C.-E. (2008) TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet neurology*, **7**, 409-416.
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E. & Robberecht, W. (2006) The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et biophysica acta*, **1762**, 1068-1082.
- van der Zee, J., Pirici, D., Van Langenhove, T., Engelborghs, S., Vandenberghe, R., Hoffmann, M., Pusswald, G., Van den Broeck, M., Peeters, K., Matheijssens, M., Martin, J.J., De Deyn, P.P., Cruts, M., Haubenberger, D., Kumar-Singh, S., Zimprich, A. & Van Broeckhoven, C. (2009) Clinical heterogeneity in 3 unrelated families linked to VCP p.Arg159His. *Neurology*, **73**, 626-632.
- Van Laar, V.S. & Berman, S.B. (2013) The interplay of neuronal mitochondrial dynamics and bioenergetics: implications for Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, **51**, 43-55.
- van Vught, P.W.J., Veldink, J.H. & van Den Berg, L.H. (2010) P413L CHGB is not associated with ALS susceptibility or age at onset in a Dutch population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, E77; author reply E78.
- van Zundert, B., Peuscher, M.H., Hynynen, M., Chen, A., Neve, R.L., Brown, R.H.J., Constantine-Paton, M. & Bellingham, M.C. (2008) Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 10864-10874.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K.L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P.N., Blair, I.P., Nicholson, G., de Belleruche, J., Gallo, J.-M., Miller, C.C. & Shaw, C.E. (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science (New York, N.Y.)*, **323**, 1208-1211.

- Vande Velde, C., Miller, T.M., Cashman, N.R. & Cleveland, D.W. (2008) Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 4022-4027.
- Vanselow, B.K. & Keller, B.U. (2000) Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *The Journal of physiology*, **525 Pt 2**, 433-445.
- Varadi, A., Cirulli, V. & Rutter, G.A. (2004a) Mitochondrial localization as a determinant of capacitative Ca²⁺ entry in HeLa cells. *Cell calcium*, **36**, 499-508.
- Varadi, A., Johnson-Cadwell, L.I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V.J. & Rutter, G.A. (2004b) Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci*, **117**, 4389-4400.
- Vargas, M.R., Johnson, D.A., Sirkis, D.W., Messing, A. & Johnson, J.A. (2008) Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 13574-13581.
- Vargas, M.R. & Johnson, J.A. (2010) Astroglial gliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, **7**, 471-481.
- Vargas, M.R., Pehar, M., Cassina, P., Beckman, J.S. & Barbeito, L. (2006) Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *J Neurochem*, **97**, 687-696.
- Vidal-Puig, A.J., Grujic, D., Zhang, C.Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., Muoio, D.M. & Lowell, B.B. (2000) Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 16258-16266.
- Vielhaber, S., Winkler, K., Kirches, E., Kunz, D., Buchner, M., Feistner, H., Elger, C.E., Ludolph, A.C., Riepe, M.W. & Kunz, W.S. (1999) Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, **169**, 133-139.
- Vijayvergiya, C., Beal, M.F., Buck, J. & Manfredi, G. (2005) Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 2463-2470.
- Vukosavic, S., Dubois-Dauphin, M., Romero, N. & Przedborski, S. (1999) Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, **73**, 2460-2468.
- Vukosavic, S., Stefanis, L., Jackson-Lewis, V., Guegan, C., Romero, N., Chen, C., Dubois-Dauphin, M. & Przedborski, S. (2000) Delaying caspase activation by Bcl-2: A clue to disease retardation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**, 9119-9125.

W

- Wakahara, N., Katoh, H., Yaguchi, Y., Uehara, A., Satoh, H., Terada, H., Fujise, Y. & Hayashi, H. (2004) Difference in the cardioprotective mechanisms between ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, **68**, 156-162.
- Wang, H. & Oster, G. (1998) Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature*, **396**, 279-282.

