



HAL
open science

Analyse des effets de l'exercice physique dans un modèle murin de Sclérose Latérale Amyotrophique

Séverine Deforges

► **To cite this version:**

Séverine Deforges. Analyse des effets de l'exercice physique dans un modèle murin de Sclérose Latérale Amyotrophique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : 2011PA066075 . tel-00824771

HAL Id: tel-00824771

<https://theses.hal.science/tel-00824771>

Submitted on 22 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie – Paris 6
Ecole doctorale 158 : Cerveau – Comportement – Cognition
discipline : Neurobiologie
spécialité : Biologie cellulaire et Physiologie

Présentée par **Séverine DEFORGES** en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Analyse des effets de l'exercice physique dans un modèle murin de Sclérose Latérale Amyotrophique

dirigée par le Pr F.CHARBONNIER

Soutenue le 8 avril 2011
devant la commission d'examen composée de

Pr François Couraud
Dr Brigitte Pettman
Dr Jean-Philippe Loeffler
Pr Jean-François Toussaint
Pr Frédéric Charbonnier

président du jury, UMR7224 CNRS/Université Pierre et Marie Curie
rapporteur, UMR901 INSERM/Université d'AIX-MARSEILLE II
rapporteur, U692 INSERM, Université de Strasbourg
examineur, UMR970 INSERM/Université Paris Descartes
directeur de thèse, UMR8194 CNRS/Université Paris Descartes

Doctorate school « Cerveau – Comportement – Cognition »

Discipline : Neurosciences

Specialty : Cellular Biology et Physiology

Presented by **Séverine DEFORGES** for the title of
Doctor of Philosophy Degree – Pierre & Marie Curie University – Paris 6

Effects of physical exercise in a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

supervised by Pr F.CHARBONNIER

Oral examination the 8th april of 2011

Examination panel:

Pr François Couraud

Dr Brigitte Pettmann

Dr Jean-Philippe Loeffler

Pr Jean-François Toussaint

Pr Frédéric Charbonnier

chairman, Pierre and Marie Curie University

examiner, University of Marseille

examiner, University of Strasbourg

examiner, Paris Descartes University

PhD supervisor, Paris Descartes University



Centre d'étude de la sensori-motricité - UMR 8194 CNRS / Université Paris Descartes
Équipe Dégénérescence et plasticité neuromusculaire

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative adult-onset disease characterized by a selective loss of fast motoneurons (MN), muscle paralysis and lipidic hyper-metabolism. Physical exercise could be used as therapy in ALS. However, the use of different running-based training protocols in ALS mice led to contradictory results, suggesting that exercise effects might depend on exercise intensity.

In this scientific context, we have recently designed a new swimming-based training protocol associated with high frequency and amplitude limb movements. We analyzed the neuromuscular adaptations induced by a swimming or a running programs, in wild-type and SOD1^{G93A} ALS mice.

In our experimental conditions, swimming predominantly requests rapid motor units and activates larger-sized MN, contrary to treadmill running which predominantly requests slow motor units (medium-sized MN activation and fast-to-slow transitions in muscle fiber). In ALS mice, swimming unlike running results in a significant delay in the onset of symptoms and in a survival improvement by about 25 days. It limits the death of MN and the astrogliosis in the lumbar spinal cord, and maintains the skeletal muscle integrity. These effects are correlated with the swimming-induced adaptation of energetic metabolism leading to an increase in the glucose uptake and the maintenance of the lipid reserves in ALS mice.

All these data highlight a strong relationship between activation and protection of the fast motor units preferentially affected in ALS. The determination of neuroprotection mechanisms induced by swimming in ALS mice would allow new molecular therapeutic strategies for ALS patients.

Key words: ALS, swimming, survival, neuroprotection, metabolism.

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale du sujet adulte caractérisée par la perte sélective des motoneurons (MN) rapides, des paralysies musculaires et un hypermétabolisme lipidique. L'exercice physique pourrait être envisagé comme traitement thérapeutique de la SLA. Sur les souris SLA, des protocoles de course différents ont des effets contradictoires en fonction de leur intensité.

Dans ce contexte scientifique, nous avons comparé les adaptations neuromusculaires de souris sauvages et SLA SOD1^{G93A} soumises à un entraînement à la course sur tapis roulant et à la nage en piscine à courant que nous avons développée. Dans nos conditions expérimentales, la nage recrute préférentiellement les unités motrices rapides et active les MN de large surface, contrairement à la course qui recrute préférentiellement les unités motrices lentes (activation des MN de surface réduite et induction de transitions de fibres musculaires rapides vers lentes). Seule la nage retarde l'apparition des symptômes et allonge la durée de vie des souris SLA. Elle limite la mort des MN dans la moelle épinière lombaire et maintient l'intégrité des muscles squelettiques. Ces effets de la nage sont corrélés à l'adaptation du métabolisme énergétique menant à une augmentation de l'utilisation du glucose et à la préservation des réserves lipidiques.

Nos données mettent en évidence une relation entre l'activation et la protection des unités motrices rapides sensibles à la SLA. La détermination des mécanismes de neuroprotection induits par la nage dans les souris SLA nous permettrait de proposer de nouvelles voies thérapeutiques médicamenteuses aux patients atteints de SLA.

Mots clés : SLA, nage, survie, neuroprotection, métabolisme

A mon père,

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury. Je tiens à remercier monsieur **François Couraud** d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance de thèse, après avoir suivi l'évolution de mon travail en tant que directeur de l'école doctorale et lors de ma présentation de mi-thèse. Je remercie madame **Brigitte Pettmann**, spécialiste de la mort neuronale dans la SLA, et monsieur **Jean-Philippe Loeffler**, spécialiste de l'atteinte musculaire et du métabolisme dans la SLA, d'avoir accepté de juger ce travail et pour leur indulgence. Je remercie monsieur **Jean-François Toussaint**, directeur de l'Institut de recherche biomédical et d'épidémiologie du sport (IRMES) d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'expert. J'espère vivement, qu'un jour, ce travail aura une répercussion appliquée.

Je remercie également infiniment les correcteurs officiels de ce travail, **Anne-Marie Roussel** et **Sylvie Lécolle** pour leur application et leur disponibilité, ainsi que **René Gonet père & fils** pour les dernières retouches.

Au sein du CEsEM, je souhaite témoigner toute ma gratitude envers le directeur du laboratoire, monsieur **Pierre-Paul Vidal**, pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse en parallèle de mon emploi d'Ingénieur d'étude CNRS.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que je souhaite remercier mon directeur de recherche, **Frédéric Charbonnier**, d'avoir cru en mes capacités et de me faire confiance dans la conduite du projet SLA au sein de son équipe et dans le cadre de collaborations extérieures. Ces années de thèse m'ont permis d'accéder à une autre dimension de la Recherche. Avec son emploi du temps de ministre, ses précieux conseils se sont parfois fait désirer, mais ils sont si judicieux qu'ils sont toujours les bienvenus. Aussi, je voudrais le remercier pour la formation à l'enseignement et au management auquel il m'a permis d'accéder, par le biais des travaux dirigés & pratiques et l'encadrement de nombreux stagiaires que j'ai effectué avec plaisir. Allez, tes cauchemars ne vont pas encore tout à fait finir : VEGF !!! ou autres ...

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui m'ont permise d'évoluer dans le laboratoire, ainsi que pour leurs encouragements durant ces années : **Anne-Sophie Armand**, pour ses précisions techniques ou théoriques ; **Olivier Biondi**, pour les protocoles d'entraînements et surtout pour ne pas avoir choisi la couleur de la peinture des pièces communes ; **Julien Branchu** (ho !!! Julien), pour ses *WIB!*, pour tous les entraînements (nage, boudin !) et les quelques dissections que je lui refile, mais surtout pour son talent de photographe de souris éventrées et tous les « épisodes » qui m'ont permis de tenir le coup durant la fin de ma thèse ; **Christophe Chanoine**, pour avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions avec enthousiasme et diligence, ainsi que pour sa « cérémonie du thé » même si goûts « fumier » ou « algues » ne sont pas dans mes préférences ... ; **Joël Coppet**, pour sa bonne humeur, son sourire et son café du matin sans quoi rien n'est possible ; **Nissrine Daou**, pour sa discrétion - un peu de calme dans ce monde turbulent - ; **Bruno Della Gaspera**, le roi de l'hybridation in situ, qui m'a tout appris sur cette technique (sauf les mauvaises pratiques de laboratoire...) et me permet de pipeter dans ses précieuses solutions (parfois à l'insu de son plein gré hi !hi !hi !

je connais les planques !), merci de me supporter à tout moment (même dans les pires) autour d'un café mais surtout de me mettre des chansons pourries dans la tête et de m'avoir raconté la fin du « pisode » que je n'avais pas encore vu (je te rappelle également que je ne suis pas...ta mère !!) ; **Camille Lancellin**, qui reprend une partie du flambeau SLA dans le cadre de son M2 (Maintenant que j'ai terminé ma thèse, je vais pouvoir être sur ton dos tous les jours...je serai toujours là, ça va être horrible !!), ainsi que pour tous les entraînements (encore !) et les voyages à l'animalerie qu'elle assure à ma place, sans qui ces dernières semaines auraient été impossible à gérer (desolée de t'avoir transféré mon stress ces derniers mois. merci d'avoir un cerveau à ma place et de repasser derrière moi ! ça fait du bien de pouvoir compter sur quelqu'un et de pouvoir déverser son trop plein de toxicité...ça soulage !) ; **Sylvie Lécolle**, pour ses précieux conseils techniques, nos pauses parlottes, son piano, son plan Beaufort et aussi pour son soutien dans les moments difficiles (merci beaucoup de m'avoir parlé la première année de mon arrivée !) ; **Philippe Lopes**, pour son émerveillement inaltérable et son soutien indispensable en anglais (thank you very much !) ; **Claude Pariset**, pour ses couleurs et pour ne pas avoir réussi à m'achever à l'acide acétique ; **Céline Oury**, pour son expertise au cryotome, sans qui l'analyse de mes « bouts de gras » n'aurait pas été possible et pour les moments de détente (merci beaucoup pour cette aide technique et ton soutien).

Merci également à tous les autres membres du laboratoires avec une mention particulière pour **Manouelle Nordey**, notre gestionnaire préférée et son petit facteur-bricoleur, **José Williams** (merci pour les boîtes de transport des souris !) ; **Daniel Eugène**, mon référent électrophysiologie toujours disponible ; toute l'équipe de **Claire Legay** notamment **Laure** et **Séverine** ; l'équipe de **Charbel Massade**, particulièrement **Sophie Bernard** (il nous reste des choses à faire ensemble...), **Lyndell**, **Boudin**, **Tocard**, **DgéDgé** et **le conte de Paris**...pour leur remu-ménage permanent ; les anciens que je n'oublie pas, surtout **Imam Laziz**, pour les rigolades lors des « ballades extérieures » et cet été sympathique passé au labo à pourrir BruBru ; sans oublier les stagiaires que j'ai encadrés et qui ont participé de près ou de loin à ce travail : **Martha**, **Stéphanie**, **Quentin**, **Igor**, **Hervé**, **Alexandre**, **Aurélie C.**, **Gaëlle**, **Lucie**, **Mickaël**, **Stéphy**, **Farah** et **Aurélie J.**

Je ne serais jamais parvenue à cette étape majeure de mon cheminement personnel et professionnel, sans le soutien de ma famille, mes parents et ma sœur **Isabelle**. Merci de m'avoir élevée avec l'idée que « tout est possible ! Ce n'est pas forcément facile, mais il faut commencer par s'en donner les moyens. ». Je tiens à remercier de tout cœur **Marie-Noëlle**, ma mère Noël, d'être toujours présente dans les meilleurs moments comme dans les pires. Je sais que je peux compter sur toi et rien n'est plus rassurant.

Enfin, rien n'aurait été possible sans le soutien essentiel et l'amour quotidien de mon « mari » **René**. Quand on a trouvé une équipe qui gagne, on n'en change pas. Merci, d'avoir enduré tous mes coups de blues, mes moments maniaco-dépressifs, mes hystéries fulgurantes. Merci de toujours trouver les mots qu'il faut (même les plus durs !), de me faire rire et de me faire d'aussi bons petits plats ! Promis, maintenant, je vais essayer de me calmer...

A tous, Merci !

TABLES DES MATIERES

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1

| | |
|---|-----------|
| 1- La sclérose latérale amyotrophique : une maladie hétérogène | 2 |
| 1-1. Les données cliniques | 2 |
| 1-1.1. Les symptômes | 2 |
| 1-1.1.1. Les principaux signes cliniques | 3 |
| 1-1.1.2. Les formes cliniques | 3 |
| 1-1.1.2.1. Les formes spinales | 4 |
| 1-1.1.2.2. Les formes bulbaires | 4 |
| 1-1.2. Le diagnostic | 4 |
| 1-1.3. Les traitements | 5 |
| 1-2. Les données épidémiologiques | 6 |
| 1-3. Les données étiologiques | 6 |
| 1-3.1. Les SLA sporadiques | 7 |
| 1-3.2. Les SLA familiales | 8 |
| 1-3.2.1. Le gène ALS1 : SOD1 | 9 |
| 1-3.2.2. Le gène ALS2 : Alsine | 10 |
| 1-4. Les modèles animaux | 10 |
| 2- La physiopathologie de la SLA : une maladie aux mécanismes multiples | 12 |
| 2-1. Effets de la mutation de la protéine SOD1 | 12 |
| 2-1.1. Fonctions et localisations aberrantes de la SOD1 mutée | 13 |
| 2-1.2. Formation d'agrégats toxiques de SOD1 mutées | 14 |
| 2-2. Blocage des fonctions cellulaires essentielles | 15 |
| 2-2.1. Perturbation de l'édition des ARNm matures | 15 |
| 2-2.2. Perturbation du « contrôle qualité » des protéines | 16 |
| 2-3. Désorganisation cellulaire des motoneurones | 16 |
| 2-3.1. Stress du réticulum endoplasmique | 16 |
| 2-3.2. Dysfonctionnements mitochondriaux | 17 |
| 2-3.3. Anomalies des fonctions de l'axone | 19 |
| 2-4. Phénomène d'excitotoxicité glutamatergique | 20 |
| 2-5. Activation des mécanismes d'apoptose | 21 |
| 2-5.1. Implication des ROS | 22 |
| 2-5.2. Implication des récepteurs de mort | 24 |
| 3- Les origines cellulaires de la SLA : une maladie qui ne touche pas que les motoneurones | 25 |
| 3-1. L'origine centrale de la SLA | 26 |
| 3-1.1. Le rôle des motoneurones | 26 |
| 3-1.1.1. Caractéristique des populations de motoneurones spinaux | 26 |
| 3-1.1.2. Vulnérabilité sélective des motoneurones à la SLA | 28 |
| 3-1.1.2.1. Sensibilité à l'excitotoxicité glutamatergique | 29 |
| 3-1.1.2.2. Sensibilité sélective au stress oxydant | 30 |
| 3-1.1.2.3. Sensibilité à l'apoptose | 31 |
| 3-1.2. Le rôle des astrocytes | 32 |
| 3-1.2.1. Implication dans l'excitotoxicité glutamatergique | 32 |
| 3-1.2.2. Modification du métabolisme neuronal | 33 |
| 3-1.2.3. Dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique | 33 |
| 3-1.2.4. Modification de leurs sécrétions | 34 |
| 3-1.3. Le rôle des cellules microgliales | 35 |
| 3-1.4. Le rôle des cellules myélinisantes | 36 |
| 3-1.5. Le rôle des pro-géniteurs neuraux | 37 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3-2. | Les origines périphériques de la SLA | 38 |
| 3-2.1. | L'atteinte musculaire primaire | 38 |
| 3-2.1.1. | Sensibilité de certaines fibres musculaires | 39 |
| 3-2.1.2. | Altération musculaire et dénervation | 40 |
| 3-2.1.2.1. | Dysfonctionnement des mitochondries musculaires | 40 |
| 3-2.1.2.2. | Modulation du profil sécrétoire des muscles | 41 |
| 3-2.2. | La SLA : une maladie métabolique ? | 43 |
| 3-2.2.1. | Les dysfonctionnements métaboliques dans la SLA | 43 |
| 3-2.2.2. | Rôle du muscle dans les altérations métaboliques | 46 |
| 4- | SLA et exercice physique | 48 |
| 4-1. | Les modifications induites par l'exercice physique | 50 |
| 4-1.1. | Plasticité du muscle squelettique à l'exercice | 51 |
| 4-1.1.1. | Modulation de la typologie musculaire | 51 |
| 4-1.1.2. | Adaptation au stress de l'activité contractile | 52 |
| 4-1.1.3. | Modulation de la structure du muscle squelettique | 53 |
| 4-1.2. | Adaptation du métabolisme énergétique | 54 |
| 4-1.2.1. | Modulation des taux de leptine | 54 |
| 4-1.2.2. | Modulation de l'activité de l'AMPK | 55 |
| 4-1.3. | Adaptation au stress oxydant | 57 |
| 4-2. | Les mécanismes activés par l'exercice physique et potentiellement neuroprotecteurs dans la SLA | 58 |
| 4-2.1. | Les bénéfices de l'exercice physique sur le système neuromusculaire | 58 |
| 4-2.1.1. | Les effets bénéfiques sur les dysfonctionnements liés à l'âge ou suite à un traumatisme | 59 |
| 4-2.1.2. | Les effets bénéfiques sur les maladies neurodégénératives | 59 |
| 4-2.2. | Adaptation du système nerveux central | 60 |
| 4-2.2.1. | Renforcement du système vasculaire et immunitaire | 60 |
| 4-2.2.2. | Protection des motoneurones | 61 |
| 4-2.3. | Activation de la voie IGF-1 par l'exercice physique | 62 |
| 4-2.3.1. | Caractéristiques moléculaires de la voie IGF-1 | 62 |
| 4-2.3.2. | Le rôle de l'IGF-1 | 63 |
| 4-2.3.3. | Les perturbations de la voie IGF-1 dans la SLA | 64 |
| 4-2.3.4. | Les effets de l'activation de la voie IGF-1 dans la SLA | 65 |
| 4-3. | Controverse des effets de l'exercice physique sur la SLA | 67 |
| 4-3.1. | Les effets de l'exercice physique sur les patients SLA | 67 |
| 4-3.2. | Les effets de l'exercice physique chez les souris SLA | 68 |
| | PROBLEMATIQUE | 71 |
| | RESULTATS | 74 |
| | Résultats (1) : Article 1 | 75 |
| | 1. Introduction de l'article 1 | 76 |
| | 2. Conclusions de l'article 1 | 77 |
| | Résultats (2) : Article 2 | 79 |
| | 1. Introduction de l'article 2 | 80 |
| | 2. Conclusions de l'article 2 | 82 |
| | Résultats (3) | 84 |
| | 1- Introduction | 85 |
| | 2- Matériels et méthodes | 86 |
| | 2-1. Modèle murin et entraînements | 86 |
| | 2-2. Analyses métaboliques | 86 |
| | 2-2.1. Evaluation du métabolisme glucidique | 87 |

| | | |
|--|--|------------|
| 2-2.2. | Evaluation du métabolisme lipidique | 87 |
| 2-2.2.1. | Analyse histologique du TA | 87 |
| 2-2.2.2. | Analyse histologique du foie | 88 |
| 2-3. | Analyses statistiques | 88 |
| 3- | Résultats | 89 |
| 3-1. | Evolution de la masse corporelle | 89 |
| 3-2. | Analyse de l'utilisation du glucose | 89 |
| 3-3. | Analyse des réserves lipidiques à P115 | 90 |
| 3-3.1. | Analyse du tissu adipeux blanc de l'épididyme | 90 |
| 3-3.2. | Analyse du foie | 91 |
| 4- | Conclusions | 92 |
| <i>DISCUSSION</i> | | 94 |
| 1- | Les effets bénéfiques de l'exercice physique dans un modèle murin de SLA | 95 |
| 2- | Modifications potentielles des propriétés intrinsèques des motoneurones sélectivement activés par la nage | 97 |
| 2-1. | Modulation des propriétés électro-physiologiques | 98 |
| 2-2. | Renforcement de la JNM | 99 |
| 2-3. | Diminution des mécanismes d'apoptose | 100 |
| 2-4. | Protection de l'environnement cellulaire par la modulation des communications cellulaires | 102 |
| 2-4.1. | Préservation des oligodendrocytes | 102 |
| 2-4.2. | Protection contre l'astroglie réactionnelle | 103 |
| 2-4.3. | Réduction de l'accumulation des progéniteurs neuraux | 105 |
| 3- | Rôle du muscle dans les mécanismes potentiellement neuroprotecteurs induits par la nage | 106 |
| 3-1. | Modifications intrinsèques des fibres musculaires sollicitées de manière privilégiée par la nage | 107 |
| 3-1.1. | Effets des exercices sur l'atrophie musculaire | 107 |
| 3-1.2. | Effets des exercices sur l'aplasie musculaire | 108 |
| 3-1.2.1. | Modulation du profil sécrétoire des muscles | 109 |
| 3-1.2.2. | Augmentation de la résistance des fibres musculaires au stress oxydant | 111 |
| 3-2. | Amélioration du statut métabolique des souris SLA par l'entraînement à la nage | 113 |
| <i>CONCLUSIONS-PERSPECTIVES</i> | | 116 |
| <i>BIBLIOGRAPHIE</i> | | 123 |
| <i>ABREVIATIONS</i> | | 147 |
| <i>ANNEXE</i> | | 150 |

Table des illustrations

FIGURES

| | |
|---|-----|
| <u>Figure 1</u> : Les symptômes cliniques de la SLA | 2 |
| <u>Figure 2</u> : Mutations de la protéine SOD1 identifiées chez les patients atteints de SLA | 9 |
| <u>Figure 3</u> : Production des espèces réactives de l'oxygène et fonction de la protéine SOD1 | 10 |
| <u>Figure 4</u> : Caractérisation du modèle SLA murin SOD1 ^{G93A high copy} | 11 |
| <u>Figure 5</u> : Principaux mécanismes physiopathologiques de la SLA | 12 |
| <u>Figure 6</u> : Principales fonctions toxiques de la SOD1 mutée | 13 |
| <u>Figure 7</u> : Principaux mécanismes d'apoptose induit dans les motoneurones des souris SLA | 22 |
| <u>Figure 8</u> : Modifications des populations cellulaires de la moelle épinière mises en évidence chez les souris SLA SOD1 ^{G93A} à P115 | 26 |
| <u>Figure 9</u> : Détails des unités motrices | 27 |
| <u>Figure 10</u> : Modèle du couplage métabolique à l'activité synaptique | 33 |
| <u>Figure 11</u> : Constitution cellulaire de la barrière hémato-encéphalique | 34 |
| <u>Figure 12</u> : Décours de la pathogénèse dans les souris SLA SOD1 ^{G93A} | 38 |
| <u>Figure 13</u> : Modifications de l'unité motrice induites par l'exercice physique | 50 |
| <u>Figure 14</u> : Représentation schématique des principales voies de production d'énergie dans le muscle | 54 |
| <u>Figure 15</u> : Modèles théoriques d'activation de l'AMPK | 55 |
| <u>Figure 16</u> : Réponse moléculaire à l'activation de l'AMPK au niveau des muscles squelettiques | 56 |
| <u>Figure 17</u> : Les effets bénéfiques de l'exercice physique | 58 |
| <u>Figure 18</u> : Action de l'IGF-1 sur l'unité motrice | 64 |
| <u>Figure 19</u> : Effet des entraînements sur la masse corporelle des souris SLA et Contrôles | 90 |
| <u>Figure 20</u> : Effet des entraînements sur l'utilisation du glucose par les souris SLA et Contrôles | 91 |
| <u>Figure 21</u> : Effet des entraînements sur les tissus adipeux au niveau de l'épididyme des souris SLA et Contrôles | 92 |
| <u>Figure 22</u> : Effet des entraînements sur le foie des souris SLA et Contrôles | 93 |
| <u>Figure 23</u> : Représentation schématique de la technique d'imagerie MALDI | 119 |

TABLEAUX

| | |
|--|----|
| <u>Tableau 1</u> : Modifications métaboliques observées chez les patients et les modèles souris SLA | 8 |
| <u>Tableau 2</u> : Modifications métaboliques observées chez les patients et les modèles souris SLA | 44 |
| <u>Tableau 3</u> : Effets de l'intensité de l'exercice sur les marqueurs sanguins et les principales voies du métabolisme énergétique musculaire | 57 |
| <u>Tableau 4</u> : Etudes cliniques des effets de l'exercice physique chez les patients SLA | 67 |
| <u>Tableau 5</u> : Etudes des effets de l'exercice physique dans les modèles souris SLA | 68 |

ANNEXE

Premiers résultats obtenus par la technique d'imagerie MALDI (Poster présenté au congré annuel 2010 de la société française de spectrométrie de masse) 151

INTRODUCTION

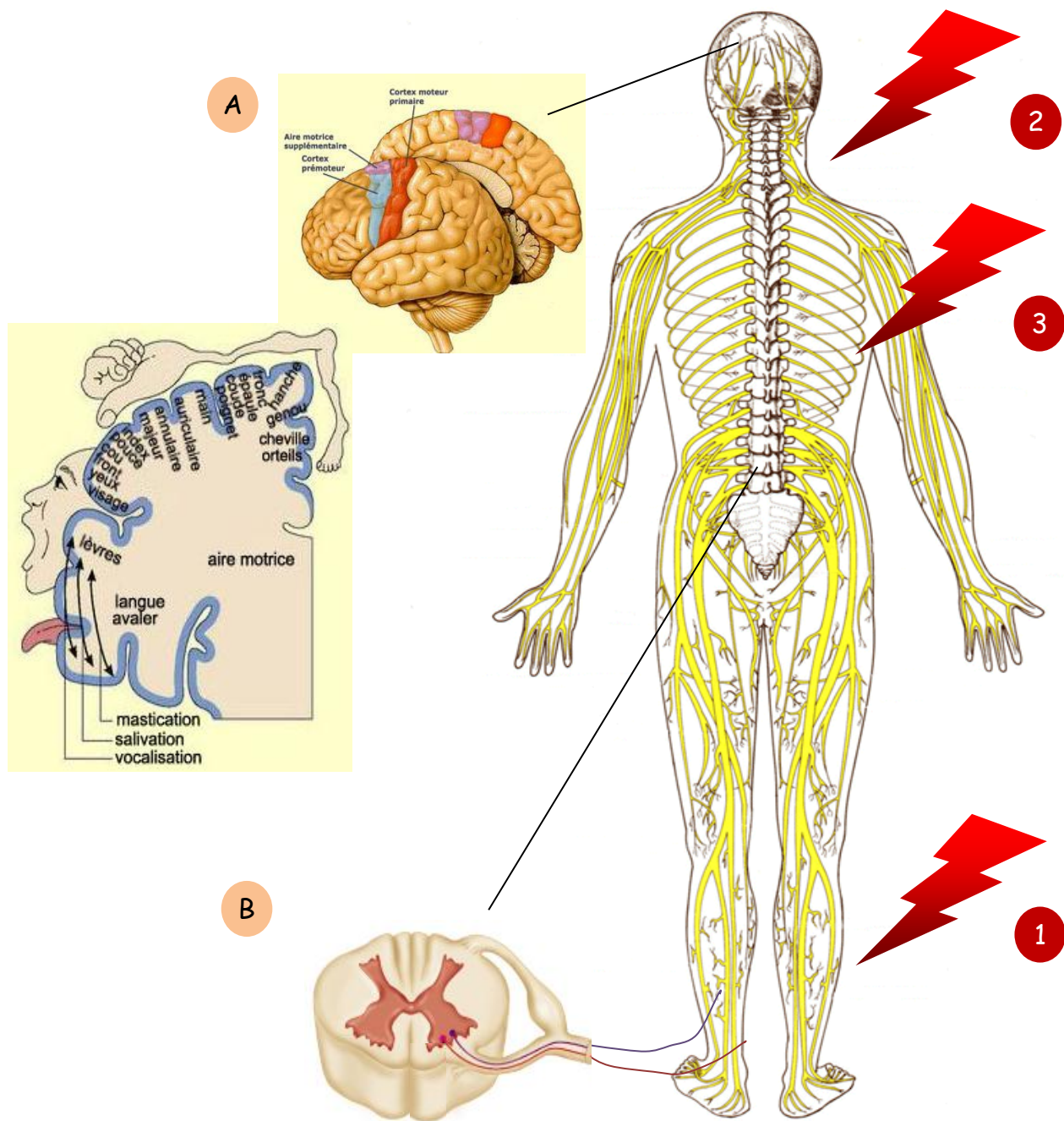


Figure 1 : Les symptômes cliniques de la SLA

La SLA se caractérise par la perte progressive et sélective des motoneurones du cortex moteur (A) et de la moelle épinière (B), associée à la perte progressive des capacités motrices. Les symptômes dépendent de la localisation des neurones atteints de manière préférentielle. Dans les formes spinales majoritaire, des paralysies des muscles volontaires sont constatées au niveau des membres inférieurs (1). Un syndrome pseudo-bulbaire se développe (2). Au final, de fortes dépressions respiratoires dues à l'atteinte des muscles respiratoires entraînent la mort des patients (3).

1- La sclérose latérale amyotrophique : une maladie hétérogène

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative progressive et fatale, d'étiologie inconnue. Elle a été décrite en 1869, par le neurobiologiste français Jean-Martin Charcot (Charcot et Joffroy, 1869). Pour cela, la SLA fut longtemps appelée Maladie de Charcot. Aux États-Unis, la SLA est connue sous le nom de Maladie de Lou Gehrig, en hommage au célèbre joueur de base-ball décédé des suites de cette maladie en 1941.

D'après l'autopsie pratiquée sur leurs patients atteints de SLA, Charcot et Joffroy (1869) décrivent une *sclérose* de la moelle épinière due à la dégénérescence des motoneurones qui donne un aspect cicatriciel et fibreux au tissu. Ils notent également un rétrécissement de la partie *latérale* de la moelle épinière, qui témoigne de l'atteinte du faisceau pyramidal composé des axones des neurones moteurs centraux dirigés vers les motoneurones. Cette dégénérescence des motoneurones est accompagnée d'une fonte de la masse musculaire, appelée *amyotrophie*.

1-1. Les données cliniques

La SLA se caractérise par la perte sélective des neurones du tronc cérébral et du cortex cérébral moteur, ainsi que des motoneurones de la moelle épinière (Rowland et Shneider, 2001). Elle est associée à des paralysies des muscles volontaires impliqués dans la locomotion et la parole (Figure 1).

1-1.1. Les symptômes

Les manifestations de la SLA sont variables et dépendent de la dégénérescence préférentielle des neurones moteurs corticaux lors d'atteinte centrale ou des motoneurones spinaux de la moelle épinière et du bulbe rachidien lors d'atteinte périphérique (Brooks et al., 1994 et 2000 ; Ravits et al., 2007a et b). Les premiers symptômes de la SLA apparaissent vers l'âge de 55 ans en moyenne, avec une amplitude de 20 à 80 ans (Hirtz et al., 2007).

1-1.1.1. Les principaux signes cliniques

Les principaux signes pathologiques s'observent au niveau des muscles des membres (De Paul et Abbs, 1987 ; Brooks et al., 1994 et 2000). Ils se traduisent par des asthénies sévères, des crampes, des réflexes ostéo-tendineux vifs (spasticité), une hypertonie globale et une atrophie progressive associée à des secousses musculaires arythmiques et asynchrones limitées à un faisceau de fibre musculaire (fasciculations). L'amaigrissement des malades est net et important ; des problèmes de constipation sans troubles sphinctériens apparaissent.

Un syndrome pseudo-bulbaire se développe : l'atteinte bilatérale des voies pyramidales reliant les neurones du cortex moteur à ceux du bulbe rachidien se traduit par des troubles de la mastication, de la phonation, de la déglutition (salivation abondante) et une exagération des expressions motrices de l'émotion (pleurs et rires involontaires). Le défaut de toux et les troubles de déglutition liés au syndrome pseudo-bulbaire aggravent les dépressions respiratoires dues à l'atteinte de la musculature respiratoire. L'atteinte fréquente de la voie neurovégétative du système nerveux autonome produit des impressions de picotements sur la peau au niveau des extrémités, sans troubles sensitifs objectifs. Les fonctions sensitives et intellectuelles sont préservées, même dans les stades avancés de la maladie. Les patients gardent, tout au long de l'évolution de la maladie, une lucidité et une conscience indemnes. La démence n'est pas considérée comme un signe de la SLA, dans sa forme classique.

La vitesse de progression de l'affection peut varier considérablement selon les patients. En général, l'aggravation progressive est fatale dans les deux à cinq ans qui suivent l'apparition des premiers symptômes (Mulder et al., 1986). Dans la majorité des cas, la mort des patients SLA survient par asphyxie suite à la paralysie de la musculature respiratoire.

1-1.1.2. Les formes cliniques

Deux formes cliniques majoritaires de la SLA ont été mises en évidence (Li et al., 1990 ; Brooks et al., 1994 et 2000 ; Ravits et al., 2007a et b) : les formes spinales et les formes bulbaires. A un stade avancé de la maladie, ces deux formes de SLA classiques se ressemblent. Il existe deux autres formes cliniques de SLA beaucoup plus rares. L'une correspond au développement de signes cliniques dus à l'atteinte des neurones corticaux ; cette maladie est appelée « sclérose latérale primaire ». L'autre correspond au développement d'une démence fronto-temporale, caractérisée par une atrophie des lobes frontaux et pariétaux du cortex, associée aux symptômes moteurs de la SLA.

1-1.1.2.1. Les formes spinales

Environ deux tiers des patients atteints de la SLA classique développent la forme spinale de la maladie (Brooks et al., 1994 et 2000). Ces formes spinales correspondent au phénotype typique de la SLA tel que l'avait décrit Charcot et Joffroy (1869). Elles se caractérisent par l'atteinte des motoneurons de la moelle épinière. Les symptômes apparaissent au niveau des membres inférieurs ou des membres supérieurs, dans les formes à début brachial. Une faiblesse asymétrique associée à des crampes lors de mouvements volontaires est ressentie à l'extrémité d'un membre (Norris et al., 1993).

1-1.1.2.2. Les formes bulbaires

Ces formes représentent un tiers des cas de SLA et touchent préférentiellement les femmes (Li et al., 1990). Les motoneurons situés dans le tronc cérébral sont principalement atteints. Les symptômes apparaissent au niveau de la face ; une paralysie progressive des muscles de la langue, des lèvres et du pharynx se développe. L'atteinte des membres survient dans un second temps. Ces formes se déclarent plus tardivement que les formes spinales, après 65 ans en moyenne, mais leur évolution est plus rapide ; l'espérance de vie des patients est inférieure à 3 ans (Turner et al., 2010a).

1-1.2. Le diagnostic

Aucun biomarqueur sûr et spécifique de la SLA n'a pu être identifié, que ce soit un biomarqueur moléculaire circulant dans le sang ou le liquide cérébro-spinal ou un biomarqueur physique mis en évidence par les techniques neurophysiologiques ou d'imagerie (pour revue : Turner et al., 2009a). Il n'existe donc pas de test de diagnostic de la SLA.

En l'absence de biomarqueur, la fédération mondiale de neurologie a établi des critères cliniques et para-cliniques (*Critères diagnostiques d'El Escorial* ; Brooks et al., 1994), malgré les phénotypes hétérogènes de la SLA. Le diagnostic de la SLA est un diagnostic clinique différentiel, basé essentiellement sur l'observation des signes cliniques. Selon la « *World Federation and Neurology Committee on Neuromuscular diseases* » (Brooks et al., 1994 et 2000), trois critères doivent être présents pour établir un diagnostic certain de SLA :

- des signes cliniques d'atteinte des neurones moteurs centraux et périphériques doivent être constatés,

- sans observation de signes objectifs de déficit sensitif (sans troubles sphinctériens, sans anomalies des mouvements oculaires et sans troubles végétatifs), et sans déficit cognitif significatif.

L'aggravation de ces signes cliniques doit être progressive et marquée par l'extension de paralysies aux régions innervées par les motoneurones spinaux et bulbaires. Ces critères permettent de poser un diagnostic, avec des degrés variables de certitude. L'évolution des symptômes est déterminée selon l'échelle de NORRIS (Hillel et al., 1989). Le diagnostic clinique est renforcé par un examen électromyographique, qui met en évidence l'atteinte neuronale (de Carvalho et al., 2008). Cette technique permet également de mesurer le nombre d'unités motrices (MUNE, *Motor unit number estimation*) (Major et al., 2007). En évaluant le nombre approximatif d'axones qui innervent un muscle ou un groupe de muscles, la MUNE permet de suivre leur perte progressive et l'avancée de la maladie.

À l'usage, la méthode de diagnostic clinique de la SLA s'avère peu sensible en début de la maladie. Pour la plupart des patients, le diagnostic certain de SLA est établi plus d'un an après l'apparition des premiers symptômes (Zoccollella et al., 2006). Les traitements proposés aux patients ne peuvent donc être que symptomatiques.

1-1.3. Les traitements

La SLA a été décrite comme l'une des maladies les plus invalidantes (Ludolph, 2006). Pourtant, il n'existe actuellement ni de prophylaxie ni de traitement curatif efficace de la SLA. Le seul médicament autorisé et prescrit en cas de SLA est le riluzole, un antagoniste du glutamate, commercialisé sous le nom de Rilutek® (Cleveland et Rothstein, 2001). Malheureusement, son effet est modéré (Lacomblez et al., 1996). D'après une étude rétrospective menée sur les patients SLA traités au riluzole de 1966 à 2006, la durée de vie des patients n'est prolongée que de 2 à 3 mois (Miller et al., 2003). Le mécanisme d'action de cette molécule sera détaillé dans la deuxième partie.

Les traitements bénéfiques de la SLA sont essentiellement symptomatiques et palliatifs. L'assistance respiratoire reste le traitement le plus efficace. Il soulage et prolonge la vie des patients. Elle est assurée soit par trachéotomie, soit par utilisation non invasive d'appareil de ventilation mécanique à long terme, qui nécessite une immobilité totale et limite la communication du patient avec l'extérieur. La kinésithérapie à l'aide d'appareillage spécifique et

les traitements médicamenteux des crampes et de la spasticité permettent de ralentir la progression du déficit moteur (Patel et Hamadeh, 2009). L'orthophonie permet de limiter les troubles moteurs qui affectent la parole et la déglutition (troubles dysarthriques). Un régime métabolique adapté, riche en lipides, a également un effet bénéfique sur la survie des patients (pour revue : Vaisman et al., 2009), car il existe une corrélation directe entre la survie des patients et un ratio plasmatique élevé de lipoprotéines de hautes (*high density lipoprotein*, HDL) et de faibles densités (*light density lipoprotein*, LDL) (Dupuis et al., 2008).

1-2. Les données épidémiologiques

La SLA est la plus fréquente des maladies du motoneurone de l'adulte et la troisième maladie neurodégénérative, après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Les estimations mondiales révèlent une incidence annuelle de 1 à 3 nouveaux cas pour 100.000 habitants et une prévalence de 3 à 8 cas pour 100.000 habitants (Hirtz et al., 2007) ; il existe une légère prédominance masculine, environ trois hommes pour deux femmes. Cette prévalence relativement faible est due à la mortalité élevée et rapide des patients ; les études épidémiologiques récentes révèlent une nette augmentation de l'incidence de la SLA dans différents pays, sans que cela puisse être attribué à l'augmentation de l'espérance de vie des populations ou au diagnostic plus fiable (Kato et al., 2006). Bien qu'il n'existe pas de chiffres officiels en France, quelques 8500 cas de SLA sont recensés et 1000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année (www.ars-asso.com).

1-3. Les données étiologiques

La majorité des cas de SLA sont d'étiologie inconnue ; ils sont classés comme formes sporadiques (SLAs). Les autres cas de SLA sont d'origine génétique avérée et ont un lien de filiation ; ils sont classés comme formes familiales (SLAf). Ces deux formes ont une évolution clinique similaire vers une atteinte généralisée et fatale, ce qui suggère une pathogenèse commune. Cependant, les formes familiales se déclarent plus précocement que les formes sporadiques, en moyenne 46 ans pour les SLAf contre 56 ans pour les SLAs, et leur évolution est généralement plus rapide (Camu et al., 1999).

1-3.1. Les SLA sporadiques

Les SLAs concernent 90 % des personnes atteintes par la maladie. Certaines régions du globe présentent une incidence accrue de la SLA, ce qui suggère la susceptibilité spécifique de certaines populations. Il existe trois foyers de haute incidence en Asie et en Océanie : l'incidence de la SLA est de 10 à 500 fois supérieure à celle du monde occidental, dans l'île de Guam (Arnold et al., 1953), en Nouvelle-Guinée et au Japon (Figlewicz et al., 1994). Certaines catégories socioprofessionnelles occidentales présentent également une très forte incidence de la SLA (pour revue : Harwood et al., 2009 ; Johnson et Atchison, 2009). L'hypothèse d'une exposition environnementale responsable du déclenchement de cette pathologie a été émise.

D'après les données épidémiologiques, les facteurs exogènes de risque de la SLAs les plus fréquemment incriminés sont :

- l'intoxication alimentaire : la SLAs pourrait être déclenchée par l'ingestion répétée d'aliments contaminés par la β -N-méthylamino-L-alanine, un acide aminé agoniste du glutamate, produit par la plupart des cyanobactéries. Ce facteur expliquerait les foyers géographiques de SLAs (Spencer, 1987).
- certaines infections virales : une réponse immune aux entérovirus (poliovirus ; Bartfeld et al., 1989) ou aux rétrovirus (virus de l'immunodéficience humaine ; Westarp et al., 1995) a été détectée chez des patients atteints de SLAs. Des ARN (*acide ribonucléique*) d'entérovirus ont également été localisés dans la moelle épinière de patients atteints de SLAs (Berger et al., 2000). Cependant, l'implication d'infection virale dans le développement de la SLAs n'a jusqu'à présent jamais été confirmée.
- l'exposition aux polluants environnementaux (pour revue : Johnson et Atchison, 2009) : les expositions répétées aux métaux lourds et aux pesticides pourraient expliquer la forte incidence de la SLAs observée parmi les agriculteurs et les militaires.

et les traumatismes liés à l'activité physique intense : cette hypothèse très ancienne (Felmus et al., 1976) et très controversée sera détaillée ultérieurement dans le chapitre 4.

Les études de cas de SLAs ont également mis en évidence des facteurs génétiques (pour revue : Corcia et al., 2008). Les gènes de susceptibilité les plus fréquemment mutés dans le développement des SLAs ont un rôle dans :

| dénomination | locus | gène et produit |
|--|----------|--|
| Transmissions dominantes | | |
| Apparition des symptômes à l'âge adulte | | |
| ALS 1 | 21q22 | SOD1 : super oxide dismutase de type 1 |
| ALS 6 | 16p11 | FUS : fused in sarcoma/translated in liposarcoma |
| ALS 7 | 20p | Inconnu |
| ALS 8 | 20q13 | VAPB : vesicular-associated membrane protein/synaptobrevin-associated membrane protein B |
| ALS 9 | 14q11 | ANG : Angiogenin |
| ALS 11 | 6q21 | FIG4 : SAC domain containing inositol phosphatase 3 |
| ALS 12 | 10p15 | OPTN : optineurin |
| ALS-FTD 1 | 9q21-q22 | Inconnu (forme associée à une démence fronto-temporale) |
| ALS-FTD 2 | 9p21 | Inconnu (forme associée à une démence fronto-temporale) |
| TDP-43 | 1p36 | (TAR) DNA-binding protein |
| DCTN1 | 2p13 | Dynactin (forme bulbaire) |
| DAO | 12q24 | D-amino-acid oxidase |
| SLA juvéniles | | |
| ALS 4 | 9q34 | SETX : Senataxin (helicase) |
| Transmissions récessives | | |
| Apparition des symptômes à l'âge adulte | | |
| ALS 12 | 10p15 | OPTN : optineurin |
| SLA juvéniles | | |
| ALS 2 | 2q33 | Alsin |
| ALS 5 | 15q21 | Spatacsin |
| Transmissions liées à l'X | | |
| ALS X | Xp11-q12 | Inconnu (Apparition des symptômes à l'âge adulte) |

Tableau 1 : Gènes mutés mis en évidence dans les cas de SLA familiale

(source : ALS ONLINE GENETICS DATABASE, www.alsod.iop.kcl.ac.uk)

- l'angiogénèse tels ANG (*angiogénine*) (Wu et al., 2007) ou VEGF (*vascular endothelium growth factor*) (Lambrechts et al., 2003),
- le cytosquelette des motoneurons tels NF-H codant la chaîne lourde des neurofilaments ou périphérine (Simpson et Al-Chalabi, 2006),
- la réparation de l'ADN (*acide désoxyribonucléique*) tels APEX1 (*apurinic/apyrimidic endonucléase*) ou hOGG1 (*8-oxoG DNA glycosylase*) (Hayward et al., 1999),
- la maturation des ARN messagers (ARNm) tels ADAR2 (*adénosine déaminase acting on RNA type 2*) (Hideyama et al., 2010) ou les gènes SMN1 et SMN2 (Moulard et al., 1998 ; Veldink et al., 2005b) qui codent la protéine SMN (*survival of motor neuron*). Les mutations du gène SMN1 sont à l'origine du développement de l'amyotrophie spinale infantile (ASI), une maladie qui présente des similarités phénotypiques avec la SLA, notamment la perte sélective des motoneurons spinaux (Lefebvre et al., 1995). La mutation du gène SMN1 semble être un facteur de risque de la SLAs (Corcia et al., 2006), alors que la mutation du gène SMN2 influencerait la sévérité de la maladie (Corcia et al., 2009).

ou la régulation du stress oxydant, car 7% des cas de SLAs sont associés à des mutations du gène SOD1 (*superoxyde dismutase de type 1*) (Jackson et al., 1997 ; Luquin et al., 2008). L'implication de mutations au niveau de ce gène est également avérée dans la SLAf (Siddique et al., 1991).

Bien que de nombreuses études aient été réalisées à ce jour, aucun facteur de risque ne peut être retenu avec suffisamment de certitude, pour en faire une cause irréfutable des SLAs. Ces facteurs de risque ont été mis en évidence par des études de cas, basées sur de faibles effectifs. L'incrimination de ces facteurs reste donc discutable, car la majorité des études d'association génétique ou des facteurs exogènes de la SLAs n'a pu être reproduite (pour revue : Rowland et Shneider, 2001). Il semble que les SLAs soient la résultante d'interactions entre des prédispositions génétiques et des facteurs exogènes.

1-3.2. Les SLA familiales

Environ 10 % des personnes atteintes de SLA ont au moins un membre de leur famille atteint par cette maladie, permettant ainsi de parler de SLA héréditaire (Mulder et al., 1986). La plupart des familles touchées par la SLAf ne présentent que deux ou trois individus atteints, reliés entre eux au premier ou second degré ; seulement 30% de ces familles présentent plus de quatre

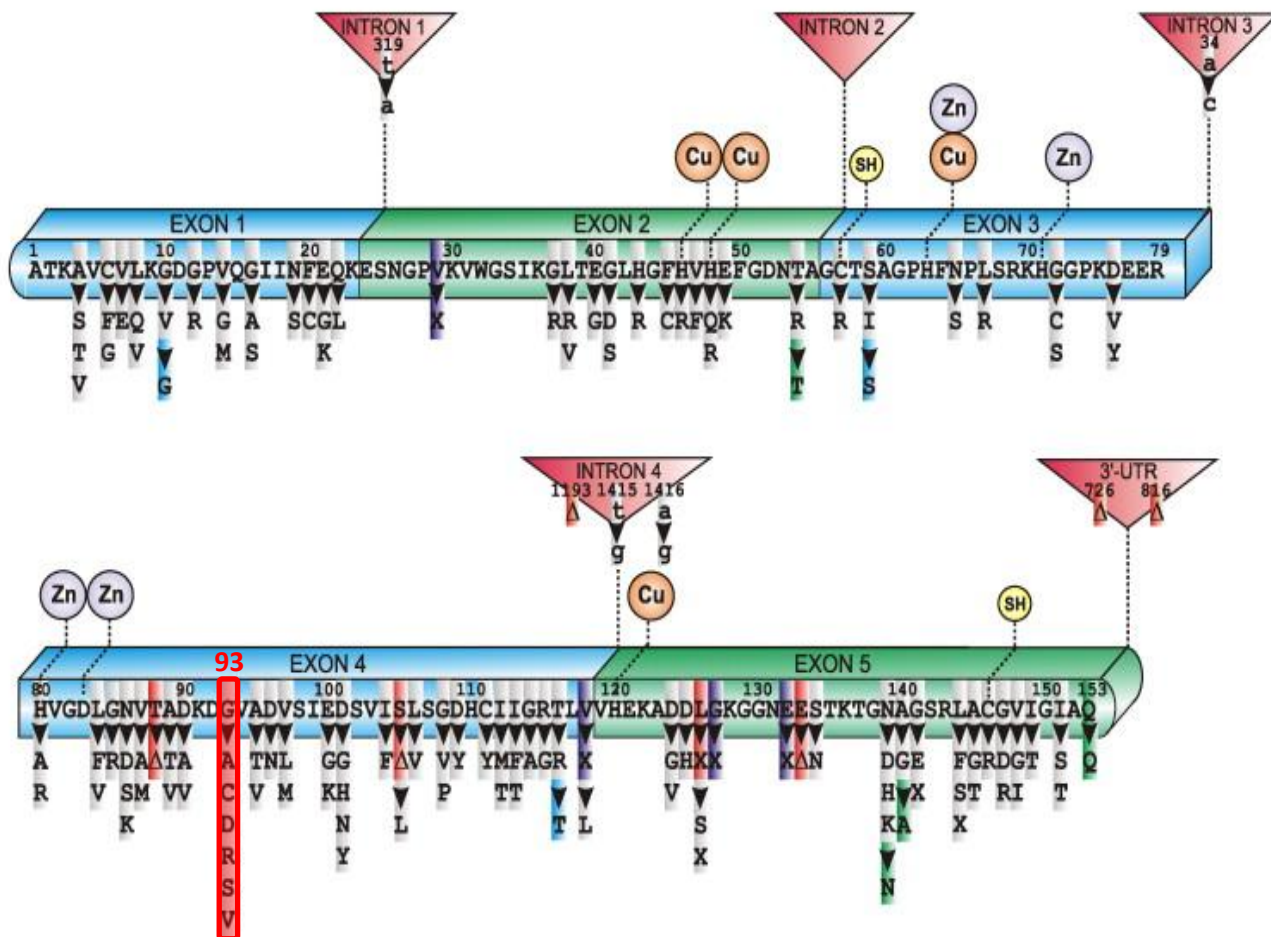


Figure 2 : Mutations de la protéine SOD1 identifiées chez les patients atteints de SLAf

L'analyse génétique de patients SLAf a mis en évidence plus de 120 mutations sur l'ensemble de la séquence de la protéine SOD1. La position 93 apparaît particulièrement sensible à la mutation (d'après Rosen et al., 1993).

individus atteints (Valdmanis et Rouleau, 2008). Les SLAf se différencient en fonction du mode de transmission - autosomique dominante ou récessive - et du gène muté impliqué (tableau 1). Les études de cas de SLAf par analyse de liaison et par clonage positionnel ont permis d'identifier plusieurs gènes nommés ALS et plusieurs loci impliqués dans la SLAf (pour revue : Gros-Louis et al., 2006). Les SLAf les plus fréquentes sont associées aux mutations des gènes ALS1 ou ALS2.

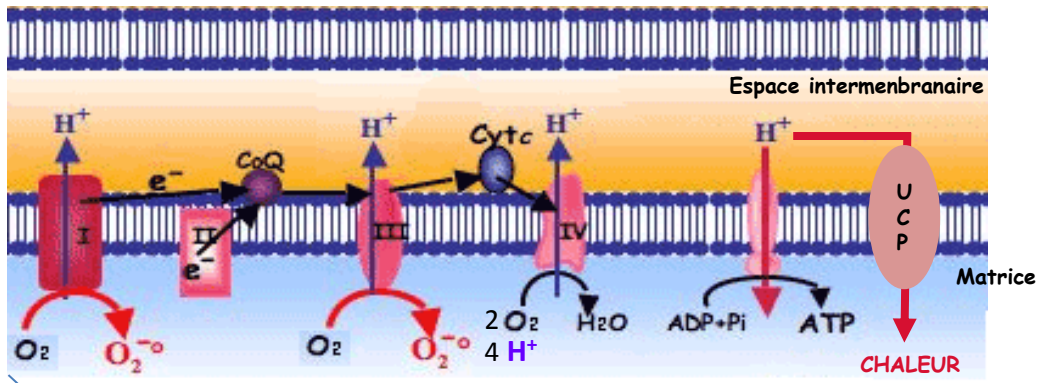
1-3.2.1. Le gène ALS1 : SOD1

Dans 20% des cas, l'analyse génétique de familles atteintes de SLAf révèle des mutations sur le gène SOD1 situé sur le chromosome 21 au niveau du locus q22 ; elles se transmettent de manière autosomique dominante (Siddique et al., 1991). Seuls les patients atteints de SLAf associées à une mutation du gène SOD1 développent un syndrome SLA classique tel que l'avait décrit Charcot et Joffroy (1869), alors que les SLAf associées à une mutation dans les autres gènes développent des syndromes atypiques (Turner et Talbot, 2008).

Le gène SOD1 code la cuivre / zinc superoxyde dismutase de type 1, une protéine de 153 acides aminés codée par 5 exons (Rosen et al., 1993). Plus de 120 mutations du gène SOD1 ont été rapportées dans les SLAf, sur quelques 70 positions réparties sur toutes les régions codantes du gène (Figure 2). Les exons 4 et 5 correspondant aux sites de fixation des ions cuivre et zinc et la glycine en position 93 située dans le site de fixation du zinc, semblent particulièrement sensibles aux mutations. Selon les mutations, des variations cliniques sont observées au niveau de l'âge d'apparition des symptômes et de la vitesse d'évolution de la pathologie (Andersen, 2006).

La protéine SOD1 est une métallo-enzyme sous forme d'homo-dimère ; son expression ubiquitaire est cytosolique. Chaque monomère contient un ion zinc qui joue un rôle structural et un ion cuivre qui agit comme cofacteur catalytique. La SOD1 intervient dans la détoxification des radicaux libres oxygénés issus du métabolisme aérobie des mitochondries ; elle joue un rôle d'antioxydant et protège ainsi la cellule du stress oxydant. En présence de cuivre et de zinc au niveau de son site actif, elle catalyse la réaction de dismutation de deux anions superoxydes radicalaires ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 3). Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé est ensuite éliminé par des catalases ou des glutathionnes peroxydases. Les effets des mutations sur la SOD1 et leur implication dans le mécanisme physiologique de la SLA seront détaillés dans le chapitre 2.

A



B

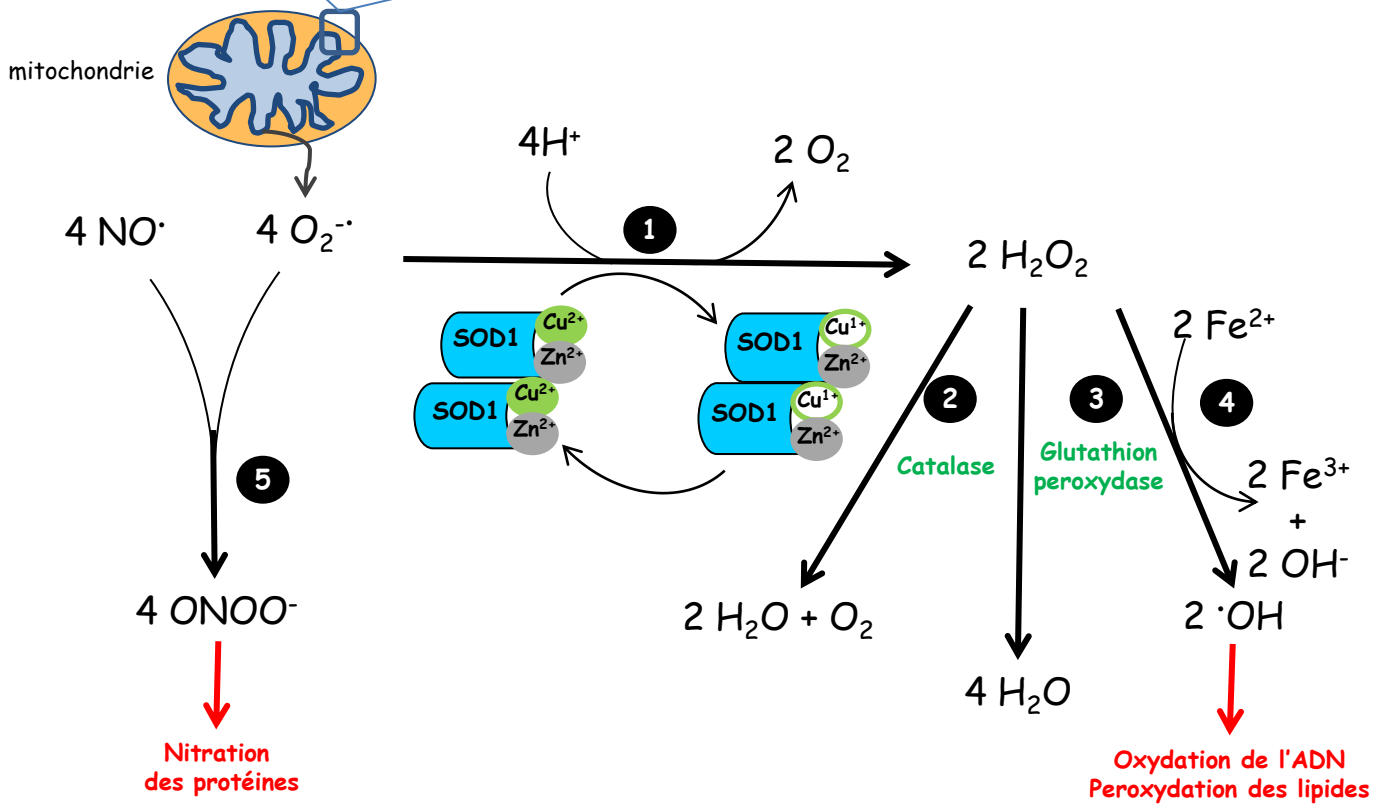


Figure 3 : Production des espèces réactives de l'oxygène et fonction de la protéine SOD1

(A) La respiration mitochondriale produit des anions superoxydes radicalaires, par la réduction partielle de l'oxygène au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire.

(B) La SOD1 catalyse la transformation des anions superoxydes radicalaires en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (1). Le peroxyde d'hydrogène est ensuite dégradé par la catalase (2) et la Glutathion peroxydase (3). Toutefois, le peroxyde d'hydrogène peut réagir selon la réaction de Fenton (4), qui produit des radicaux hydroxylés. Les anions superoxydes radicalaires peuvent réagir avec oxyde nitrique ; cette réaction aboutit à la formation de peroxynitriles hautement réactifs. Les anions superoxydes radicalaires participent directement à la production de radicaux hydroxylés en régénérant de Fe^{3+} par la réaction d'Haber-Weiss.

1-3.2.2. Le gène ALS2 : Alsine

Des mutations ont été décrites au niveau du gène ALS2 situé sur le chromosome 2 au niveau du locus q33 (Hadano et al., 2001 ; Yang et al., 2001) ; elles se transmettent de manière autosomique récessive. Les SLAf dues aux mutations du gène ALS2 sont plus rares et touchent principalement les populations d'Afrique du Nord (Figlewicz and Orrell, 2003) et du Japon (Shirakawa et al., 2009). Ces mutations induisent des SLA juvéniles atypiques : les symptômes apparaissent dans les 20 premières années de la vie et la progression est lente.

Le gène ALS2 code la protéine Alsine de 184 kDa, dont la fonction exacte est encore inconnue (Hadano et al., 2001 ; Yang et al., 2001). L'Alsine a une expression ubiquitaire, localisée majoritairement sur la face cytosolique des membranes des endosomes. Elle est particulièrement abondante dans les motoneurones. Elle possède trois domaines GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) qui participeraient à l'organisation du cytosquelette, à la croissance des dendrites et à la survie des motoneurones par l'intermédiaire de l'activation de guanine triphosphatase (Jacquier et al., 2006). Les mutations de ALS2 mises en évidence dans les SLAf introduisent un codon non-sens dans la séquence de l'ARNm ; la protéine Alsine tronquée issue de ces ARNm n'est pas fonctionnelle (Hadano et al., 2001 ; Yang et al., 2001).

1-4. Les modèles animaux

Sur la base des connaissances épidémiologiques et génétiques des SLAf et SLAs, des modèles animaux de la SLA ont été établis notamment par la mutation du gène SOD1. Le premier modèle animal de la SLA a été créé par Gurney et ses collaborateurs (1994) : la souris hSOD1^{G93A} présente plusieurs copies du transgène humain SOD1 muté, qui code une protéine dans laquelle la Glycine en position 93 est substituée par une Alanine (Gurney et al., 1994). Le nombre de copies du transgène est corrélé au phénotype clinique : il influence l'âge d'apparition des symptômes, la phase symptomatique et la durée de vie des animaux (Dal Canto et Gurney, 1995 et 1997). Il existe ainsi deux modèles de souris SLA basés sur la mutation G93A du transgène humain SOD1, l'un portant un nombre important de transgènes (> 30 copies) appelé « high copy » et l'autre portant un nombre réduit de transgènes (< 5 copies) appelé « low copy ».

D'autres modèles animaux de la SLA ont été développés (pour revue : Turner et Talbot, 2008), mais les modèles murins basés sur la mutation du gène SOD1 restent les plus utilisés. Il

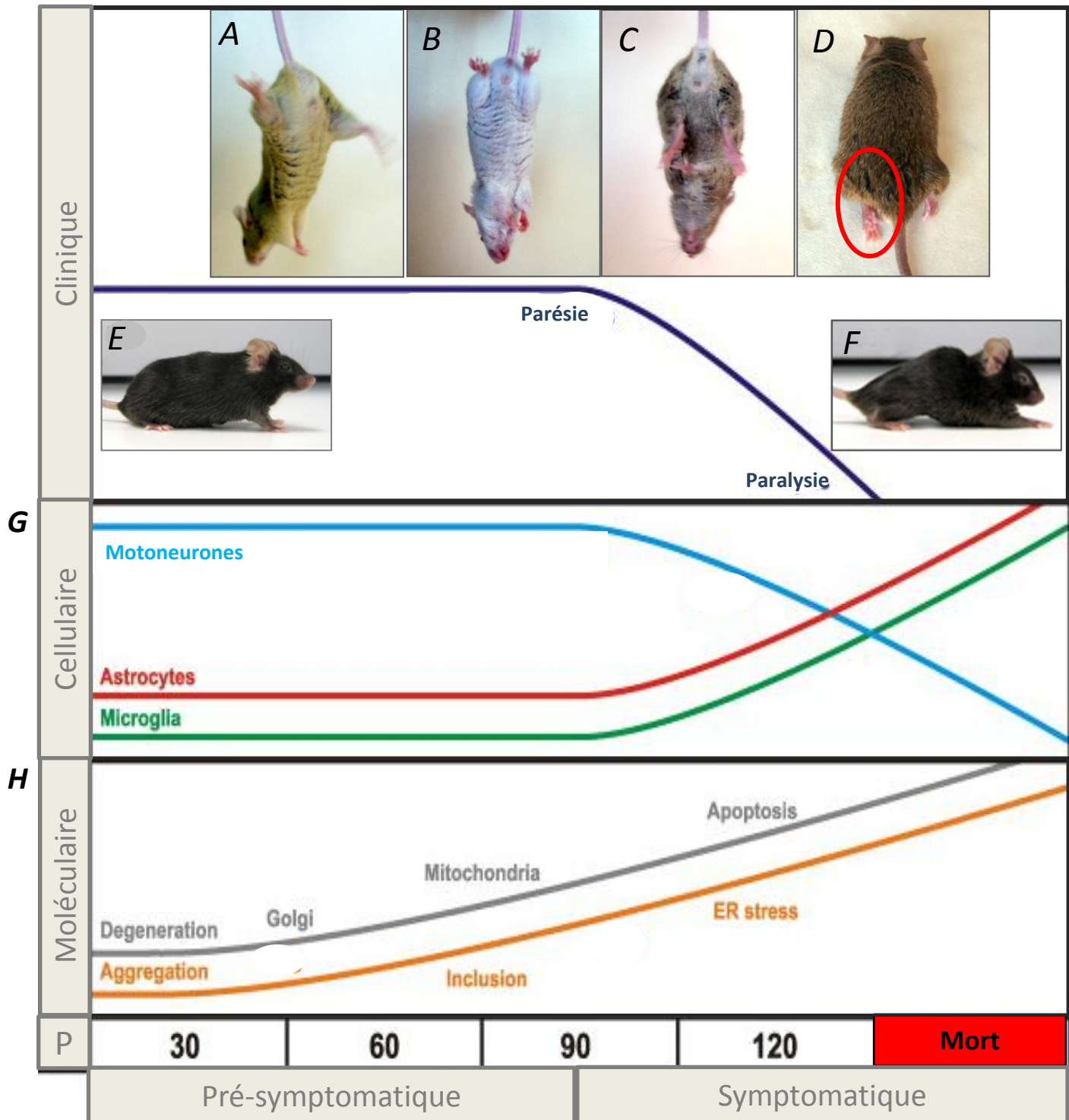


Figure 4 : Caractérisation du modèle SLA murin SOD1^{G93A high copy}

Evolution des symptômes de la SLA chez la souris SOD1^{G93A high copy} (A-F). L'évolution de la maladie peut être appréciée au niveau des membres inférieurs ; les symptômes peuvent être standardisés par un score clinique : Asymptomatique (Score 0 ; A, E) puis apparition de faiblesses musculaires vers P90 (Score 1 ; B) qui s'accroissent (Score 2 : Parésie ; C) et s'accompagnent d'une modification du déplacement et d'une atonie de la queue (score 3) jusqu'à une paralysie unilatérale puis bilatérale (Score 4 ; D). Pour des raisons éthiques, l'animal est sacrifié lorsqu'il ne peut plus se remettre sur ses pattes, en moins de 20 secondes, à partir d'une position latérale (score 5 : Moribond ; F). Représentation schématisée des modifications cellulaires observées dans la moelle épinière (G) et des modifications moléculaires induites par la SOD1 mutée dans les motoneurones (H), au cours du temps (d'après Turner et Talbot, 2008).

existe actuellement quinze modèles murins transgéniques exprimant un nombre plus ou moins important de copies du transgène humain SOD1 muté en différentes positions.

La SLA développée par les souris SLA SOD1^{G93A high copy} (nommées par la suite souris SLA) est de forme typique et présente une grande analogie avec la pathologie humaine (Chiu et al., 1995) ; ce modèle est considéré comme isomorphe de la SLA spinale humaine. Vers l'âge de 90 jours (P90), les premiers symptômes apparaissent au niveau des membres postérieurs qui présentent un déficit du réflexe d'extension (score 1) (Figure 4). L'aggravation se poursuit par des faiblesses musculaires au niveau des membres postérieurs (score 2), puis par une atonie de la queue qui modifie le déplacement (score 3). Une paralysie souvent mono puis bilatérale se développe en 3 semaines (score 4). En fin de vie, les souris présentent une posture caractéristique ; elles présentent une forte scoliose, témoin de la faiblesse musculaire, et sont incapables de se remettre sur leurs pattes lorsqu'elles sont placées sur le flanc (score 5). La mort des animaux survient par arrêt respiratoire, vers l'âge de 130 jours (P130).

D'un point de vue histologique, plusieurs altérations ont été constatées dans la moelle épinière des souris SLA (Figure 4). Au niveau des motoneurones, une vacuolisation des mitochondries apparaît dès P30, puis s'accroît avec l'apparition des symptômes (Kong et Xu, 1998). Une régression des projections corticospinales et bulbospinales est visible dès P60 et s'accroît avec l'âge (Zang et Cheema, 2002) ; le nombre d'axones dans le nerf sciatique diminue vers P80 (Fischer et al., 2004). Parallèlement à l'apparition des premiers symptômes vers P90, une fragmentation de l'appareil de Golgi (Mourelatos et al., 1996), une accumulation d'agrégats insolubles de protéines SOD1 mutées associées à l'ubiquitine (Johnston et al., 2000) et des inclusions de protéines SOD1 mutées associées aux neurofilaments (Bruijn et al., 1998) sont observées dans le cytoplasme des motoneurones. Une astroglie et une microglie sont également observées à P90 (Hall et al., 1998). A un stade plus avancé de la maladie, les somas des motoneurones situés au niveau des colonnes motrices disparaissent à partir de P100 (Fischer et al., 2004).

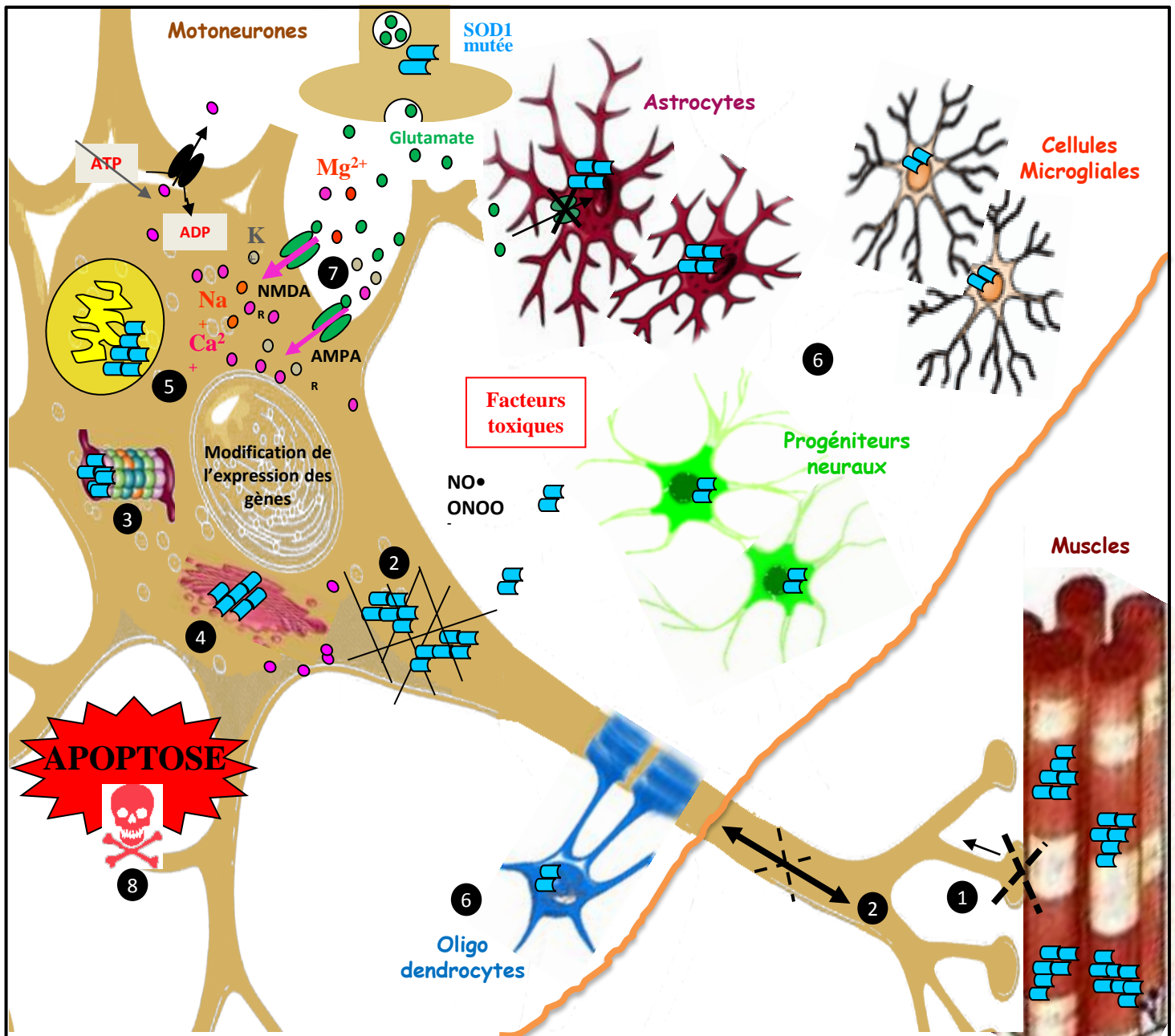


Figure 5 : Principaux mécanismes physiopathologiques de la SLA

L'action particulièrement agressive de la SOD1 mutée dans le muscle induirait la dénervation de la jonction neuromusculaire (1). Dans les motoneurones, les mutations de la protéine SOD1 induisent la formation d'agrégat insolubles qui provoquent la désorganisation du cytosquelette et une diminution du transport axonale (2). Ces agrégats perturbent également le fonctionnement de la plupart des organites : ils provoquent l'intoxication du protéasome (3) et le stress du réticulum endoplasmique (4) ; la localisation anormale de la SOD1 mutée dans l'espace inter-membranaire des mitochondries induit leur vacuolisation et les rend dysfonctionnelles (5). La surproduction de ROS et de facteurs chimiques toxiques par les motoneurones, ainsi que l'action directe de la SOD1 mutée activent les cellules gliales et induit la prolifération des progéniteurs neuraux (6). Les cellules gliales activées produisent alors des facteurs neurotoxiques et les astrocytes activés induisent l'excitotoxicité glutamatergique dans les motoneurones (7). Au final, tous ces mécanismes activent l'apoptose dans les motoneurones.

2- La physiopathologie de la SLA : une maladie aux mécanismes multiples

L'étude de la physiopathologie de la SLA chez les souris SLA a mis en évidence une cascade complexe d'événements qui résultent en la détérioration rapide et sélective des motoneurones, dont la plupart a été confirmée chez les patients SLA. La SLA apparait comme une maladie multifactorielle : les principaux mécanismes de la SLA mis en évidence dans les motoneurones s'interconnectent, notamment la production de radicaux libres, l'agrégation de protéines aberrantes, le dysfonctionnement mitochondrial, l'excitotoxicité glutamatergique et l'apoptose (Figure 5). Dans les modèles animaux, tous les essais thérapeutiques visant à bloquer ces mécanismes ralentissent la progression de la SLA, mais l'issue reste toujours fatale (pour revue : Turner et Talbot, 2008).

2-1. Effets de la mutation de la protéine SOD1

A la suite de la découverte de mutations du gène SOD1 dans les SLA, l'hypothèse que ces mutations conduisaient à une perte de la fonction enzymatique de la protéine et donc induisaient un stress oxydant intense a d'abord été émise (Rosen et al., 1993). Cette hypothèse était étayée par la diminution de l'activité SOD1 décrite dans les globules rouges des patients SLA (Deng et al., 1993). Cependant, les souris possédant des transgènes humains SOD1 mutés développent une SLA, bien que leurs enzymes SOD1 endogènes soient actives (Gurney et al., 1994), alors que les souris invalidées pour le gène SOD1 ne développent pas de SLA (Reaume et al., 1996). De plus, la phase symptomatique chez les souris SLA est conditionnée par l'activité de la SOD1 humaine codée par le transgène (pour revue : Turner et Talbot, 2008). Lorsque le transgène porte une mutation qui préserve l'activité enzymatique de la SOD1 humaine, les souris SLA ont une phase symptomatique relativement longue. Cette phase symptomatique est accélérée lorsque la mutation inactive l'enzyme, mais les symptômes apparaissent plus tardivement.

La seconde hypothèse émise fut un gain de fonctions toxiques acquises par la protéine SOD1 mutée ; ces fonctions toxiques s'amplifieraient au cours du temps (Gurney et al., 1994). La toxicité de la SOD1 mutée serait due à des altérations de sa structure protéique, responsables de changements de sa conformation tridimensionnelle (pour revue : Cleveland et Rothstein, 2001). Ces changements de conformation de la SOD1 mutée modifieraient son activité enzymatique, sa

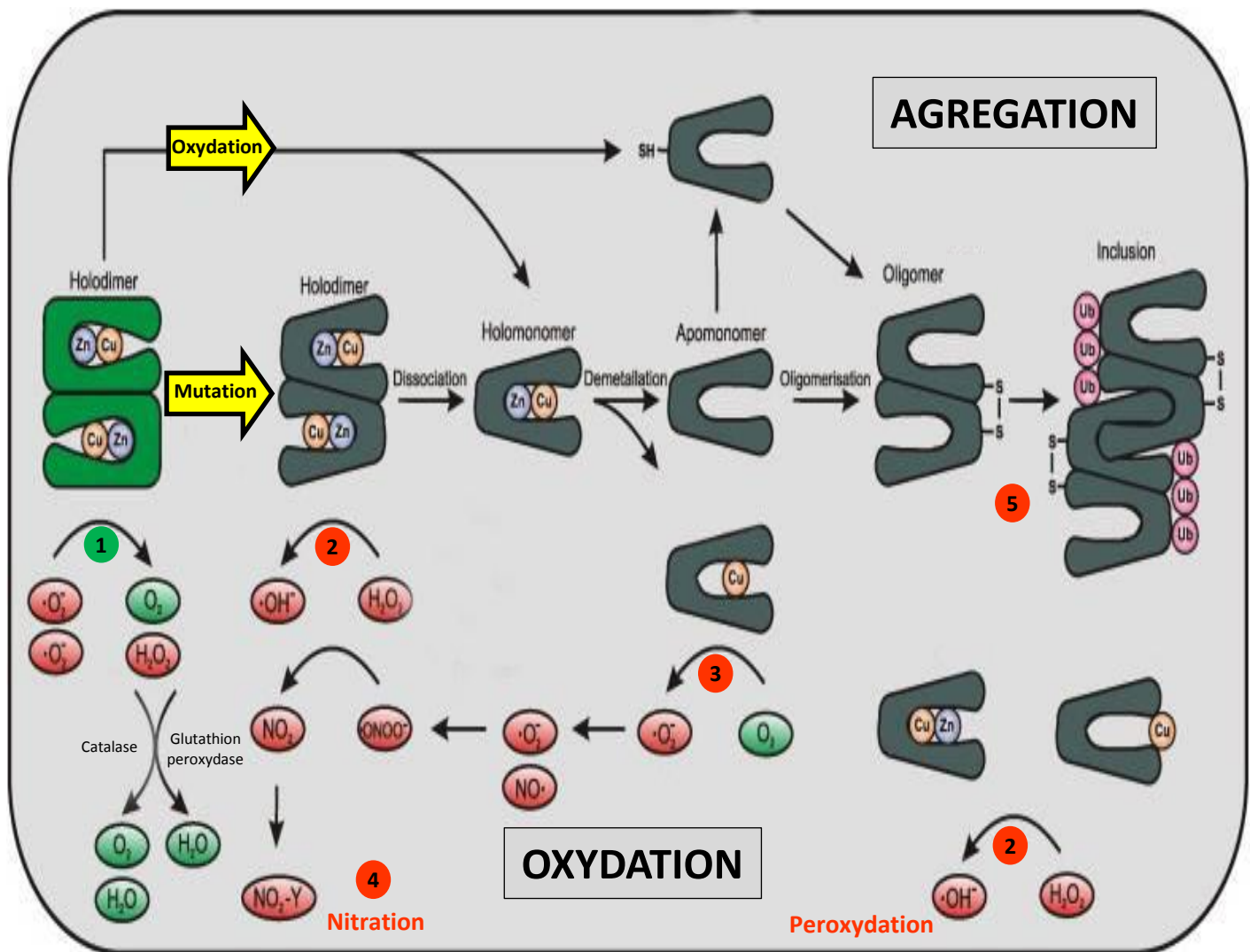


Figure 6 : Principales fonctions toxiques de la SOD1 mutée

Certaines mutations de la SOD1 confèrent à l'enzyme un maintien de sa fonction normale de détoxification des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène (1). La mutation et l'oxydation de la SOD1 provoque sa monomérisation et la perte de la fixation des ions métalliques. Sous cette forme, elle catalyse alors la réaction inverse et produit des radicaux hydroxylés à partir du peroxyde d'hydrogène (2), qui provoquent la peroxydation des lipides. Elle catalyse également la production d'anions superoxydes à partir de l'oxygène (3), qui s'associe à l'oxyde nitrique pour former des peroxynitrides responsables de la nitration des protéines (4). La mutation de la SOD1 provoque également son oligomérisation et son agrégation en complexes insolubles qui déstabilisent l'organisation cellulaire (5) (d'après Cleveland et Rothstein, 2001).

localisation cellulaire et ses capacités d'agrégation. Malheureusement, la forme biochimique sous laquelle la SOD1 mutée exerce sa toxicité cellulaire demeure inconnue, de même que les raisons de son impact sélectif sur les motoneurons.

2-1.1. Fonctions et localisations aberrantes de la SOD1 mutée

Le stress oxydant provient d'un déséquilibre entre les systèmes cellulaires de production des molécules oxydantes et ceux mis en place pour les dégrader. Les principales molécules oxydantes sont pour la plupart des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*). Les principales ROS sont des radicaux oxygénés ($O_2^{\cdot-}$ ou $\cdot OH$ par exemple) ou des molécules pouvant produire des radicaux libres (H_2O_2 par exemple). Les anions superoxydes radicalaires ($O_2^{\cdot-}$) sont produits par la chaîne respiratoire des mitochondries, lors du passage des électrons au niveau des complexes I et III (Figure 3A). Les radicaux hydroxylés ($\cdot OH$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les peroxynitriles ($ONOO^-$) sont des dérivés d'anions superoxydes et du monoxyde d'azote radicalaire ($NO\cdot$, *oxyde nitrique*). Ces ROS sont très instables et très réactives ; elles possèdent un électron libre qui peut créer des dommages cellulaires par des mécanismes d'oxydation. C'est pourquoi, la cellule développe des systèmes de défense contre ces molécules oxydantes. L'action des ROS est limitée par leur fixation à des molécules anti-oxydantes telles les vitamines ou par leur détoxification enzymatique notamment par la SOD1.

Les mutations de la SOD1 pourraient amplifier son activité pro-oxydante en catalysant des oxydations aberrantes, car les modifications de la structure de la SOD1 mutée favorisent son activité pro-oxydante, en renforçant la réactivité de l'enzyme pour des substrats anormaux (Cleveland et Liu, 2000) (Figure 6). Elle acquiert une activité peroxydase responsable de dommage à l'ADN et de la peroxydation des lipides (Wiedau-Pazos et al., 1996). Elle catalyse également la nitration de tyrosines dans les protéines (Crow et al., 1997). La perte de la fixation de l'atome de zinc induite par certaines mutations confère à la SOD1 mutée une activité oxydante anormale (Estevez et al., 1999) : en présence seulement d'un atome de cuivre sur son site actif, elle catalyse la réaction inverse à sa fonction normale et produit ainsi des anions superoxydes radicalaires. De plus, lors de mutations dans les exons 3 ou 4, la perte de la charge en zinc de la SOD1 mutée génère une surcharge cellulaire en zinc, qui produit un stress oxydant et favoriserait la dégénérescence des motoneurons (Kim et al., 2009). Des modifications imputables au stress oxydant, telles l'oxydation et la nitration des protéines ou la peroxydation des lipides, ont été détectées dans la moelle épinière des patients (Pedersen et al., 1998) et des souris SLA (Ferrante

et al., 1997 ; Bogdanov et al., 1998). Les mutations de la SOD1 diminueraient son activité anti-oxydante ; elles induiraient ainsi l'accumulation de ROS et le fort stress oxydant observé dans les tissus neuromusculaires des souris SLA, aussi bien dans la moelle épinière (Hall et al., 1998) que dans les muscles squelettiques (Kraft et al., 2007).

D'autre part, l'activité superoxyde dismutase est normalement assurée dans la cellule par trois enzymes : la SOD1 cytoplasmique, la SOD2 mitochondriale et la SOD3 extracellulaire. La mutation de la protéine SOD1 modifie cet ordre ; en fonction de la mutation, la SOD1 se localise alors anormalement dans les motoneurones. La SOD1^{G93A} présente une association mitochondriale préférentielle (Higgins et al., 2003 ; Sato et al., 2005), où elle exerce une toxicité directe. Elle est également sécrétée massivement par les motoneurones et les astrocytes (Urushitani et al., 2006). Cette forme extracellulaire surabondante de SOD1 mutée active les cellules microgliales environnantes et induit une réaction inflammatoire locale dans la moelle épinière (Zhao et al., 2010).

2-1.2. Formation d'agrégats toxiques de SOD1 mutées

Les mutations entraînent des changements de conformation, qui déstabilisent les dimères et favorisent l'agrégation de différentes espèces biochimiques de SOD1 (Figure 6). L'accumulation cytoplasmique, au cours du temps, d'agrégats insolubles de protéines SOD1 mutées est un des marqueurs histopathologiques caractéristiques de la SLA, chez les patients (Kato et al., 1996 ; Ince et al., 1996) et les souris SLA (Bruinij et al., 1997 ; Johnston et al., 2000). Ces agrégats sont sélectivement concentrés dans les motoneurones, les cellules musculaires et les astrocytes. Chez les souris SLA, ils sont détectables dès la phase asymptomatique et augmentent lors de l'apparition des symptômes (Wang et al., 2002) ; leur concentration est corrélée à l'évolution de la maladie (Turner et al., 2003).

Ces agrégats de SOD1 mutées ont la capacité de se lier à d'autres protéines. Ils ont un effet toxique sur la cellule, en séquestrant des protéines essentielles à la machinerie cellulaire. Les protéines qui interagissent avec la SOD1 mutée voient ainsi leur activité bloquée. Les agrégats multi-protéiques ainsi formés désorganisent la cellule : ils bloquent des fonctions cellulaires essentielles et perturbent le fonctionnement de plusieurs organites.

2-2. Blocage des fonctions cellulaires essentielles

Les agrégats de SOD1 mutées induiraient une forte modification de l'expression génique. Ils auraient une action inhibitrice sur la synthèse protéique des motoneurones, en perturbant le métabolisme des ARNm (pour revue : Strong, 2010) ainsi que la maturation et la dégradation des protéines (pour revue : Ticozzi et al., 2010).

2-2.1. Perturbation de l'édition des ARNm matures

Les protéines SOD1 mutées s'agrègent aux protéines *TAR-DNA binding protein 43* (TDP-43) (Neumann et al., 2006) et SMN (Turner et al., 2009b) impliquées dans l'édition des ARNm.

La TDP-43 est une protéine multifonctionnelle, nucléaire et cytoplasmique, dans les neurones. Elle est impliquée dans le contrôle des différentes étapes de l'expression génique : la transcription, l'épissage, la maturation, le transport et la traduction de l'ARNm. Dans la SLA, la protéine TDP-43 est surexprimée, anormalement phosphorylée et ubiquitinylée ; elle ne remplit plus ses fonctions (pour revue : Cheah et al., 2010). Elle se localise essentiellement dans des inclusions cytoplasmiques, où elle interagit avec la protéine SOD1 mutée et l'ARNm de la chaîne légère des neurofilaments. Ces inclusions perturberaient le trafic des protéines entre le noyau et le cytoplasme. Bien que des inclusions de TDP-43 soient retrouvées dans les motoneurones des patients atteints de SLAf et SLAs, l'accumulation de TDP-43 n'est pas spécifique de la SLA (Wan et al., 2008) ; elle témoigne seulement d'un processus neurodégénératif. Cependant, dans la SLA, elle participerait à l'intoxication du protéasome et à l'activation de l'autophagie dans les motoneurones (Wang et al., 2010).

La protéine SMN est une protéine ubiquitaire qui intervient dans plusieurs processus cellulaires (pour revue : Burghes et Beattie, 2009). Elle participe à l'assemblage du spliceosome, le complexe protéique qui permet la maturation des ARNm ; elle agit comme une molécule chaperonne dépendante de l'ATP qui facilite l'assemblage spécifique des protéines et des ARN dans la formation du complexe ribo-nucléo-protéique. La diminution du taux de SMN est corrélé à la sévérité de la SLA (Kunst et al., 2000). Différents modèles de souris SLA présentent une diminution de la quantité de protéine SMN dans la moelle épinière, corrélée à l'apparition des symptômes (Turner et al., 2009b). Cette diminution ne provient pas d'une régulation négative de la transcription de SMN, mais d'une interaction physique avec la SOD1 mutée.

2-2.2. Perturbation du « contrôle qualité » des protéines

Les protéines SOD1 mutées interagissent avec plusieurs protéines chaperonnes (Bergemalm et al., 2010 ; pour revue : Ticozzi et al., 2010), dont la fonction est d'assister la maturation et de veiller au repliement tridimensionnel adéquat des protéines cellulaires. La séquestration des protéines chaperonnes dans les agrégats de SOD1 mutée induit une augmentation de leur expression (Veldink et al., 2005b ; Wang et al., 2009), mais les protéines cellulaires mal conformées s'accumulent tout de même dans le cytoplasme des motoneurones.

Pour éliminer les protéines cellulaires cytoplasmiques mal conformées ou devant être détruites, les cellules disposent d'un système efficace : le protéasome. Les protéines aberrantes sont ubiquitinylées puis adressées au protéasome, où elles sont dégradées. Dans les motoneurones, les agrégats de SOD1 mutées sont ubiquitinylés (Leigh et al., 1991 ; Urushitani et al., 2002). Le protéasome serait intoxiqué par l'accumulation massive de SOD1 mutées ubiquitinylées et ne pourrait plus jouer son rôle pour dégrader les autres protéines cellulaires mal conformées en raison de la déplétion en protéines chaperonnes (Cheroni et al., 2005 et 2009). Cette intoxication du protéasome serait en partie responsable de l'accumulation d'agrégats de SOD1 mutée dans les motoneurones (Puttappathi et al., 2003 et 2007).

2-3. Désorganisation cellulaire des motoneurones

Dans la SLA, le fonctionnement de la plupart des organites cellulaires est perturbé dans les motoneurones. Comme le protéasome, le réticulum endoplasmique et les mitochondries semblent intoxiqués par les agrégats de SOD1 mutées. L'accumulation de SOD1 mutées dans des inclusions cytoplasmiques désorganise également le cytosquelette des motoneurones.

2-3.1. Stress du réticulum endoplasmique

Dans la SLA, la sécrétion de la SOD1 mutée dans le milieu extracellulaire nécessite son passage par le réticulum endoplasmique (RE) (Turner et al., 2005 ; Urushitani et al., 2006). L'accumulation des protéines SOD1 mutées mal conformées dans le RE serait responsable du stress du RE mis en évidence dans les motoneurones des souris SLA (Kikuchi et al., 2006 ; Atkin et al., 2006 ; Saxena et al., 2009) et des patients (Ito et al., 2009 ; Sasaki, 2010).