- Wang, J., Farr, G.W., Hall, D.H., Li, F., Furtak, K., Dreier, L. & Horwich, A.L. (2009a) An ALS-linked mutant SOD1 produces a locomotor defect associated with aggregation and synaptic dysfunction when expressed in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, **5**, e1000350.
- Wang, J., Xu, G., Slunt, H.H., Gonzales, V., Coonfield, M., Fromholt, D., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. & Borchelt, D.R. (2005) Coincident thresholds of mutant protein for paralytic disease and protein aggregation caused by restrictively expressed superoxide dismutase cDNA. *Neurobiology of disease*, **20**, 943-952.
- Wang, L., Cherednichenko, G., Hernandez, L., Halow, J., Camacho, S.A., Figueredo, V. & Schaefer, S. (2001) Preconditioning limits mitochondrial Ca²⁺ during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **280**, H2321-2328.
- Wang, L., Gutmann, D.H. & Roos, R.P. (2011a) Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Human molecular genetics*, **20**, 286-293.
- Wang, L., Sharma, K., Grisotti, G. & Roos, R.P. (2009b) The effect of mutant SOD1 dismutase activity on non-cell autonomous degeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, **35**, 234-240.
- Wang, R., Yang, B. & Zhang, D. (2011b) Activation of interferon signaling pathways in spinal cord astrocytes from an ALS mouse model. *Glia*, **59**, 946-958.
- Wang, X.-S., Lee, S., Simmons, Z., Boyer, P., Scott, K., Liu, W. & Connor, J. (2004) Increased incidence of the Hfe mutation in amyotrophic lateral sclerosis and related cellular consequences. *J Neurol Sci*, **227**, 27-33.
- Wang, X., Petrie, T.G., Liu, Y., Liu, J., Fujioka, H. & Zhu, X. (2012) Parkinson's disease-associated DJ-1 mutations impair mitochondrial dynamics and cause mitochondrial dysfunction. *Journal of neurochemistry*, **121**, 830-839.
- Ware, C.F. (2005) Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annual review of immunology*, **23**, 787-819.
- Watanabe, Y., Yasui, K., Nakano, T., Doi, K., Fukada, Y., Kitayama, M., Ishimoto, M., Kurihara, S., Kawashima, M., Fukuda, H., Adachi, Y., Inoue, T. & Nakashima, K. (2005) Mouse motor neuron disease caused by truncated SOD1 with or without C-terminal modification. *Brain research. Molecular brain research*, **135**, 12-20.
- Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W.T., Mooyer, P.A.W., Wanders, R.J.A. & Leonard, J.V. (2007) A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *The New England journal of medicine*, **356**, 1736-1741.
- Watson, M.R., Lagow, R.D., Xu, K., Zhang, B. & Bonini, N.M. (2008) A drosophila model for amyotrophic lateral sclerosis reveals motor neuron damage by human SOD1. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 24972-24981.
- Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N.J., Miller, T.M. & Baloh, R.H. (2009) TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 18809-18814.
- Weisberg, S.J., Lyakhovetsky, R., Werdiger, A.-c., Gitler, A.D., Soen, Y. & Kaganovich, D. (2012) Compartmentalization of superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) aggregates determines their toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 15811-15816.
- Weisiger, R.A. & Fridovich, I. (1973) Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *The Journal of biological chemistry*, **248**, 4793-4796.

- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C. & Reynolds, B.A. (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**, 7599-7609.
- Weisskopf, M.G., McCullough, M.L., Calle, E.E., Thun, M.J., Cudkowicz, M. & Ascherio, A. (2004) Prospective study of cigarette smoking and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol*, **160**, 26-33.
- Weydt, P., Pineda, V.V., Torrence, A.E., Libby, R.T., Satterfield, T.F., Lazarowski, E.R., Gilbert, M.L., Morton, G.J., Bammler, T.K., Strand, A.D., Cui, L., Beyer, R.P., Easley, C.N., Smith, A.C., Krainc, D., Luquet, S., Sweet, I.R., Schwartz, M.W. & La Spada, A.R. (2006) Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell metabolism*, **4**, 349-362.
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J.A. & Jessell, T.M. (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, **110**, 385-397.
- Wiedemann, F.R., Manfredi, G., Mawrin, C., Beal, M.F. & Schon, E.A. (2002) Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem*, **80**, 616-625.
- Wijesekera, L.C. & Leigh, P.N. (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet journal of rare diseases*, **4**, 22.
- Wils, H., Kleinberger, G., Janssens, J., Pereson, S., Joris, G., Cuijt, I., Smits, V., Ceuterick-de Groote, C., Van Broeckhoven, C. & Kumar-Singh, S. (2010) TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 3858-3863.
- Wojtczak, L. & Wieckowski, M.R. (1999) The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **31**, 447-455.
- Wong, M. & Martin, L.J. (2010) Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet*, **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. & 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.
- Wootz, H., Hansson, I., Korhonen, L. & Lindholm, D. (2006) XIAP decreases caspase-12 cleavage and calpain activity in spinal cord of ALS transgenic mice. *Experimental cell research*, **312**, 1890-1898.
- Wozniak, M.J., Melzer, M., Dorner, C., Haring, H.-U. & Lammers, R. (2005) The novel protein KBP regulates mitochondria localization by interaction with a kinesin-like protein. *BMC cell biology*, **6**, 35.
- Wu, D., Yu, W., Kishikawa, H., Folkerth, R.D., Iafrate, A.J., Shen, Y., Xin, W., Sims, K. & Hu, G.-F. (2007) Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*, **62**, 609-617.
- Wu, L.-S., Cheng, W.-C., Hou, S.-C., Yan, Y.-T., Jiang, S.-T. & Shen, C.-K.J. (2010) TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis*, **48**, 56-62.