Le stress du RE est directement lié à la mutation de la SOD1 et à la toxicité des agrégats formés. Il est provoqué par l'accumulation de SOD1 mutées mal-conformées dans la lumière du RE (Atkin et al., 2006 ; Kikuchi et al., 2006 ; Nagata et al., 2007) et par l'interaction physique de la SOD1 mutée avec Derlin-1 (Nishitoh et al., 2008), une molécule permettant la retro-translocation des protéines mal-conformées du RE vers le cytoplasme. Afin de protéger la cellule contre le stress du RE, une réponse adaptative nommée UPR (*unfolded protein response*) est induite ; elle a pour but de ralentir la synthèse protéique globale (pour revue : Fofelle et Ferré, 2007). La réponse UPR empêche l'arrivée d'autres protéines dans la lumière du RE, augmente la synthèse des protéines chaperons pour stimuler les processus de repliement et oriente les protéines mal-conformées vers la dégradation. Lorsque la réponse UPR est insuffisante face à l'importance des dommages, elle déclenche l'apoptose dans la cellule. Dans la SLA, le stress du RE participerait à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Ca^{2+}), ainsi qu'à l'induction de l'apoptose des motoneurones (Saxena et al., 2009).

Les inclusions cytoplasmiques de protéines SOD1 mutées, observées dans les axones des motoneurones des patients (Shibata et al., 1996) et des souris SLA (Stieber et al., 2000), seraient issues du stress du RE. Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence de protéines spécifiques du RE dans ces inclusions, aussi bien chez les patients que les souris SLA (Bergemalm et al., 2010).

2-3.2. Dysfonctionnements mitochondriaux

Une des caractéristiques conservées chez les patients SLA est l'augmentation du nombre et des anomalies morphologiques des mitochondries, au niveau des terminaisons axonales des motoneurones spinaux (Sasaki et Iwata, 1996). De manière générale, l'inhibition des processus de fusion des mitochondries qui conduit à l'augmentation du nombre des mitochondries joue un rôle clé dans la progression de la mort cellulaire neuronale (pour revue : Cheung et al., 2007). De plus, une diminution des fonctions mitochondriales a été mise en évidence dans la moelle épinière des patients atteints de SLAs, notamment une diminution de l'activité de la citrate synthase et des complexes de la chaîne respiratoire (Wiedemann et al., 2002).

Chez les souris SLA en phase asymptomatique, les mitochondries motoneuronales présentent une vacuolisation et une désorganisation de leur membrane, qui s'accroît fortement à l'apparition des symptômes (Dal Canto et Gurney, 1995 ; Jaarsma et al., 2000). Cette vacuolisation est due à une modification de la perméabilité membranaire responsable de

l'expansion de l'espace inter-membranaire mitochondrial, où se localisent anormalement des agrégats de SOD1 mutées (Higgins et al., 2003) ubiquitinylés par une enzyme mitochondriale (Yonashiro et al., 2009). Cette localisation mitochondriale anormale de la SOD1 mutée dans les motoneurones est dépendante de la mutation (Bergemalm et al., 2006) : les mutations produisant une SOD1 stable, comme par exemple la mutation G93A, induisent cette association mitochondriale, contrairement aux mutations produisant une SOD1 instable comme par exemple les mutations G85R ou G127X.

Les agrégats de SOD1 mutées exercent une toxicité directe sur les mitochondries en induisant d'importants dysfonctionnements mitochondriaux. Ils diminuent l'activité des complexes I et III de la chaîne respiratoire (Browne et al., 1998 ; Mattiazzi et al., 2002) et induisent un stress oxydant local par la production accrue de ROS (Radi et al., 2002 ; Martin et al., 2005), notamment celle du NO• par l'activation de la iNOS (*oxyde nitrique synthase, inductible*) mitochondriale (Chen et al., 2010). Ces agrégats perturbent également fortement le potentiel membranaire des mitochondries (De Vos et al., 2007), notamment par leur interaction avec les canaux ioniques dépendants du voltage VDAC1 (*voltage-dependent anion channel type I*) situés à la membrane externe des mitochondries (Israelson et al., 2010). Le passage de l'ADP (*adénosine di-phosphate*) dans l'espace inter-membranaire des mitochondries est alors diminué, ce qui a pour conséquence la diminution de la synthèse d'ATP. La perte partielle du potentiel membranaire provoque une perméabilité transitoire de la membrane mitochondriale externe (De Vos et al., 2007). Cette perméabilité facilite l'entrée de petites molécules, notamment des molécules d'eau ; l'accumulation de ces molécules dans l'espace inter-membranaire participe au gonflement des mitochondries.

Les mitochondries jouent normalement un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du Ca²⁺ intracellulaire ; elles absorbent l'excès cytoplasmique de Ca²⁺ (Palecek et al. 1999). Dans les motoneurones des souris SLA, le Ca²⁺ surabondant dans le cytoplasme en raison de l'excitotoxicité glutamatergique (décrite ultérieurement) n'est plus régulé par les mitochondries, car leur pouvoir d'absorption du Ca²⁺ est diminué (Damiano et al., 2006 ; Jaiswal et al., 2009). La perte de cette fonction mitochondriale précède l'apparition des symptômes (Damiano et al., 2006) ; elle participerait directement à l'induction de la mort des motoneurones (Stout et al., 1998).

Les dysfonctionnements mitochondriaux mise en évidence dans la SLA activent la voie intrinsèque de l'apoptose, dont la mitochondrie est un acteur central (pour revue : Haase et al., 2008). La modification de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe libère, dans le

cytoplasme, le cytochrome c contenu dans l'espace inter-membranaire (De Vos et al., 2007), induisant la constitution de l'apoptosome et l'activation des caspases qui initient l'apoptose. Les agrégats de SOD1 mutées dans l'espace inter-membranaire s'agrègent également aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2, un régulateur majeur de l'apoptose, et bloquent ainsi leur action de rétention du cytochrome c dans l'espace inter-membranaire (Pasinelli et al., 2004).

2-3.3. Anomalies des fonctions de l'axone

Les neurofilaments sont les protéines les plus abondantes des motoneurones, en raison de la longueur de leur axone ; ils déterminent la forme et le calibre des axones. L'accumulation de neurofilaments dans les inclusions d'agrégats de SOD1 mutée, au niveau des axones des motoneurones, est une des caractéristiques histopathologiques de la SLA chez les patients atteints de SLAf ou SLAs (Munoz et al., 1988 ; Chou et al., 1996) et les souris SLA (Collard et al., 1995 ; Bruinj et al., 1997). La participation directe des neurofilaments dans la pathogenèse de la SLA a donc été proposée. L'accumulation des neurofilaments serait due à leur nitration par les peroxy-nitriles (Chou et al., 1996). D'autres protéines du cytosquelette ont également été mises en évidence dans ces inclusions, notamment la tubuline (Williamson et Cleveland, 1999) et la périphérine (Bergemalm et al., 2010). Ces inclusions produisent une désorganisation du cytosquelette et aboutissent à un « étranglement axonal » qui entrave la fonction de l'axone (Williamson et Cleveland, 1999).

Les vitesses du transport axonal antérograde et rétrograde sont diminuées, dans les racines ventrales de la moelle épinière et dans le nerf sciatique (Williamson et Cleveland, 1999). La protéine SOD1 mutée interagit avec les protéines essentielles au transport axonal rétrograde et antérograde : le complexe Dynéine/dynactine (Ström et al., 2008) et les kinésines (Tateno et al., 2009) qui servent de moteurs moléculaires pour le transport des vésicules le long des microtubules. Cette interaction entrave la fonction de ces protéines. Les défauts du transport axonal induisent un épuisement en protéines et une relocalisation des mitochondries entre le soma et la périphérie de l'axone. Chronologiquement, le dysfonctionnement du transport axonal précède les signes cliniques de la SLA (Sasaki et al., 2005). Il serait à l'origine de la dégénérescence de l'axone.

Ainsi, le défaut de transport axonal provoque une diminution du nombre de mitochondries dans l'axone qui, associé à la diminution de la production d'ATP, a un impact direct sur la fonction axonale de propagation du potentiel d'action jusqu'au muscle (De Vos et al., 2007). En

effet, la régulation du potentiel de repos de la membrane de l'axone nécessite le fonctionnement de pompes électrogènes sodium (Na^+) / potassium (K^+) dépendantes de l'ATP, afin de rétablir les gradients de Na^+ et K^+ après le passage du potentiel d'action (hyperpolarisation de la membrane). Sans ATP, ces pompes ne peuvent fonctionner. Le Na^+ s'accumule dans le cytoplasme ; l'activation inverse des échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ contribueraient à l'accumulation toxique de Ca^{2+} dans le cytoplasme et à la dégénérescence des motoneurones dans la SLA (Vucic et al., 2007).

2-4. Phénomène d'excitotoxicité glutamatergique

Le glutamate est le neurotransmetteur de la communication cellulaire entre les neurones du cortex moteur et les motoneurones de la moelle épinière (pour revue : Hamilton et Attwell, 2010). A la membrane du motoneurone, en fonction de leur agoniste synthétique spécifique, deux types de récepteurs ionotropiques sont impliqués dans la transmission excitatrice :

- les récepteurs NMDA (*N-méthyl D-aspartate*), des tétramères formés de deux sous-unités NR1 (8 variants d'épissage alternatif : NR1-1, NR1-2, NR1-3, NR1-4, avec (NR1a) ou sans (NR1b) l'exon 5) et de deux sous-unités NR2 (4 types issus de gènes différents : NR2A, NR2B, NR2C ou NR2D) ou NR3 (NR3A ou NR3B). Généralement, les récepteur NMDA sont des tétramères composés de deux sous-unités NR1 et NR2. Les sous-unités NR2 spécifient les propriétés électrophysiologiques des récepteurs NMDA, notamment la sensibilité au glutamate ; elles portent les sites de liaison du glutamate et définissent la perméabilité au Ca^{2+} (pour revue : Llansola et al., 2005)

- les récepteurs AMPA (*α amino 3-hydroxy 5-méthyl 4-isoxazole propionic acide*), des tétramères composés de sous-unités GluR de quatre types différents (GluR 1 à 4), sont perméables au Na^+ ainsi qu'au Ca^{2+} lorsqu'ils sont déficients en sous-unité GluR2.

L'activation des récepteurs au glutamate génère l'entrée des ions Na^+ et Ca^{2+} dans les motoneurones, qui produisent la dépolarisation de la membrane, la première phase du potentiel d'action. L'activité synaptique de ces récepteurs est normalement contrôlée par la recapture d'environ 80% du neurotransmetteur par les astrocytes péri-synaptiques, via les transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAAT).

Des perturbations de la transmission glutamatergique ont été observées dans la SLA. Le liquide céphalorachidien des patients (Rothstein et al., 1990) et des souris SLA $\text{SOD1}^{\text{G85R}}$ (Bruijn

et al., 1997) présentent une concentration de glutamate trois fois plus élevée que la normale. Cette augmentation de glutamate est due à une réduction de la recapture du glutamate par les astrocytes (Rothstein et al., 1992). Une diminution de 30 à 95% de l'activité du transporteur astrocytaire EAAT2 est observée dans la moelle épinière des patients (Rothstein et al., 1995b) et des souris SLA symptomatiques (Warita et al., 2002). Ainsi, les motoneurones suractivés ne peuvent faire face à l'afflux massif de Ca^{2+} car son rejet du milieu intracellulaire dépend de pompes à protons qui nécessitent de l'ATP. La persistance de la forte concentration intracellulaire de Ca^{2+} activerait de nombreuses protéines dépendantes du Ca^{2+} telles des protéases, la phospholipase A2 et la nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*). L'activation de ces protéines dépendantes du Ca^{2+} provoquerait des dommages importants, en dégradant les principaux composants cellulaires. La forte concentration synaptique du glutamate induit une excitotoxicité dans les motoneurones. Ce phénomène détecté juste avant l'apparition des symptômes pourrait expliquer, en partie, la perte sélective des motoneurones dans la SLA (Choi et al., 2009).

L'excitotoxicité glutamatergique est l'un des principaux mécanismes physiopathologiques de la SLA : il a été mis en évidence aussi bien chez les patients atteints de SLAf ou SLAs (Rothstein et al., 1990 et 1995a ; Fray et al., 1998) que dans les modèles animaux de SLA (Warita et al., 2002 ; Howland et al., 2002). Ce mécanisme permet de faire le lien entre plusieurs caractéristiques pathologiques mises en évidence dans la SLA, notamment entre le stress oxydant, l'apoptose et la sélectivité des motoneurones.

Ce mécanisme commun aux différentes formes de SLA a justifié l'utilisation thérapeutique du riluzole, un inhibiteur des canaux sodiques et calciques dépendants du voltage, qui stabilise leur conformation inactive (Bryson et al., 1996). Le riluzole agit comme un antagoniste des récepteurs NMDA ; il bloque ainsi l'entrée du Ca^{2+} dans les motoneurones. Il diminue également la libération pré-synaptique du glutamate (Cleveland et Rothstein, 2001). Cependant, le riluzole a un effet modéré sur les patients SLA (Miller et al., 2003). La complexité et l'interconnexion des mécanismes physiopathologiques de la SLA qui induisent tous l'apoptose des motoneurones expliquent certainement l'efficacité relative du riluzole chez les patients.

2-5. Activation des mécanismes d'apoptose

Dans la SLA, l'apoptose est impliquée dans la disparition des motoneurones (pour revue : Haase et al., 2008). Tous les mécanismes de la mort cellulaire programmée sont activés dans les

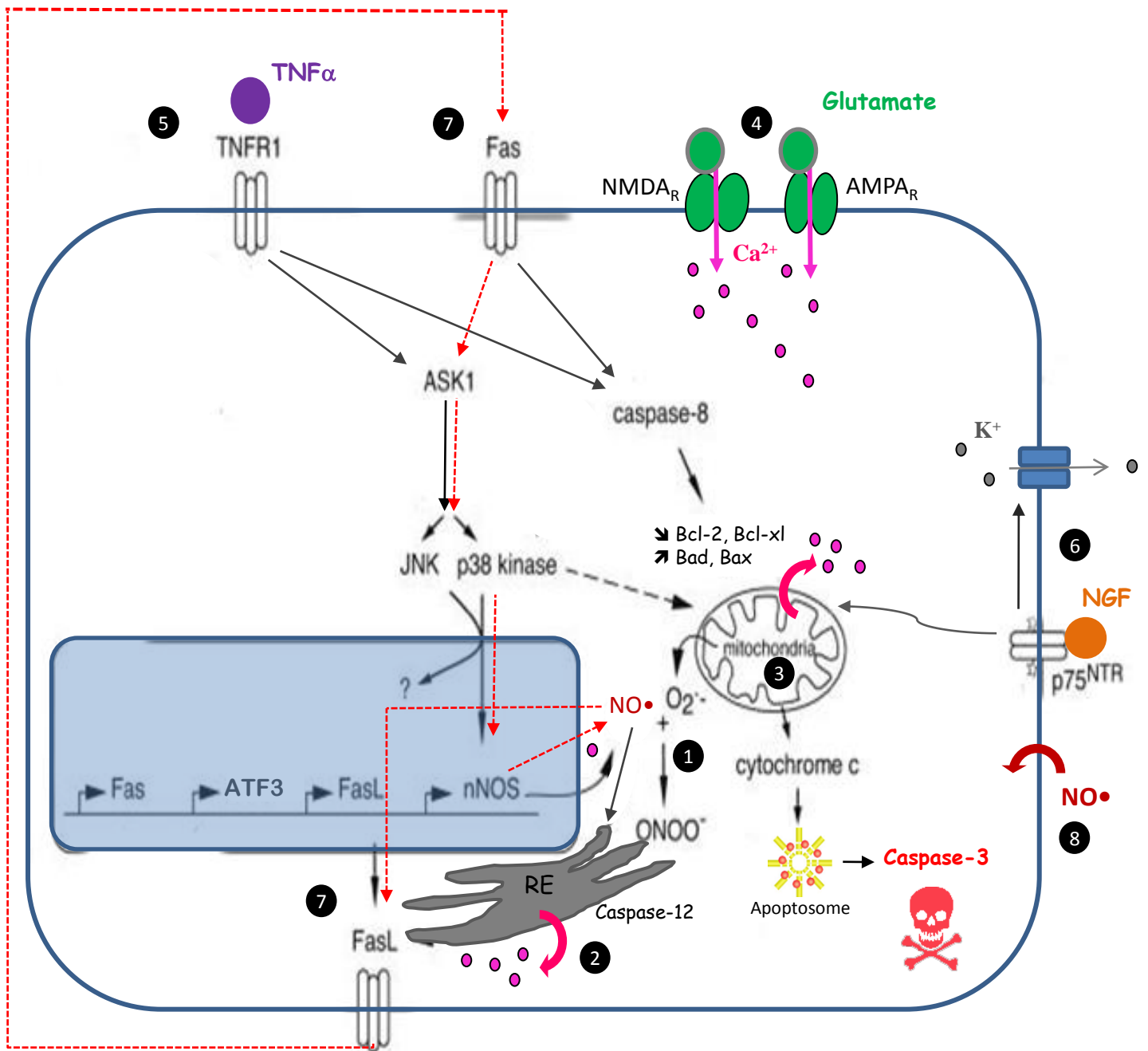


Figure 7 : Principaux mécanismes d'apoptose induit dans les motoneurones des souris SLA

La SOD1 mutée induit la surproduction de ROS (1), le stress du réticulum endoplasmique (2) et le dysfonctionnement des mitochondries (3). Le relargage de cytochrome c dans le cytoplasme induit la formation de l'apoptosome (cytochrome c/Apaf-1/caspase 9) qui active la caspase-3. Ces mécanismes sont accentués par l'excitotoxicité glutamatergique, via l'entrée massive de calcium par la sur-activation des récepteurs au glutamate (NMDA_R et AMPA_R déficients en sous-unité GluR2) (4). L'apoptose est également induite par l'activation de récepteurs membranaires, notamment par le TNF α produit par les cellules microgliales activées (5), le NGF produit en grande quantité par les astrocytes activés qui induit l'efflux de potassium (6) et le ligand du récepteur de mort Fas (7). La voie Fas/FasL est potentialisée par le NO \bullet produit par le motoneurones et les cellules gliales environnantes (8) (d'après Haase et al., 2008).

motoneurones SLA : l'apoptose neuronale est médiée par les voies intrinsèque et extrinsèque qui s'interconnectent et s'auto-amplifient. L'accumulation de ROS et le déséquilibre ionique induit par l'excitotoxicité glutamatergique accentuent le dysfonctionnement des mitochondries et leur libération de cytochrome c qui activent la voie apoptotique intrinsèque. La voie apoptotique extrinsèque implique l'activation de récepteurs de mort à la surface cellulaire tels les récepteurs Fas et la famille des récepteurs au TNF α (*tumor necrosis factor α*). Les différentes voies apoptotiques activées dans les motoneurones sont résumées dans la Figure 7.

2-5.1. Implication des ROS

Dans la SLA, les ROS agissent comme des messagers secondaires du stress cellulaire. Elles sont générées par les motoneurones eux-mêmes, via les fonctions aberrantes de la SOD1 mutée, par leurs mitochondries dysfonctionnelles ou en réponse aux stimuli produits par les cellules environnantes (pour revue : Haase et al., 2008). La production de ROS est amplifiée, dans les motoneurones, par l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺, notamment par l'activation d'enzymes dépendantes du Ca²⁺ telle la NOS. La NOS catalyse une réaction d'oxydation de l'acide aminé précurseur L-Arginine pour synthétiser du NO•. Cette réaction complexe exige la présence d'un grand nombre de cofacteurs et de co-substrats, incluant l'O₂ et le NAD(P)H (*nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit*). Il existe 3 isoformes de NOS : une forme neuronale constitutive (nNOS), une forme endothéliale (eNOS) et une forme inducible (iNOS) qui produit 1000 fois plus de NO• que la nNOS. La nNOS et la iNOS activée également dans les mitochondries produisent du NO• en grande quantité, dans les motoneurones adultes apoptotiques (Martin et al., 2005) et particulièrement dans ceux des souris SLA (Sargsyan et al., 2005 ; Chen et al., 2010). Chez les souris SLA en phase asymptomatique, l'iNOS est induite dans les motoneurones par des médiateurs de l'inflammation (Sargsyan et al., 2005) ; le NO• produit s'accumule dans le cytoplasme. Les motoneurones enverraient alors des signaux de détresse dans le milieu extracellulaire, qui activeraient l'iNOS dans les cellules de Schwann (Chen et al., 2010), les cellules microgliales impliquées dans le processus inflammatoire et les astrocytes activés environnants (Sargsyan et al., 2005). Chez les souris SLA en phase symptomatique, le NO• produit par les cellules gliales environnantes s'accumulerait à nouveau dans les motoneurones (Sargsyan et al., 2005), car le NO• est une petite molécule très lipophile qui diffuse rapidement à travers les parois cellulaires. La toxicité du NO• est dépendante de sa liaison à O₂^{•-} (pour revue : Urushitani et Shimohama, 2001) pour former le ONOO⁻, qui produit notamment la nitration des neurofilaments (Chou et al., 1996) et inhibe de façon irréversible la chaîne respiratoire des

mitochondries (Urushitani et Shimohama, 2001). Dans les motoneurones des souris SLA, le ONOO⁻ ainsi formé en grande quantité activerait l'apoptose.

L'augmentation des ROS dans le cytoplasme des motoneurones crée des changements dans l'état redox des protéines de signalisation et modifie ainsi leur activité. Par ailleurs, les protéines participant au stress oxydant sont surexprimées, alors que les gènes possédant une séquence ARE (*antioxidant response element*) et impliqués dans la défense au stress oxydant sont réprimés dans les motoneurones des souris SLA (Perrin et al., 2006). La forte production de ROS provoque directement le stress du RE dans les motoneurones. Les ROS modifient la perméabilité des canaux calciques situés sur la membrane plasmique du RE (pour revue : Foufelle et Ferré, 2007). Le Ca²⁺ contenu dans le RE est alors libéré dans le cytoplasme des motoneurones, où le Ca²⁺ est déjà surabondant en raison de l'excitotoxicité glutamatergique. Le stress du RE modifie l'expression des gènes des motoneurones, en activant deux facteurs de transcription (pour revue : Fofelle et Ferré, 2007) : le facteur CREB (*cyclic AMP response element binding protein*), activé par le Ca²⁺ libéré du RE, et le facteur eIF2 α (*eukaryotic initiator factor 2 α*), phosphorylé par une kinase située sur la membrane du RE et activée directement par le stress. Il provoque également l'apoptose, en stimulant des molécules de signalisation pro-apoptotiques, telle la caspase-12 située sur la face cytoplasmique du RE et la kinase ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) (Wootz et al., 2006). ASK1 module la transcription du génome des motoneurones via l'activation des voies de signalisation des kinases JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) et p38 (*mitogen activating protein kinase p38*) (Benhar et al., 2001). L'activation de p38 est persistante dans les motoneurones des souris SLA ; elle est corrélée à l'évolution de la maladie (Tortarolo et al., 2003). Dans la SLA, le stress de RE participerait activement à l'induction de l'apoptose dans les motoneurones (Saxena et al., 2009)

Par ailleurs, La mutation de la SOD1, en plus de produire des ROS, induit une augmentation de la disponibilité en ions métalliques de cuivre et de zinc. De façon surprenante, l'expression des métallothionéines, des protéines jouant un rôle protecteur contre ces ions, est diminuée dans la moelle épinière des patients atteints de SLAs (Hozumi et al., 2008). Chez les souris SLA, la diminution de l'expression de ces métallothionéines par manipulation génétique accélère la dégénérescence des motoneurones, l'apparition et la progression de la maladie associée (Puttapparthi et al., 2002), suggérant ainsi leur implication dans la pathologie de la SLA.

2-5.2. Implication des récepteurs de mort

La mort des motoneurons dans la SLA fait intervenir également l'activation de la voie Fas/FasL, une voie extrinsèque de l'apoptose spécifique à ce type de neurones (Raoul et al., 1999). Cette voie participe à l'activation de p38 et à la transcription de la nNOS. L'excès de NO• ainsi produit serait responsable de l'hypersensibilité des motoneurons à la voie apoptotique Fas/FasL observée chez les souris SLA (Raoul et al., 2002). L'ajout de NO• dans le milieu, à des concentrations sans effet sur des motoneurons sauvages, suffit à provoquer la mort *in vitro* des motoneurons exprimant la SOD1 mutée. Il existerait une boucle d'amplification NO•/Fas/FasL (Raoul et al., 2006) : le NO• produit en réponse à l'activation de la voie Fas/FasL induirait la surexpression de FasL.

Dans la moelle épinière des patients SLA, les cellules microgliales activées produisent du TNF α en grande quantité (Cereda et al., 2008). Dans la moelle épinière des souris SLA, l'augmentation du TNF α est observée lors de l'apparition des symptômes (Hensley et al., 2006). Les motoneurons spinaux surexpriment les récepteurs au TNF α (TNFR1) via l'activation permanente de la p38 (Veglianese et al., 2006). La liaison du TNF α au TNFR1 augmenterait la production mitochondriale de ROS et modifierait l'expression du génome des motoneurons via l'activation du facteur de transcription NF κ B (*nuclear factor κ B*).

Au final, l'activation de ces récepteurs à la surface des motoneurons induisent l'activation en cascade de cystéine-aspartate protéases appelées caspases (Guégan et al., 2001). La caspase-3, un des effecteurs finaux, dégrade des composants cellulaires majeurs tel l'ADN ce qui provoquent la mort de la cellule.

3- Les origines cellulaires de la SLA : une maladie qui ne touche pas que les motoneurones

Les recherches sur les mécanismes physiopathologiques de la SLA se sont focalisées sur les motoneurones, cibles sélectives de la maladie. Cependant, l'expression de la SOD1 mutée restreinte aux motoneurones chez la souris, après la naissance, ne génère pas de syndrome SLA ou de signes décelables de maladie du motoneurone (Pramatarova et al., 2001 ; Lino et al., 2002). Au contraire, l'excision du gène SOD1 muté uniquement dans les motoneurones des souris SLA retarde l'apparition de la maladie, mais pas sa progression (Boillee et al., 2006). Les créations de souris SLA chimères ont montré qu'un motoneurone porteur de transgènes SOD1 mutés pouvait survivre dans un environnement riche en cellules « sauvages » (ne portant pas de transgènes), alors qu'un motoneurone « sauvage » placé dans un environnement riche en cellules porteuses de transgènes SOD1 mutés pouvait développer des marqueurs histopathologiques de la SLA (Clement et al., 2003 ; pour revue : Pettmann et al., 2006). Ceci suggère que d'autres types cellulaires pourraient être impliqués dans la neurodégénérescence associée à la mutation de la SOD1 dans la SLA. Dans ce contexte, l'implication des cellules du système nerveux central (SNC) et périphérique a été envisagée.

Deux grands types de cellules sont présents dans le SNC : les neurones et les cellules gliales. Les cellules gliales représentent près de 90 % des cellules du SNC ; elles jouent un rôle essentiel dans la nutrition et la stabilité structurelle des neurones, notamment dans la fonctionnalité des connexions synaptiques (pour revue : Kriegstein et Götz, 2003). Deux classes de cellules gliales se distinguent en fonction de leurs précurseurs : les cellules microgliales sont dérivées des monocytes, alors que les astrocytes et les oligodendrocytes sont dérivées des glioblastes. L'utilisation de souris SLA chimères et de modèles cellulaires *in vitro* ont mis en évidence l'implication directe des motoneurones (Boilée et al., 2006 ; Jaarsma et al., 2008), des astrocytes (Gong et al., 2000 ; Yamanaka et al., 2008) et des cellules microgliales (Sargsyan et al., 2005 ; Boilée et al., 2006), dans les processus physiopathologiques de la SLA. L'expression de la SOD1 mutée par les astrocytes ou les cellules microgliales déclenche des mécanismes neurotoxiques, alors que l'excision du gène SOD1 muté dans ces cellules ralentit la progression de la maladie chez les souris SLA, mais n'a pas d'effet sur l'apparition des symptômes. Ces résultats, ainsi que la présence d'astrocytes et de cellules microgliales activées aux sites des motoneurones dégénérescents, confortent la théorie d'un « suicide assisté » des motoneurones

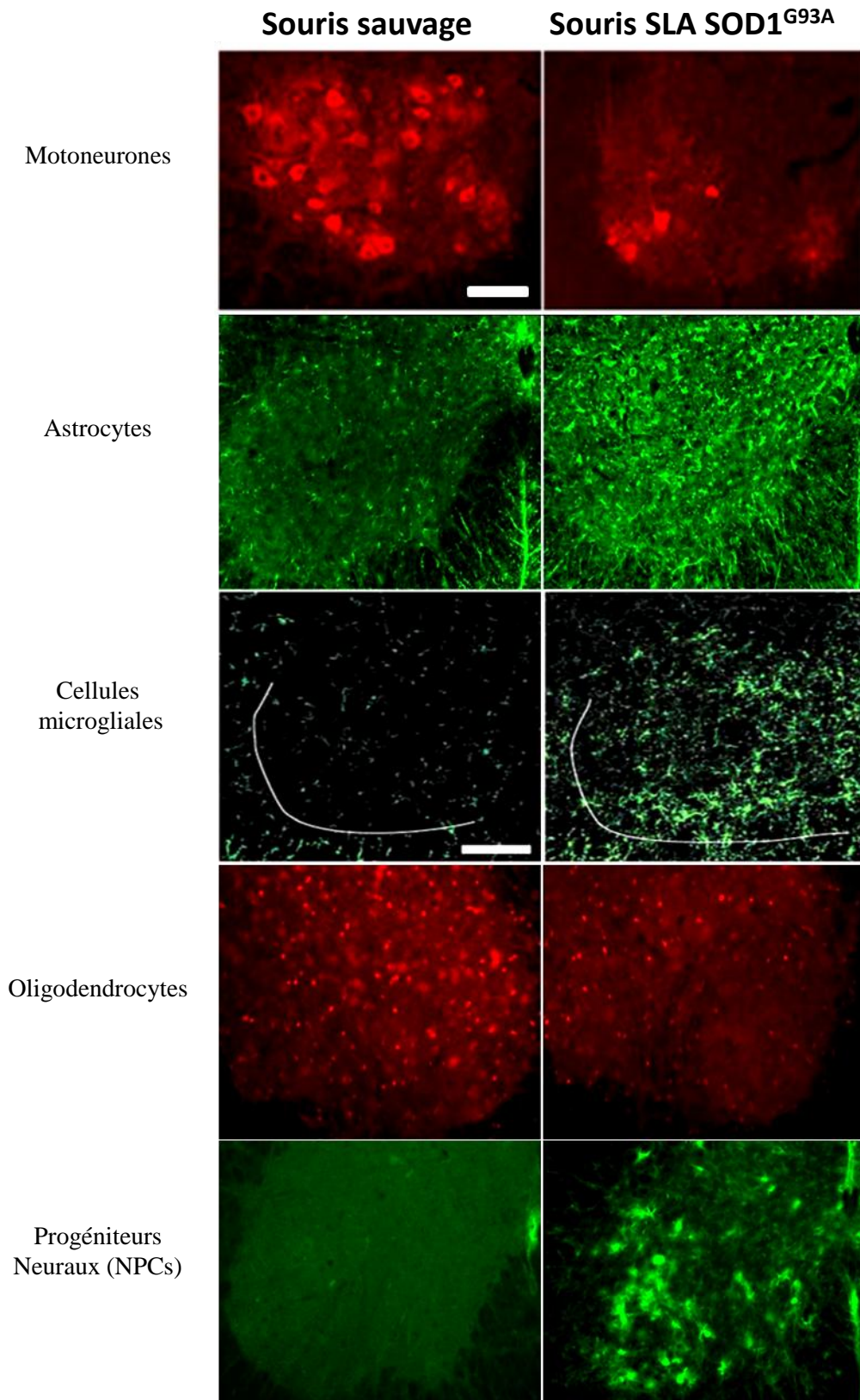


Figure 8 : Modifications des populations cellulaires de la moelle épinière mises en évidence chez les souris SLA SOD1^{G93A} à P115.

Chaque population cellulaire peut être mise en évidence dans la corne ventrale par une immunohistochimie fluorescente dirigée contre un antigène spécifique : les motoneurones par la Choline-Acétyl Transférase (ChAT) et la localisation, les astrocytes par la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP), les cellules microgliales par le cluster de différenciation CD11b, les oligodendrocytes par l'anhydrase carbonique de type II (CAII) et les progéniteurs neuraux par la nestine. (Photographies issues de Deforges et al., 2009 et Saxena et al., 2009 pour les cellules microgliales – le trait indique la limite de la substance grise).

émise par Pettmann et ses collaborateurs (2006). La mort des motoneurones dans la SLA serait la résultante de l'activation triangulaire motoneurones / astrocytes / cellules microgliales, par le biais de facteurs toxiques sécrétés par chacun de ces types cellulaires.

Cependant, l'utilisation des souris chimériques a montré également que la dégénérescence des motoneurones et la mort des animaux sont inévitables, bien que la SOD1 mutée ne soit pas exprimée dans les cellules du SNC. L'hypothèse d'une origine de la SLA autre que centrale a donc été émise, notamment l'implication des cellules musculaires atteintes par la maladie et en communication directe avec les motoneurones.

3-1. L'origine centrale de la SLA

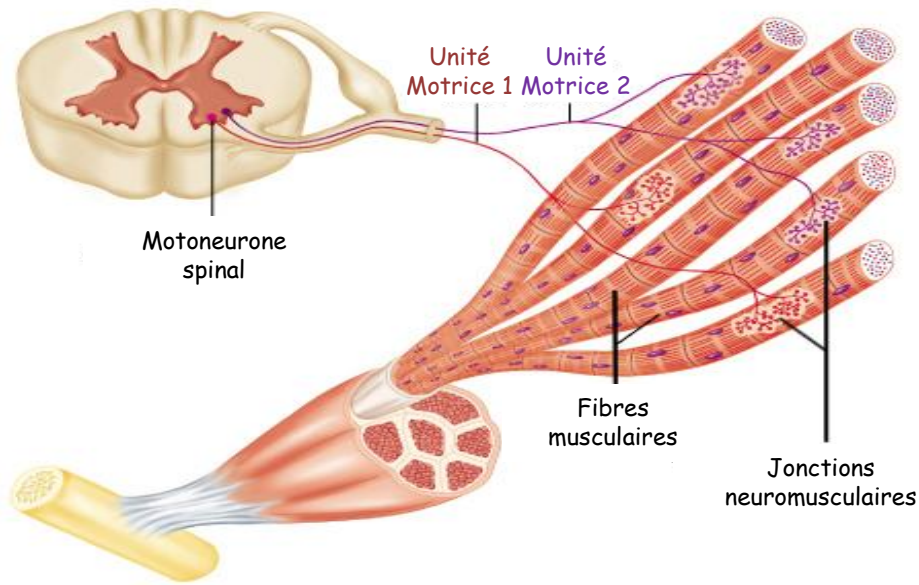
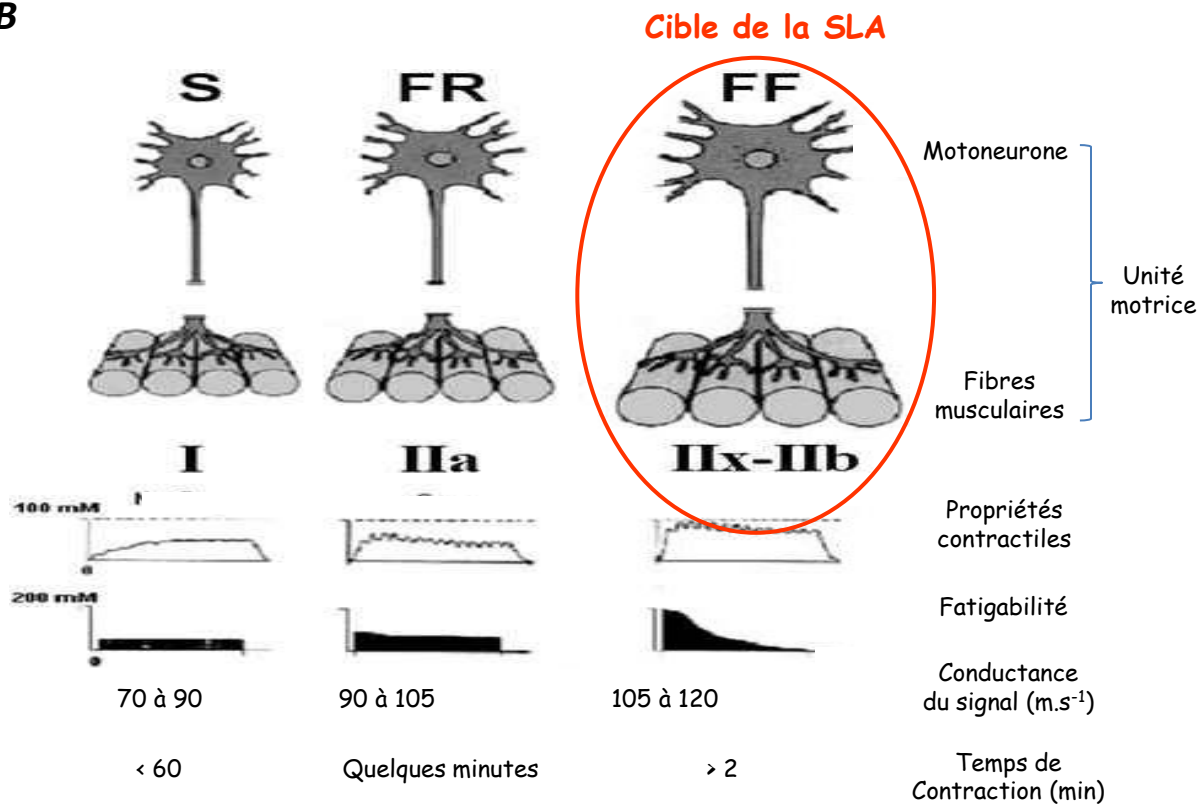
L'utilisation de souris SLA, de chimères et de modèles cellulaires *in vitro* ont permis d'identifier le rôle des différents types cellulaires du SNC et périphérique dans la SLA (Figure 8). Plusieurs mécanismes spécifiques de ces types cellulaires responsables de la mort sélective des motoneurones ont pu être mis en évidence.

3-1.1. Le rôle des motoneurones

Le motoneurone est la cible et l'acteur principal de la SLA (Boillee et al., 2006 ; Jaarsma et al., 2008). Ces cellules présentent une vulnérabilité particulière, mais toutes les sous-populations motoneuronales n'ont pas la même sensibilité à la maladie.

3-1.1.1. Caractéristique des populations de motoneurones spinaux

Dans le système moteur, les motoneurones ne fonctionnent pas comme des cellules isolées ; ils constituent une des entités de l'unité motrice. L'unité motrice représente la plus petite unité contractile fonctionnelle. Elle se décompose en trois parties : un motoneurone α , les jonctions neuromusculaires (JNM) et les fibres musculaires innervées par ce motoneurone (Figure 9 A). Les motoneurones et les muscles ont un développement indépendant, jusqu'au contact entre les terminaisons nerveuses et les fibres musculaires. Suite à la formation de la JNM, ces entités interagissent entre elles et dépendent l'une de l'autre. Il existe une corrélation entre les propriétés électriques du motoneurone, notamment son potentiel et sa fréquence de décharge, et les

A**B****Figure 9 : Détails des unités motrices**

(A) Représentation schématique de deux unités motrices, constituées d'un motoneurone et des fibres musculaires qu'il innervait par la formation d'une jonction neuromusculaire.

(B) Caractéristiques des différents types d'unité motrices en fonction de leur rapidité, selon le principe d'Henneman et Mendell (1991) : les unités motrices les plus lentes (S ; Slow), les intermédiaires (FR ; Fast Resistant) et les rapides (FF ; Fast Fatiguable). La SLA touche sélectivement les unités motrices FF les plus rapides.

propriétés mécaniques de l'unité motrice mature, c'est-à-dire sa force contractile (Henneman et Mendell, 1991 ; Burke, 1994).

Selon le principe d'Henneman, la taille du soma des motoneurons détermine leur ordre d'activation (Henneman et Mendell, 1991). Ce principe constitue la base de la commande motrice et détermine l'ordre de recrutement des unités motrices. La résistance d'entrée est inversement proportionnelle à la surface du soma : les motoneurons de faible surface présentent une grande résistance d'entrée, alors que les motoneurons de large surface présentent une faible résistance d'entrée. Ainsi, l'amplitude du potentiel post-synaptique excitateur est plus importante au niveau des motoneurons de faible surface qu'au niveau des motoneurons de large surface, afin d'induire une réponse plus efficace.

Chez les mammifères, les unités motrices se divisent en trois catégories selon leurs caractéristiques fonctionnelles et morphologiques (Figure 9 B) :

- les unités motrices rapides et fatigables (*Fast Fatigable*, FF)

Elles se caractérisent par des motoneurons d'un soma de surface supérieure à $600 \mu\text{m}^2$ et d'un axone de large diamètre, où la vitesse de conduction du signal est rapide (105 à $120 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). Les fibres musculaires innervées par ces larges motoneurons sont de type rapide. Chez la souris, on distingue deux types d'unités motrices FF en fonction des fibres musculaires qui les composent : les unités motrices FF-IIb constituées de fibres qui expriment la chaîne lourde de la myosine Iib (MyHC-IIb, *myosin heavy chain*) au métabolisme énergétique essentiellement glycolytique et les unités motrices FF-IIx constituées de fibres MyHC-IIx plus lentes au métabolisme mixte à dominance glycolytique. Chez l'homme, seules les unités motrices FF-IIx constituent le type FF. Ces unités motrices composées d'un grand nombre de fibres musculaires produisent des contractions phasiques, d'une grande intensité mais de courte durée (moins de 2 minutes).

- Les unités motrices lentes (*Slow*, S)

Elles se caractérisent par un motoneurone d'un soma de surface inférieure à $300 \mu\text{m}^2$ et d'un axone de faible diamètre, où la vitesse de conduction du signal est lente (70 à $90 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). Les fibres musculaires innervées par ces motoneurons sont de type lent : très vascularisées, elles expriment la MyHC-I et leur métabolisme énergétique est essentiellement aérobie oxydatif, incluant le catabolisme des lipides. Ces unités motrices composées d'un faible nombre de fibres musculaires produisent des contractions toniques, de faible intensité mais de longue durée (plus d'1 heure).

- Les unités motrices résistantes (*Fast Resistant*, FR)

De propriétés intermédiaires, elles permettent un continuum fonctionnel entre les unités FF et S. Elles se caractérisent par un motoneurone dont la surface du soma est comprise entre 300 et 600 μm^2 et un axone de diamètre moyen. La vitesse de conduction du signal est proportionnelle au diamètre de l'axone. Les fibres musculaires innervées par ces motoneurones ont une vitesse de contraction intermédiaire et leur métabolisme énergétique est mixte. Les unités motrices FR sont constituées de fibres MyHC-IIa relativement rapides au métabolisme mixte à dominance oxydative. Ces unités motrices sont composées d'un nombre variable de fibres musculaires en fonction de la nature du muscle. Elles produisent des contractions assez fortes sur plusieurs minutes.

3-1.1.2. Vulnérabilité sélective des motoneurones à la SLA

La SLA touche plus particulièrement les motoneurones de large surface de soma associés aux unités motrices FF, alors que les motoneurones associés aux unités motrices S et FR semblent plus résistants à la maladie (Frey et al., 2000 ; Pun et al., 2006 ; Hegedus et al., 2007). Dans la SLA, les populations motoneuronales spinales peuvent donc être classées en deux catégories : les motoneurones vulnérables à la SLA impliqués dans les unités motrices très rapides et les motoneurones résistants impliqués dans les unités motrices plus lentes (Saxena et al., 2009). Les motoneurones sensibles à la SLA présentent d'importantes modifications de l'expression de leur génome et ce dès l'apparition de symptômes chez les souris SLA (Vlug et al., 2005 ; Malaspina et al., 2010). Ils peuvent être identifiés par la présence abondante de deux marqueurs de la détresse cellulaire : la protéine c-Jun phosphorylée - un composant du facteur de transcription AP-1 - et le facteur de transcription ATF-3 (*activating transcription factor 3*) qui est un membre de la famille des facteurs ATF/CREB. Le facteur ATF-3 pourrait être un marqueur des motoneurones vulnérables ; son expression est augmentée bien avant la détection de la forme active de la caspase-3 (Vlug et al., 2005).

Les motoneurones des patients SLA présentent des propriétés électrophysiologiques anormales, en particulier une hyperexcitabilité axonale (Kanai et al., 2006) et une hyperpolarisation membranaire (Vucic et al., 2007 et 2006). Ces altérations pourraient être dues à des perturbations de la structure, de la fonction et de l'expression des canaux ioniques. Chez les patients atteints de SLAs, des dysfonctionnements des canaux potassiques ont notamment été mis en évidence (Jiang et al., 2005).

L'étude précoce des motoneurones des souris SLA révèle des modifications des propriétés électriques et morphologiques, bien avant l'apparition des symptômes. Les motoneurones spinaux des souris SLA SOD1^{G93A} embryonnaires (E12-E14) présentent *in vitro* une hyperexcitabilité intrinsèque, due à l'augmentation des courants entrants sodiques persistants (Kuo et al., 2005). Juste après la naissance (P4-P10), les motoneurones des souris SLA SOD1^{G85R} ont une surface de soma et un diamètre des dendrites primaires similaires à ceux de souris sauvages, mais leurs arborisations dendritiques présentent des différences significatives en termes de paramètres morphométriques (Amandola et al., 2007 et 2008). La ramification et la croissance anormales des dendrites des motoneurones des souris SLA suggèrent un défaut dans les mécanismes d'élagage, actifs normalement pendant cette période du développement post-natal. Ces données suggèrent que les motoneurones des souris SLA présenteraient un retard de développement par rapport aux souris sauvages. Ces résultats indiquent que la SOD1 mutée agirait très tôt sur les motoneurones spinaux ; l'immaturation des motoneurones des souris SLA SOD1^{G85R} serait directement liée aux propriétés toxiques de la SOD1 mutée (Pambo-Pambo et al., 2009). Cette immaturité pourrait dépendre de la perturbation du transport axonal rétrograde mis en évidence dès E13 chez les souris SLA SOD1^{G93A} (Kieran et al., 2007).

3-1.1.2.1. Sensibilité à l'excitotoxicité glutamatergique

Les motoneurones sont particulièrement sensibles à l'excitotoxicité glutamatergique, en raison de l'expression particulière des récepteurs au glutamate à leur surface et de leur dépendance aux astrocytes pour la régulation de ce neurotransmetteur. Par rapport aux autres neurones, les motoneurones spinaux expriment naturellement un taux élevé de récepteurs NMDA (Tölle et al., 1993).

La présence de la sous-unité NR2B dans la composition des récepteurs NMDA définirait les populations motoneuronales sensibles à la SLA (Fuller et al., 2006). Chez les souris SLA, les motoneurones du noyau bulbaire de l'hypoglosse, qui innervent la langue, sont sensibles à l'excitotoxicité glutamatergique et expriment une forte proportion de sous-unité NR2B, alors que les motoneurones oculomoteurs qui sont résistants l'expriment en plus faible proportion (Fuller et al., 2006). Les motoneurones spinaux expriment également des récepteurs AMPA exclusivement déficients en sous-unité GluR2 et donc perméables au Ca²⁺ (Williams et al., 1997 ; Kawahara et al., 2004).

De plus, les motoneurones des souris SLA présentent un déficit en Parvalbumine et Calbindine, deux protéines tampons du Ca²⁺ (Sasaki et al., 2006). N'étant plus séquestré par ces

protéines, le Ca^{2+} affluant via les récepteurs NMDA et AMPA augmente sous la forme libre dans le cytoplasme. Ainsi disponible, le Ca^{2+} active des protéines cytoplasmiques dépendantes du Ca^{2+} , qui produisent des dommages cellulaires et un stress oxydant intense.

3-1.1.2.2. Sensibilité sélective au stress oxydant

Les neurones sont particulièrement sensibles aux dommages produits par les ROS, notamment par l' $\text{O}_2^{\cdot-}$, car ils ne possèdent pas de mécanismes de défense anti-oxydante suffisamment efficaces (Halliwell, 2006). Plus que tout autre neurone, les motoneurones sont particulièrement vulnérables à la perte des fonctions mitochondriales (Schönfeld et Reiser, 2007). Avec l'âge, la génération de ROS par les mitochondries motoneuronales n'est pas modifiée, mais la capacité de stockage du Ca^{2+} de celles-ci diminue. Cette particularité pourrait expliquer l'apparition tardive des symptômes malgré l'origine génétique de la SLA, dans les modèles basés sur la mutation de la SOD1. La SLA apparaîtrait lorsque le motoneurone ne pourrait plus faire face aux dysfonctionnements qu'il subit. De plus, les motoneurones ont un métabolisme important qui nécessite la production abondante d'ATP dépendante de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Une diminution de la respiration mitochondriale et de la synthèse d'ATP ont été rapportées dans les motoneurones des patients (Wiedemann et al., 2002) et des souris SLA (Jung et al., 2002). Sans ATP, les motoneurones ne peuvent actionner leurs pompes calciques dépendantes de l'ATP, qui participent au rejet de l'excès de Ca^{2+} cytoplasmique dans le milieu extracellulaire.

Par ailleurs, l'expression des gènes des motoneurones des souris SLA est largement modifiée ; ces modifications accentuent la sensibilité des motoneurones au stress oxydant et à l'apoptose (Kirby et al., 2005 ; Perrin et al., 2006 ; Ferraiuolo et al., 2007). La sélectivité des motoneurones FF par les mécanismes de la SLA s'expliquerait en partie par l'inadéquation de leur système de défense contre le stress oxydant. En effet, les motoneurones FF des patients et des souris SLA présentent une diminution des protéines régulatrices majeures du système cellulaire d'oxydoréduction telles la peroxiredoxine-II, la L-glutathion peroxydase (Kato et al., 2005) et la thiorédoxine réductase-1 (Mitchell et al., 2009). De par ce fait, seule cette population motoneuronale présente une sensibilité au stress du RE (Saxena et al., 2009). A l'inverse, les motoneurones S et FR ont un système redox efficace ; ils sont donc moins sensibles au stress oxydant induit par la SLA.

3-1.1.2.3. Sensibilité à l'apoptose

Dans la SLA, les motoneurones présentent une hypersensibilité à l'apoptose, qui fait intervenir l'activation de voies de signalisation de mort spécifiques, notamment les voies NO•/Fas/FasL (Raoul et al., 1999 et 2006) et NGF/p75^{NTR} (Seeburger et al., 1993 ; Pehar et al., 2007). L'expression des principaux régulateurs de la voie intrinsèque de l'apoptose est modifiée que ce soit au niveau transcriptionnel ou traductionnel : les protéines pro-apoptotiques Bad et Bax sont surexprimées, alors que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl sont réprimées (Mu et al., 1996 ; Gonzalez de Aguilar et al., 2000).

Dès la phase asymptotique, les souris SLA présentent un pourcentage significativement augmenté de motoneurones exprimant FasL, par rapport aux souris sauvages (Raoul et al., 1999). Les motoneurones des souris SLA présentent une hypersensibilité à la mort induite par la voie Fas/FasL, potentialisée par le NO• synthétisé directement par les motoneurones ainsi que par les cellules microgliales (Raoul et al., 2006 ; Chen et al., 2009).

De plus, les motoneurones des patients SLA à l'âge adulte expriment anormalement les récepteurs p75^{NTR} (*p75 neurotrophin receptor*) (Seeburger et al., 1993). Normalement, ces récepteurs ne sont exprimés par les motoneurones que pendant la période embryonnaire (Yan et al., 1988), mais leur expression peut être induite chez l'adulte par l'axotomie (Koliatsos et al., 1991). Dans la SLA, le NGF (*nerve growth factor*) abondamment sécrété par les astrocytes activés se fixe sur ces récepteurs p75^{NTR}, dont l'activation induit l'efflux d'ion K⁺ et des mécanismes d'apoptose (Pehar et al., 2004), notamment l'augmentation de la production de O₂^{-•} mitochondrial et la libération du cytochrome c dans le cytoplasme (Pehar et al., 2007). Chez les souris SLA, cette sensibilité particulière des motoneurones au NGF est corrélée à la diminution des défenses antioxydantes. L'activation des récepteurs p75^{NTR} provoque la diminution de l'expression du facteur nucléaire Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) impliqué dans la transcription des gènes possédant une séquence ARE, et la régulation négative des enzymes impliquées dans la biosynthèse du glutathion (Pehar et al., 2007), un antioxydant majeur contre les radicaux libres oxygénés.

L'expression du génome des motoneurones est également largement modulée par l'activation persistante par phosphorylation des kinases JNK (Benhar et al., 2001) et p38 (Tortarolo et al., 2003). Ces kinases phosphorylent des facteurs de transcription impliqués dans l'induction de la mort neuronale (pour revue : Kim et Choi, 2010).

3-1.2. Le rôle des astrocytes

Les astrocytes jouent un rôle actif dans le développement et le fonctionnement normal des neurones, par la sécrétion de nombreux facteurs neurotrophiques (pour revue : Rothstein et al., 1996). Ces cellules gliales ont une fonction métabolique essentielle pour les motoneurones : ils sont le lieu de stockage du lactate indispensable au fonctionnement des motoneurones et maintiennent l'homéostasie ionique du milieu extracellulaire via un ensemble de pompes ioniques. Ils participent également au contrôle de l'action des neurotransmetteurs en prévenant leur accumulation au niveau de la fente synaptique.

L'astrogliose réactionnelle - prolifération et activation des astrocytes - dans la moelle épinière est une des caractéristiques histopathologiques de la SLA, chez les patients et les modèles animaux (Hall et al., 1998 ; Kushner et al., 1991). Normalement, lors de dommages cérébraux, les astrocytes prolifèrent et sécrètent des facteurs neurotrophiques qui participent à la réparation des synapses, à la néo-neurogenèse et à la protection du tissu nerveux non affecté. Au contraire, l'astrogliose réactionnelle déclenchée dans la SLA participerait activement à la mort des motoneurones (Yamanaka et al., 2008 ; Staats et Van den Bosch, 2009).

3-1.2.1. Implication dans l'excitotoxicité glutamatergique

Les astrocytes sont chargés d'éliminer certains neurotransmetteurs de l'espace synaptique. Ils expriment notamment des transporteurs transmembranaires de haute affinité au glutamate (EAAT1 et 2 chez la souris et Glut1 chez l'homme), qui captent 80% du glutamate synaptique et le convertissent en glutamine, un acide aminé non toxique pour les neurones (pour revue : Rothstein et al., 1996).

Dans la SLA, les astrocytes jouent un rôle majeur dans l'excitotoxicité glutamatergique et participent à l'auto-amplification du phénomène (Yamanaka et al., 2008 ; Staats et Van den Bosch, 2009). Chez les souris SLA, les astrocytes activés présentent une diminution de 80% de leur efficacité de captage du glutamate ; cette inefficacité est due à une inhibition post-traductionnelle des transporteurs EAAT2 par la SOD1 mutée (Trotti et al., 1999). La SOD1 mutée catalyse l'oxydation par l' H_2O_2 de la partie C-terminale cytosolique de EAAT2, qui induit son clivage protéolytique par la caspase-3 (Boston-Howes et al., 2006). Les motoneurones ont un impact direct sur le fonctionnement des astrocytes qui les environnent (Carriedo et al., 2000), notamment par les peroxy-nitriles produits qui diminuent également l'efficacité des transporteurs astrocytaires EAAT2 (Rao et al., 2003).

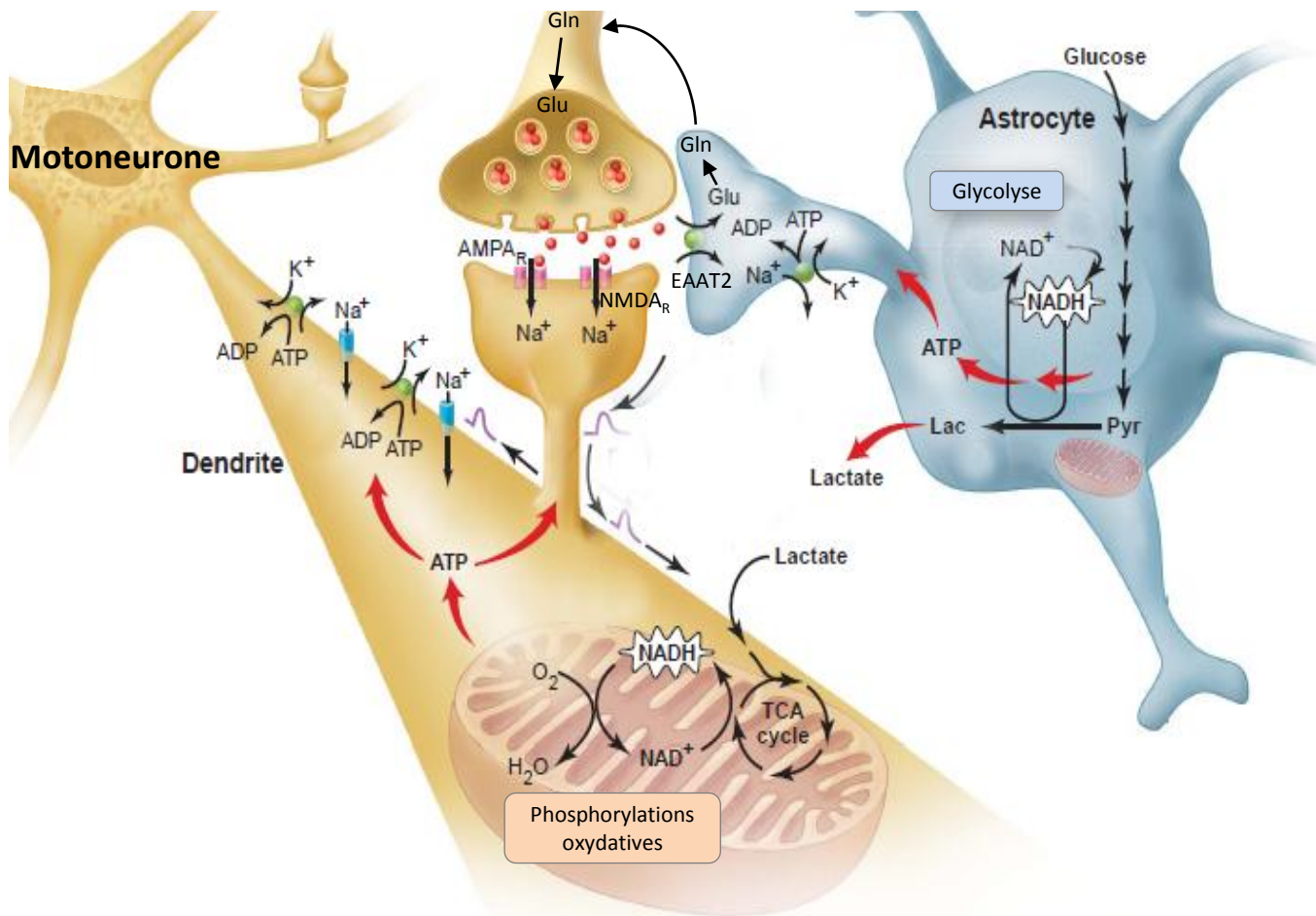


Figure 10 : Modèle du couplage métabolique à l'activité synaptique

Au niveau de la synapse excitatrice, les astrocytes capturent l'excès de glutamate via les transporteurs EAAT. Le glutamate capturé est converti en glutamine sous l'action de la glutamine synthase. La glutamine est directement utilisée par les neurones pré-synaptiques pour synthétiser du glutamate. Cette réaction demande de l'ATP ; la glycolyse est alors activée dans les astrocytes et le glucose est transformé en lactate. Le Lactate produit par les astrocytes est la source principale d'énergie des neurones post-synaptique. Il est utilisé pour produire l'énergie nécessaire à la propagation du potentiel d'action induit par la fixation du glutamate sur les récepteurs AMPA et NMDA (d'après Pellerin et al., 2004).

De plus, l'état d'activation des astrocytes agirait directement sur la régulation de la transcription des motoneurones. Les sécrétions des astrocytes activés seraient responsables de l'expression des récepteurs AMPA perméables au Ca^{2+} , à la membrane des motoneurones (Van Damme et al., 2007) ; la diminution de leur sécrétion en VEGF régule négativement le taux d'ARNm GluR2 dans les motoneurones (Bogaert et al., 2010).

3-1.2.2. Modification du métabolisme neuronal

La diminution de la capture du glutamate par les astrocytes activés perturbe également le couplage neuro-métabolique existant entre les astrocytes et les motoneurones (Figure 10) (Magistretti et al., 1999 ; Aubert et Costalat, 2005a). Les motoneurones demandent une forte quantité d'énergie pour soutenir leur activité synaptique et réguler leur homéostasie ionique par le fonctionnement de pompes ioniques. Ils utilisent comme source principale d'énergie, l'oxydation du lactate produit par les astrocytes à partir du glucose ; le glucose constitue seulement 20% de leurs apports énergétiques (Magistretti et al., 1999). Dans les astrocytes, le glutamate importé dans le cytoplasme conditionne l'entrée du glucose qui est transformé en lactate par glycolyse anaérobie, afin de fournir l'énergie nécessaire à la transformation du glutamate en glutamine. Le lactate est ensuite rejeté dans le milieu extérieur et pompé par les motoneurones.

Chez les patients SLA, les astrocytes activés présentent une diminution de leur transporteur au lactate MCP-1 et libèrent moins de lactate dans le milieu extracellulaire (Magistretti, communication 2009). Privés de cette source énergétique majeure, les motoneurones SLA doivent adapter leur métabolisme énergétique, afin d'utiliser directement le glucose. Malheureusement, l'activation de la glycolyse dans les motoneurones SLA les rend encore plus sensibles au stress oxydant, notamment par la diminution de la quantité de NADPH disponible pour la protection contre les radicaux libres (Herrero-Mendez et al., 2009).

3-1.2.3. Dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique

Les astrocytes jouent un rôle de structure dans la maintenance de la barrière hémato-encéphalique (BHE, ce terme désigne ici à la fois la « blood-brain barrier » et la « blood-spinal cord barrier ») (Figure 11). Ils interagissent avec les cellules endothéliales des capillaires sanguins qui irriguent le SNC pour constituer les unités neurovasculaires impliquées dans la régulation du flux sanguin cérébral (Abbott et al., 2006). La BHE est une barrière anatomique de transport sélectif entre le sang et le système nerveux central. Elle filtre et règle les échanges moléculaires à

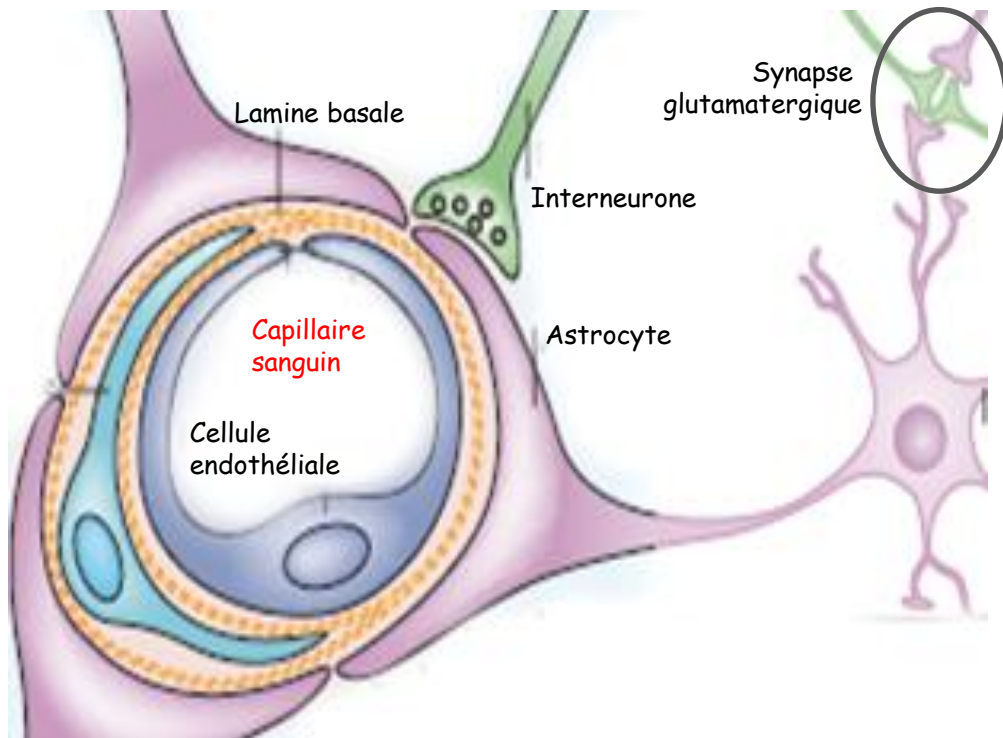


Figure 11 : Constitution cellulaire de la barrière hémato-encéphalique

Les cellules endothéliales entourées de la lamine basale et des prolongements des astrocytes forment la BHE.

l'interface entre le sang et le fluide interstitiel du tissu nerveux encéphalique ou spinal. Elle facilite l'entrée des nutriments nécessaires aux cellules et permet l'écoulement de composés potentiellement nocifs.

Dès l'apparition des symptômes, les souris SLA présentent de larges perturbations de la BHE, dans toutes les régions du cerveau et de la moelle épinière (Garbuzova-Davis et al., 2007). Ces dysfonctionnements sont dus à de fortes désorganisations des astrocytes activés et des cellules endothéliales qui la constituent. Comme dans les motoneurones, la dégénérescence des mitochondries, le gonflement du RE et la présence de vacuoles cytoplasmiques ont été observés dans ces cellules (Garbuzova-Davis et al., 2007). La formation progressive d'œdèmes extracellulaires dans les tissus nerveux a également été mise en évidence. Ces œdèmes sont associés à la rupture des capillaires par la dégradation de la membrane des cellules endothéliales et à la rétraction des prolongements astrocytaires (Garbuzova-Davis et al., 2007). Les ruptures des unités neurovasculaires provoqueraient des microhémorragies, qui contribueraient à la mort des motoneurones en diminuant l'approvisionnement en éléments nutritifs et l'enlèvement des déchets toxiques.

3-1.2.4. Modification de leurs sécrétions

Dans la SLA, les astrocytes activés présentent une activité sécrétoire modifiée (Ekestern et al., 2004). Les patients SLA présentent, au niveau de la moelle épinière, une diminution en facteurs neurotrophiques, qui conditionnent la survie et la plasticité des neurones environnants en influençant l'élongation de l'axone, tels le GDNF (*glial derived neurotrophic factor*), le CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) et le BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) (Ekestern et al., 2004).

Les astrocytes activés des patients SLA sécrètent également moins de facteurs angiogéniques, tel le VEGF (Brockington et al., 2006 ; Staats et Van den Bosch, 2009). Indépendamment de ses effets sur le système vasculaire, le VEGF stimule la croissance des neurites (Sondell et al., 2000), active la survie des neurones et promeut la neurogénèse (Jin et al., 2002). Cette sécrétion insuffisante de VEGF par les astrocytes activés contribuerait directement à la neurodégénérescence. En effet, une délétion dans la région promotrice du gène VEGF provoque une dégénérescence sélective des motoneurones (Oosthuysen et al., 2001) en favorisant l'excitotoxicité glutamatergique (Bogaert et al., 2010).

Par ailleurs, les astrocytes activés produiraient, sous l'effet de la SOD1 mutée, des facteurs solubles de nature encore inconnue, qui auraient un effet toxique direct sur les motoneurones sans pour autant activer les récepteurs de mort (Nagai et al., 2007). Dans la moelle épinière dégénérante, les astrocytes activés sécrètent également en plus forte quantité certains facteurs tel le NGF (Anand et al., 1995). Cette abondance de NGF provoquerait l'accumulation des mitochondries dans les motoneurones, en régulant leur distribution au niveau de l'axone (Chada et Hollenbeck, 2004) et en augmentant de leur production d'O₂[•] (Pehar et al., 2007). Elle activerait également l'apoptose via les récepteurs p75^{NTR} (Pehar et al., 2004).

3-1.3. Le rôle des cellules microgliales

Les cellules microgliales, un sous-type de macrophages, sont les cellules immunitaires du système nerveux central. L'inflammation est une des caractéristiques histopathologiques de la SLA : une microgliose - prolifération et activation des cellules microgliales - et une infiltration de lymphocytes au niveau des motoneurones dégénérants sont observées dans la moelle épinière des patients SLA (Troost et al., 1989 et 1990) et dans les modèles animaux (Hall et al., 1998). Chez les souris SLA, cette microgliose est observée très précocement vers P30, bien avant l'apparition des symptômes à P90 (Saxena et al., 2009). L'accumulation de SOD1 mutées dans les cellules microgliales et dans le milieu extracellulaire active directement cette microgliose (Zhao et al., 2007). Les microhémorragies vasculaires constatées dans la moelle épinière, par la rupture de la BHE, déverseraient des composés dérivés de l'hémoglobine qui participeraient à cette inflammation (Zhong et al., 2008).

De manière générale, l'activation des cellules microgliales génère un changement de morphologie et de l'expression des récepteurs de surface, ainsi que la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines (pour revue : Henkel et al., 2009). Dans la SLA, l'inflammation n'est pas une simple conséquence tardive de la dégénérescence des motoneurones ; l'état d'activation des cellules microgliales pourrait contribuer activement à la progression de la maladie (Zhong et al., 2008).

L'équilibre entre la neuroprotection et la neurotoxicité exercée par les cellules microgliales dépend de leur état d'activation. Initialement, les cellules microgliales activées sous la forme M2 ralentissent la progression de la SLA (Zhong et al., 2008). Elles sécrètent localement des cytokines anti-inflammatoires telles l'interleukine 4 (IL-4) et l'IL-10, ainsi que des facteurs de croissance tel l'IGF-1 (*insuline like growth factor type 1*) qui promeuvent la survie neuronale.

Puis, les cellules microgliales activées prennent la forme cytotoxique M1, dont les sécrétions contribuent à l'accélération de la SLA (Zhong et al., 2008). Elles sécrètent alors massivement des cytokines pro-inflammatoires tels l'IL-1 β et le TNF α , ainsi que des ROS qui participent à l'induction de l'apoptose dans les motoneurones. De plus, leurs sécrétions de NO• et de D-sérine, un agoniste des récepteurs NMDA, accroissent la vulnérabilité des motoneurones à la toxicité du glutamate (Sasabe et al., 2007).

3-1.4. Le rôle des cellules myélinisantes

Dans le système moteur, les cellules myélinisantes (oligodendrocytes / cellules de Schwann) jouent un rôle essentiel en formant une gaine de myéline tout au long des axones. Cet agencement permet la conduction saltatoire à grande vitesse du potentiel d'action et assure des économies d'énergie pour la propagation des influx nerveux.

Au niveau du SNC, les oligodendrocytes ont une relation bidirectionnelle avec les motoneurones. Au cours du développement, ils conditionnent mutuellement leur survie et leur différenciation, par le biais de facteurs sécrétés. Les patients SLA présentent des altérations de la myéline au niveau du faisceau pyramidal (Delisle et Carpenter, 1984). Le stress du RE induit par la SOD1 mutée serait responsable de la diminution du nombre d'oligodendrocytes constatée dans la moelle épinière des souris SLA (Ito et al., 2009).

Au niveau du système nerveux périphérique, les cellules de Schwann ont un rôle de support synaptique à la jonction neuromusculaire et soutiennent la régénération nerveuse (Chen et al., 2007 ; Woodhoo et Sommer, 2008). Lors de dommage du nerf, les cellules de Schwann phagocytent leur myéline puis guident et supportent la nouvelle excroissance de l'axone (processus de « sprouting ») par la synthèse de facteurs neurotrophiques (CNTF, GDNF, IGF-1), avant de le myéliniser à nouveau. Les cellules de Schwann sont directement impliquées dans certaines neuropathies ; dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth, la démyélinisation induit la dégénérescence des axones et la mort des motoneurones (Scherer et Wrabetz, 2008). Les patients SLA présentent également une altération de la myéline au niveau du nerf périphérique (Perrie et al., 1993), mais les cellules de Schwann semblent résistantes à l'agrégation de la SOD1 mutée. La suraccumulation de la SOD1 mutée dans les cellules de Schwann n'a pas d'effet sur la pathologie des souris SLA ; les souris chimériques exprimant uniquement la SOD1 mutée dans les cellules de Schwann ont une locomotion et une durée de vie identiques à celles des souris sauvages (Turner et al., 2010b). Cependant, de manière surprenante, l'excision de la SOD1 mutée

uniquement dans ces cellules accélère le développement de la maladie chez les souris SLA (Lobsiger et al., 2009). Dans ces conditions, les cellules de Schwann produisent moins d'IGF-1, ce qui limite le « sprouting » des axones dénervés ; la SLA développée est alors plus agressive.

Dans la SLA, les modifications des populations cellulaires myélinisantes ne seraient qu'une conséquence secondaire de la dégénérescence axonale massive (Turner et al., 2010b). Les cellules myélinisantes n'induiraient pas directement de processus neurodégénératifs, contrairement aux astrocytes et aux cellules microgliales.

3-1.5. Le rôle des pro-géniteurs neuraux

Les pro-géniteurs neuraux (NPCs, *neural progenitor cells*) présentent une grande plasticité (Hsieh et Gage, 2004). Sous l'action de différents facteurs trophiques, ils ont la capacité de se différencier en neurones ou en glioblastes, les précurseurs des oligodendrocytes et des astrocytes. Chez les souris SLA, une prolifération massive de NPCs apparaît autour du canal central, dans la zone épendimale de la moelle épinière, au cours de la phase pré-symptomatique (Chi et al., 2006). Les NPCs migrent dans les cornes ventrales, en passant préalablement par les cornes dorsales ; puis, elles perdent leur capacité de prolifération, lors de l'apparition des symptômes (Chi et al., 2006). Lorsque la paralysie se développe de manière asymétrique, les NPCs ne sont détectées que dans les cornes ventrales du côté ipsilatéral du membre inférieur paralysé (de Hemptinne et al., 2006).

D'après ces études, la présence de ces NPCs au niveau des sites de dégénérescence des motoneurones suggère que de nouveaux neurones pourraient restaurer le circuit moteur. En effet, une neurogénèse issue des NPCs a été établie dans le SNC adulte (Johansson et al., 1999). Les NPCs se différencient notamment en neurones sous l'effet du GDNF produit par les astrocytes et ces nouveaux neurones ont la capacité de remplacer fonctionnellement les neurones dégénérés (Hsieh et Gage, 2004).

Dans la SLA, la prolifération massive des NPCs pourrait être induite en réponse à la disparition des motoneurones, à moins qu'elle ne soit le reflet de l'astrogliose constatée. Malheureusement, les travaux de lignage du devenir de ces NPCs, dans la moelle épinière des souris SLA, sont restés vains (Chi et al., 2006 et 2007 ; Juan et al., 2007) ; il semble que ces NPCs ne se différencient pas et restent sous cette forme immature. Pour l'instant, l'accumulation et le rôle des NPCs au cours de la SLA reste une énigme.

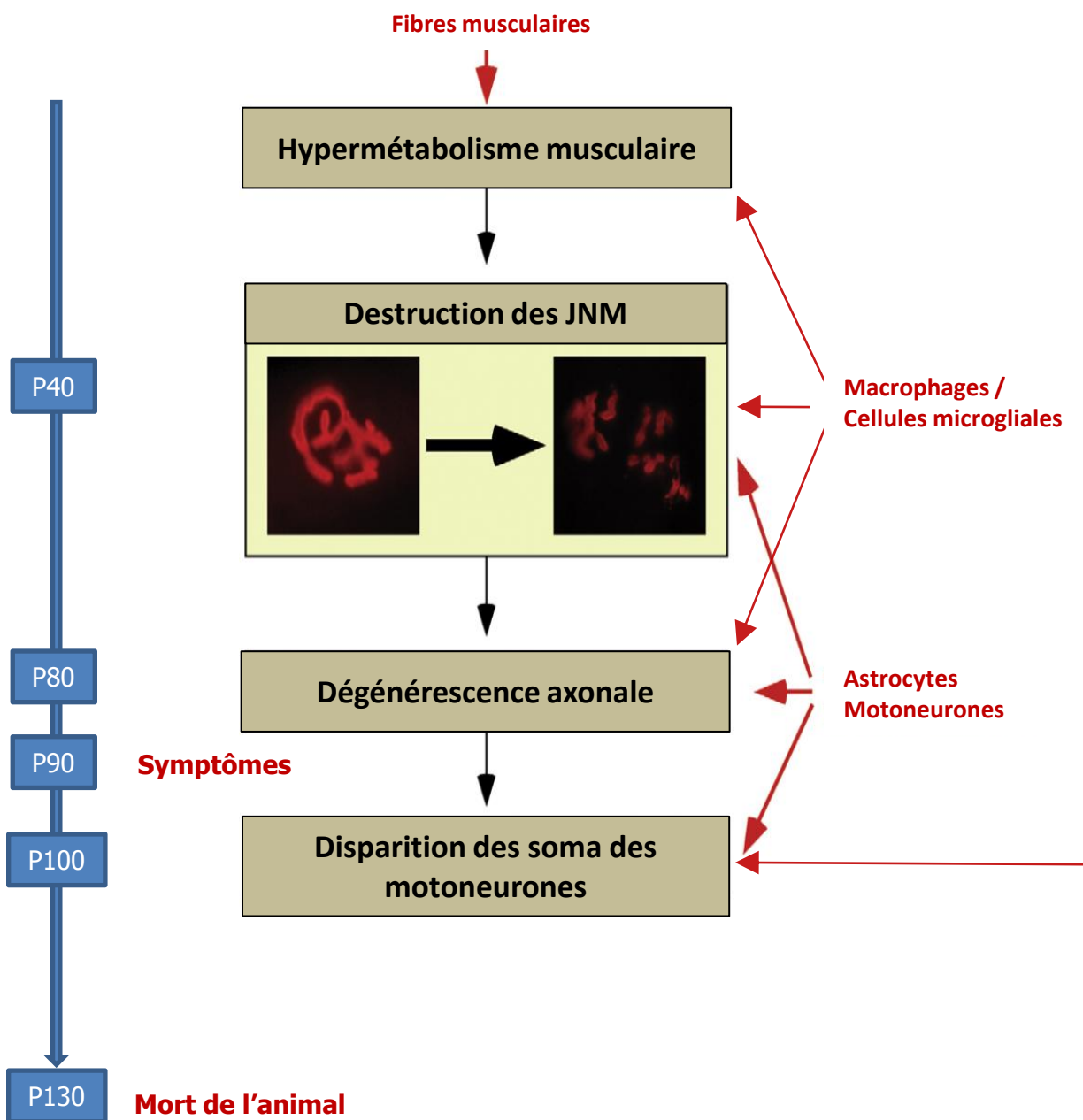


Figure 12 : Déroulement de la pathogénèse dans les souris SLA SOD1^{G93A}

L'expression spécifique de la SOD1 mutée dans différents types cellulaires a permis de mettre en évidence leur implication dans les principaux événements de la maladie. L'hypermétabolisme musculaire associé au déficit énergétique semble être l'évènement précoce. Il provoquerait la destruction de la jonction neuromusculaire, suivie par la dégénérescence de l'axone et la mort du motoneurone par apoptose (d'après Dupuis et Loeffler, 2009).

3-2. Les origines périphériques de la SLA

La SLA est définie comme une maladie du motoneurone, dont l'atteinte musculaire ne serait qu'une conséquence. Cependant, le motoneurone n'est pas une entité isolée, l'implication de la seconde entité de l'unité motrice, le muscle squelettique, a donc été envisagée dans la SLA.

3-2.1. L'atteinte musculaire primaire

Les souris SLA développent une SLA typique : les symptômes sont observés au niveau des pattes postérieures de l'animal (Gurney et al., 1994). A partir de P90, les souris SLA présentent une faiblesse musculaire associée à une aplasie (diminution du nombre de fibres qui constituent un muscle) et à une sévère atrophie (diminution du diamètre des fibres) dans les muscles squelettiques. Ces désordres conduisent à une réduction significative de la force musculaire.

L'analyse systématique des souris SLA en phase asymptomatique a révélé une diminution significative du nombre de JNM. Les dénervations des JNM débutent bien avant l'apparition des premiers symptômes : elles sont observées précocement puis s'étendent localement (Frey et al., 2000). A P40, lorsque la perte des unités motrices évaluée par mesure électro-myographique est constatée (Kennel et al., 1996), 40% des JNM sont dénervées (Frey et al., 2000). Ces dénervations précèdent largement la disparition des axones moteurs, dont le nombre diminue dans les ganglions ventraux de la moelle épinière à partir de P80 (Fischer et al., 2004). Elle précède également la disparition des somas des motoneurons spinaux, constatée à partir de P90 et corrélée à l'apparition des premiers symptômes (Chiu et al., 1995). Les pertes de 60% des axones et des corps cellulaires des motoneurons spinaux, quantifiées à P100, restent constantes jusqu'à la mort de l'animal (Fischer et al., 2004), mais seulement 10% du transport axonal rétrograde persiste (Parkhouse et al., 2008).

La SLA pourrait donc résulter d'une axonopathie distale (Fischer et al., 2004) : la dégénérescence du motoneurone serait la résultante d'un phénomène rétrograde. Suite à un dysfonctionnement synaptique périphérique d'origine musculaire, la déstabilisation de l'élément post-synaptique induirait la dénervation de la JNM, puis la rétractation de l'axone et la disparition du corps cellulaire du motoneurone (Figure 12). Cette théorie est confortée par plusieurs études de neuroprotection, qui ont montré que la préservation isolée des somas des motoneurons spinaux ne permettait pas de guérir les souris SLA (Gould et al., 2006 ; Rouaux et al., 2007 ;

Dewil et al., 2007). Par exemple, la suppression dans les motoneurones de la protéine proapoptotique Bax, un acteur majeur de la voie intrinsèque de l'apoptose dans la SLA, permet de préserver les motoneurones, mais n'évite pas la dénervation des JNM et l'atrophie musculaire (Gould et al., 2006). Ces atteintes périphériques persistantes sont suffisantes pour induire la mort des souris SLA. Les motoneurones ainsi préservés présentent un défaut dans le processus de « sprouting », qui ne leur permet pas de ré-innover les fibres musculaires dénervées.

3-2.1.1. Sensibilité de certaines fibres musculaires

Dans l'organisme, deux types de muscles squelettiques se distinguent en fonction de leur vitesse de contraction. Les muscles rapides sont constitués uniquement de fibres rapides de type II majoritairement IIb et IIx. Les muscles lents sont constitués à la fois de fibres lentes de type I et de fibres rapides intermédiaires de type IIa et IIx. Les études longitudinales des dénervations chez les souris SLA ont mis en évidence une sensibilité particulière des unités motrices FF les plus rapides, qui associe un motoneurone de large surface de soma et des fibres musculaires IIb (Frey et al., 2000 ; Pun et al., 2006 ; Hegedus et al., 2008). Les JNM des unités motrices FF-IIb hautement vulnérables sont dénervées les premières, puis cette dénervation s'étend aux FF-IIx. Les JNM des unités motrices S - les plus lentes - sont résistantes et persistent jusqu'à la phase terminale de la maladie. En conséquence, les muscles rapides du mollet (le *Tibialis antérieur* par exemple) des souris SLA présentent une diminution significative de leur force contractile à partir de P40, alors que les muscles lents (le *Soleus* par exemple) conservent leur force contractile (Hegedus et al., 2007).

Lors de l'apparition des symptômes à P90, les muscles rapides présentent une perte de 80% de leur force contractile, alors que 60% des unités motrices sont intactes (Hegedus et al., 2007). Bien que les somas des motoneurones soient toujours présents dans la moelle épinière, les fibres dénervées ne sont pas ré-innervées. Les racines dorsales de la moelle épinière lombaire des souris SLA présentent une augmentation du nombre d'axones de très petit diamètre et la proportion de fibres de type IIa augmente dans les muscles rapides (Fischer et al., 2004 ; Hegedus et al., 2008). Ceci traduit des phénomènes de « sprouting » des motoneurones S et FR ; les motoneurones FF semblent avoir perdu leur capacité de « sprouting ». Les signaux de régénération envoyés par les fibres IIb dénervées ne seraient pas adéquats pour maintenir la fonction des motoneurones FF (Parkhouse et al., 2008). Sans jonctions avec des fibres musculaires, ces motoneurones dégèreraient. La vulnérabilité particulière des JNM des fibres

Iib expliquerait ainsi la perte sélective des motoneurons de large surface des unités motrices FF au cours de la SLA.

3-2.1.2. Altération musculaire et dénerivation

Les souris invalidées pour le gène SOD1 ne développent pas les symptômes de la SLA et ne présentent pas d'importantes anomalies cellulaires dans la moelle épinière, mais des dénervations sont observées au niveau des muscles squelettiques (Shefner et al., 1999). Ces dénervations s'accroissent progressivement et précèdent une réduction du nombre d'axones moteurs fonctionnels dans le nerf sciatique. Chez ces souris invalidées pour le gène SOD1, des modifications du nombre et de la distribution des mitochondries musculaires ont également été observées (Kostrominova et al., 2007). Chez les souris SLA, la surexpression de la SOD1 mutée a un effet plus agressif dans les muscles que dans les motoneurons (Leclerc et al., 2001) : au cours de la phase asymptomatique, l'activité de la SOD1 mutée augmente dans les muscles squelettiques, avant d'augmenter dans la moelle épinière. Ces résultats suggèrent une sensibilité particulière du muscle à une altération fonctionnelle de la protéine SOD1.

3-2.1.2.1. Dysfonctionnement des mitochondries musculaires

Dans la SLA, les mitochondries musculaires présentent les mêmes anomalies structurales et fonctionnelles que les mitochondries motoneuronales : des agrégats de mitochondries vacuolisées ont été observés dans les fibres musculaires des patients SLA (Afifi et al., 1966), ainsi que chez les souris SLA (Leclerc et al., 2001) où les mitochondries musculaires s'amassent au niveau des JNM (Zhou et al., 2010). Mais contrairement aux motoneurons, les anomalies mitochondriales musculaires ne seraient pas seulement la conséquence de la surcharge mitochondriale en protéines SOD1 mutées, car les modèles animaux exprimant une SOD1 mutée stable par la mutation G93A ou instable par la mutation G85R présentent ces anomalies (Dupuis et al., 2006).

Des dysfonctionnements des mitochondries ont été mis en évidence dans les muscles squelettiques des patients atteints de SLAs (Wiedemann et al., 1998 ; Vielhaber et al., 1999). Les mitochondries musculaires présentent une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire. L'ADN mitochondrial est présent en plus faible quantité et de nombreuses mutations ont été mise en évidence ; ces mutations ont pour conséquence une diminution de l'expression de la citrate synthase, un marqueur enzymatique des mitochondries (Vielhaber et al., 2000).

Chez les souris SLA SOD1^{G85R}, les mitochondries musculaires présentent également une altération de l'activité des complexes respiratoires I et III qui induit une surproduction de ROS (Mattiuzzi et al., 2002) et une diminution de la synthèse d'ATP (Dupuis et al., 2003). Chez les souris SLA SOD1^{G93A}, la dépolarisation des membranes mitochondriales induit un stress osmotique et la libération d'une vague calcique produisant un stress oxydant, notamment par la production de NO• sous l'activation de la iNOS mitochondriale (Zhou et al., 2010). Ce stress oxydant est corrélé à la modulation négative de l'expression génique d'effecteurs de la détoxification des ROS (Jokic et al., 2003 ; Gonzalez de Aguilar et al., 2008). L'accumulation de ROS dans le cytoplasme des fibres musculaires active l'autophagie, l'un des principaux mécanismes de dégradation intracellulaire, responsable de l'atrophie des fibres musculaires et de la perte du volume musculaire visibles bien avant l'apparition des symptômes chez les souris SLA (Muller et al., 2007). Ce stress oxydant initié dans une fibre musculaire se propagerait ensuite localement aux autres fibres du muscle (Zhou et al., 2010) et de façon rétrograde aux motoneurones (Kraft et al., 2007), notamment par la diffusion du NO• et des ONOO⁻.

Les altérations mitochondriales musculaires mises en évidence chez les souris SLA seraient suffisantes pour déstabiliser les JNM et conduire à la dégénérescence des neurones ; elles participeraient également à l'aggravation de la pathologie SLA (Dupuis et al., 2009a et 2009b). Contrairement aux souris SLA, les dysfonctionnements des mitochondries musculaires chez les patients SLA seraient probablement secondaires à la dénervation de la JNM, car ils apparaissent au stade terminal de la maladie (Bradley et al., 2009). Cependant, les fibres musculaires des patients SLA présentent une sensibilité intrinsèque au stress oxydant, qui est indépendante de toute influence nerveuse (Dupuis et al., 2009b). Cette sensibilité particulière reste inexpliquée : la diminution des défenses anti-oxydantes et les anomalies de l'homéostasie du Ca²⁺ régulée par les mitochondries pourraient y contribuer (Dupuis et al., 2009b).

3-2.1.2.2. Modulation du profil sécrétoire des muscles

Le stress oxydant généré dans les muscles module leur profil sécrétoire. Les souris SLA présentent des modulations négatives de l'expression musculaire de certains gènes possédant une séquence ARE impliqués dans la défense contre le stress oxydant, ainsi que dans la régénération des tissus nerveux (Gonzalez de Aguilar et al., 2008 ; Ferraiuolo et al., 2009). Au contraire, la modulation positive de l'expression musculaire de facteurs diffusibles influençant directement l'évolution de la SLA a également été mise en évidence. Par exemple, les muscles des patients et des souris SLA sur-expriment massivement Nogo-A, un inhibiteur de la croissance des neurites

(Dupuis et al., 2002). Le niveau d'expression de cet inhibiteur est corrélé à l'état clinique des patients SLA (Jokic et al., 2005). Chez les souris SLA SOD1^{G86R}, la surexpression musculaire de Nogo-A favorise la dénervation des JNM, alors que l'ablation de cette protéine dans le muscle augmente la durée de vie de ces souris (Jokic et al., 2006).