X

- Xiao, Q., Zhao, W., Beers, D.R., Yen, A.A., Xie, W., Henkel, J.S. & Appel, S.H. (2007) Mutant SOD1(G93A) microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *J Neurochem*, **102**, 2008-2019.
- Xu, Y.-F., Gendron, T.F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., D'Alton, S., Sheng, H., Casey, M.C., Tong, J., Knight, J., Yu, X., Rademakers, R., Boylan, K., Hutton, M., McGowan, E., Dickson, D.W., Lewis, J. & Petrucelli, L. (2010) Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial

aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **30**, 10851-10859.

Y

- Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E.A., Garcia, M.L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O.R., Cleveland, D.W. & Goldstein, L.S.B. (2008a) 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 of the United States of America*, **105**, 7594-7599.
- Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H. & Cleveland, D.W. (2008b) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*, **11**, 251-253.
- Yan, J., Deng, H.X., Siddique, N., Fecto, F., Chen, W., Yang, Y., Liu, E., Donkervoort, S., Zheng, J.G., Shi, Y., Ahmeti, K.B., Brooks, B., Engel, W.K. & Siddique, T. (2010) Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology*, **75**, 807-814.
- Yan, Q., Snider, W.D., Pinzone, J.J. & Johnson, E.M., Jr. (1988) Retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in motoneurons of developing rats: assessment of potential neurotrophic effects. *Neuron*, **1**, 335-343.
- Yang, S., Liu, T., Li, S., Zhang, X., Ding, Q., Que, H., Yan, X., Wei, K. & Liu, S. (2008) Comparative proteomic analysis of brains of naturally aging mice. *Neuroscience*, **154**, 1107-1120.
- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H.X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W.Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A.C., Cole, N., Gascon, G., Yagmour, A., Ben-Hamida, M., Pericak-Vance, M., Hentati, F. & Siddique, T. (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, **29**, 160-165.
- Yang, Y.S., Harel, N.Y. & Strittmatter, S.M. (2009) Reticulon-4A (Nogo-A) redistributes protein disulfide isomerase to protect mice from SOD1-dependent amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 13850-13859.
- Yi, M., Weaver, D. & Hajnoczky, G. (2004) Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *The Journal of cell biology*, **167**, 661-672.
- Yokoseki, A., Shiga, A., Tan, C.-F., Tagawa, A., Kaneko, H., Koyama, A., Eguchi, H., Tsujino, A., Ikeuchi, T., Kakita, A., Okamoto, K., Nishizawa, M., Takahashi, H. & Onodera, O. (2008) TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*, **63**, 538-542.
- Yoshida, H., Watanabe, A. & Ihara, Y. (1998) Collapsin response mediator protein-2 is associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 9761-9768.
- Yoshihara, T., Ishigaki, S., Yamamoto, M., Liang, Y., Niwa, J.-i., Takeuchi, H., Doyu, M. & Sobue, G. (2002) Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, **80**, 158-167.
- Yoshiyama, Y., Yamada, T., Asanuma, K. & Asahi, T. (1994) Apoptosis related antigen, Le(Y) and nick-end labeling are positive in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*, **88**, 207-211.

Z

- Zhang, C.Y., Hagen, T., Mootha, V.K., Sliker, L.J. & Lowell, B.B. (1999) Assessment of uncoupling activity of uncoupling protein 3 using a yeast heterologous expression system. *FEBS letters*, **449**, 129-134.

- Zhang, X., Chen, S., Li, L., Wang, Q. & Le, W. (2008) Folic acid protects motor neurons against the increased homocysteine, inflammation and apoptosis in SOD1 G93A transgenic mice. *Neuropharmacology*, **54**, 1112-1119.
- Zhong, Z., Deane, R., Ali, Z., Parisi, M., Shapovalov, Y., O'Banion, M.K., Stojanovic, K., Sagare, A., Boillee, S., Cleveland, D.W. & Zlokovic, B.V. (2008) ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci*, **11**, 420-422.
- Zhou, H., Huang, C., Chen, H., Wang, D., Landel, C.P., Xia, P.Y., Bowser, R., Liu, Y.-J. & Xia, X.G. (2010) Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS genetics*, **6**, e1000887.
- Zhuo, M.L., Huang, Y., Liu, D.P. & Liang, C.C. (2005) KATP channel: relation with cell metabolism and role in the cardiovascular system. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **37**, 751-764.
- Zou, J.Y. & Crews, F.T. (2005) TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain research*, **1034**, 11-24.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M. & Vance, J.M. (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*, **36**, 449-451.