Avec l'âge, les motoneurones deviennent de plus en plus dépendants d'un support trophique (Crew et Wigston, 1990). Les muscles squelettiques adultes jouent normalement un rôle de soutien pour les motoneurones : ils sont une source de facteurs trophiques qui conditionnent la survie, la croissance axonale lors des processus de « sprouting » et la maintenance des connexions synaptiques des motoneurones (Funakoshi et al., 1995). Ils sécrètent notamment des facteurs neurotrophiques tels le BDNF, le GDNF, l'IGF-1 et le NGF (Taylor et al., 2007). Ces facteurs sécrétés au niveau périphérique peuvent être transportés de façon rétrograde aux motoneurones (pour revue : Cary et La Spada, 2008). La modulation négative de l'expression de ces facteurs dans le muscle sous l'action de la SOD1 mutée, comme dans les cellules gliales, pourrait exacerber la SLA (Taylor et al., 2007).

Dans ce contexte, le muscle a été envisagé comme une cible thérapeutique de la SLA. L'induction de la surexpression musculaire de GDNF (Li et al., 2007), d'IGF-1 (Dobrowolny et al., 2005 et 2008a) ou de MGF (*mecano growth factor*) (Riddoch-Contreras et al., 2009), un variant d'épissage de l'IGF-1, chez les souris SLA, retarde l'apparition de la maladie et allonge leur durée de vie. La surexpression musculaire locale d'IGF-1 est particulièrement efficace (Dobrowolny et al., 2008a). Elle a un effet sur l'ensemble de l'unité motrice : elle maintient l'intégrité des muscles en stabilisant les JNM et en renforçant l'activité des cellules satellites (les précurseurs des fibres musculaires) ; au niveau de la moelle épinière, elle réduit l'inflammation et augmente la survie neuronale.

L'ensemble de ces études établit le muscle squelettique comme une cible primaire de l'action du stress oxydant, via l'activité de la SOD1 mutée, qui induit la dénervation de l'élément post-synaptique des JNM et la sécrétion de facteurs toxiques. Cependant, l'excision du gène SOD1 muté restreinte aux muscles des souris SLA n'a pas d'effet sur l'apparition et la progression de la maladie, bien qu'elle permette un renforcement de leur masse et de leur force musculaires, (Miller et al., 2006 ; Towne et al., 2008). Ainsi, le muscle, malgré les dommages causés par la SOD1 mutée, ne serait pas un contributeur essentiel à la pathogenèse de la SLA. Dans ces deux études, le mode d'excision du gène SOD1 muté dans le muscle peut toute fois être discuté. En effet, la diminution du taux de protéines SOD1 mutée dans le muscle n'est que

partielle (50% environ) ; le taux de protéines mutées résiduelles pourrait donc être suffisant pour atteindre le seuil neurotoxique. De plus, ces excisions surviennent certainement trop tardivement : elles sont réalisées au cours de la phase asymptomatique à P40, alors que près de 40% des JNM des unités motrices FF sont déjà dénervées à cet âge (Fischer et al., 2004). L'excision tardive du gène SOD1 muté ne permettrait apparemment pas de contrecarrer les mécanismes toxiques déjà initiés dans les fibres musculaires.

L'expression de la SOD1 mutée restreinte aux muscles est suffisante pour induire l'accumulation de ROS et des changements dans l'activité métabolique des fibres musculaires, ainsi qu'une atrophie sévère associée à une altération de la structure et de la performance fonctionnelle des muscles squelettiques (Dobrowolny et al., 2008b). Cependant, aucun signe évident de dégénérescence des motoneurones n'est observé. La toxicité musculaire dans la SLA pourrait donc être indirecte et dépendre de l'expression de la SOD1 mutée dans un autre type cellulaire. Par exemple, de nombreuses cytokines sécrétées par les macrophages sont capables d'agir sur l'expression des gènes musculaires ; l'expression de la SOD1 mutée par les macrophages pourrait donc être la cause de la toxicité musculaire envers le motoneurone (Dupuis et Loeffler, 2009). Le muscle ne serait alors pas l'initiateur, mais un acteur de la SLA.

3-2.2. La SLA : une maladie métabolique ?

Les études approfondies de la SLA ont mis en évidence des altérations de la physiologie et du métabolisme de plusieurs types cellulaires, qui agissent en synergie pour exacerber la maladie. La seconde observation d'un dysfonctionnement périphérique est l'exacerbation du métabolisme énergétique, chez deux tiers des patients SLA ; ce phénomène précoce est constant au cours de la pathologie et pourrait influencer le développement de la maladie (pour revue : Piquet, 2006 ; Mattson et al., 2007). Bien que ces perturbations métaboliques observées chez les patients SLA aient été pendant longtemps considérées comme anecdotiques, elles pourraient être à l'origine de la maladie.

3-2.2.1. Les dysfonctionnements métaboliques dans la SLA

La plupart des patients SLA présentent une augmentation 10 à 20 % de leur dépense énergétique au repos, alors que d'autres ont une dépense énergétique diminuée et associée à l'accumulation de graisse (Kasarskis et al., 1996 ; Desport et al., 2001 ; pour revue : Piquet, 2006). Deux tiers des patients SLA présentent un déficit énergétique chronique et un syndrome de

| | Souris SLA | Patients SLA |
|---|-----------------------|-------------------------|
| Augmentation de la consommation d'oxygène de l'organisme (hypermétabolisme) | + | + |
| Indice de masse corporelle (réserves adipeuses) | - | - |
| Utilisation du glucose | + | - |
| LDL-cholestérol | - | + |
| Cholestérol total | - | + |
| Expression musculaire d'UCP3 | + | + |
| Dysfonctionnement mitochondrial musculaire | + | + |
| Protection par l'hyperlipidémie | + | + |

Tableau 2 : Modifications métaboliques observées chez les patients et les modèles souris SLA

+ : augmenté ou présent ; - : diminué ou absent (d'après Dupuis et Loeffler, 2008).

malnutrition : ils présentent une perte de poids supérieure à 10% et un indice de masse corporelle inférieur à 18,5. Cette diminution progressive de la masse grasseuse et l'augmentation de la dépense énergétique au repos sont corrélées à l'aggravation de la maladie (Kasarskis et al., 1996) ; elles s'accroissent à l'approche de la mort.

Malgré leur hypermétabolisme basal, les patients SLA ont une lipidémie augmentée, notamment une augmentation du rapport des lipoprotéines sériques LDL/HDL (Dupuis et al., 2008). Cette hyperlipidémie serait due à un dysfonctionnement hépatique du métabolisme du cholestérol, qui induit une stéatose du foie. L'excès de la production de VLDL (*very low density lipoprotein*) riches en cholestérol et le défaut de leur catabolisme conduiraient à une diminution du taux de HDL et une augmentation du taux de LDL. Le ratio LDL/HDL serait corrélé aux chances de survie des patients : lorsque leurs niveaux de lipides sériques sont élevés, les patients SLA présentent une durée de vie prolongée (Dupuis et al., 2008), alors que des niveaux de lipides sériques faibles sont corrélés à une insuffisance respiratoire chez ces patients (Yoshii et al., 2010). D'autre part, les patients SLA présentent une augmentation de la circulation des acides gras libres et une tolérance abaissée au glucose (Pradat et al., 2010). Ces facteurs définissent une résistance à l'insuline, une hormone qui favorise la pénétration intracellulaire et le métabolisme du glucose, favorise la lipogénèse et inhibe la lipolyse. La résistance à l'insuline mise en évidence chez les patients SLA expliquerait leur hypermétabolisme lipidique, bien qu'elle ne semble pas corrélée à la sévérité de la maladie (Pradat et al., 2010).

Des défauts métaboliques systémiques ont également été mis en évidence chez les souris SLA (Tableau 2). Comme les patients, les souris SLA présentent un déficit pondéral par rapport aux souris sauvages et une diminution de leur masse adipeuse, qui précèdent l'apparition des symptômes (Dupuis et al., 2004). L'entrée dans la phase symptomatique des modèles murins SLA est corrélée à la perte de 10% de leur masse corporelle. Cette perte n'est pas la conséquence d'une diminution de la prise alimentaire, mais d'une augmentation du métabolisme basal qui ne s'explique ni par un dérèglement de la thermogénèse ni par l'augmentation des hormones thyroïdiennes.

Chez les souris SLA, le métabolisme lipidique est plus particulièrement perturbé. Les taux de lipides sanguins à jeun et post prandiaux sont diminués, en raison d'une clairance lipidique par les tissus périphériques notamment musculaires et de dysfonctionnements intestinaux (Dupuis et al., 2004 et 2008 ; Fergani et al., 2007). Les augmentations de l'absorption des lipides au niveau de l'intestin et de la transformation des triglycérides en acides gras non estérifiés aboutissent à

une diminution de la synthèse de VLDL, les lipoprotéines les plus riches en triglycérides (Fergani et al., 2007). Au niveau central, le métabolisme lipidique serait également favorisé, comme le montre l'augmentation de la transcription des transporteurs des lipides Apoc1 et FABP4 dans la moelle épinière de rat SLA SOD1^{G93A}, au cours de la phase symptomatique (Malaspina et al., 2010).

L'ensemble des travaux sur les modifications métaboliques au cours de la SLA montre une association de la maladie à une augmentation du métabolisme basal, responsable du déficit énergétique chronique, associé à un hypermétabolisme lipidique et à une diminution de l'utilisation du glucose. L'origine de la SLA pourrait donc être un trouble métabolique systémique, avec des conséquences physiopathologiques sur le système moteur (Martin et al., 2007). Afin de valider cette hypothèse, l'influence du régime alimentaire sur le développement de la SLA a été testée chez les patients et les souris SLA (pour revue : Mattson et al., 2007). Les souris SLA soumises à une restriction calorique présentent une exacerbation du phénotype clinique de la maladie : la maladie se déclare plus tôt et la mort est plus rapide (Hamadeh et al., 2005 et 2006 ; Patel et al., 2010). A l'inverse, l'application aux souris SLA d'un régime enrichi en lipides ou en sucres corrige leur déficit énergétique (Dupuis et al., 2004). Ce régime nutritionnel permet d'augmenter leur durée de vie, en protégeant les motoneurones et en diminuant la dénervation des JNM. Ces études confirment que le déficit énergétique est un déterminant important de la pathogénèse de la SLA, dans les modèles murins. De même, l'état nutritionnel serait un facteur pronostique de survie des patients SLA (Vaisman et al., 2009).

De plus, chez les souris SLA, les anomalies fonctionnelles mitochondriales mises en évidence dans les motoneurones et les fibres musculaires ont également été observées au niveau du foie, l'organe central de la glycogénèse (Mattiuzzi et al., 2002). Or, les mitochondries jouent un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique nécessaire au fonctionnement cellulaire. Parmi les maladies métaboliques d'origine génétique ou environnementale, les mitochondriopathies (Barkovich et al., 1993) et les myopathies métaboliques (Van Adel et Tarnopolsky, 2009) provoquent des troubles neuromusculaires importants, qui seraient l'expression d'une anomalie de la machinerie musculaire, dont le principal but est de produire l'énergie nécessaire à la contraction musculaire (Muravchick, 2008 ; Finsterer et al., 2010). D'après Martin et ses collaborateurs (2007), les similitudes entre les dysfonctionnements mitochondriaux et l'atteinte musculaire dans les modèles murins de la SLA et de mitochondriopathies sont frappantes.

3-2.2.2. Rôle du muscle dans les altérations métaboliques

Le dysfonctionnement métabolique des souris SLA est particulièrement prononcé au niveau des muscles. La modulation positive de l'expression musculaire des enzymes clés du métabolisme des carbohydrates et des acides gras (Fergani et al., 2007 ; Gonzalez de Aguilar et al., 2008), ainsi qu'une capture du glucose et des lipides plus importante par les muscles (Dupuis et al., 2004 ; Fergani et al., 2007), suggèrent une augmentation du métabolisme énergétique musculaire. La perte de poids des animaux traduit une balance énergétique négative et se caractérise par la clairance des triglycériques et des diglycérides intramusculaires (Fergani et al., 2007), connue pour induire une résistance à l'insuline. Par ailleurs, l'accumulation de ROS induit, dans les muscles des patients et des souris SLA, une forte régulation positive du gène Rad (*Ras associée au diabète*) (Halter et al., 2010), qui intervient dans la susceptibilité au diabète non insulino-dépendant. Ces analyses métaboliques approfondies suggèrent que les souris SLA développeraient un métabolisme musculaire exclusivement lipidique. La demande accrue de nutriments dans les tissus musculaires serait ainsi responsable de l'augmentation du métabolisme basal et de la fonte des réserves adipeuses de l'animal.

Ces anomalies métaboliques musculaires précèdent l'amyotrophie et les défauts électromyographiques mis en évidence chez les souris SLA (Holl et al., 2008). L'hypermétabolisme musculaire pourrait être à l'origine de la désorganisation des JNM. Cette hypothèse a été émise suite à l'augmentation de l'expression d'UCP-3 (*uncoupling protein type 3*), une protéine mitochondriale qui découple l'énergie de la chaîne respiratoire de la synthèse d'ATP pour favoriser une production de chaleur, constatée précocement dans les muscles des souris SLA SOD1^{G86R} (Dupuis et al., 2003). Dans ces souris, la surexpression musculaire expérimentale d'une autre protéine mitochondriale découplante, UCP-1, induit un hypermétabolisme et un déficit énergétique dans l'organisme (Dupuis et al., 2009a). Elle génère également une dénervation modérée des JNM, une dégénérescence des motoneurones lombaires et une astroglie réactionnelle. Ces résultats montrent que les altérations mitochondriales et métaboliques du muscle peuvent à elles seules déclencher certains processus pathologiques de la SLA, notamment la déstabilisation de la partie post-synaptique de la JNM.

L'origine métabolique musculaire de la SLA permettrait d'expliquer la perte sélective des unités motrices rapides. La cible de la SLA est la population de motoneurones de large surface de soma, associée aux unités motrices FF les plus rapides (Frey et al., 2000 ; Pun et al., 2006 ; Hegedus et al., 2007 ; Saxena et al., 2009). La crise énergétique instaurée dans l'organisme par la SLA sensibilise les fibres musculaires qui ont un besoin énergétique élevé pour leur contraction.

C'est pourquoi, les fibres MyHC-IIb seraient dénervées les premières ; la dénervation s'étendrait ensuite aux fibres MyHC-IIx. Les fibres MyHC-I et IIa résisteraient à la demande énergétique grâce à leur métabolisme lipidique, générant ainsi l'utilisation accrue des lipides dans le muscle et la dyslipidémie constatées chez les souris SLA. La sensibilité des fibres musculaires à la dénervation et la sélectivité de la mort des motoneurons qui les innervent pourrait dépendre, au moins en partie, du métabolisme énergétique de ces fibres.

Le muscle squelettique apparaît comme la cible primaire de la SLA, même s'il ne joue qu'un rôle passif dans le déclenchement de la maladie. Cet organe est le lieu de l'action primaire du stress oxydant et des altérations métaboliques, qui pourraient être à l'origine de la dénervation des JNM. Ainsi, ces découvertes suggèrent que le muscle pourrait être une cible thérapeutique de la SLA. Un traitement simple à mettre en œuvre et ayant des effets systémiques sur l'ensemble du système moteur et sur le métabolisme existe : c'est l'exercice physique.

4- SLA et exercice physique

L'exercice physique a longtemps été présenté comme l'un des principaux risques environnementaux incriminés dans le développement de la SLA. Depuis les années 60, les études épidémiologiques décrivent une augmentation de l'incidence de la SLA, chez les personnes dont la profession ou les loisirs imposent une activité physique intense (pour revue : Longstreth et al., 1991 et 1998 ; Harwood et al., 2009). Cependant, les études épidémiologiques les plus récentes n'ont montré aucune association entre l'exercice physique et le déclenchement de la SLA (Valenti et al., 2005 ; Veldink et al., 2005a). Ces dernières études invalident les conclusions des études précédentes ; les méthodes d'analyses et l'échantillonnage des cohortes utilisés seraient critiquables et les résultats n'ont jamais pu être reproduits (Hardwood et al., 2009). Malgré cela, l'incrimination de l'exercice physique dans le développement de la SLA résiste à ces démonstrations. L'augmentation spectaculaire de l'incidence de la SLA chez les sportifs de haut niveau, notamment chez les footballeurs, et la publication de cas de sportifs professionnels célèbres atteints de SLA, comme par exemple celui du joueur américain de baseball Lou Gehrig, ont contribué au renforcement de cette hypothèse.

En effet, l'incidence de la SLA est 50 fois plus élevée chez les footballeurs italiens (Taioli, 2007) et américains (Abel, 2007) que dans le reste de la population et la maladie se déclare plus tôt. En Italie, la SLA est considérée comme une maladie professionnelle chez les footballeurs (Vanacore et al., 2006). Cependant, le facteur de risque impliqué dans ces cas de SLA ne semble pas être l'exercice physique. Les cyanobactéries présentes dans les pelouses des stades italiens pourraient en être la cause (Stipa et al., 2006). Ainsi, la mise en évidence de ces bactéries conforte le risque lié aux facteurs environnementaux et alimentaires bien documentés dans la SLA (pour revue : Spencer et al., 1987). De plus, l'augmentation de cette incidence n'est observée en Italie que depuis les années 80 (Chio et al., 2005), ce qui correspond au changement de comportement dans le milieu sportif. L'utilisation massive de molécules dopantes prescrites ou illicites et de compléments alimentaires pourraient constituer des facteurs de risques de la SLA plus importants que l'exercice physique lui-même (Beretta et al., 2003). La prise prolongée de stéroïdes anabolisants ou androgéniques est reconnue pour induire certaines maladies métaboliques (pour revue : Prouteau, 2008). L'étude très ancienne des cas de SLA survenus dans l'équipe de football américain des « San Francisco 49ers » de 1964 avait d'ailleurs abouti aux mêmes conclusions

(Fimrite, 1987). Le développement de la SLA fut alors attribué à l'utilisation intensionnelle de substances dopantes ; l'utilisation du diméthyle sulfoxyde et de stéroïdes anabolisants fut notamment mise en cause.

L'exercice physique a également été considéré comme néfaste pour les patients SLA (pour revue : Harwood et al., 2009). Il pourrait contribuer au développement du stress oxydant et de l'excitotoxicité glutamatergique, les deux principaux mécanismes physiopathologiques de la SLA.

En effet, au cours de l'exercice physique, les unités motrices sont intensivement sollicitées. Les motoneurones sollicités par l'exercice physique sont sur-activés par le glutamate. Chez les personnes susceptibles de déclencher la SLA, la stimulation excessive des motoneurones pourrait aggraver l'excitotoxicité glutamatergique et révéler ainsi la maladie (Longstreth et al., 1991). Par exemple, chez les personnes présentant un dysfonctionnement des pompes Na^+ / K^+ dans les motoneurones (Kiernan, 2009), mis en évidence chez les patients SLA (Jiang et al., 2005), la sur-activation des motoneurones lors d'un exercice physique pourrait aggraver l'accumulation de Na^+ intracellulaire, ainsi que les perturbations du potentiel membranaire de repos. Ces changements de la concentration intracellulaire de Na^+ auraient pour effet l'activation inverse des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; ceci aurait pour conséquence l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et, au final, activerait les voies apoptotiques dans les motoneurones. Au niveau musculaire, les stress énergétique et oxydant induits par l'exercice physique ainsi que la réponse inflammatoire pourraient instaurer un environnement favorable au développement de la SLA, chez les personnes incapables de supporter ces réponses cellulaires. Certains gènes régulés positivement par l'exercice physique (pour revue : Bray, 2000) sont connus pour être associés au développement de la SLA, notamment le gène SOD1 surexprimé pour détoxifier les ROS produits. De plus, les lésions mécaniques provoquées par l'exercice physique intense, au niveau des muscles squelettiques, rendraient les muscles plus sensibles aux mécanismes physiopathologiques de la SLA. Lors d'un exercice physique, l'accumulation de Ca^{2+} dans les fibres musculaires pourrait potentialiser le stress oxydant et induire des dysfonctionnements mitochondriaux, qui fragiliseraient les JNM et accéléreraient la dégénérescence de ces fibres.

D'après Ferraiuolo et ses collaborateurs (2009), les réponses des motoneurones et des muscles squelettiques au stress physiologique produit par un exercice de course et les mécanismes de la SLA sont tellement proches, qu'une interférence entre eux serait possible. C'est pourquoi, il

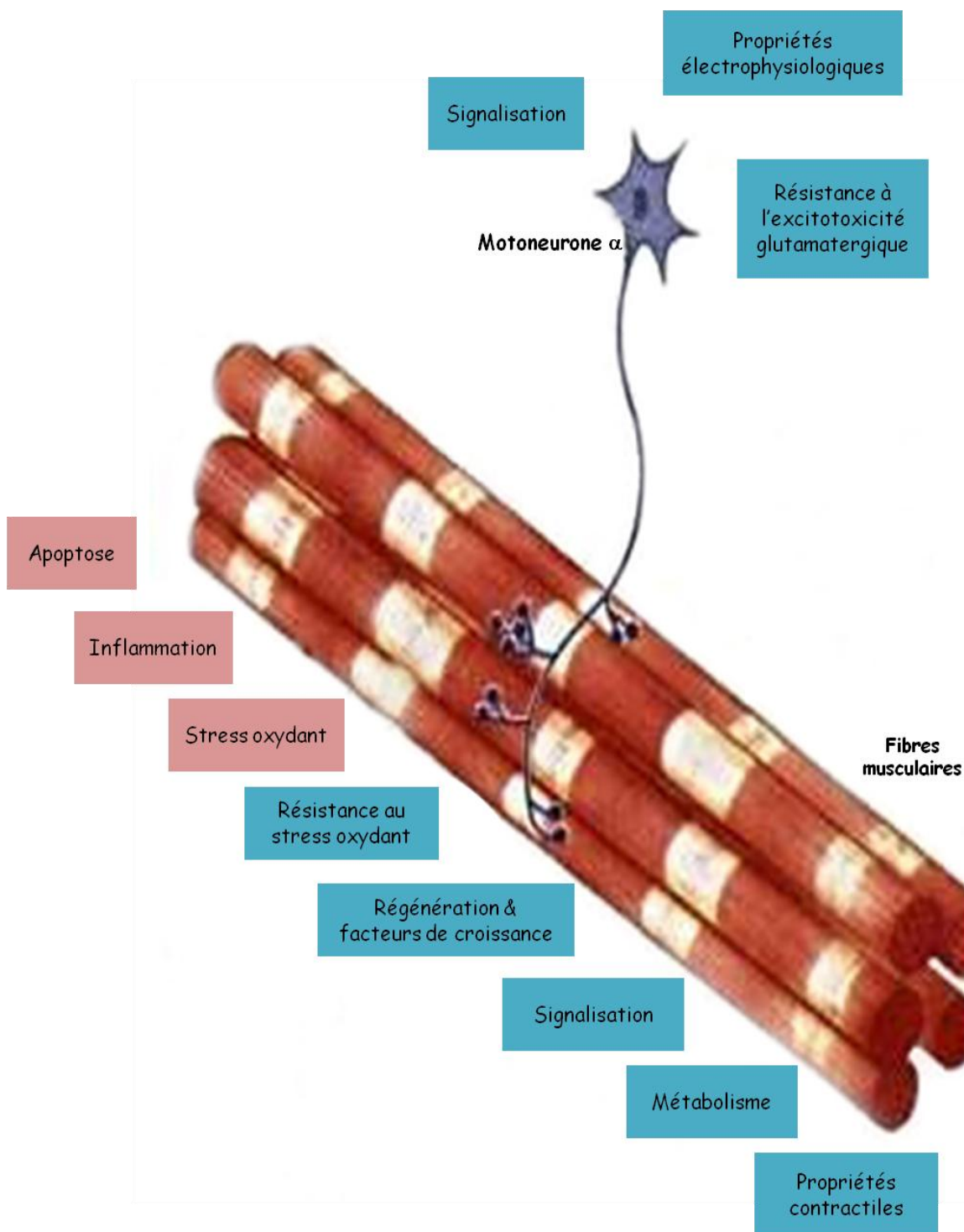


Figure 13 : Modifications de l'unité motrice observées à la suite d'un exercice physique

fut, pendant longtemps, déconseillé aux patients SLA de pratiquer une activité physique, afin de protéger leur masse musculaire.

Paradoxalement, l'exercice physique a des effets bénéfiques incontestables sur le système neuromusculaire (Figure 13) et des études récentes montrent ses bienfaits sur l'évolution de plusieurs maladies neurodégénératives (pour revue : McCrate et Kaspar, 2008). L'adaptation de l'organisme à l'exercice physique pourrait limiter la progression de la SLA et ainsi avoir un effet bénéfique sur les patients.

4-1. Les modifications induites par l'exercice physique

L'exercice physique se définit comme une forme d'activité physique sportive ou de loisir, structurée et pratiquée de façon répétitive sur une période de temps donnée, dans le but précis d'améliorer sa performance ou une composante de sa condition physique (Kino-Québec, 1999). L'activité physique englobe tout mouvement corporel produit par la contraction des muscles squelettiques, entraînant une augmentation de la dépense d'énergie au dessus de la dépense de repos (métabolisme basal). L'activité physique a un coût énergétique qui peut être traduit en dépense énergétique quantifiable (Schutz et al., 2001). Les méthodes de mesure de la dépense énergétique permettent de mesurer directement le coût énergétique global de l'activité physique d'un individu, mais elles dépendent de facteurs tels la masse corporelle, le rendement et l'efficacité du mouvement, rendant difficile la comparaison entre individus.

L'exercice physique est un phénomène complexe ; il est souvent mal défini dans la recherche biomédicale. Il se caractérise selon plusieurs paramètres : son type (quelle activité physique), sa durée (pendant combien de temps), sa fréquence (quelle régularité et quel fractionnement), son intensité (quel investissement physique et quelle dépense énergétique) et son contexte (quel environnement) (pour revue : Inserm, 2008). Trois types d'activités - endurance, assouplissement et résistance (développement de la force musculaire) - et trois niveaux d'intensité - faible, modérée et intense - sont couramment utilisés.

Les réponses à l'exercice physique sont souvent très variables d'un individu à l'autre. Cependant, la réponse à l'exercice dépend en grande partie de la variation de l'expression génique des unités motrices sollicitées (pour revue : Bray, 2000).

4-1.1. Plasticité du muscle squelettique à l'exercice

La contraction musculaire est la base de l'activité physique. En fonction de la nature de la commande nerveuse, de la nature des contraintes mécaniques liées au type et à l'intensité de l'activité physique et de la réponse hormonale à l'effort, l'exercice physique modifie la typologie, le métabolisme et la structure du muscle squelettique (pour revue : Inserm, 2008). Ces modifications sont également dépendantes de la composition en fibres lentes et rapides du muscle considéré (Pette et Staron, 1997). Une seule séance d'exercice physique induit des changements significatifs dans l'expression de gènes musculaires impliqués dans des fonctions cellulaires variées (McKenzie et Goldfarb, 2007).

4-1.1.1. Modulation de la typologie musculaire

Des expérimentations sur des modèles animaux ont montré qu'il est possible de transformer la typologie d'un muscle en faisant varier la nature de la stimulation nerveuse (pour revue : Hoyle, 1983). La commande nerveuse de la motricité agit initialement sur l'entrée de calcium dans la cellule musculaire, par la fixation de l'acétylcholine libérée par le motoneurone sur ses récepteurs musculaires au niveau de la JNM. La modulation des flux de Ca^{2+} induit la libération du Ca^{2+} intracellulaire stocké dans le reticulum sarcoplasmique. Dans le muscle, l'activation des voies de signalisation calciques agit sur la différenciation métabolique et structurale des muscles, notamment via l'activation de NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) (Rao et al., 1997) et des facteurs myogéniques (MyoD, MRF4 (*myogenic regulatory factor type 4*), myogenin, Myf5) (Siu et al., 2004) qui régulent l'expression génique des MyHC. Le rapport entre les concentrations musculaires locales des différents facteurs myogéniques est impliqué dans l'expression de la typologie musculaire lente ou rapide (Hughes et al., 1993) et dans l'augmentation des capacités oxydatives du muscle en réponse à l'entraînement (Millers, 1991).

Pour schématiser les effets de l'entraînement sur le muscle, notamment dans les modèles animaux, la pratique des sports d'endurance est souvent opposée à celle des sports de force et de vitesse, dits en résistance (pour revue : Holzer et al., 2006) :

- Un exercice d'endurance ou d'intensité faible à modérée – la course par exemple – peut induire une augmentation de la proportion de fibres lentes de type I dans les muscles locomoteurs, associée à un réseau capillaire plus dense. Il existe aussi une augmentation de la densité mitochondriale corrélée à une amélioration de la consommation maximale d'oxygène. Les transitions des fibres musculaires rapides glycolytiques de type II en fibres lentes oxydatives de

type I sont associées à une modification de l'expression de la MyHC et à l'instauration d'un métabolisme préférentiellement oxydatif. Ces transitions dépendent de la surexpression d'activateurs nucléaires de la transcription, parmi lesquels les PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) et PGC-1 α (*PPAR gamma coactivator-1alpha*) (Lin et al., 2002 ; Russell et al., 2003). PGC-1 α active alors l'expression des enzymes de la chaîne respiratoire des mitochondries et des protéines contractiles caractéristiques des fibres lentes telle la MyHC I. La surexpression de PGC-1 α dans le muscle augmente également l'expression des gènes Oxphos impliqués dans la phosphorylation oxydative, ainsi que celle des UCPs (pour revue : Puigserver et Spiegelman, 2003). Ceci confère aux fibres musculaires une plus grande résistance à la fatigue, lors d'une stimulation électrique répétée.

- Lors d'un exercice de résistance ou de forte intensité – la nage par exemple –, un accroissement de la surface de section des fibres musculaires lié à l'activation des cellules satellites, une augmentation de la proportion de fibres de type rapides et une forte diminution de la densité mitochondriale sont observés. Ces adaptations musculaires dépendent de la modulation de l'expression génique par l'activation de facteurs de transcription spécifiques du muscle, notamment MyoD et MRF4 (Fluck et Hoppeler, 2003). Ces facteurs activent notamment la transcription de PGC-1 α par un promoteur alternatif produisant l'isoforme PGC-1 α -b (Yoshioka et al., 2009).

4-1.1.2. Adaptation au stress de l'activité contractile

Un exercice physique intense peut provoquer des lésions musculaires en réponse au stress provoqué par l'activité contractile (Jones et al., 1986), notamment des dommages mécaniques (Clarkson et al., 1992 ; Kuipers et al., 1994) et des dommages secondaires associés aux processus inflammatoires qui surviennent quelques jours après la première lésion (Clarkson et al., 1992).

Le stress mécanique peut causer des microlésions musculaires, notamment la rupture de la membrane plasmique des fibres musculaires, qui provoque l'augmentation de la concentration des protéines musculaires dans le sang telle la phospho-créatine kinase (PCK) (Kuipers et al., 1994) ainsi que l'accumulation de Ca²⁺ dans les fibres musculaires (Clarkson et al., 1992). Cependant, l'exercice physique induit une régénération musculaire (pour revue : Holzer et al., 2006). Il active les cellules satellites, en l'augmentant l'expression de facteurs trophiques tel le MGF (Bamman et al., 2004) et des gènes impliqués dans la myogénèse (Ferraiuolo et al., 2009) dans les fibres musculaires.

Le stress mécanique induit également la sécrétion transitoire par le muscle squelettique de myokines impliquées dans l'inflammation chronique, telles l'Interleukine-6 (IL-6) et l'IL-15 (Arnold et al., 2011). Ces myokines activent et recrutent de nombreuses cellules du système immunitaire qui produisent des radicaux libres. Suite à un exercice physique, des douleurs musculaires dues à l'inflammation du tissu conjonctif musculaire apparaissent (Clarkson et al., 1992). Après un exercice physique pénible, les taux plasmatiques d'autres cytokines inflammatoires, tels le TNF α et la protéine inflammatoire des macrophages de type 1, ou anti-inflammatoires telle l'IL-10 augmentent (pour revue : Febbraio, 2007). Mais l'origine cellulaire de ces cytokines reste indéterminée ; elles pourraient être produites par le muscle ou les macrophages recrutés au niveau des sites de lésions musculaires.

En réponse au stress provoqué par l'activité contractile, les muscles squelettiques s'adaptent par des changements de l'expression de leurs gènes codants les protéines de choc thermique (HSP) (Morton et al., 2009). L'augmentation de la transcription des HSP se produit pendant l'exercice, immédiatement ou plusieurs heures après l'exercice. Ces HSP facilitent la réparation des blessures et fournissent une protection contre de nouveaux dommages cellulaires.

4-1.1.3. Modulation de la structure du muscle squelettique

L'architecture musculaire est également modifiée en fonction de l'exercice pratiqué. Les muscles d'un athlète qui a subi un entraînement en force ou vitesse présentent un accroissement de leur longueur, favorable au développement de tensions musculaires importantes et d'une vitesse de contraction élevée, associé à l'augmentation du nombre de sarcomères (Abe et al., 2000).

L'exercice physique est également connu pour ses effets hypertrophiques sur les muscles, qui se caractérisent par une augmentation de la masse musculaire et de la section transversale des fibres associée à leur teneur accrue en protéines myofibrillaires. En effet, suite à un exercice physique, le muscle squelettique sécrète transitoirement des facteurs trophiques, notamment du GDNF, de l'IGF-1 ou du MGF, du VEGF (pour revue : McCrate and Kaspar, 2008) et des myokines parmi lesquelles le BDNF (pour revue : Arnold et al., 2011). Il présente également une augmentation de la synthèse de molécules responsables de la néo-vascularisation et de l'induction de la myogenèse (Ferraiuolo et al., 2009). L'hypertrophie musculaire résulterait de l'activation de la transcription musculaire par la voie Ca²⁺/calmoduline-dépendante via le facteur NFAT (Al-Shanti et Stewart, 2009) et la voie IGF-1 (pour revue : Chin et al., 2009).

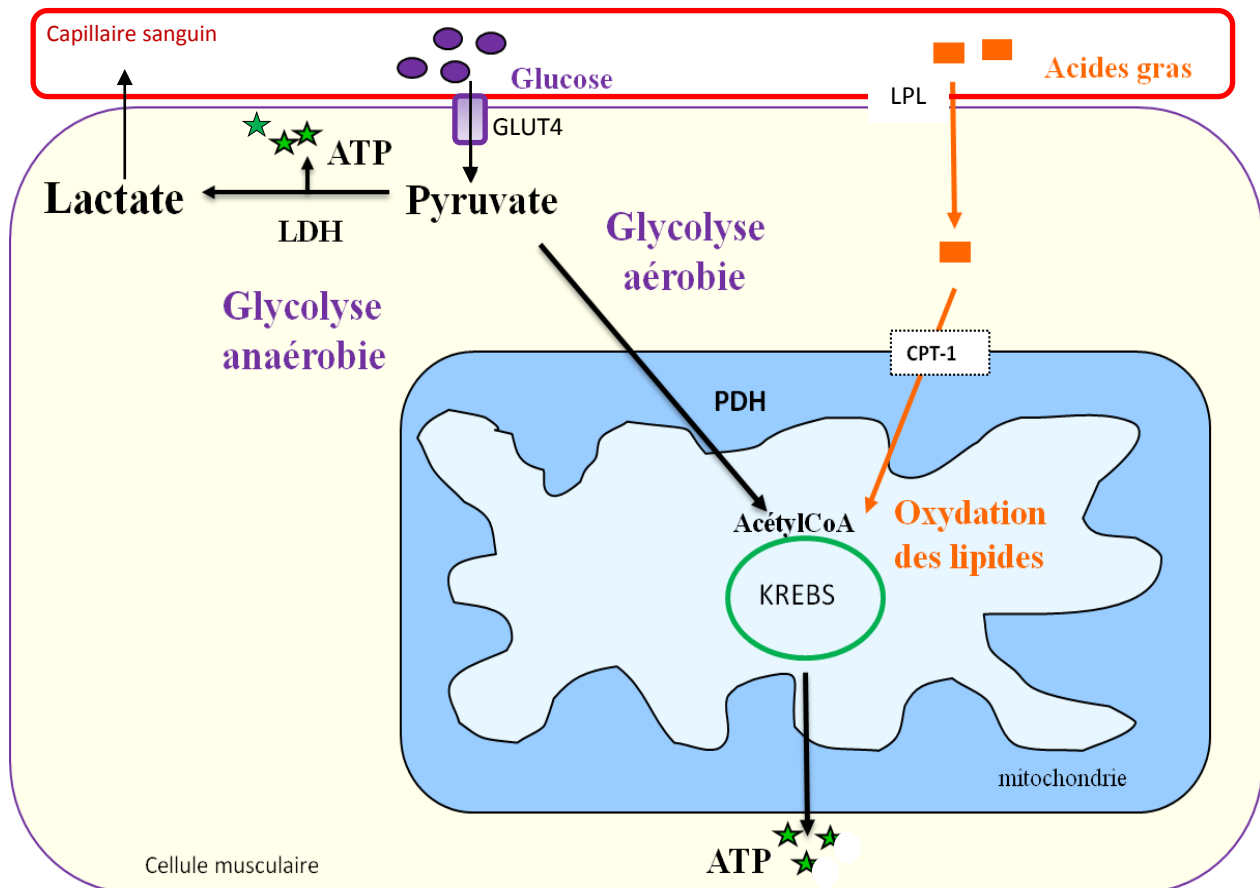


Figure 14 : Représentation schématique des principales voies de production d'énergie dans une cellule musculaire

CPT-1 : carnitine palmitoyl transférase ; GLUT4 : transporteur au glucose ; LDH : lactate déshydrogénase ; LPL : lipoprotéine lipase ; PDH : pyruvate déshydrogénase

4-1.2. Adaptation du métabolisme énergétique

La contraction musculaire résulte de la transformation de l'énergie chimique fournie par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique nécessaire au glissement des filaments des protéines contractiles, l'actine et la myosine (Huxley, 1969). Trois systèmes permettent de produire l'ATP nécessaire aux fibres musculaires, en fonction du degré d'effort et d'endurance de l'exercice. Le premier système est l'utilisation des réserves d'ATP et de créatine phosphate stockées dans les cellules, mais ces réserves s'épuisent rapidement lors d'un exercice physique. Deux autres systèmes sont alors sollicités : la glycolyse, suivie de la fermentation du lactique (voie anaérobie) ou de l'oxydation du pyruvate dans les mitochondries (voie aérobie), et l'oxydation des lipides (Figure 14).

L'effort physique crée un état de crise énergétique dans l'organisme. Pour faire face aux exigences énergétiques de la contraction musculaire, l'exercice physique modifie le métabolisme musculaire, ainsi que le métabolisme général de l'organisme en affectant les mécanismes régulateurs de l'homéostasie du glucose. La régulation du métabolisme systémique résulte de la mise en jeu des mécanismes hormonaux et nerveux, qui interagissent de manière coordonnée.

4-1.2.1. Modulation des taux de leptine

La leptine circulante est une « hormone » adipocytaire (pour revue : Gomez-Merino et al., 2004). Elle est sécrétée majoritairement par le tissu adipeux blanc et secondairement au niveau de l'estomac et des muscles ; ses récepteurs ont une localisation ubiquitaire. La leptine est un marqueur des variations des stocks de substrats énergétiques. Sécrétée en réponse à l'augmentation des réserves de graisses, elle joue un rôle clé dans la régulation de la balance énergétique : elle active les voies anorexigènes et inhibe les voies orexigènes. Par son interaction avec ses récepteurs spécifiques situés dans l'hypothalamus, elle régule la prise alimentaire (action inhibitrice) et la dépense énergétique (action stimulatrice). Dans le foie, elle participe au contrôle de la glycémie : elle diminue la sécrétion d'insuline, la néoglucogénèse et inhibe la glycolyse. Dans divers tissus, elle a un effet thermogène. Elle augmente la température corporelle, en modulant positivement l'expression des UCPs : UCP1 dans le tissu adipeux brun, UCP2 dans le tissu adipeux blanc ou le foie et UCP3 dans le muscle. Elle modifie également le métabolisme de divers tissus et contrôle les réserves en triglycérides de l'organisme, par l'activation de l'AMPK (*adénosine monophosphate activated protein kinase*). Elle favorise notamment l'utilisation des lipides dans le muscle squelettique (Figure 15A).

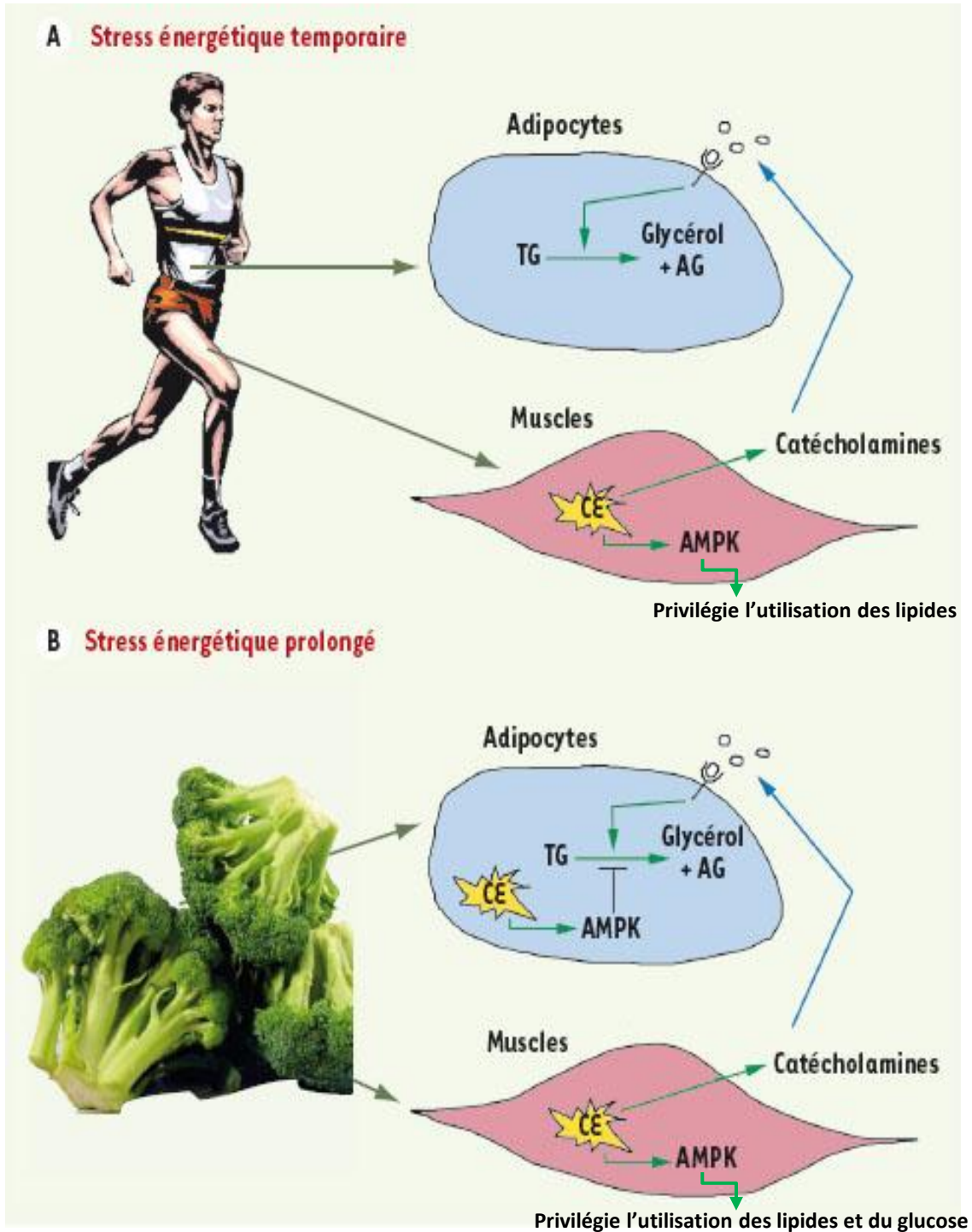


Figure 15 : Modèles théoriques d'activation de l'AMPK

(A) Lors d'une crise énergétique (CE) temporaire, notamment au niveau des muscles squelettiques au cours d'un exercice physique, l'AMPK est activée ; elle augmente l'utilisation des lipides comme source d'énergie (TG : triglycérides ; AG : acides gras).

(B) Lors d'une crise énergétique prolongée associée à l'exercice physique, l'AMPK est activée dans les muscles squelettiques, ainsi que dans les adipocytes où elle inhibe la lipolyse (d'après Narbonne et Roy, 2009).

L'exercice physique contribuerait à la régulation du taux circulant de leptine. Chez l'homme, le taux de leptine varie en fonction de l'exercice pratiqué (Essig et al., 2000 ; Karamouzis et al., 2002). Lors d'un exercice de nage, le taux de leptine diminue significativement ; par conséquent, la prise alimentaire est stimulée afin de restituer les réserves énergétiques dans les muscles (Essig et al., 2000). Lors d'un exercice de course, ce taux augmente en corrélation avec l'intensité de l'exercice; l'augmentation de la température corporelle est donc une réaction normale de l'organisme en réponse à cet exercice (Gomez-Merino et al., 2002) . Par son effet thermogène, un exercice de course priverait l'organisme des bienfaits de l'hypothermie.

En effet, l'hypothermie modérée de 1 à 2 degrés de la température corporelle est connue pour ses effets protecteurs sur le SNC (pour revue : Dietrich et al., 2009). L'hypothermie favorise la récupération des fonctions motrices et protège les neurones de la mort cellulaire lors de lésions par ischémie cérébrale, de dommages liés au stress ou de lésions mécaniques de la moelle épinière. L'hypothermie agit sur l'activité cellulaire : elle diminue la consommation d'oxygène, la production de dioxyde de carbone et le métabolisme énergétique ; les réserves d'ATP cytoplasmiques sont ainsi préservées. L'hypothermie diminue la libération neuronale de la plupart des neurotransmetteurs, notamment l'acétylcholine et le glutamate. Elle diminue également l'expression neuronale des récepteurs AMPA et NMDA. Elle limite ainsi l'entrée du Ca^{2+} et modifie sa signalisation intracellulaire en augmentant l'expression de la calmoduline. L'hypothermie agit également sur la microvascularité du SNC : elle diminue la perméabilité de la BHE et prévient les ruptures de celle-ci. Elle réduit ainsi les œdèmes vasculaires en limitant l'accumulation d'eau, d'astrocytes et de cellules microgliales, dont elle atténue la réaction inflammatoire. Enfin, l'hypothermie agit directement sur l'apoptose des neurones en limitant la libération du cytochrome c, l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de leur ADN.

4-1.2.2. Modulation de l'activité de l'AMPK

De nombreux stimuli sont susceptibles d'activer l'AMPK, notamment l'exercice musculaire, l'hypoxie ou certaines hormones comme la leptine (pour revue : Tosca et al., 2008). En fonction des effets aigus et chroniques de l'exercice physique, l'AMPK est activée dans les muscles et le foie lors de l'augmentation du rapport AMP/ATP, chez l'homme comme chez les rongeurs (Narbonne et Roy, 2009). Mais en cas de stress énergétique prolongé, l'AMPK est activée également dans les adipocytes, où elle limite la lipolyse (Figure 15B) (Narbonne et Roy, 2009).

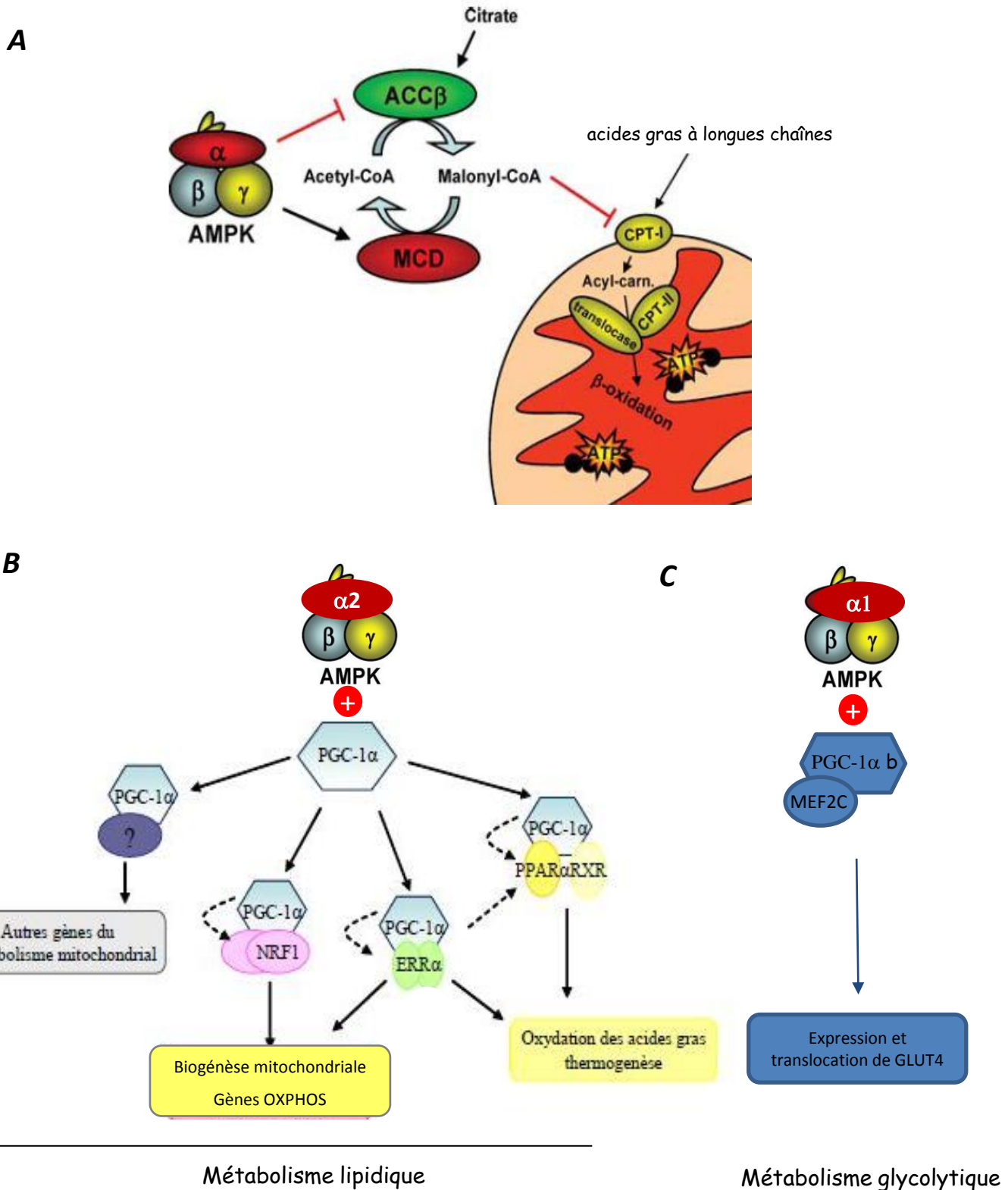


Figure 16 : Réponse moléculaire à l'activation de l'AMPK au niveau des muscles squelettiques

Au cours d'un exercice physique d'intensité modérée, l'AMPK active la translocation des acides gras à longues chaînes dans la mitochondrie, via CPT-1 (ACC β , acétyl-CoA carboxylase- β ; MCD, malonyl-CoA décarboxylase) (A). Elle active également PGC-1 α qui se lie à un nombre varié de facteurs de transcription qui activent l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondriale. Elle facilite ainsi l'utilisation des lipides comme source d'énergie (B). Lors d'un exercice physique de forte intensité, l'AMPK α 1 est également activée. Elle favorise l'entrée du glucose en augmentant l'expression des transporteurs au glucose GLUT4 (C) (d'après Jørgensen et al., 2006)

L'AMPK est une enzyme clé de la régulation de l'homéostasie énergétique (pour revue : Richter et Ruderman, 2009). Par le jeu de phosphorylations d'intermédiaires, l'AMPK activée maintient l'équilibre entre la consommation et la production d'ATP. La voie de l'AMPK stimule l'expression des gènes spécifiques de l'adaptation musculaire lors d'une augmentation de la dépense énergétique (Figure 16).

Pendant une séance d'exercice physique, l'AMPK activée stimule les voies cataboliques génératrices d'ATP (pour revue : Tosca et al., 2008). Elle favorise la captation du glucose : pour cela, elle augmente l'expression des transporteurs du glucose GLUT4 (*glucose transporter type 4*) régulée par le facteur de transcription MEF2C (*myocyte enhancer factor 2C*), ainsi que la translocation de GLUT4 à la membrane. Elle favorise également l'oxydation des acides gras : elle augmente l'expression des protéines mitochondriales et la biogénèse des mitochondries en activant PGC-1 α ; elle inhibe l'acétylCoA carboxylase (ACC), ce qui a pour conséquence d'augmenter l'entrée des lipides dans la mitochondrie. Dans le même temps, l'AMPK activée freine les voies anaboliques consommatrices d'ATP (pour revue : Tosca et al., 2008). Elle inhibe les synthèses de protéines et de lipides, en réduisant l'activité de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) - un régulateur de l'initiation de la traduction - (Dreyer et al., 2006). mTOR est un capteur des besoins énergétiques et du statut nutritionnel du muscle squelettique ; son activité dépend de l'activité de l'AMPK et de la disponibilité en acides aminés (Deldicque et al., 2005). Pendant la phase de récupération, il se produit un rebond d'activité de mTOR ; la récupération de la charge énergétique musculaire initierait alors l'accroissement de la synthèse protéique.

Chez l'homme, un même exercice peut influencer différemment le métabolisme en fonction de l'intensité à laquelle il est pratiqué (Chen et al., 2003). Un exercice à intensité modérée privilégie l'utilisation des lipides comme source d'énergie, alors qu'un exercice à forte intensité privilégie l'utilisation du glucose (Tableau 3). Cette variation d'orientation du métabolisme énergétique, en fonction de l'intensité de l'exercice serait liée à l'état d'activation de l'AMPK. Lors d'un exercice d'intensité modérée, les fibres musculaires sollicitées présentent une activation préférentiellement de la sous-unité $\alpha 2$ de l'AMPK (Chen et al., 2003) et sécrètent des catécholamines qui activent la lipolyse dans le tissu adipeux (Zimmermann et al., 2004). La fixation de ces catécholamines aux récepteurs membranaires des adipocytes active en cascade des lipases des triglycérides (pour revue : Duncan et al., 2007). Les acides gras libérés des adipocytes passent dans le sang et sont captés par les fibres musculaires, où ils permettent de rétablir l'homéostasie énergétique en constituant la principale source énergétique musculaire (Narbonne et Roy, 2009). Un exercice de course induit un métabolisme oxydatif des lipides dans les fibres musculaires sollicitées, qui nécessitent un changement de l'expression du type de

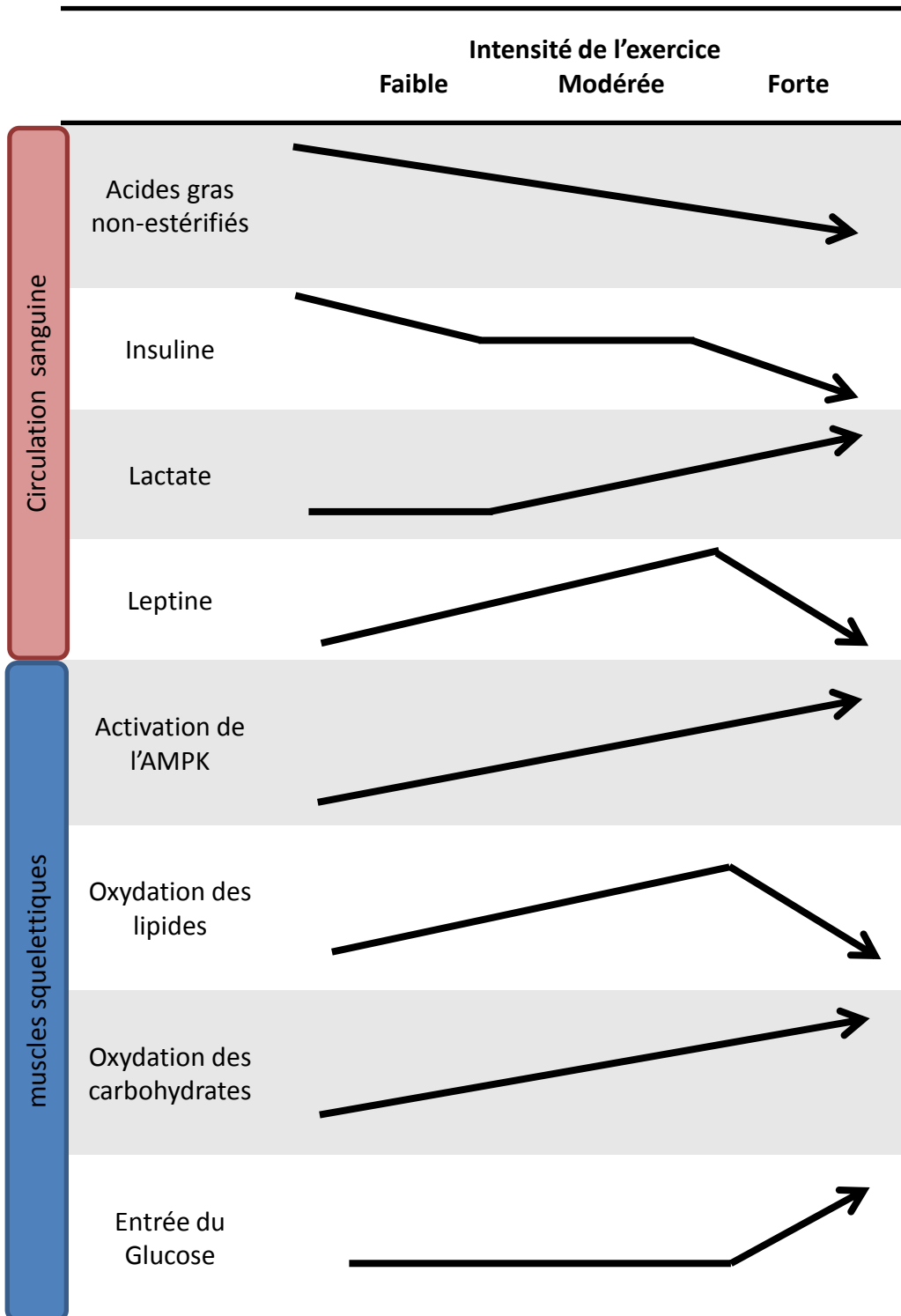


Tableau 3 : Effets de l'intensité de l'exercice sur les marqueurs sanguins et les principales voies du métabolisme énergétique musculaire

Un exercice d'intensité faible à modérée induit un métabolisme énergétique préférentiellement aérobie, privilégiant l'utilisation des lipides. Au contraire, un exercice de forte intensité induit un métabolisme énergétique préférentiellement glycolytique (d'après Chen et al., 2003).

MyHC et une reprogrammation du métabolisme énergétique, que ce soit chez l'homme ou les rongeurs (Narkar et al., 2008). Au contraire, un exercice de forte intensité active massivement l'AMPK dans les fibres musculaires sollicités et induit préférentiellement un métabolisme glycolytique (Chen et al., 2003). Dans le *Soleus* à l'exercice, seule l'activation de la sous-unité $\alpha 1$ de l'AMPK est impliquée dans l'augmentation de l'utilisation du glucose dans les fibres musculaires sollicitées (Jensen et al., 2008).

Les bénéfices thérapeutiques de l'activité physique régulière, dans certains troubles associés à un syndrome métabolique, pourraient être attribués à l'activation de l'AMPK (pour revue : Richter et Ruderman, 2009). En effet, l'activation de l'AMPK améliore l'état métabolique de modèles murins de syndrome métabolique et inflammatoire, tels le diabète de type 2 et la maladie d'Alzheimer (pour revue : Richter et Ruderman, 2009).

4-1.3. Adaptation au stress oxydant

La contraction musculaire génère un stress oxydant par la production de ROS à des taux déterminés par l'intensité, la fréquence et la durée des protocoles d'exercice (pour revue : Gomez-Cabrera et al., 2009). Par exemple, la consommation élevée d'oxygène et l'augmentation du métabolisme oxydatif musculaire lors d'un exercice de course conduisent à une production massive de ROS au niveau des muscles (Davies et al., 1982) et du foie (Sen et al., 2000).

La réponse physiologique à l'exercice physique nécessite donc un recours important aux mécanismes de défense contre le stress oxydant (pour revue : Banerjee et al., 2003 ; Gomez-Cabrera et al., 2009). C'est pourquoi, suite à un entraînement physique, une diminution du taux basal du radical $^{\circ}\text{OH}$ a été observée dans le plasma et dans le muscle squelettique (Itoh et al., 1998). Un entraînement par un exercice d'endurance ou de résistance est, en effet, un moyen efficace pour augmenter la défense anti-oxydante et améliorer la réponse au stress oxydant ; ces processus compensatoires rendent d'ailleurs le muscle plus résistant à ce type de dommages (Radak et al., 2002).

Pour se défendre contre la toxicité des ROS, le muscle fait appel à un puissant régulateur de l'expression génique, PGC-1 α , une des cibles directes de la voie Ca^{2+} /calmoduline (pour revue : Tiraby et Langin, 2005). La concentration en PGC-1 α est plus forte dans les muscles squelettiques riches en fibres lentes oxydatives de type I et IIa, tel le *Soleus*, car sa fonction principale est la régulation de la biogenèse des mitochondries et du métabolisme énergétique

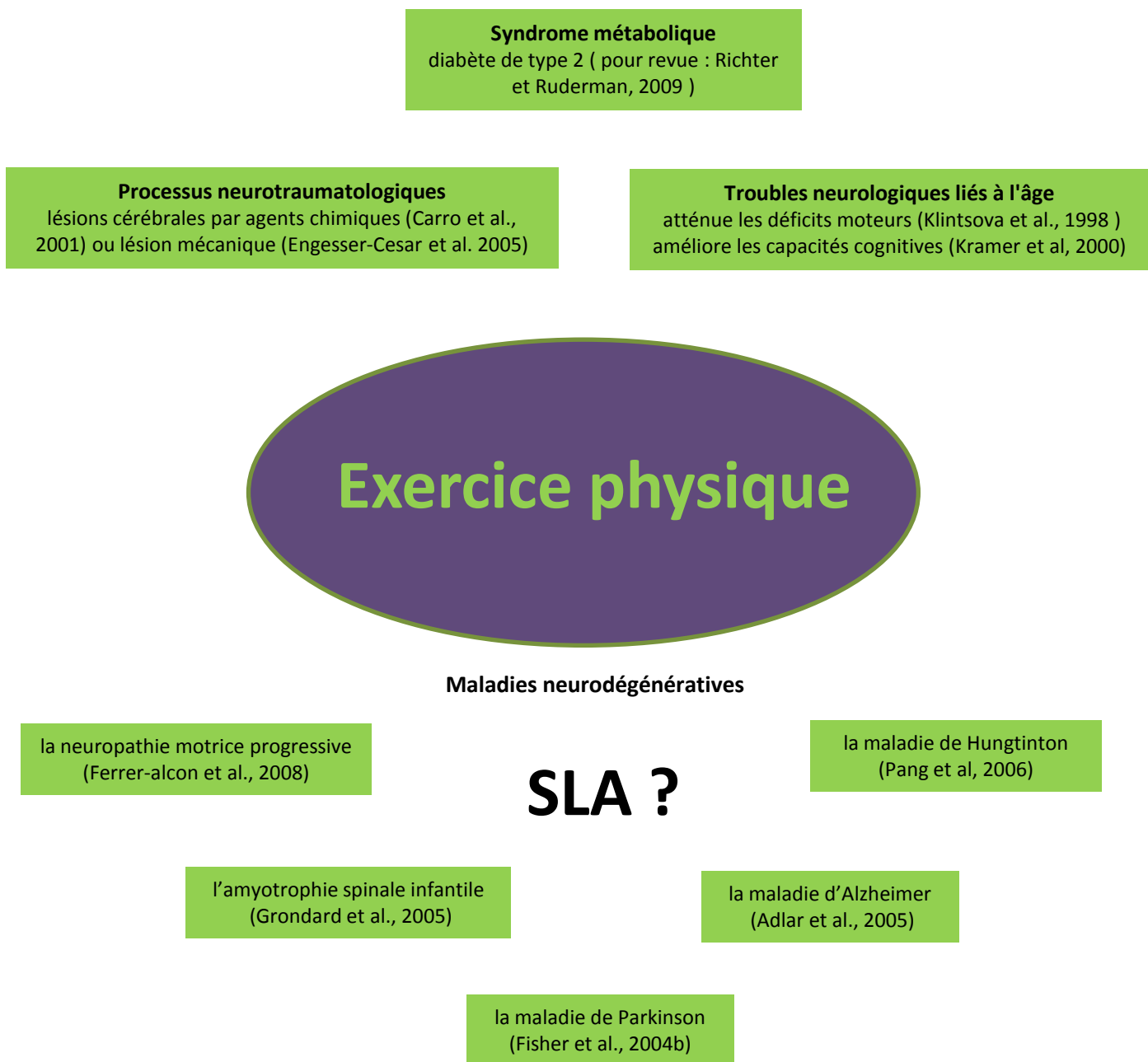


Figure 17 : Les effets bénéfiques de l'exercice physique

L'exercice physique a démontré des effets bénéfiques dans de nombreuses pathologies humaines, notamment dans les pathologies neurodégénératives.

oxydatif. PGC-1 α n'a qu'un rôle modéré dans la régulation des fonctions musculaires de base ; mais, c'est un effecteur transcriptionnel majeur de l'adaptation du muscle squelettique aux changements d'activité induits par l'exercice physique ou aux modifications physiologiques tel le jeûne. L'expression de PGC-1 α est dépendante de l'intensité de l'exercice ; l'AMPK serait un des médiateurs de l'intensité de l'exercice (Egan et al., 2010).

Par l'action de PGC-1 α et β , l'exercice physique prévient l'atrophie en inhibant les facteurs de transcription pro-apoptotique FOXO3 (*forkhead box protein O3*) et protéolytique NF κ B (Brault et al., 2010). C'est pourquoi, l'augmentation de la transcription spécifique de PGC-1 α au niveau musculaire a un effet bénéfique dans un grand nombre de modèles murins de dystrophie musculaire, de myopathie mitochondriale et de dénervation après coupure du nerf sciatique (Arnold et al., 2011). PGC-1 α est également un régulateur important du fonctionnement de la JNM (pour revue : Arnold, 2007). Dans des fibres musculaires isolées, ses niveaux d'expression sont corrélés à la formation des agrégats de récepteurs à l'acétylcholine, une des étapes précoces de l'installation de la JNM.

4-2. Les mécanismes activés par l'exercice physique et potentiellement neuroprotecteurs dans la SLA

L'activité physique présente un large éventail d'avantages sur le bien-être et la santé d'un organisme. Il agit positivement sur le métabolisme d'un individu (maintien du « poids de santé »), le tonus musculaire, les systèmes immunitaire et cardiovasculaire. De nombreuses études réalisées chez l'homme et dans des modèles rongeurs (pour revue : Kramer et Erickson, 2007 ; McCrate et Kaspar, 2008) ont également rapportées les effets bénéfiques de l'exercice physique sur le système nerveux central, périphérique et neuromusculaire adulte.

4-2.1. Les bénéfices de l'exercice physique sur le système neuromusculaire

L'exercice physique réduirait les risques de troubles neurologiques liés à l'âge, à des lésions physiques ou à des processus pathologiques, en améliorant le fonctionnement du SNC et en limitant la neurodégénérescence (Figure 17). Ainsi, l'exercice physique pourrait être envisagé comme une méthode de récupération efficace des fonctions motrices, dans le cadre de maladies affectant le système moteur chez l'homme.

4-2.1.1. Les effets bénéfiques sur les dysfonctionnements liés à l'âge ou suite à un traumatisme

L'exercice physique atténue les déficits moteurs et améliore les capacités cognitives chez les personnes âgées (Kramer et al., 1999) et dans les modèles rongeurs âgés (Klintsova et al., 1998). Au niveau du SNC des rongeurs âgés, l'exercice physique réduit la perte neuronale liée à l'âge (Larsen et al., 2000), active la neurogénèse (Van Praag et al., 1999) et induit une plasticité synaptique (Cotman et al., 2002).

Au niveau musculaire, l'exercice physique a également des effets bénéfiques sur les dysfonctionnements liés à l'âge. Il limite la sarcopénie sénile - caractérisée par la diminution de la masse et de la force musculaire - corrélée à l'avance de l'âge et liée aux altérations de l'ADN mitochondrial (McKenzie et al., 2002), au stress oxydant (Fulle et al., 2004), ainsi qu'à la diminution des capacités de régénération musculaire (Le Grand et Rudnicki, 2007). Ces effets sur la sarcopénie sénile dépendent des modulations de l'expression génique des muscles par l'exercice physique, notamment de la stimulation des défenses anti-oxydantes (pour revue : Banerjee et al., 2003) et des facteurs myogéniques impliqués dans la régénération musculaire (Bamman et al., 2004)

L'exercice a également des effets prometteurs en neurotraumatologie. La rééducation, par la marche volontaire en roue, de souris ayant subi une lésion de la moelle épinière permet une amélioration significative de la récupération des fonctions motrices et une augmentation de la régénération du nerf sciatique sous la lésion (Engesser-Cesar et al., 2005).

4-2.1.2. Les effets bénéfiques sur les maladies neurodégénératives

Dans des modèles rongeurs, l'exercice physique limite la progression de maladies neuromusculaires telle la neuropathie motrice progressive (Ferrer-alcon et al., 2008) et de plusieurs maladies neurodégénératives telles la maladie d'Alzheimer (Adlar et al., 2005) et la maladie de Huntington (Pang et al., 2006). De plus, l'exercice physique atténue les symptômes et accélère la neuro-plasticité, lors de la destruction des neurones dopaminergiques du locus niger dans le cerveau de souris par injection de 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, une neurotoxine qui induit des symptômes permanents de la maladie de Parkinson chez la souris (Fisher et al., 2004).

L'amyotrophie spinale infantile (ASI) est une maladie neurodégénérative pédiatrique caractérisée, comme la SLA, par la perte des motoneurones de la moelle épinière. Au laboratoire, le développement d'un protocole d'entraînement de souris a permis l'étude des effets de l'exercice physique dans un modèle murin d'ASI de type 2 (type sévère de la maladie) (Grondard et al., 2005). Cette étude a montré que l'exercice régulier augmente la durée de vie de plus de 50% des souris ASI entraînées par rapport aux souris ASI sédentaires, préserve leurs fonctions motrices et augmente significativement leur force musculaire ainsi que leur activité spontanée. L'exercice physique chez les souris ASI protège les unités motrices : il promeut la survie des motoneurones et atténue l'atrophie musculaire induite par la maladie. Dans l'ASI, les motoneurones présentent une perte de la protéine SMN responsable de la maladie (Lefebvre et al., 1995), ainsi qu'un retard de développement (Biondi et al., 2008). L'exercice physique augmente l'expression de la protéine SMN dans les motoneurones (Grondard et al., 2005) et accélère la maturation des unités motrices (Biondi et al., 2008) en modulant l'expression génique des motoneurones et des fibres musculaires (Biondi et al., 2010). L'effet potentiellement neuroprotecteur de l'exercice physique chez les souris ASI entraînées serait dû à l'adaptation à l'exercice de l'expression génique des unités motrices.

4-2.2. Adaptation du système nerveux central

Lors de l'adaptation à l'exercice physique, des modifications dans l'ensemble des populations cellulaires du SNC et du système neuromusculaire impliquées dans la physiopathologie de la SLA sont induites, notamment par la modulation de l'expression génique des unités motrices et des cellules gliales.

4-2.2.1. Renforcement du système vasculaire et immunitaire

Les unités neurovasculaires constituent la BHE, dont la fonction d'approvisionnement en éléments nutritifs et d'enlèvement des déchets toxiques est essentielle au SNC. Elle le protège également des fluctuations de la composition ionique du sang, qui peuvent survenir après un repas ou un exercice et qui pourraient perturber la signalisation synaptique et axonale des neurones. Pour cela, l'exercice physique stimulerait la neuro-vascularisation dans le SNC ; il renforcerait les unités neurovasculaires en couplant l'induction de l'angiogenèse à la prolifération des astrocytes (Li et al., 2005). En effet, après une séance de course sur tapis roulant, 80% des vaisseaux sanguins détectés dans le cortex moteur d'un rat sont nouvellement formés (Ding et al., 2004). Ainsi,

l'exercice physique renforcerait le couplage neuro-métabolique, permettant de répondre à l'élévation des besoins énergétiques des motoneurones activés lors de l'exercice.

Il agirait également sur les cellules microgliales en modulant leur production de cytokines. Au niveau de la moelle épinière comme dans les muscles, l'exercice augmente la transcription de CTNF et de BDNF dans les astrocytes, des facteurs neurotrophiques agissant sur la résistance au stress cellulaire et la régénération des motoneurones (Siamilis et al., 2009). Ainsi, l'exercice physique réduit significativement la présence de ROS, dans la moelle épinière de rat lors de l'injection sous cutanée d' H_2O_2 (Siamilis et al., 2009). Un exercice de course régulier induit la surexpression des métallothionéines dans les astrocytes (Hashimoto et al., 2009) ; ces métallothionéines protègent également la moelle épinière de l'action des ROS.

4-2.2.2. Protection des motoneurones

Après un exercice physique, le système neuromusculaire subit des modifications structurales et fonctionnelles significatives, afin d'optimiser la transmission des stimuli électriques et chimiques (Gardiner et al., 2006 ; Ferraiuolo et al., 2009). Les changements survenus dans l'expression du génome des motoneurones en réponse à un exercice physique traduisent des modifications de leurs propriétés électro-physiologiques, notamment une altération des conductances ioniques (Gardiner et al., 2006).

Des modifications dans la signalisation des facteurs neurotrophiques et l'activation d'un processus de remodelage du cytosquelette sont également observées, afin d'améliorer la plasticité synaptique (Gardiner et al., 2006 ; Ferraiuolo et al., 2009). L'exercice induit une restructuration dendritique et augmente la synthèse de protéines qui améliorent le transport axonal bidirectionnel (Gardiner et al., 2006). Les modifications observées dans les unités motrices à la suite d'un exercice physique ont pour but d'augmenter l'efficacité de la JNM : elles permettent d'accroître la libération de neurotransmetteur à la synapse et de renforcer la communication entre l'axone du motoneurone et le muscle, par l'augmentation du contenu en acétylcholinestérase dans le motoneurone et du nombre de récepteurs à l'acétylcholine à la membrane des fibres musculaires.

Les facteurs trophiques sécrétés par les muscles adaptés à l'exercice agissent sur les motoneurones par effet rétrograde ou systémique en traversant la BHE ; ces facteurs ont des effets neuroprotecteurs et induisent la neurogénèse dans le SNC (pour revue : McCrate and Kaspar, 2008). Des essais thérapeutiques de l'utilisation de ces facteurs de croissance, afin de mimer les

effets de l'exercice physique, ont été initiés dans des modèles murins de dysfonctionnement du SNC ; le traitement le plus étudié est celui par l'IGF-1.

4-2.3. Activation de la voie IGF-1 par l'exercice physique

L'IGF-1 circulant est considéré aujourd'hui comme un des principaux médiateur des effets de l'exercice physique à court ou long terme sur le SNC. Afin de bénéficier de son action pléiotrophique, l'exercice physique facilite le passage de l'IGF-1 à travers la BHE (Carro et al., 2001 ;Torres-Aleman et al., 2005). Lors d'un exercice physique, la signalisation intracellulaire de l'IGF-1 module l'expression du génome des motoneurones activés ; elle induit notamment l'expression du marqueur d'activation cFos (Carro et al., 2000). Elle protège également les motoneurones de l'effet toxique du glutamate, lors d'une activation répétée (Carro et al., 2001). En effet, la neuroprotection induite par l'exercice physique, sur des lésions cérébrales provoquées par l'injection intracérébrale d'acide domoïque qui mime l'excitotoxicité glutamatergique, est dépendante de l'IGF-1 ; l'injection d'anticorps bloquant l'IGF-1 inhibe cet effet (Carro et al., 2001). La voie IGF-1 apparaît comme une voie majeure de neuroprotection induite par l'exercice physique, mais les mécanismes cellulaires et moléculaires qui supportent les effets bénéfiques de l'exercice physique sur le SNC sont complexes. L'exercice physique activerait des mécanismes dépendants et indépendants de l'IGF-1, qui varieraient en fonction de l'intensité de l'exercice pratiqué (Trejo et al., 2008 ; Llorens-Martín et al., 2010).

4-2.3.1. Caractéristiques moléculaires de la voie IGF-1

L'IGF-1 est un facteur de croissance peptidique de la même famille que l'insuline, l'IGF-2 (*Insulin-like growth factor type 2*) et la relaxine (pour revue : et Clemmons, 1995). Cette hormone de structure moléculaire similaire à l'insuline est sécrétée majoritairement par le foie et plus minoritairement par de nombreux types cellulaires telles les cellules gliales, les fibres musculaires ou les cellules tumorales (Tanaka et al., 1999). L'IGF-1 est synthétisé en très grande quantité pendant le développement fœtal, puis le niveau d'IGF-1 circulant dans le sang décroît au cours de la vie post-natale. Au stade adulte, la sécrétion d'IGF-1 par le foie est alors stimulée par l'hormone de croissance neuroendocrine (GH ; *growth hormone*). L'IGF-1 a une action autocrine et paracrine ; libéré dans la circulation sanguine, il a également une action endocrine. La biodisponibilité en l'IGF-1 est modulée par son interaction avec des transporteurs (*IGFBP* ; *insulin-like growth factor binding proteins*), qui potentialisent ou inhibent son effet en le

protégeant de la dégradation ou en empêchant sa fixation à son récepteur spécifique, le récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R) (pour revue : Jones et Clemmons, 1995). La signalisation de la voie IGF-1 dépend du taux d'IGF-1, de sa disponibilité en fonction des IGFBPs auxquels il est lié et de la sensibilité de la cellule à l'activation de l'IGF-1R (pour revue : Jones et Clemmons, 1995). L'IGF-1 peut également se lier aux récepteurs de l'IGF-2 (IGF-2R) ou de l'insuline (IR), mais avec des affinités moindres.

L'IGF-1R est un récepteur mitogène qui présente une forte homologie avec l'IR (pour revue : Jones et Clemmons, 1995). Ce sont des holorécepteurs homodimériques à activité tyrosine kinase ; il existe également des récepteurs hybrides constitués d'un monomère IR et d'un monomère IGF-1R. Chaque monomère est composé de deux sous-unités reliées par un pont disulfure : une sous-unité α extracellulaire qui forme le site de fixation spécifique au ligand et une sous-unité β transmembranaire dont le domaine cytoplasmique possède une activité tyrosine kinase. L'IGF-1R est activé principalement par l'IGF-1 ; il peut également être activé par l'IGF-2 et par l'insuline avec une affinité moindre.

Lors de la liaison de l'IGF-1 à son récepteur, le signal intracellulaire est initié par la trans-autophosphorylation de l'IGF-1R qui constitue ainsi un site d'ancrage pour les protéines IRS (*insuline receptor substrat*) (pour revue : Chitnis et al., 2008). Deux voies majeures de signalisation peuvent ainsi être activées. La première est la voie de signalisation PI3K/Akt (*phosphatidyl Inositol 3-Kinase / Akt*) ; cette voie est impliquée dans la survie cellulaire. La seconde est la voie de signalisation des kinases qui phosphorylent ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase) ; cette voie est impliquée dans la prolifération et la mort cellulaire, en fonction de la chronicité de son activation. L'effet visible de l'activation de l'IGF-1R dans les neurones résulterait donc de la balance entre les signaux anti et pro-apoptotiques induits par ces deux voies (Zhang et al., 2004 ; Subramaniam et al., 2005).

4-2.3.2. Le rôle de l'IGF-1

L'action de l'IGF-1 est essentielle à la croissance et à la régulation du métabolisme des mammifères (pour revue : Jones et Clemmons, 1995 ; Zhu et al., 2008). La distribution généralisée de son récepteur fait de l'IGF-1 un des principaux facteurs trophiques de la circulation sanguine. L'IGF-1 agit sur de nombreux types cellulaires. En fonction du type cellulaire et de l'état de différenciation de la cellule, il régule sa prolifération, sa croissance, sa mobilité ainsi que sa survie, en modulant l'expression de son génome. L'IGF-1 régule également les mécanismes de

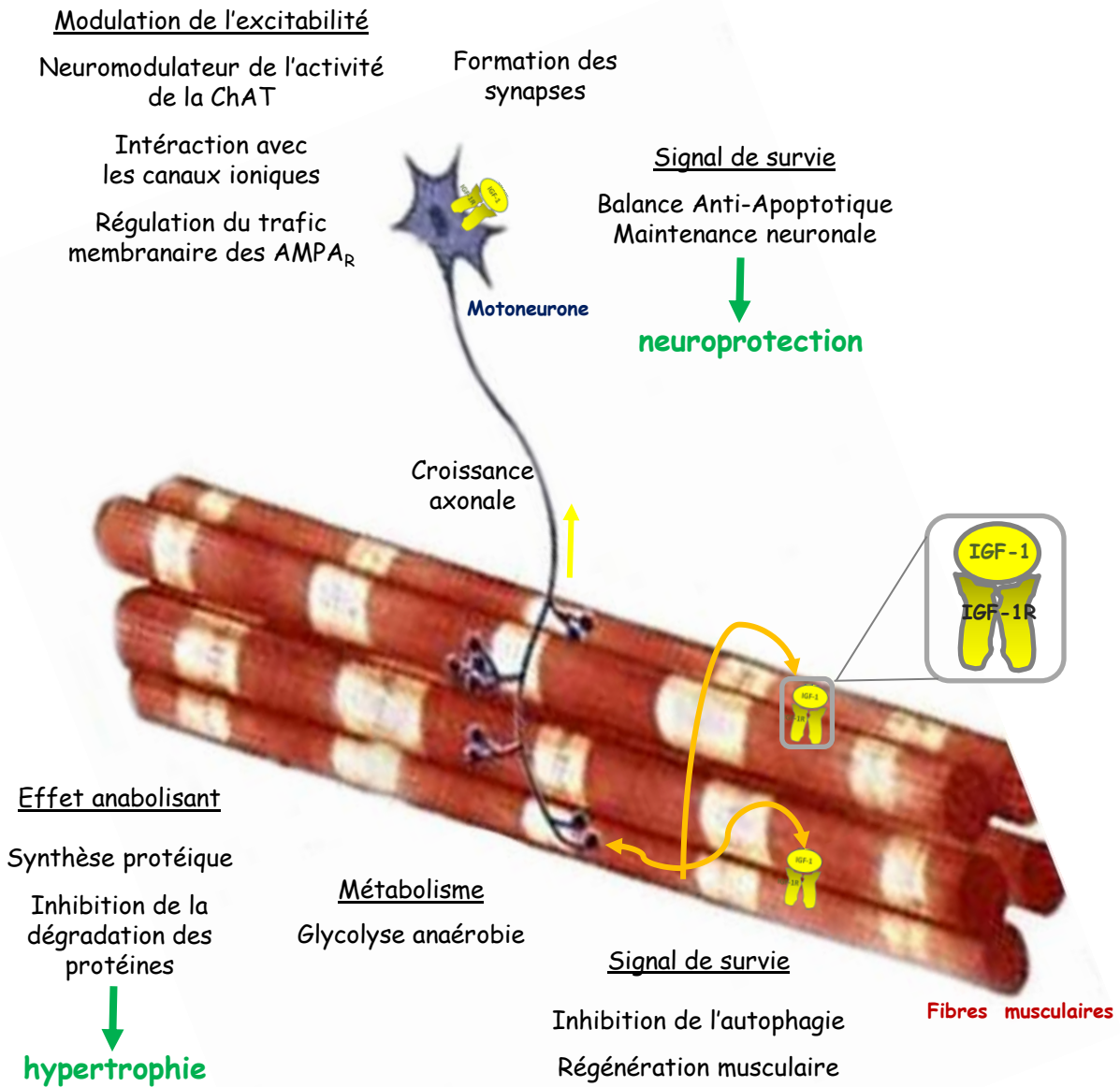


Figure 18 : Action de l'IGF-1 sur l'unité motrice

Au cours d'une séance d'exercice physique, l'IGF-1 est produit massivement par les fibres musculaires. Il agit directement sur les muscles de manière autocrine et paracrine. L'IGF-1 musculaire agit également sur les motoneurons de manière paracrine par une signalisation rétrograde ou de manière endocrine.

contrôle du métabolisme cellulaire. En fonction des nutriments disponibles, il influence la balance énergétique entre le stockage sous forme de graisse ou de glycogène et la consommation d'énergie ; il agit sur l'homéostasie du glucose, en stimulant son utilisation par glycolyse anaérobie. Chez les mammifères, l'insuline favorise l'utilisation préférentielle du glucose dans les tissus périphériques ; dans le SNC, elle n'est présente qu'en faible quantité alors que l'IGF-1 y est abondant. A l'âge embryonnaire et post-natal, l'IGF-1 est synthétisé directement au niveau du SNC ; mais à l'âge adulte, la principale source d'IGF-1 du SNC est l'IGF-1 circulant après passage de la BHE (pour revue : Carro et Torres-Aleman, 2006).

L'effet de l'IGF-1 est particulièrement remarquable sur le système neuromusculaire (Figure 18). Au niveau des motoneurones, l'IGF-1 promeut les processus de croissance axonale et la formation des synapses au cours du développement (Ozdinler et Macklis, 2006). A l'âge adulte, IGF-1 agit comme un neuromodulateur des activités de l'acide glutamique décarboxylase et de l'acétylcholine transférase (ChAT) (Bilic et al., 2006). Il soutient la survie des motoneurones embryonnaires et des motoneurones adultes après traumatisme, en modulant l'excitabilité des neurones par son interaction avec les canaux ioniques membranaires (K^+ , Cl^- et Ca^{2+}) et sa régulation du trafic membranaire des récepteurs des neurotransmetteurs, tels les récepteurs AMPA (pour revue : Doré et al., 1997 ; Carro et Torres-Aleman, 2006). Cet effet neuroprotecteur avéré de l'IGF-1 ne dépend pas uniquement de l'activation des IGF-1R sur les motoneurones, mais également de son activation sur les cellules gliales. L'IGF-1 est un modulateur de la réponse immune et inflammatoire : il participe au recrutement et à la prolifération des cellules gliales après un dommage cérébral ; il module l'expression du génome des astrocytes. L'effet de l'IGF-1 sur les cellules gliales conditionne indirectement la survie des motoneurones. Au niveau périphérique, l'IGF-1 stimule la prolifération et la différenciation des cellules musculaires lisses et squelettiques, ainsi que l'utilisation du glucose par glycolyse anaérobie (Chin et al., 2009). Cet effet anabolisant de l'IGF-1 sur le muscle est médié par la voie PI3K/Akt : elle inhibe la protéine FOXO3 qui initie la dégradation protéique par le protéasome et l'autophagie ; parallèlement, elle active la protéine mTOR qui initie la synthèse de nouvelles protéines.

4-2.3.3. Les perturbations de la voie IGF-1 dans la SLA

La voie IGF-1 est particulièrement perturbée dans la SLA : les patients SLA présentent une diminution du taux plasmatique d'IGF-1 (Torres-Aleman et al., 1998), ainsi qu'une diminution de l'IGF-1 libre dans le fluide cérébro-spinal (Wilczak et al., 2003 ; Bilic et al., 2006). Cette diminution d'IGF-1 libre pourrait être due à l'augmentation de l'expression de plusieurs

IGFBP inhibitrices, au niveau sanguin (Torres-Aleman et al., 1998) et par les motoneurones eux-mêmes (Wilczak et al., 2003), notamment les IGFBP 2, 5, et 6. La diminution de la disponibilité en IGF-1 au niveau du SNC pourrait également être une conséquence de la rupture de la BHE, en raison des astrocytes activés.

Cette diminution d'IGF-1 dans la moelle épinière pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de l'IGF-1R constatée chez les patients SLA, particulièrement concentrée au niveau du canal central et des cornes dorsales (Adem et al., 1994). Chez les souris SLA en phase symptomatique, l'augmentation du nombre d'IGF-1R a été constatée sur les motoneurones (Wilczak et al., 2003) et les astrocytes activés qui expriment anormalement ce récepteur (Chung et al., 2003). De plus, la voie IGF-1 serait inhibée dans les motoneurones, en raison de l'activation des cellules gliales : l'inflammation par les cellules microgliales activées qui produisent du TNF α et l'accumulation de glutamate dans l'espace synaptique dû au dysfonctionnement des astrocytes activés induiraient une résistance des neurones à l'IGF-1 (pour revue : Trejo et al., 2004). En effet, le TNF α (Ye et al., 2003) et l'excès de glutamate (Garcia-Galloway et al., 2003) agissent directement sur la fonctionnalité de l'IGF-1R en inhibant le recrutement moléculaire de l'IRS, l'élément initiateur de la voie IGF-1.

Compte tenu du rôle essentiel de l'IGF-1 dans le fonctionnement du système nerveux, le manque d'IGF-1 pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse et la progression de la maladie. D'ailleurs, lorsque les cellules de Schwann des souris SLA produisent moins d'IGF-1, la SLA développée est plus agressive (Lobsiger et al., 2009).

4-2.3.4. Les effets de l'activation de la voie IGF-1 dans la SLA

Les données expérimentales et cliniques suggèrent que l'utilisation de l'IGF-1 dans le traitement de diverses neuropathies, maladies neurodégénératives ou lésions cérébrales pourrait réduire ou ralentir les pertes de neurones (pour revue : Carro et Torres-Aleman, 2006). L'injection d'IGF-1 a donc été envisagée comme traitement thérapeutique des patients SLA (pour revue : Mitchell et Borasio, 2007).

Dans la première étude américaine, les patients SLA traités à l'IGF-1 administré par injection sous-cutanée présentaient un ralentissement significatif de la perte des fonctions motrices et une meilleure qualité de vie (Lai et al., 1997). Cependant, une étude similaire menée sur des populations européennes n'a pas confirmé ces résultats (Borasio et al., 1998). Une récente

étude vient de confirmer l'absence d'effet bénéfique de ce type de traitement dans la SLA, que ce soit sur la survie des patients ou sur la progression des déficits moteurs (Sorenson et al., 2008). Pour être disponible dans la moelle épinière, l'IGF-1 doit passer la BHE ; dans ces conditions d'injection, les quantités d'IGF-1 délivrées aux motoneurons spinaux semblent trop faibles pour induire un effet bénéfique visible sur les patients SLA.

Afin d'augmenter la concentration d'IGF-1 au niveau de la moelle épinière, les effets d'injections intrathécales d'IGF-1 ont été étudiés chez les souris (Narai et al., 2005) et les patients SLA (Nagano et al., 2005). Ces essais cliniques ont révélé des effets bénéfiques chez les patients lors d'injections lentes (durant 6h, toutes les 2 semaines, pendant 40 semaines) et chez les souris lors d'un traitement par infusion continue. L'IGF-1 délivré directement dans le SNC induit une augmentation significative de la durée de vie et une préservation des fonctions motrices des patients et des souris SLA.

L'utilisation de vecteurs viraux recombinant AAV/IGF-1 (adeno associated virus/IGF-1), permettant l'expression soutenue et à long terme d'IGF-1 dans la moelle épinière, a été évaluée chez les souris SLA en phase symptomatique ou asymptomatique. L'injection intramusculaire de ce vecteur dans les quadriceps des membres postérieurs et les intercostaux de souris SLA en phase symptomatique à P90 a un effet curatif; elle augmente leur durée de vie de 22 jours en moyenne (Kaspar et al., 2003). Cependant, son effet préventif obtenu par injection aux souris SLA en phase asymptomatique à P60 est plus efficace : la durée de vie de ces souris est alors augmentée de 37 jours et l'apparition des symptômes est retardée de 30 jours en moyenne (Kaspar et al., 2003). L'injection stéréotaxique de ce vecteur dans la substance grise de la moelle épinière lombaire (Lepore et al., 2007) ou dans le noyau cérébelleux profond (Dodge et al., 2008) de souris SLA asymptomatiques a le même effet sur le développement clinique de la maladie que l'injection intramusculaire. L'injection de ce vecteur permet également de protéger les motoneurons, de limiter l'activation des cellules gliales et de diminuer leurs productions de TNF α et de NO, facilitant ainsi l'activation de la voie de signalisation IGF-1 dans les motoneurons, ainsi protégés.

D'autres méthodes de surexpression de l'IGF-1 et de ciblage des motoneurons ont également été testées, chez les souris SLA, notamment la surexpression périphérique d'IGF-1 restreinte au muscle ; mais les résultats obtenus sont contradictoires. L'expression musculaire d'une isoforme d'IGF-1 non-circulante semble ralentir considérablement la maladie chez la souris SLA et exercer une neuroprotection (Dobrowolny et al., 2005 et 2008). Elle a un effet hypertrophique sur le muscle et active la prolifération des cellules satellites et la fusion des

| Publication | Type d'exercice | Résultats | | |
|-------------------------|--|--|--|--|
| | | Déclin des fonctions motrices | Fonctions respiratoires | Symptômes |
| Pinto et al., 1999 | Exercice de course sur tapis roulants + ventilation assistée non-invasive | Atténuation après 12 mois d'entraînement | Amélioration | ND |
| Drory et al., 2001 | Exercices d'endurance de charge modérée sollicitant les muscles des membres et du tronc + des exercices d'étirements adaptés à chaque patient 15 min/jour, 2 fois/jour | Atténuation après 3 mois d'entraînement | ND | Atténuation de la spasticité et de la fatigue et amélioration de la qualité de vie |
| Bello-Haas et al., 2007 | Exercices de résistance 3 fois/semaine + des exercices d'étirements quotidiens adaptés à chaque patient | Atténuation après 6 mois d'entraînement | Pas de différence significative | Amélioration de la qualité de vie |
| Cheah et al., 2009 | Programme d'entraînement des muscles inspiratoires de 12 semaines | ND | Amélioration et augmentation des capacités inspiratoires | Amélioration de la qualité de vie |

Tableau 4 : Etudes cliniques des effets de l'exercice physique chez les patients SLA

myoblastes, comme en témoigne la présence de nombreuses fibres musculaires aux noyaux centraux. Mais ces résultats n'ont pas été confirmés par un autre groupe (Messi et al., 2007).

4-3. Controverse des effets de l'exercice physique sur la SLA

Deux effets opposés de l'exercice physique peuvent être envisagés dans la SLA. 1) L'exercice physique pourrait favoriser le développement de la SLA. Les stress oxydant, métabolique et mécanique provoqués par l'exercice physique au niveau musculaire pourraient participer activement aux mécanismes physiopathologiques de la maladie. 2) L'adaptation progressive de l'organisme lors d'un entraînement régulier pourrait limiter la progression de la SLA, atténuer la dégénérescence neuronale et renforcer l'interaction neuromusculaire. L'effet bénéfique de l'exercice physique serait alors induit par le développement des défenses anti-oxydantes et contre l'excitotoxicité, ainsi que par la modulation des niveaux d'expression des protéines anti-apoptotiques dans les unités motrices sollicitées.

Afin de tester les effets de l'exercice physique, des études ont été initiées chez les patients SLA (Tableau 4). Des études ont également été initiées sur les modèles animaux (Tableau 5), afin de définir l'efficacité et les mécanismes par lesquels l'exercice physique pourrait induire une neuroprotection dans la SLA.

4-3.1. Les effets de l'exercice physique sur les patients SLA

Malgré une amélioration pondérée des fonctions motrices des patients SLA soumis à un ensemble d'exercices adaptés au cas par cas par rapport aux patients SLA sédentaires (Drory et al., 2001 ; Bello-Haas et al., 2007), la plupart des études ne montrent aucune incidence significative sur la qualité de la vie, la fatigue ou la force musculaire des patients SLA entraînés (pour revue : Patel et Hamadeh, 2009) (Tableau 4). Le renforcement de la musculature respiratoire semble cependant présenter des effets bénéfiques sur les patients SLA. Un essai combinant un exercice de course sur tapis roulant à une ventilation assistée non invasive a montré un renforcement significatif de la force musculaire inspiratoire des patients SLA (Pinto et al., 1999). Les patients entraînés présentaient une augmentation des fonctions respiratoires et des fonctions motrices, par rapport aux patients sédentaires. Dans une étude plus récente, les volumes pulmonaires et la force musculaire inspiratoire de patients SLA ont été évalués avant, pendant et

| Référence | Souche Souris utilisée | Type d'exercice | Résultats | | |
|-------------------------|--|---|---|---|--|
| | | | Déclin des Fonctions motrices | Durée de vie | Neuroprotection |
| Veldink et al., 2003 | SOD1 ^{G93A low copy} mâles & femelles SOD1 ^{G93A high copy} femelles P56 | Exercice sur tapis roulant motorisé 16m/min, 45'/jour 5 jours/7 | Pas d'effet sur les mâles Retard important chez les femelles SOD1 ^{G93A low copy} Pas d'effet sur les SOD1 ^{G93A high copy} | Pas d'effet sur les mâles Pas d'effet pour les femelles SOD1 ^{G93A low copy} Augmentation de 4 jours pour les SOD1 ^{G93A high copy} | Non déterminé Pas de neuroprotection pour les femelles quelque soit la souche |
| Kirkinesos et al., 2004 | SOD1 ^{G93A high copy} mâles & femelles P50 | Exercice sur tapis roulant motorisé 13m/min, 30'/jour 5 jours/7 | Pas d'effet quelque soit le sexe | Augmentation de 10 jours pour les mâles | Non déterminé |
| Mahoney et al., 2004 | SOD1 ^{G93A high copy} mâles P40 | Exercice sur tapis roulant motorisé 9 à 22 m/min, 45'/jour 5 jours/7 | Pas d'effet | Accélération de la mort de 10 jours | Non déterminé |
| Liebetanz et al., 2004 | SOD1 ^{G93A high copy} mâles P35 | Exercice alternatif de marche en roue motorisée 10h/jour, 5 jours/7 | Pas d'effet | Pas d'effet | Non déterminé |
| Kaspar et al., 2005 | SOD1 ^{G93A high copy} mâles P40 | Exercice volontaire en roue, accès quotidien 2H 6H 12H | Pas d'effet Retard Retard | Augmentation 7 jours 40 jours 25 jours | Non déterminé Neuroprotection Non déterminé |
| Carreras et al., 2010 | SOD1 ^{G93A high copy} mâles P30 | Exercice sur tapis roulant motorisé Intensité modérée (10 min,30'/jour,3/7) Forte intensité (20 min,60'/jour,5/7) | Retard Accélération | Non déterminé Non déterminé | Neuroprotection Transitoire Pas de neuroprotection |

Tableau 5 : Etudes des effets de l'exercice physique dans les modèles souris SLA

après un programme d'exercice de 12 semaines des muscles inspiratoires (Cheah et al., 2009). Dans cette étude, des améliorations des fonctions respiratoires ont également été observées.

Ainsi, les études sur l'homme montrent que les exercices modérés ont tendance à améliorer la santé des patients SLA en augmentant leurs fonctions motrices et leurs capacités respiratoires, limitant ainsi le développement des symptômes de la maladie. Bien que les cohortes étudiées soient trop faibles pour déterminer dans quelle mesure le renforcement musculaire par l'exercice physique peut être bénéfique sur la durée de vie des patients SLA, aucun effet néfaste n'a été constaté.

4-3.2. Les effets de l'exercice physique chez les souris SLA

Les effets d'un exercice de course par des protocoles différents ont été étudiés chez les souris SLA (Tableau 5). Ces études ont données des résultats contradictoires.

L'entraînement de souris SLA asymptomatiques en course forcée sur tapis roulant motorisé à une intensité modérée montre un effet bénéfique sur le développement de la maladie, que ce soit sur l'apparition des symptômes ou la durée de vie (Kirkinezos et al., 2003 ; Veldink et al., 2003). Cependant, cet effet semble dépendre du sexe des animaux. Les conclusions de la première étude menée sur la souche de souris SLA SOD1^{G93A high copy} indiquent que la course pratiquée à partir de P50 - à la vitesse de 13 mètres par minutes (m/min), à raison de 30 minutes par jour et ce 5 jours par semaine - est bénéfique pour les souris SLA mâles, alors qu'il n'a aucun effet pour les femelles SLA (Kirkinezos et al., 2003). Bien que l'exercice de course ne modifie pas l'âge d'apparition des symptômes, la durée de vie des souris SLA mâles entraînées est augmentée de 8%, soit un prolongement d'une dizaine de jours. De manière surprenante, les conclusions de la seconde étude menée sur les souches de souris SLA^{G93A low copy} et SLA^{G93A high copy} entraînées à la course à partir de P56 - à la vitesse de 16 m/min à raison de 45 minutes par jour et ce 5 jours par semaine - ne montrent pas d'effet sur la durée de vie des souris mâles quelque soit la souche (Veldink et al., 2003). Pourtant, cet exercice a des effets bénéfiques sur le développement de la SLA chez les femelles. Il retarde de manière très significative l'apparition des symptômes sans modifier la durée de vie des femelles SLA^{G93A low copy}. Au contraire, il augmente la survie des femelles SLA^{G93A high copy} de 4 jours sans modifier l'âge d'apparition des symptômes. Dans ces deux études, les effets bénéfiques de l'exercice et le polymorphisme sexuel sont attribués aux effets neuroprotecteurs potentiels des hormones sexuelles, aux androgènes dans le premier cas et aux œstrogènes dans le second.

Le bénéfice d'un exercice de course sur les souris SLA SOD1^{G93A high copy} semble dépendre de l'intensité à laquelle il est pratiqué. En effet, un exercice de course sur tapis roulant motorisé pratiqué à partir de P40, dont la vitesse est augmentée progressivement de 9 à 22 m/min à raison de 45 minutes par jour et ce 5 jours par semaine, accélère le développement de la SLA (Mahoney et al., 2004). Dans ces conditions, l'exercice n'a pas d'effet sur les souris SLA femelles ; mais bien que l'exercice n'ait pas d'effet sur l'apparition des symptômes, la mort des souris SLA mâles est avancée de 10 jours. Au contraire, un exercice alternatif de marche forcée en roue motorisée pratiqué par des souris SLA de même souche, à partir de P35 et à raison de 10h par jour au total, n'accélère ni l'apparition du déficit moteur ni la mort des animaux (Liebetanz et al., 2004).

Les effets d'un exercice de course, en fonction de la durée, ont également été évalués sur ces souris SLA. Une roue non-motorisée a été mise en accès libre pendant 2h, 6h ou *ad libitum* (soit 12h pour un cycle jour/nuit alterné) par jour, dans la cage de souris mâles SLA SOD1^{G93A high copy} à partir de P40 (Kaspar et al., 2005). L'effet maximum de cet exercice est obtenu lorsque les souris SLA ont un accès quotidien à la roue pendant 6h. Dans ces conditions, les souris SLA présentent un net ralentissement de la progression de la maladie et une amélioration des fonctions motrices ; la survie de ces souris est augmentée de 40 jours en moyenne. Cet effet est largement supérieur à celui obtenu lors d'un accès quotidien à la roue pendant 2h ou 12h. L'augmentation de la survie des souris SLA est réduite à 7 jours pour 2h d'accès quotidien et à 25 jours pour l'accès *ad libitum*, sans qu'aucun effet ne soit observé sur le déficit moteur. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'un exercice de course doit être pratiqué suffisamment longtemps pour avoir un effet clinique significatif sur les souris SLA, sans être pratiqué de façon excessive.

L'effet neuroprotecteur de la course au niveau de la moelle épinière lombaire est également controversé chez les souris SLA. Un exercice de course sur tapis roulant motorisé n'induit pas, au cours de la phase symptomatique, une différence significative du nombre de motoneurones spinaux chez les souris femelles SLA^{G93A low copy} entraînées par rapport aux sédentaires, malgré (Veldink et al., 2003). Au contraire, la forte augmentation de la durée de vie des souris mâles SLA^{G93A high copy} constatée par Kaspar et ses collaborateurs (2005), avec un exercice de course volontaire en roue accessible quotidiennement pendant 6h, est corrélée à une neuroprotection significative durant la phase symptomatique. Cependant, la protection des motoneurones par l'entraînement à la course ne serait que transitoire. En effet, les souris SLA^{G93A high copy} entraînées à raison de 30 minutes par jour et ce 3 jours par semaine à la vitesse de 10 m/min présentent, à P95, un nombre de motoneurones spinaux significativement supérieur à celui

des souris SLA sédentaires (Carreras et al., 2010). Mais, cette différence disparaît, à P120, à l'approche de la mort de l'animal.

L'effet neuroprotecteur de l'exercice physique sur l'excitotoxicité glutamatergique dans le SNC, un des principaux mécanismes physiopathologiques de la SLA, est médié par l'IGF-1 (Carro et al., 2001) ; l'exercice physique faciliterait notamment le passage de l'IGF-1 à travers la BHE. Afin de définir si l'effet neuroprotecteur qu'ils ont obtenu sur les souris SLA entraînées dépend de l'IGF-1, Kaspar et ses collaborateurs (2005) ont combiné un exercice volontaire de course en roue accessible quotidiennement pendant 6h à des injections intramusculaires de vecteurs AAV/IGF-1. Les injections ont été réalisées dans les muscles intercostaux et des membres postérieurs, lors de l'apparition des symptômes à P90 ; elles permettent une expression massive de l'IGF-1 par les motoneurones. Ces deux « traitements » simultanés ont un effet synergique sur les souris SLA^{G93A high copy} : leur combinaison prolonge la durée de vie de 40%, soit 83 jours en moyenne de survie par rapport aux souris SLA sédentaires non-injectées. L'analyse moléculaire des effets de cette combinaison ou de chacune de ses composantes révèle que l'exercice physique seul suffit à induire une augmentation de l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-Xl dans la moelle épinière, indépendamment de la surexpression de l'IGF-1 (Kaspar et al., 2005). Ces résultats confirment bien l'activation par l'exercice physique de mécanismes neuroprotecteurs dépendants et indépendants de l'IGF-1 dans la SLA, comme précédemment décrit dans d'autres contextes (Trejo et al., 2008 ; Llorens-Martín et al., 2010).

A ce jour, la combinaison de l'exercice physique à l'augmentation de l'expression de l'IGF-1 dans les motoneurones spinaux est le traitement le plus efficace obtenu sur les souris SLA^{G93A high copy}.

PROBLEMATIQUE

L'exercice physique pourrait être envisagé comme un traitement thérapeutique de la SLA. Cependant, l'analyse des effets d'un exercice de course dans le modèle souris SLA SOD1G93A révèle des résultats contradictoires. Pour certains, la course pratiquée à intensité modérée retarderait l'apparition des symptômes (Kaspar et al., 2005 ; Kirkinetzos et al., 2003) et augmenterait la durée de vie (Kaspar et al., 2005) des souris SLA, alors que pour d'autres elle n'a pas d'effet (Veldink et al., 2003). Lorsqu'elle est pratiquée à forte intensité, la course accélérerait la mort des souris SLA (Mahoney et al., 2004) ou n'aurait pas d'effet (Liebetanz et al., 2004). Le potentiel neuroprotecteur de la course est également controversé ; seul Kaspar et ses collaborateurs (2005) obtiennent une protection des motoneurones spinaux chez les souris SLA entraînées.

Pour tenter de résoudre ces controverses, il a été récemment proposé que les différents effets observés sur le développement des signes cliniques moteurs de la SLA et sur la protection des motoneurones spinaux dépendent de l'intensité de l'exercice pratiqué (McCrate et Kaspar, 2008). Un exercice pratiqué à intensité modérée serait bénéfique, alors qu'un exercice pratiqué à forte intensité serait néfaste.

Cependant, aucune hypothèse cellulaire ou moléculaire n'est proposée pour tenter d'expliquer la divergence de ces résultats.

Afin de répondre aux questions laissées en suspend par la littérature, nous avons mis en place deux protocoles d'exercice physique très différents : un exercice de forte intensité, la nage, et un exercice d'intensité modérée, la course.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé ces deux protocoles d'exercices dans une population de souris sauvages. Nous nous sommes intéressés au type d'unités motrices recrutées préférentiellement par chacun de ces exercices : nous avons défini le type de population motoneuronale activée spécifiquement, la plasticité musculaire et l'adaptation du métabolisme énergétique à la nage et à la course.

Dans un deuxième temps, nous avons soumis à un entraînement à la nage ou à la course, des souris SLA en phase pré-symptomatique. Sur ces deux populations de souris SLA entraînées comparées à une population de souris SLA sédentaires, nous avons réalisé une étude clinique et comportementale. Nous avons également effectué une analyse cellulaire de l'unité motrice au cours de la phase symptomatique. Nous nous sommes particulièrement intéressés au potentiel neuroprotecteurs de ces deux exercices.

Par ailleurs, la SLA perturbe le métabolisme énergétique ; elle induit un hypermétabolisme lipidique chez les patients (pour revue : Piquet, 2006) et les modèles animaux (Dupuis et al., 2004 et 2007 ; Fergani et al., 2007). Or, les exercices de nage et de course ont des effets différents sur l'orientation du métabolisme énergétique chez l'homme : la nage favorise le métabolisme glycolytique, alors que la course favorise le métabolisme oxydatif et l'utilisation privilégiée des lipides (Chen et al., 2003). Des effets différents selon l'exercice pratiqué peuvent être attendus sur cette maladie. Nous avons donc analysé les adaptations du métabolisme énergétique induites par nos exercices de nage et de course, dans des populations de souris sauvages et SLA.

RESULTATS

Exercise-Induced Modulation of Calcineurin Activity Parallels the Time course of Myofibre Transitions

Clément GRONDARD, Olivier BIONDI, Claude PARISET, Philippe LOPES, **Séverine DEFORGES**, Sylvie LECOLLE, Bruno DELLA GASPERA, Claude-Louis GALLIEN, Christophe CHANOINE et Frédéric CHARBONNIER

The journal of Cellular Physiology, 2008, Jan;214(1):126-35

1. Introduction de l'article 1

Chez les rongeurs, la majorité des recherches fondamentales sur les effets de l'exercice physique, en particulier sur les adaptations du système neuromusculaire, utilise uniquement des protocoles de course avec des intensités différentes. Les études chez l'homme ont pourtant montré des adaptations significativement différentes obtenues par des entraînements à la course et à la nage, au niveau systémique sur le métabolisme énergétique et au niveau cellulaire que ce soit sur les muscles ou les populations motoneuronales. Or chez les rongeurs, aucun protocole de nage parfaitement paramétré, permettant d'obtenir le geste de nage « naturel » existe.

Dans ce contexte scientifique, nous avons développé un nouvel ergomètre, une piscine à courant ajustable ; nous avons précisément paramétré un protocole de nage forcée pour souris. Dans un premier temps, nous avons analysé le comportement moteur de souris sauvages pratiquant cet exercice de nage ou un exercice classique de course sur tapis roulant motorisé. Pour cela, nous avons mesuré l'amplitude et la fréquence des mouvements effectués par les membres postérieurs des souris au cours de chacun de ces exercices.

Puis, nous avons comparé les adaptations neuromusculaires induites par ces exercices de nage et de course, dans une population de souris mâles sauvages. Le lactate sanguin étant un indicateur du type de métabolisme musculaire privilégié lors d'un exercice physique, nous avons évalué les niveaux de lactate sanguin après une séance de nage ou de course. Nous nous sommes également intéressés au type d'unités motrices recrutées préférentiellement par chacun de ces exercices. Au niveau de la moelle épinière, nous avons défini la population motoneuronale activée de manière préférentielle, mise en évidence par l'expression du marqueur d'activité cFOS. Au niveau musculaire, nous avons analysé le phénotype de deux muscles extenseurs de la cheville, le *Soleus* - un muscle lent - et le *Plantaris* - un muscle rapide -, après 6 et 12 semaines d'un entraînement à la nage ou à la course.

Exercise-Induced Modulation of Calcineurin Activity Parallels the Time Course of Myofibre Transitions

CLÉMENT GRONDARD, OLIVIER BIONDI, CLAUDE PARISSET, PHILIPPE LOPES, SÉVERINE DEFORGES, SYLVIE LÉCOLLE, BRUNO DELLA GASPERA, CLAUDE-LOUIS GALLIEN, CHRISTOPHE CHANOINE, AND FRÉDÉRIC CHARBONNIER*

Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux Sensorimoteurs, UMR 7060 CNRS, Equipe Biologie du Développement et de la Différenciation Neuromusculaire, Paris Cedex, France

This study establishes a causal link between the limitation of myofibre transitions and modulation of calcineurin activity, during different exercise paradigms. We have designed a new swimming-based training protocol in order to draw a comparison between a high frequency and amplitude exercise (swimming) and low frequency and amplitude exercise (running). We initially analysed the time course of muscle adaptations to a 6- or 12-week swimming- or running-based training exercise program, on two muscles of the mouse calf, the slow-twitch *soleus* and the fast-twitch *plantaris*. The magnitude of exercise-induced muscle plasticity proved to be dependent on both the muscle type and the exercise paradigm. In contrast to the running-based training which generated a continuous increase of the slow phenotype throughout a 12-week training program, swimming induced transitions to a slower phenotype which ended after 6 weeks of training. We then compared the time course of the exercise-induced changes in calcineurin activity during muscle adaptation to training. Both exercises induced an initial activation followed by the inhibition of calcineurin. In the muscles of animals submitted to a 12-week swimming-based training, this inhibition was concomitant with the end of myofibre transition. Calcineurin inhibition was a consequence of the inhibition of its catalytic subunit gene expression on one hand, and of the expression increase of the modulatory calcineurin interacting proteins 1 gene (MCIP1), on the other. The present study provides the first experimental cues for an interpretation of muscle phenotypic variation control.

J. Cell. Physiol. 214: 126–135, 2008. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Muscle fibres are dynamic structures that are capable of adapting their phenotype in response to several physiological stimuli, and more particularly, to an increase or decrease in motoneuron activity. Based on the isoform of myosin heavy chain (MyHC) they express, mammalian skeletal muscles can be classified in slow (type I) and fast (type II) fibres. The fast fibre type can be further divided into three different subsets, from slower type IIA fibres to faster IIX (also referred to as IID) and IIB fibres. These fibres also differ in their oxidative enzyme and mitochondrial contents, which is higher in type I and IIA (fast oxidative) fibres than in type IIX (fast intermediate) and IIB (fast glycolytic) fibres. Velocity of shortening is dictated by MyHC isoforms, whereas resistance to fatigue is related to oxidative enzyme content. Thus, type I fibres show low shortening velocity and high resistance to fatigue, and type IIB fibres show high shortening velocity and low resistance to fatigue. Moreover, the presence of intermediate fibres expressing several MyHC isoforms gives rise to a continuous spectrum of fibres from type I to type IIB in a given muscle.

The fibre type pattern of a given muscle is specific to this muscle but is liable to be modified by a change in the metabolic requirements induced by a change in muscle activity. The fast-to-slow or slow-to-fast fibre type shift involves a common pattern of sequential and reversible transitions from IIB to IIX, IIX to IIA and IIA to I (Peuker et al., 1998; Stevens et al., 1999). It has been largely shown that an increase in neuromuscular activity (e.g. exercise), results in a fast-to-slow transition, and, on the contrary, that the lack of activity (e.g. resulting from denervation, suspension, or the absence of gravity), induces a slow-to-fast transition (for review, see Pette and Staron, 2000). Numerous studies have been devoted to the identification of

the molecular mechanisms that are involved in these adaptative processes. Most of them converge to the Ca^{2+} - and CaM-dependent phosphoprotein phosphatase calcineurin. Calcineurin has been implicated as a molecular decoder of the sustained intracellular Ca^{2+} signals evoked in muscle cells in response to motoneuron activation. In particular, calcineurin activates nuclear trans-acting factors such as NFATc (Chin et al., 1998; Wu et al., 2000) that enhance the transcription of slow fibre-specific genes, thus promoting skeletal muscle fibre transition to a slower phenotype (for review, see Olson and

Clément Grondard and Olivier Biondi contributed equally to this work.

Contract grant sponsor: Centre National de la Recherche Scientifique.

Contract grant sponsor: Association Française contre les Myopathies.

Contract grant sponsor: Centre de Prévention et de Lutte contre le Dopage.

*Correspondence to: Frédéric Charbonnier, Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux Sensorimoteurs, UMR 7060 CNRS, Equipe Biologie du Développement et de la Différenciation Neuromusculaire, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France. E-mail: frederic.charbonnier@univ-paris5.fr

Received 21 December 2006; Accepted 4 May 2007

DOI: 10.1002/jcp.21168

Williams, 2000). The involvement of calcineurin signalling events in regulating muscle phenotype was further substantiated by experiments on gene-targeted (Parsons et al., 2003) or transgenic mouse models (Talmadge et al., 2004) respectively showing a down- or up-regulation of the oxidative/slow fibre type program in several muscles. In addition, the administration of calcineurin inhibitors such as Cyclosporin A and FK506 prevented fast-to-slow fibre-type transitions in the overloaded *plantaris* (Dunn et al., 1999), and induced a shift toward the expression of faster contractile proteins in the normal weight bearing *soleus* (Chin et al., 1998; Bigard et al., 2000).

Despite all these efforts, several questions related to the muscle adaptation to a drastic change in the activity requirement remain unanswered. Recently, the hypothesis of a determined range of muscle phenotypic variation has emerged, notably from the muscle analysis in transgenic mice displaying high-level expression of a constitutive active form of calcineurin (Talmadge et al., 2004). However, further experimental evidence is required in the case of normal wild type mice submitted to an increase in motor workloads. Moreover, should this phenomenon be relevant in normal conditions, the characteristics of this limitation must be further clarified notably in terms of muscle type (slow or fast) and level of activity demand, associated with the frequency, amplitude and duration of exercise. Most importantly, the cellular control of this putative limitation of the muscle fibre plasticity remains to be documented. Indeed, a group of myofibres is closely associated with a single motoneuron, thus constituting the motor unit, that is, the smallest part of the motor system that can be activated independently. Furthermore, the responses of the motoneurons to an increase in activity are still unclear, so is the contribution of each part of the motor unit (i.e. the muscle cell and the motoneuron), in the relative maintenance of the muscle phenotype in spite of an increased intensity and/or duration of the workload. Also, the molecular control leading to this limitation of muscle fibre plasticity remains to be elucidated. Finally, the possible modulation of the calcineurin activity during the time course of the muscle adaptation has yet to be demonstrated in normal conditions.

In this study, we aimed at providing evidences for a causal link between the extent of myofibre transitions and the modulation of calcineurin activity in mouse skeletal muscles in response to different exercise paradigms. To this end, we have first developed and precisely parametered a new swimming-based training protocol and compared the metabolic, cellular and molecular adaptations to this protocol to that of the classical running-based training paradigm. Then, we have undertaken a comparative study of the muscular typology variations in relation to changes in calcineurin activity and expression in the case of running- and swimming-based programs. We have subsequently established a causal relationship between these variations and changes in calcineurin protein level and (or) enzyme activity. This study has been performed on two muscles of the calf, the slow-twitch *soleus* and the fast-twitch *plantaris* at 2 time points of the training schedules. The present study has shown an exercise- and muscle-specific effect of training on the myofibre phenotype transitions. The exercise-induced changes in calcineurin phosphatase activity proved to be biphasic: an initial increase in activity was followed by an inhibition phase which was due to an inhibition of the catalytic subunit gene expression on one hand and to the enhancement of MCIPI gene transcription, on the other.

Materials and Methods

Animals

Studies were carried out on male adult *mus musculus* inbred strains (CBA, R Janvier Breeding Centre, Le Genest, France) which ensure

an identical genetic background in successive generations. The animals were housed in standard cages (three animals per cage) under controlled conditions of temperature (23°C) and lighting (light on from 6.00 am to 6.00 pm). They were provided with a stock diet and water ad libitum. The care and treatment of animals conformed to the local authority (Ministère de la Recherche et de la Technologie) guidelines for the detention, use and the ethical treatment of laboratory animals.

Training of animals

A first pool of 15 animals was submitted to a swimming-based training program in an adjustable-flow swimming pool. This swimming pool was specifically designed to train mice for an extended period of time. The mice swam in a narrow lane, against an adjustable current of water. The mice were forced to swim due to the need to keep the head above water for breathing. They could not stop moving for more than a few seconds. The animals were trained 60 min a day, 5 days a week, for a total duration of 6 or 12 weeks. After a period of 4 days, during which the water flow was progressively increased to 4 L min⁻¹, the mice were trained at this flow.

Another pool of 14 animals was submitted to a running-based training program on a treadmill for 60 min per day, 5 days a week, for a total duration of 6 or 12 weeks. After a period of 4 days during which the speed was progressively increased to 15 m min⁻¹, the mice were trained at this speed.

A third pool (control animals) of seven animals, referred as untrained mice, were placed in the pool without a flow (n = 4) and stayed floating on the water surface with a poor activity or on the treadmill without speed (n = 3) and displayed only an exploratory walking activity for the duration of training of the previous pools of animals. The control mice were studied in parallel.

Experimental procedures

Seven groups were studied: one group of untrained mice (group 1); one group exercised on the swimming-based training program for only 1 h (group 2, swimming-based exercised group); one group exercised on the running-based training program for only 1 h (group 3, running-based exercised group); one group trained on the swimming-based-training program for 6 weeks (group 4, 6-week swimming-based trained group); one group trained on the running-based training program for 6 weeks (group 5, 6-week running-based trained group); one group trained on the swimming-based training program for 12 weeks (group 6, 12-week swimming-based trained group); one group trained on the running-based training program for 12 weeks (group 7, 12-week running-based trained group).

Movement analysis

Mice were filmed in a lateral view for 20 min using a digital video camera (Sony DCR TRV50E) during a running-based exercise bout at 15 m min⁻¹ (n = 8) and a swimming-based exercise bout against a water flow of 4 L min⁻¹ (n = 7). Prior to the actual experiment, mice were habituated to the treadmill speed and the water flow for 10–15 min during two consecutive days.

The mice hindlimb motion was tracked using the Video Spot Tracker v05.07 software program (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, National Institutes of Health, Bethesda, MD). The video analysis of the step and swimming cycles were performed off-line using a single step video (frame by frame). A step cycle was defined as the interval from the initial frame of the foot contact after a forward swing to the next such frame, as described by Gruner et al. (1980). A swimming cycle was divided in two phases: a power stroke (PS) associated with the extension of the limb from minimum to maximum hip angle and the return stroke (RS) associated with the flexion of the limb from hip maximum to minimum, as described by Gruner and Altman (1980). For the measurement of movement frequency, the time taken to

complete three successive step or swimming cycles was measured for each mouse. This measurement was randomly repeated 10 times during the 20 min video recording.

The movement amplitude (stride length) during the running-based exercise was computed from the distance between two successive footfalls of the same foot. The Video Spot Tracker software provided distances that were calibrated against a 20 mm metallic reference marker in the frame image. The amplitude of movement during the swimming-based training was defined as the distance between the maximum extension of one limb during the power stroke and the maximum flexion of the same limb during the return stroke. The amplitude was calculated with the Image-pro plus software v6.0 (Mediacybernetics, Silver Spring, MD) that allowed the accurate determination of the Cartesian coordinates. Distances were also calibrated against a 20 mm metallic reference marker in the frame image.

Blood lactate level

Serum lactic acid concentration was used to determine the effects of each type of exercise. The blood lactate level was assayed on three groups of mice, one group of unexercised mice, that were placed in the pool without a flow for 30 min ($n = 4$), one group composed of swimming-based exercised mice for 30 min ($n = 5$) and one group consisting in running-based exercised mice for 30 min ($n = 4$). The blood samples were collected on anaesthetised animals within 5 min after each exercise period and were immediately processed for plasma lactate assay using the SIGMA[®] kit for the determination of blood plasma lactate using a spectrophotometric method at a 540 nm wavelength.

Choline acetyl-transferase staining of the motoneurons and c-Fos immunodetection

The immunohistochemical analysis of choline acetyl-transferase (ChAT) and c-Fos was performed on the spinal cord of two groups of mice: one group trained on the swimming-based training program for 1 h per day ($n = 6$) and one group trained on the running-based training program for 1 h per day ($n = 6$). After 8 days of training, the mice were perfused with 4% paraformaldehyde immediately after the exercise bout and processed for histological analysis. Spinal cord sections, 50 μm thick, were cut between L1 and L5 on a sliding microtome, collected in phosphate buffered saline (PBS), and processed as free-floating sections. One out of five successive sections was subsequently processed for immunostaining.

Tissue sections were incubated for 30 min at room temperature in a blocking solution (7% normal donkey serum with 0.3% Triton X-100 in PBS). Immunohistochemical detection of c-Fos protein was performed using a polyclonal antibody (1/200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Sections were washed between every subsequent step with PBS. An immunostaining using ChAT (polyclonal goat anti-ChAT; 1/200; CHEMICON, Temecula, CA) was used to stain motoneurons in the spinal cord sections. After incubation, tissue sections were washed three times for 10 min in PBS and incubated in the secondary antibody solution (Alexa Fluor[®] 488 donkey anti-goat IgG; 1/400; Molecular Probes, Eugene, OR), for 2 h at room temperature.

Finally, the sections were washed three times for 10 min in PBS, stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (final concentration: 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and mounted in VECTASHIELD[®] Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The staining specificity was checked in control incubations performed in the absence of the primary antibody.

C-Fos-positive motoneurons were counted at a 400 \times magnification of the lumbar spinal cord of each mouse. Motoneuron counts and areas were evaluated using Image J v1.33 software (National Institutes of Health).

Myofibre typing

Animals were anaesthetised by intraperitoneal injection of 3.5% chloral hydrate. The *soleus* and *plantaris* were dissected and processed for biochemical and immunohistochemical determinations within a 15 min interval after the end of the training period.

Cryosections (10 μm) were cut at the middle of each *soleus* or *plantaris* muscle. Sections were incubated for 1 h in PBS at a 3% BSA final concentration in order to block the non-specific sites and probed with antibodies specific to mouse type I and II (NCL-MyHCs NOVOCASTRA[®]), IIA (gift from Helen M. BLAU) and IIB (gift from SCHIAFFINO) MyHC, used at a 1/20 dilution for all the antibodies followed by FITC-labelled rabbit anti-mouse IgG DAKO[®] at a 1/20 dilution in 3% Bovine Serum Albumin in PBS (final concentration). The proportion of fibre IIX was determined as the difference between the total number of type II fibres and the number of fibres IIA + IIB. In order to evaluate the proportion of hybrid fibres, that is, expressing more than one MyHC isoform, serial sections of each muscle were probed with type I and II MyHC antibodies (*soleus*) or IIA and IIB MyHCs (*plantaris*) as described above. The images of the corresponding muscle sections were superimposed by the Image-pro plus software v6.0 and the double-labelling fibres were counted using the Image J v1.33 software.

Specific immune complexes were visualized by epifluorescence microscopy. Images of each section were captured using camera-plot and transferred on Image J v1.33 software for counting. The number of MyHC-immunostained fibres and the total number of fibres were counted on each section.

Muscle-fibre cross-sectional analysis

Frozen *soleus* and *plantaris* muscles from mice were collected and sectioned into 10 μm -thick sections. Muscles sections were stained with haematoxylin and eosin, dehydrated via an alcohol gradient (70, 90 and 100%) and mounted with Eukitt[®] (VWR International; Strasbourg, France). The highest number of myofibres per muscle section was retained for statistical analysis. Muscular fibre counts and areas were evaluated using the Image J v1.33 software.

Calcineurin phosphoprotein phosphatase activity

Total calcineurin phosphoprotein phosphatase activity was assayed in muscle extracts using the Promega[®] kit, modified by Dunn et al. (2000). Briefly, muscle samples were ground in liquid nitrogen and then homogenized in a final volume of 250 μl lysis buffer (0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 Mm DTT, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 50 mM TRIS pH 8.0). The homogenates were spun down at 13,500 rpm during 15 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ and desalted twice on SEPHADEX G25 columns. Each assay was performed in duplicate. The protein contents of each desalted supernatant were assayed using the Bradford protein microassay procedure (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Fifteen microlitres aliquots of each desalted supernatant were added to 35 μl of the incubation medium containing 250 mM Imidazole, 1 mM EDTA, 1 mM CaCl_2 , 5 mM NiCl_2 , 500 mM DTT, 100 nM Calmodulin, 750 nM Okadaic acid, 100 μM Ser/Thr phosphopeptide (Promega[®]), in the presence or absence of 0.15 ng/ml Cyclosporin A (final concentrations). After a 2 min incubation period at 30 $^{\circ}\text{C}$, 50 μl of the dye solution was added to each tube and the free phosphate (P_i) released was assayed according to the manufacturer's protocol. The calcineurin activity was determined as the difference in pmoles of P_i released per minute and per mg of protein (P_i pmol min^{-1} mg^{-1}) in the absence versus presence of Cyclosporin A.

Protein and Western blot analysis

Frozen *soleus* and *plantaris* muscle samples (6–20 mg) stored in liquid nitrogen were ground in liquid nitrogen and homogenized in

100 μ l/5 mg muscle of ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris–HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP40, 5 mM EDTA pH 8.0, 2 mM PMSF (phenyl-methylsulfonyl fluoride, Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 50 μ g/ml leupeptin, 50 μ g/ml pepstatin A and 50 μ g/ml aprotinin). Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 min, 13,500 rpm) was determined as previously described and 50 μ g samples of each homogenate were submitted to 12.5% SDS-PAGE electrophoresis (1.5 M Tris pH 8.3, 12.5% Acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.06% Temed). The separated proteins were transferred on PVDF membranes (Biorad Laboratories) according to Towbin et al. (1984). Equal loading of samples was checked by Ponceau staining of the transferred gels. Western blot analysis was performed on membranes overnight at 4°C in 4% BSA, 0.05% Tween-20, TBS pH 7.4. The primary antibody (polyclonal rabbit anti mouse calcineurin Pan A purchased from CHEMICON) was incubated for 1 h at room temperature at a 1/1,000 dilution in the above blocking medium. Membranes were rinsed in 0.05% Tween-20 in TBS for 3 \times 10 min at room temperature and then incubated in horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody directed against rabbit immunoglobulins (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) at a 1/20,000 dilution in 0.05% Tween-20 in TBS for 1 h at room temperature. Bound antibody complexes were developed using the ECL plus kit and exposed to hyperfilm ECL-plus X ray film (AMERSHAM Biotech., Les Ulis, France).

RT-PCR analysis

RNA was isolated using the Qiagen (Valencia, CA) RNeasy MINI kit according to the manufacturer's instructions. RNA was treated with 1 unit of amplification grade deoxyribonuclease I (Life Technologies, Eragny, France) per microgram of RNA to remove genomic DNA. Then 0.5 μ g of the RNA was reverse-transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and treated with RNase H, according to the manufacturer's instructions. The complementary DNA obtained was then used as a template for the real-time RT-PCR, performed using an ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Fluorescence detection was performed in 384-well plates using SYBR Green buffer (Applied Biosystems). Primer concentrations were optimised to yield the lowest concentration of primers that gave the same C_t values as recommended by Applied Biosystems. A not reverse-transcribed control RNA sample was used with each real-time RT-PCR experiment to check for the absence of genomic DNA contamination. PCR amplification was performed as a singleplex reaction in a total reaction volume of 25 μ l. The reaction mixture consisted of 12.5 μ l of SYBR Green template (Applied Biosystems) forward and reverse primers (MCIPI1: Forward 5'-TTGTGTGGCAAACGATGATGTCTTCA-3', Reverse 5'-TGTGAACCTCCTATGTGTAAGTC-3'; MCIPI2: Forward 5'-CTAGCATGGACTGTGATGTTTCCACT-3', Reverse 5'-CTGAACCTGACTCATGAAGCTCTAT-3'; GAPDH: Forward 5'-TCCTGCACCACCACTGCTTAGCC-3', Reverse 5'-TAGCCCAAGATGCCCTTCAGTGGG-3') as determined from the prior optimisation procedure, nuclease-free water and cDNA. The PCR parameters were incubation for one cycle at 50°C for 2 min to prevent amplification of carryover DNA, followed by denaturation at 94°C for 10 min, and then amplification for 40 cycles of 95°C/15 sec and 60°C/1 min. Amplification products were routinely checked using dissociation curve software (Applied Biosystems) and by gel electrophoresis on a 1% agarose gel, then visualized under UV light following staining with 0.05% ethidium bromide to confirm the size of the DNA fragment and that only one product was formed. Samples were compared using the relative C_t method, where the amount of target normalized to the amount of endogenous control and relative to the control sample is given by $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Statistical analysis

All values are presented as means and standard deviation for each group (Systat v 8.0, SPSS, Inc., Chicago, IL). A Kolmogorov–Smirnov normal distribution analysis was performed on all data followed by either a Student's *t*-test for normally distributed data or a non-parametric Kruskal–Wallis test, to verify significant differences between groups. Therefore, a Student's *t*-test was used to verify significant differences between movement frequency and amplitude data of the mice hindlimb during running- and swimming-based conditions. For all other data, a non-parametric Kruskal–Wallis test was performed. For the statistical evaluation of motoneuron number, identified by ChAT immunoreactivity, the number of cells present in each ventral horn of the L1 to L5 spinal cord, was corrected according to the method of Abercrombie (1946), which compensates for double counting in adjacent spinal cord sections.

Results

Swimming-based protocol design and metabolic index

A variety of swimming tests have been used as criteria of the physical work capacity of animals under diverse experimental conditions. Mostly, weights have been attached to the mouse tail in order to standardise the workload and reduce the swimming time in the static water pool. However, this artificial increase in the body weight may not always rule out the effect of weight differences as a factor in swimming time (reviewed by Matsumoto et al. (1996)). In order to obtain a standard workload leading to quantify the maximum swimming capacity without adding weight, we developed a swimming pool associated to a pump that generates a water flow. Inside the pool, a narrow, top-covered swimming area was placed facing the flow. The top cover had a backward inclination forcing the mouse to swim forward to avoid getting drowned (Fig. 1A and Charbonnier and Soude, 2006, Patent FR 06 53772).

Locomotive behaviour was studied in normal mice to compute the movement frequency and amplitude of the mice hindlimb during running- and swimming-based conditions. A significant difference in the frequency of movement was found between the running- and swimming-based exercises (234.2 ± 24.5 cycles min^{-1} vs. 373.9 ± 47.6 cycles min^{-1} , respectively, $P < 0.001$) (Fig. 1B). Furthermore, a significant difference in hindlimb amplitude was also found between the running- and swimming-based exercises (3.79 ± 0.23 cm vs. 4.86 ± 0.40 cm, respectively, $P < 0.001$) (Fig. 1C). This result represented a 37% and 22% difference in movement frequency and amplitude, respectively, between running- and swimming-based training. These data substantiate the classification of the running-based exercise as a low frequency and amplitude exercise and the swimming-based training as a high frequency and amplitude exercise.

We measured the blood lactate accumulation in untrained mice submitted to either a swimming or a running test. A significant lactate accumulation was recorded only after the swimming test, in comparison to untrained animals ($P < 0.05$). The fact that no blood lactate accumulation was evidenced after the running test led to the first indication that swimming was more an anaerobic-type exercise than running which is an aerobic-type exercise (Fig. 1D).

Exercise-specific motoneuronal activation

In order to ensure a precise characterisation of running- and swimming-based exercises, we questioned whether the motoneurons which were activated in response to each exercise displayed different morphological features.

We analysed the expression of the activity marker c-Fos in motoneurons, which are specifically identified by their

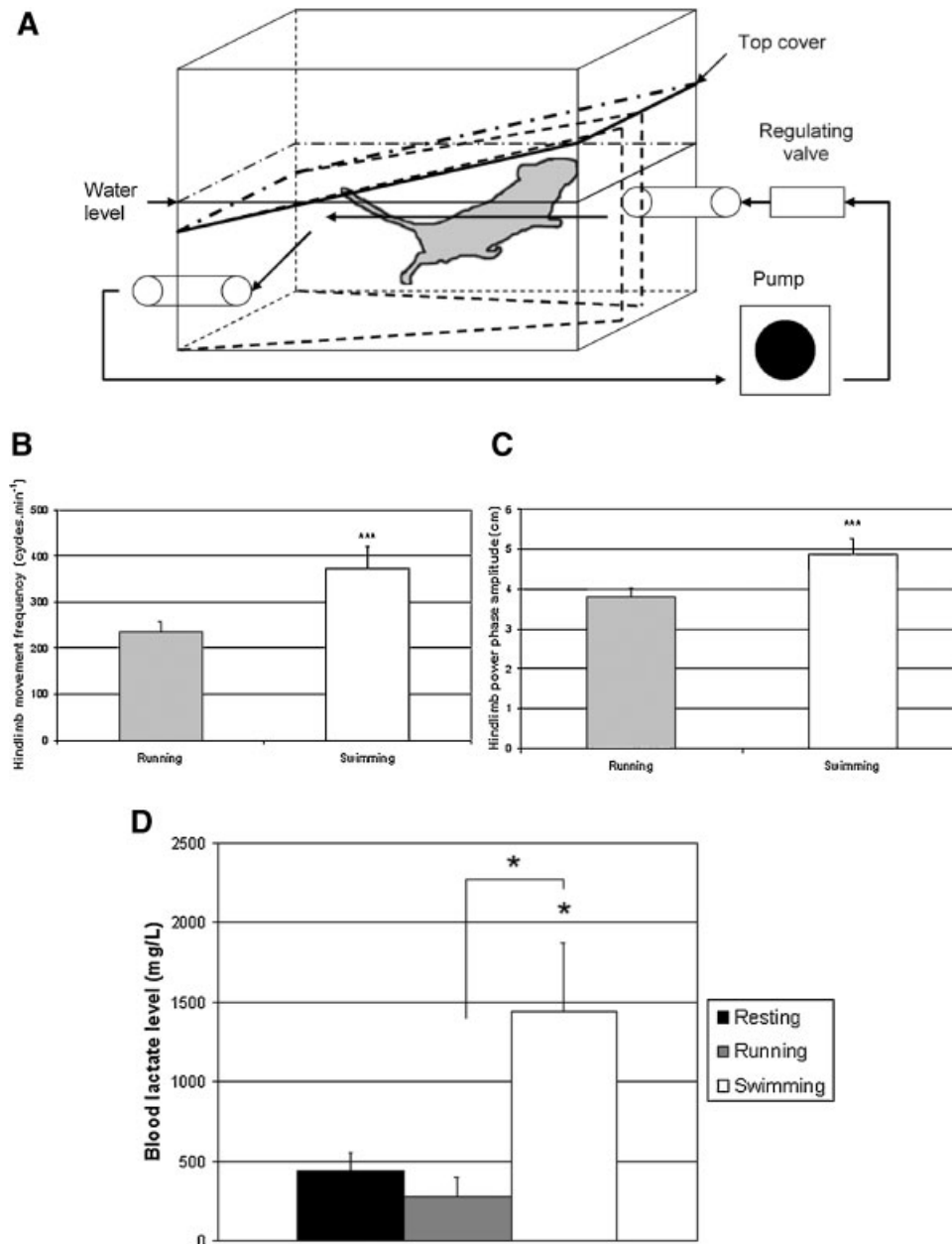


Fig. 1. The swimming pool (A) has been designed to force the mice to swim against a regulated water flow which push them backwards in the immersed part of the pool. The mice were forced to swim forward to keep the head above water for breathing. The average step frequency (B) and the hindlimb amplitude (C) was recorded during the running-based exercise ($n = 8$) and the swimming-based exercise ($n = 7$) ($^{***}P < 0.001$). The metabolic index of the two exercises (D) was determined by the blood lactate level variation after 30 min of a running-based ($n = 4$) or a swimming-based ($n = 5$) exercise in trained mice in comparison to controls ($n = 4$) ($^{*}P < 0.05$).

immunoreactivity for ChAT in the spinal cord of mice submitted to the running- and the swimming-based protocols (Fig. 2). Among the three sub-populations of motoneurons, sampled by the value of the median soma area, the small-diameter motoneuron population ($< 300 \mu\text{m}^2$) was preferentially activated by the running-based training (32.3% activation for running vs. 5.5% for swimming) and the large-diameter motoneuron population ($> 600 \mu\text{m}^2$) was preferentially activated by the swimming-based training (47.3% activation for swimming vs. 22.9% for running). No difference in the activation of the medium sized motoneuron population could be detected.

Immunohistochemical detection of MyHC isoforms

We submitted a population of male CBA mice to swimming- or running-based training program, for 6 or 12 weeks.

The muscular typology of two muscles of the calf, the slow-twitch *soleus* and the fast-twitch *plantaris* was analysed by immunochemistry using antibodies raised against the slow type (I) and the fast type (IIA, IIB, II total) isoforms of the MyHC. The results showed that muscles displayed a differential adaptation, depending of the exercise type and of the muscle nature (Fig. 3).

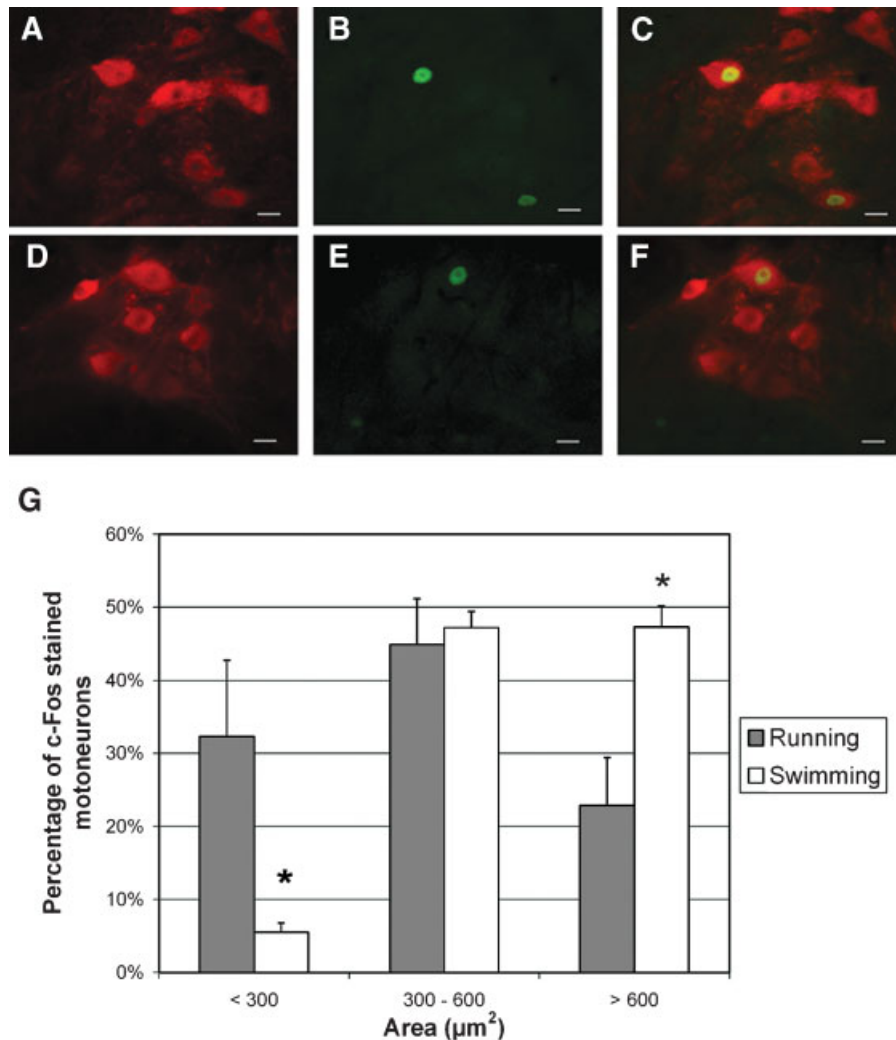


Fig. 2. Exercise-specific motoneuron activation in running-based (A,B,C) and swimming-based (D,E,F) exercise. Immuno-cytodetection of the activity marker c-Fos (B,E) in motoneurons, which are identified by their immunoreactivity for ChAT (A,D). Immunoreactive motoneurons for c-Fos were selectively counted (C,F) and their area (G) was computed, over the lumbar spinal cord (L1-L5), after the running-based ($n = 6$) or the swimming-based ($n = 6$) training ($^*P < 0.05$). Scale bar, 50 μm .

For swimming, comparable adaptations were recorded for both muscles. An increased population of type IIA fibres was observed from 6 weeks of training. With about 15% increase in type IIA, the *plantaris* proved to be more affected by transition than the *soleus* (about 8% increase). This change was shown to be associated in both muscles with a proportional decrease in the population of type IIB/IX fibres. This fast-to-slow transition proved to end after 6 weeks of training since no more significant modification was detected in the 6-week extended period of training (12 weeks in total). Interestingly, all the transitions induced by the swimming-based training were confined to the fast myofibres.

For running, significant differences were observed in the exercise-induced adaptations of the two muscles. In the slow-twitch *soleus*, an increase of about 10% in the proportion of slow type I fibres was detected in the 12-week trained group. This transition to type I was specific to the *soleus*. In this muscle, the population of type IIA fibres proved to be biphasic. After a first significant increase of about 9% from 6 weeks, the number of type IIA fibres decreased by 8% during the second half of the training period, paralleling the transition of type I fibres. After

12 weeks, type IIA fibres represented the totality of type II fibres (about 40% of the total number of fibres). In the *plantaris*, the proportion of type IIA fibres gradually increased from 21% to 48.5% after 12 weeks of training. This increase was associated to a gradual decrease in the population of type IIB fibres, from 66.9% in untrained muscles, to 55.5% and 32.5% after 6 and 12 weeks of training, respectively. A significant increase in hybrid fibre-type I/II for the *soleus* and in hybrid fibre-type IIA/IIB for the *plantaris* was found in trained mice, for both exercise types, in comparison to the untrained mouse muscles (Fig. 3G,H,I) ($P < 0.05$).

In addition, no change in the cross-sectional area of the myofibres was recorded in any of the two muscles at any time point of the study (data not shown).

Taken together, these results showed that different adaptations to training occurred and clearly depended on both, the muscle nature and the exercise paradigm. Very interestingly, at 6 weeks, transitions were achieved in the swimming-trained muscles, irrespective of their nature, therefore providing the opportunity to identify the molecular cues that specifically limited this myofibre transition process.

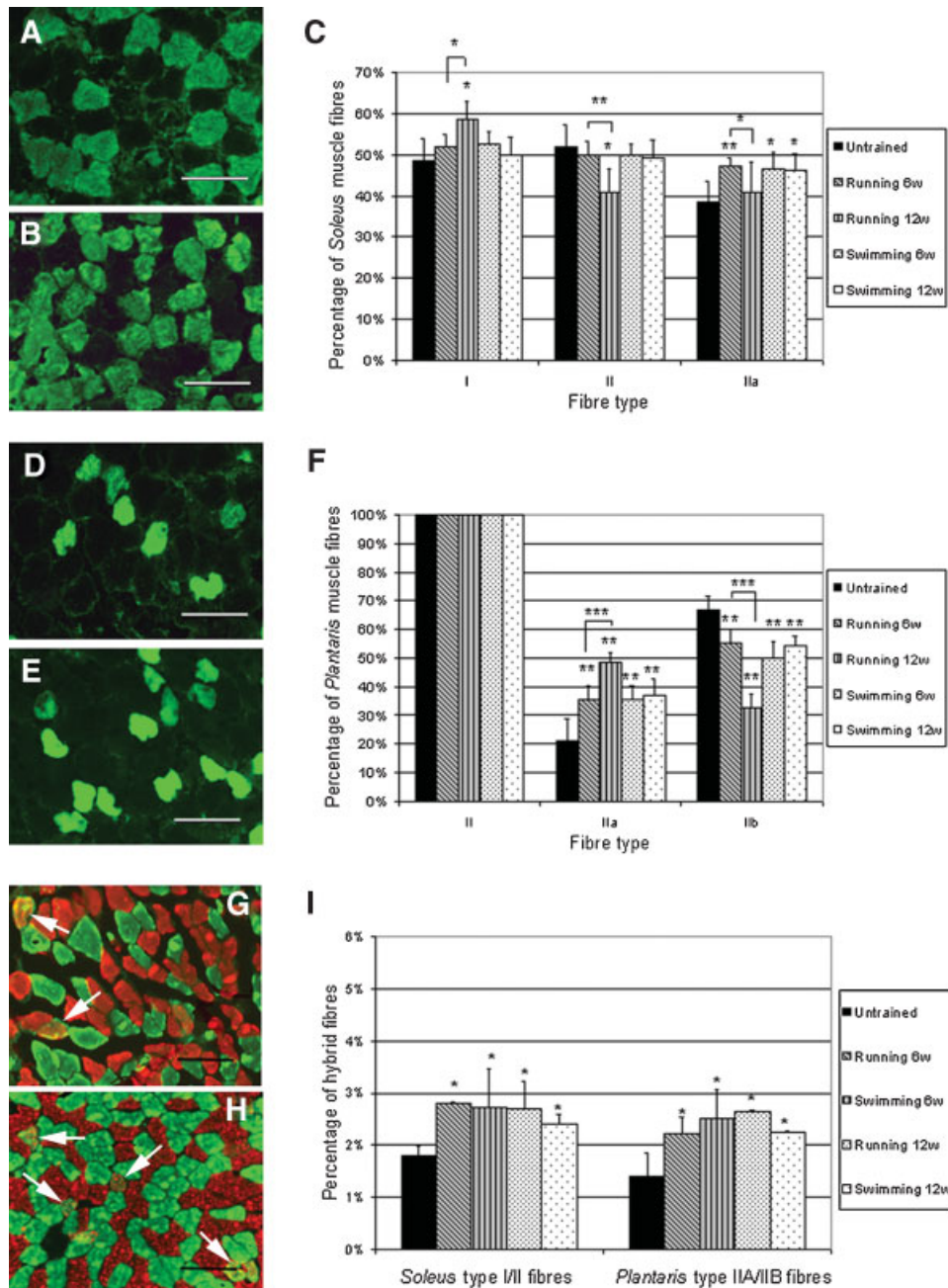


Fig. 3. Increase in type I muscle fibre proportion in the *soleus* after a 12 weeks running-based training (B) in comparison to the untrained mice (A). Increase in type-IIA muscle-fibre proportion in mice submitted to a 6-week swimming-based training period (E) in comparison to the untrained mice (D). Changes in the muscular typology of the slow-twitch *soleus* (C) and the fast-twitch *plantaris* (F), after a 6-week ($n = 8$) or 12-week ($n = 6$) running-based training, or after a swimming-based training period of 6 ($n = 8$) or 12 ($n = 7$) weeks. All the results were compared to the untrained mice ($n = 7$). Hybrid fibre-type I/II (white arrows) increase in the *soleus* after a 6-week swimming-based training (H) compared to control (G). Percentage of hybrid fibre-type I/II in the *soleus* and type IIA/IIB in the *plantaris* after 6 or 12 weeks of running- or swimming-based training compared to controls (I) (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Scale bar, 50 μm .

Calcineurin phosphoprotein phosphatase activity and calcineurin protein content in muscles

Since calcineurin activation have been proposed as a major mechanism for promoting fast-to-slow myofibre transitions in response to exercise, we assayed calcineurin phosphoprotein phosphatase activity on extracts of *soleus* and *plantaris* collected from mice of each group, that is, untrained mice and mice

submitted to swimming- or running-based training for 6 or 12 weeks (Fig. 4). The basal level of calcineurin activity recorded after 1h-running bout was higher in *soleus* ($79 \text{ P}_i \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) than in the *plantaris* ($42.5 \text{ P}_i \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). In the *soleus* extracts, this basal enzyme activity was higher after the running than after the swimming bout ($52.7 \text{ P}_i \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) (Fig. 4A). By contrast, with $39 \text{ P}_i \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, the swimming-based trained *plantaris* displayed similar

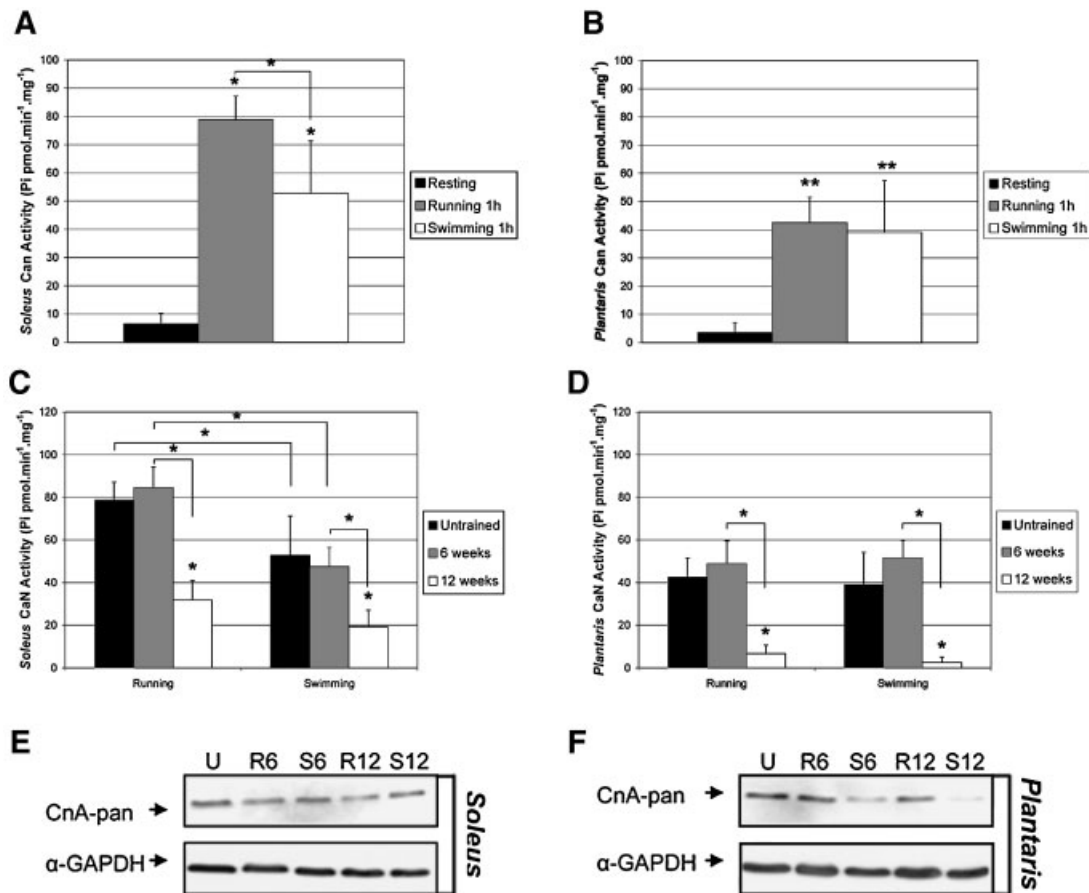


Fig. 4. Total calcineurin (CaN) phosphoprotein phosphatase activity expressed in pmoles of P_i released per minute and per mg of protein (P_i pmol min⁻¹ mg⁻¹) after 1 h of running-based (n = 4) or swimming-based (n = 4) exercise in comparison to the resting mice (n = 6) in the soleus (A) and plantaris (B). Comparison of the calcineurin activity after 6 or 12 weeks of a running-based (n = 4) or swimming-based (n = 4) training in the soleus (C) and plantaris (D). Total amount of calcineurin catalytic subunit A in the soleus (E) and plantaris (F) muscles determined on Western blots, using an anti-CnA_(α+β) primary antibody (U = untrained mice; R6 = 6 weeks of running-based training; S6 = 6 weeks of swimming-based training; R12 = 12 weeks of running-based training; S12 = 12 weeks of swimming-based training).

calcineurin activation than after the running bout (Fig. 4B). The level of calcineurin activity remained stable in the two muscles after 6 weeks of training and for the two exercise paradigms. Interestingly, a significant decrease in the calcineurin extractable activity was observed after 12 weeks of swimming- and running-based training in both muscles (Fig. 4C,D). This 96% decrease was more pronounced in the swimming-based trained plantaris which displayed after 12 weeks of training a calcineurin activity level comparable to the level recorded in control unexercised muscle. A less pronounced fall in activity (84.1%) was recorded in the running-based trained plantaris. A persistent calcineurin activity was evidenced in the soleus, with higher levels in the running-based (31.75 P_i pmol min⁻¹ mg⁻¹) compared to the swimming-based trained muscles (19.2 P_i pmol min⁻¹ mg⁻¹).

We then questioned whether the decrease of calcineurin activity during the time course of myofibre transition might be caused by an alteration of calcineurin catalytic subunit A (CnA) protein content. We thus studied the whole amount of CnA_(α+β) isoforms in the different muscle samples through the immunodetection of this protein on Western blots of the corresponding homogenates. Interestingly, a dramatic decrease of CnA protein content was evidenced after 6 and 12 weeks of swimming in the plantaris (Fig. 4F) and after 12 weeks of running

in the soleus (Fig. 4E) and, to a lesser extent, in the plantaris. Both the swimming-based training in the soleus and the running-based training in the plantaris did not lead to significant differences in the level of CnA after 12 weeks of training. Finally, apart from the swimming-based trained plantaris, no significant difference in the level of CnA was evidenced after a 6-week swimming- or running-based training in both muscles when compared with untrained animals.

Modulatory calcineurin interacting proteins (MCIPs) mRNA levels

Since the mere decrease of muscle calcineurin content could not account for the limitation of myofibre transition, particularly in the running-based trained plantaris and in the swimming-based trained soleus, we questioned whether the modulation of calcineurin activity could result from a modification of the expression of calcineurin-interacting proteins such as MCIPs. Real-time RT-PCR was therefore used to detect changes in the expression of MCIP1 and MCIP2 in both muscles, after 12 weeks of training. As evidenced in Fig. 5, submitting mice to training results in an exercise-specific increase in the number of MCIP1 transcripts in the soleus and in

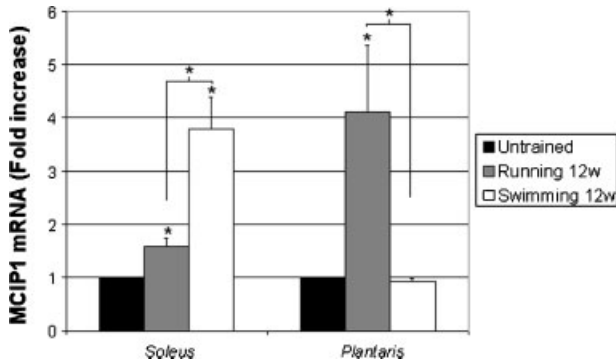


Fig. 5. RT-PCR analysis of MCIP1 mRNA levels in *soleus* and *plantaris* muscles in untrained mice compared to 12 weeks running- and swimming-based trained mice ($n = 3$) ($*P < 0.05$).

the *plantaris* of trained versus untrained animals. The extent of this increase proved to be higher for the running-based trained *plantaris* (4.10 ± 1.25 -fold) and for the swimming-based trained *soleus* (3.79 ± 0.58 -fold). No difference in the MCIP1 expression was recorded in the swimming-based trained *plantaris*. By contrast, no significant alteration in the MCIP2 expression was detected in any of the two muscles (data not shown).

Discussion

Our present data clearly show that during the time course of muscle adaptations to training, exercise-induced calcineurin activation is followed by exercise-induced inhibition of calcineurin catalytic activity, paralleling a limitation in the adaptive capacity of the follow-up exercised muscles. The calcineurin inhibition is at least partly due to the inhibition of its subunits gene expression and by the overexpression of interacting proteins of the MCIP family. In addition, both the range of phenotypic variation and changes in calcineurin enzyme activity proved to be muscle- and exercise-type specific.

The present results strengthen the emerging hypothesis of a limited adaptive range for muscles of variable phenotype under normal conditions (Ausoni et al., 1990; Talmadge et al., 2004). We have shown in the present study that muscles of a given phenotype can only adapt within a qualitatively and a quantitatively limited range, that depends on the characteristics of the workload. From a qualitative point of view and in response to running-based exercise only, the slow-twitch *soleus* did shift within the boundaries IIX–I. In response to the swimming-based training, the *soleus* and the fast-twitch *plantaris* displayed shifts restricted to type II fibres instead. From a quantitative point of view, the *plantaris* was more affected by the transitions than the *soleus*, regardless of the exercise paradigm. In the running-based trained *plantaris*, transitions affected 15% and 28% of myofibres at 6 and 12 weeks, respectively. By contrast, whatever the experimental conditions, the myofibre transition in the *soleus* affected less than 10% of myofibres. Moreover, as highlighted for the first time in the present study, the transition pattern and schedule prove to be dependent on the exercise type, that is, low frequency and amplitude hindlimb movements associated with running-based exercise and high frequency and amplitude hindlimb movements associated with swimming-based exercise. Indeed, in the swimming-based trained *soleus*, the limited transitions to type IIA are solely observed during the first 6 weeks of training, regardless of the total duration of training. By contrast, in the running-based trained *soleus*, a progressive and complete transition from type

IIX to type I is observed. This slowest phenotype gain is only observed after 12 weeks of training. An exercise-specific effect on the time course and the extent of fibre type transitions is also observed in the *plantaris*. The running-based training induces a gradual increase in type IIA fibres up to 12 weeks of training whereas in the case of swimming, these transitions are solely observed up to 6 weeks of training.

The changes in calcineurin enzyme activity closely parallels the marked events of muscle- and exercise-specific myofibre transitions, thus strengthening the hypothesis of a causal relationship between calcineurin activity level and the extent of fast-to-slow myofibre transitions. These differential effects of exercise are fully illustrated in the *soleus*. The level of calcineurin activity is higher in the running-based trained *soleus* in which a complete range of myofibre transitions is observed leading to type I fibres compared to the swimming-trained *soleus* in which transitions are limited to fibres expressing the IIA MyHC isoform. In addition, calcineurin phosphatase activity was higher in the *soleus* than in the *plantaris* in which transition are limited to type IIA fibres. The specific effects of calcineurin in increasing either type IIA or type I myofibres, depending on the exercise and the muscle type, might be indicative of a threshold effect of calcineurin activity on the expression of MyHC IIA and MyHC I isoforms. According to this hypothesis, the transcription of MyHC I isoform would require the dephosphorylation of a specific high K_M calcineurin substrate. This requirement would be solely fulfilled in the *soleus* after a persistent stimulation of calcineurin activity in response to running-based training, and not in the *plantaris* despite an identical level of exercise-induced stimulation. This hypothesis would account for muscle specific effects recorded for different electric stimulation patterns on the expression of MyHC isoforms (Ausoni et al., 1990).

During the time course of the training program, the initial exercise-induced stimulation of calcineurin activity is followed by an inhibition of the enzyme. The kinetics of this enzyme inhibition was similar for swimming and running with a substantial reduction in calcineurin activity after 12 weeks of training towards the baseline levels recorded in untrained animals. Yet, a residual calcineurin activity is still recorded after 12 weeks of training in the *soleus*, and, most noteworthy, for the running-based protocol in which a gradual myofibre transition to type I can be specifically observed. The calcineurin inhibition may result from either a reduction in calcineurin protein and/or the modulation of the activity of pre-existing calcineurin molecules. A dramatic decrease in the calcineurin protein level was evidenced after 12 weeks of training, and, intriguingly, solely in the swimming-based trained *plantaris* and in the running-based trained *soleus*. To date, the relationship between calcineurin expression and enzyme activity level was proposed to explain the discrepancy of the phenotype of transgenic muscles expressing at a high (Talmadge et al., 2004) or a low (Dunn et al., 2000) level of a constitutively active form of calcineurin, leading to either a wide or limited myofibre transition amplitude, respectively. Thus, in this study, calcineurin expression is most likely linked to the characteristics of the exercise protocol. Indeed, it clearly appears that the swimming-based protocol preferentially activated the fast motor units and, in all likelihood, the fast-twitch muscles. By contrast, the running-based protocol preferentially activated the slow motor units and probably the slow-twitch muscles.

Neither in the swimming-based trained *soleus* nor in the running-based trained *plantaris* was the calcineurin inhibition associated with a corresponding decrease in the protein level. This finding strongly suggests that the modulation of calcineurin enzyme activity involves some muscle endogenous effectors of calcineurin activity. Among those, we focused on the expression of the modulatory calcineurin interacting proteins (MCIPs) 1 and 2 which are highly expressed in Mammalian

skeletal muscle (Rothermel et al., 2003) and have been demonstrated to inhibit myofibre transition to a slower/more oxidative phenotype when overexpressed in the muscle (Rothermel et al., 2000). Interestingly, the overexpression of MCIP1 mRNA was mainly observed in the swimming-based trained *soleus* and in the running-based trained *plantaris*, in which the calcineurin protein level remained stable throughout the training schedule. Our data of MCIP gene expression could account, at least in part, for a decrease in calcineurin activity which is observed in the swimming-based trained *soleus* and the running-based trained *plantaris* after 12 weeks of training. The existence of an endogenous regulation of calcineurin activity may explain why, in skeletal muscles that express a constitutively active form of calcineurin, a limitation of muscle plasticity still occurs (Talmadge et al., 2004).

The present evidence for an exercise-specific effect is to be related to the neural stimulation-specific effect on the metabolic properties and on the expression of myosin heavy chain isoforms in myofibres (Bigard et al., 2000; Dunn et al., 2001; Wu et al., 2001). To this respect, it would be of great interest to test the two present exercise paradigms in mouse models of human neuromuscular disorders. Indeed, growing evidence has recently accumulated on the beneficial effects of exercise in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Kirkinetzos et al., 2003; Veldink et al., 2003; Liebetanz et al., 2004; Kaspar et al., 2005) and spinal muscular atrophy (Grondard et al., 2005) mouse models. All these studies have investigated the effects of running-based protocols on these neuromuscular disorders. The original swimming-based protocol reported in the present study preferentially activates the fast motor unit and therefore, is likely to exert a beneficial impact on the diseased motor units, notably in the case of ALS which is characterised by a preferential loss of fast motor units (Rowland and Shneider, 2001).

Acknowledgments

We thank Dr. Menetrey for help for c-Fos and Chat immunohistochemistry in the spinal cord. This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique and by grants from the Association Française contre les Myopathies and from the Centre de Prévention et de Lutte contre le Dopage. Olivier Biondi and Clément Grondard are recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche.

Literature Cited

Abercrombie M. 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94:239–247.

- Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K, Lomo T. 1990. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci* 10:153–160.
- Bigard X, Sanchez H, Zoll J, Mateo P, Rousseau V, Veksler V, Ventura-Clapier R. 2000. Calcineurin Co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *J Biol Chem* 275:19653–19660.
- Charbonnier F, Soude J. 2006. Device delimiting a swimming space for rodents and its use to study swimming in rodents. Patent FR 06 53772.
- Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 12:2499–2509.
- Dunn SE, Burns JL, Michel RN. 1999. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 274:21908–21912.
- Dunn SE, Chin ER, Michel RN. 2000. Matching of calcineurin activity to upstream effectors is critical for skeletal muscle fiber growth. *J Cell Biol* 151:663–672.
- Dunn SE, Simard AR, Bassel-Duby R, Williams RS, Michel RN. 2001. Nerve activity-dependent modulation of calcineurin signaling in adult fast and slow skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 276:45243–45254.
- Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lecolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F. 2005. Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 25:8587.
- Gruner JA, Altman J. 1980. Swimming in the rat: Analysis of locomotor performance in comparison to stepping. *Exp Brain Res* 40:374–382.
- Gruner JA, Altman J, Spivack N. 1980. Effects of arrested cerebellar development on locomotion in the rat. Cinematographic and electromyographic analysis. *Exp Brain Res* 40:361–373.
- Kaspar BK, Frost LM, Christian L, Umapathi P, Gage FH. 2005. Synergy of insulin-like growth factor-I and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57:649–655.
- Kirkinetzos IG, Hernandez D, Bradley WG, Moraes CT. 2003. Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 53:804–807.
- Liebetanz D, Hagemann K, von Lewinski F, Kahler E, Paulus VV. 2004. Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20:3115–3120.
- Matsumoto K, Ishihara K, Tanaka K, Inoue K, Fushiki T. 1996. An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice. *J Appl Physiol* 81:1843–1849.
- Olson EN, Williams RS. 2000. Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* 101:689–692.
- Parsons SA, Wilkins BJ, Bueno OF, Molkentin JD. 2003. Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin A alpha and A beta gene-targeted mice. *Mol Cell Biol* 23:4331–4343.
- Pette D, Staron RS. 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Rev Technol* 50:500–509.
- Peuker H, Conjard A, Pette D. 1998. Alpha-cardiac-like myosin heavy chain as an intermediate between MHCIIa and MHCI beta in transforming rabbit muscle. *Am J Physiol* 4:C595–C602.
- Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS. 2000. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem* 275:8719–8725.
- Rothermel BA, Vega RB, Williams RS. 2003. The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc Med* 13:15–21.
- Rowland LP, Shneider NA. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344:1688–1700.
- Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, Pette D. 1999. Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am J Physiol* 277:C1044–C1049.
- Talmadge RJ, Otis JS, Rittler MR, Garcia ND, Spencer SR, Lees SJ, Naya FJ. 2004. Calcineurin activation influences muscle phenotype in a muscle-specific fashion. *BMC Cell Biol* 5:28.
- Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG, Rosenfelder G. 1984. Glycosylphospholipid blotting: An immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J Immunol Methods* 72:471–479.
- Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH, van den Berg LH. 2003. Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord* 13:737–743.
- Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER, Simard AR, Michel RN, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS. 2000. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J* 19:1963–1973.
- Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, Hutcheson KA, DiMaio JM, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS. 2001. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J* 20:6414–6423.

2. Conclusions de l'article 1

Dans nos conditions expérimentales, l'exercice de nage en piscine à courant s'est avéré être, comme chez l'homme, un exercice de forte intensité associé à une grande amplitude et une fréquence importante des mouvements. En comparaison, l'exercice de course sur tapis roulant motorisé présente une amplitude et une fréquence des mouvements nettement plus faible que la nage.

L'augmentation de la concentration du lactate sanguin constatée chez les souris entraînées à la nage par rapport aux souris sédentaires suggère que la nage favoriserait l'utilisation du glucose comme source d'énergie par la voie de la glycolyse anaérobie, dans les muscles squelettiques. Au contraire, le niveau de lactate sanguin des souris entraînées à la course n'est pas significativement modifié par rapport à celui des souris sédentaires ; la course favoriserait donc plutôt l'utilisation des voies énergétiques aérobies mitochondriales, dans les muscles squelettiques. Les deux exercices induisent donc des adaptations du métabolisme énergétique différentes, qui suivent celles obtenues chez l'homme avec ces types d'exercices (Chen et al., 2003).

Au niveau cellulaire, nos résultats suggèrent que ces deux exercices recrutent des unités motrices différentes chez la souris. En effet, les motoneurons activés de manière privilégiée par la nage, mis en évidence par l'expression du marqueur d'activité cFOS, présentent une surface de soma supérieure à $300 \mu\text{m}^2$. L'entraînement à la nage active plus particulièrement ceux de surface supérieure à $600 \mu\text{m}^2$. Les motoneurons activés de manière privilégiée par la course présentent une surface de soma réduite par rapport à la nage ; les motoneurons exprimant le marqueur cFOS ont une surface de soma inférieure à $600 \mu\text{m}^2$. Comme le montre l'analyse de la typologie musculaire après 12 semaines d'entraînement à la course, un phénotype plus lent est induit dans les deux types de muscle étudiés. L'entraînement à la course augmente la proportion de fibres musculaires de type I dans le *Soleus* et de type IIa dans le *Plantaris*. Dans les deux types de muscles étudiés, peu de transitions des fibres de type IIb sont observées suite à l'entraînement à la nage ; celles-ci n'évoluent pas au cours de l'entraînement. L'entraînement à la nage recruterait préférentiellement les unités motrices rapides de type FF constituées, selon le principe d'Henneman et Mendell (1991), de fibres musculaires rapides de types IIx et IIb au métabolisme glycolytique anaérobie dominant innervées par des motoneurons de large surface de soma. Au contraire, l'entraînement à la course recruterait préférentiellement les unités motrices lentes de

type FR et S, constituées des fibres musculaires les plus lentes de type IIa et I au métabolisme préférentiellement aérobie innervées par des motoneurons de surface de soma réduite.

Ainsi, nous disposons de deux exercices de types différents pour la souris : un exercice de nage de forte intensité, qui recrute préférentiellement les unités motrices rapides et privilégie le métabolisme glycolytique anaérobie, et un exercice de course d'intensité plus modérée qui recrute préférentiellement les unités motrices lentes et privilégie le métabolisme aérobie.

Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

Séverine DEFORGES, Julien BRANCHU, Clément GRONDARD, Olivier BIONDI, Claude PARISSET, Sylvie LECOLLE, Philippe LOPES, Pierre-Paul VIDAL, Christophe CHANOINE et Frédéric CHARBONNIER

The Journal of Physiology, 2009, Jul 15 ; 587(Pt 14):3561-72.

1. Introduction de l'article 2

Les effets neuroprotecteurs de l'exercice physique sur les dysfonctionnements du système nerveux central et la progression de plusieurs maladies neurodégénératives sont aujourd'hui bien documentés (pour revue : Kramer et Erickson, 2007 ; McCrate et Kaspar, 2008). Cependant, l'analyse des effets de la course sur les souris SLA SOD1^{G93A high copy} révèle des résultats contradictoires pour ce type d'exercice. Selon le protocole utilisé, la course n'a pas d'effet (Liebetanz et al., 2004) voire même elle accélère le développement de la maladie (Mahoney et al., 2004), alors que pour d'autres, elle ralentit le développement de la SLA (Kirkinezos et al., 2003 ; Kaspar et al., 2005) et active des mécanismes neuroprotecteurs (Kaspar et al., 2005). Afin de concilier ces résultats, l'hypothèse selon laquelle l'intensité de l'exercice pourrait être un facteur déterminant dans l'activation de mécanismes neuroprotecteurs dans la SLA a été émise (McCrate et Kaspar, 2008). Ainsi, un exercice d'intensité modérée serait bénéfique alors qu'un exercice trop intense serait néfaste. Cependant, aucune donnée cellulaire ou moléculaire ne vient étayer cette hypothèse. Il apparaît donc nécessaire de définir l'intensité de l'exercice capable d'activer des mécanismes neuroprotecteurs chez les souris SLA et de circonscrire les effets de l'exercice physique sur les adaptations du système neuromusculaire dans son ensemble.

Au laboratoire, nous disposons de deux exercices bien caractérisés : un exercice de nage en piscine à courant ajustable d'intensité plus importante que celle d'un exercice de course sur tapis roulant motorisé à vitesse réglable. Nous avons donc analysé les effets d'un entraînement à chacun de ces exercices dans le modèle souris SLA transgéniques B6SJL-hSOD1 (G93A^{high copy}) (Gurney et al., 1994). Ces souris développent une forme isotypique de la SLA humaine : les symptômes apparaissent vers l'âge de 90 jours (P90) au niveau des membres postérieurs et le décès survient vers l'âge de 130 jours (P130). A partir de P70, nous avons soumis ces souris SLA en phase pré-symptomatique à un entraînement quotidien à la nage ou à la course, à raison de 30 minutes par jour et 5 jours par semaine. Nous avons réalisé une étude clinique du début de l'entraînement jusqu'à la mort des animaux, sur les deux populations de souris SLA entraînées comparées à des populations de souris SLA sédentaires placées dans les ergomètres hors tension. Nous avons déterminé l'âge moyen d'apparition des symptômes standardisé par un score clinique, ainsi que la survie moyenne pour chacune de ces trois populations de souris SLA. Cette étude clinique a été complétée par une étude comportementale des fonctions motrices : la force physique des membres antérieurs et le déplacement spontané ont été mesurés pour les trois

populations de souris SLA et comparés à ceux mesurés pour une population de souris Contrôles sédentaires de fond génétique B6SJL.

Afin de comparer les adaptations cellulaires induites par ces deux exercices chez les souris SLA, nous avons étudié différentes populations cellulaires de la moelle épinière lombaire (L1 - L5), à l'âge de 115 jours au cours de la phase symptomatique tardive. Nous avons dénombré les motoneurones spinaux innervant les muscles des membres inférieurs et analysé leur distribution en fonction de la surface du soma. Nous avons également analysé des populations cellulaires non-neuronales environnant ces motoneurones : les astrocytes, les oligodendrocytes et les progéniteurs neuraux (NPCs) ont été dénombrés dans les cornes ventrales. Enfin, nous avons établi le phénotype de trois muscles squelettiques caractéristiques du mollet, choisis en fonction de leur nature et de leur fonction sur la cheville : le *Soleus* - un muscle lent, extenseur - et deux muscles rapides, le *Plantaris* - un extenseur - et le *Tibialis antérieur* - un fléchisseur. Le nombre, la typologie basée sur l'expression majoritaire de la chaîne lourde de la myosine et la surface de section des fibres musculaires qui composent chacun de ces muscles ont été définis.

Par ailleurs, nous avons étudié les effets moléculaires de ces deux exercices sur l'apoptose. L'activation de la caspase-3, un des principaux effecteurs de l'apoptose, a été évaluée dans les cornes ventrales de la moelle épinière lombaire et plus précisément au niveau des colonnes motrices où se situent les motoneurones.

Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

Séverine Deforges¹, Julien Branchu¹, Olivier Biondi¹, Clément Grondard¹, Claude Pariset¹, Sylvie Lécolle¹, Philippe Lopes^{1,2}, Pierre-Paul Vidal¹, Christophe Chanoine¹ and Frédéric Charbonnier¹

¹Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux Sensorimoteurs, UMR 7060 CNRS, Equipe Biologie du Développement et de la Différenciation Neuromusculaire, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France

²Université d'Evry-val-d'Essonne, Bd François Mitterrand, 91000 Evry, France

Several studies using transgenic mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have reported a life span increase in exercised animals, as long as animals are submitted to a moderate-intensity training protocol. However, the neuroprotective potential of exercise is still questionable. To gain further insight into the cellular basis of the exercise-induced effects in neuroprotection, we compared the efficiency of a swimming-based training, a high-frequency and -amplitude exercise that preferentially recruits the fast motor units, and of a moderate running-based training, that preferentially triggers the slow motor units, in an ALS mouse model. Surprisingly, we found that the swimming-induced benefits sustained the motor function and increased the ALS mouse life span by about 25 days. The magnitude of this beneficial effect is one of the highest among those induced by any therapeutic strategy in this disease. We have shown that, unlike running, swimming significantly delays spinal motoneuron death and, more specifically, the motoneurons of large soma area. Analysis of the muscular phenotype revealed a swimming-induced relative maintenance of the fast phenotype in fast-twitch muscles. Furthermore, the swimming programme preserved astrocyte and oligodendrocyte populations in ALS spinal cord. As a whole, these data are highly suggestive of a causal relationship not only linking motoneuron activation and protection, but also motoneuron protection and the maintenance of the motoneuron surrounding environment. Basically, exercise-induced neuroprotective mechanisms provide an example of the molecular adaptation of activated motoneurons.

(Received 29 January 2009; accepted after revision 1 June 2009; first published online 2 June 2009)

Corresponding author F. Charbonnier: University Paris Descartes, Biology, 45 rue des Saints-Pères, Paris 75006, France. Email: frederic.charbonnier@parisdescartes.fr

Abbreviations ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CA II, carbonic anhydrase II; ChAT, choline acetyl-transferase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IGF-1, insulin-like growth factor 1; MyHC, myosin heavy chain; NPCs, neural progenitor cells; ROS, reactive oxygen species; SOD1, superoxide dismutase 1.

Amyotrophic lateral sclerosis is a chronic neurodegenerative disease characterised by a progressive motor weakness originating from selective motoneuron cell death. On average, mortality occurs within the 4 years following the occurrence of the first clinical symptoms. The currently available therapy extends survival in humans by approximately 3 months. Thus, developing new therapeutic strategies for ALS is of paramount importance. Mutations in superoxide dismutase 1 (SOD1) have been observed in about 20% of familial ALS patients (Rosen, 1993). SOD1 normally converts superoxide ion, a by-product of mitochondrial metabolism, to water and hydrogen peroxide. Despite the fact that SOD1 activity impairment has been ruled out as the causal event of

the disease (Shefner *et al.* 1999), there is some evidence for a gain in toxic function with the mutant form of SOD1 (Boillée *et al.* 2006). The clinical and morphological abnormalities are common to familial and other forms of ALS, suggesting a common degeneration mechanism. Yet, in spite of the wide variety of possible causes for ALS, including environmental agents, oxidative stress, disturbance of the glutamatergic neurotransmission, a large amount of literature data correlates neuronal cell death to glutamatergic excitotoxicity (Heath & Shaw, 2002). Interestingly, the deleterious effects of glutamatergic excitotoxicity might be decreased by submitting mice to physical exercise training (Carro *et al.* 2000, 2001). These beneficial effects have been linked to

an exercise-induced increase in circulating IGF-1 uptake by neurons (Carro *et al.* 2001). Furthermore, several groups have reported beneficial effects of a moderate running-based training in ALS mouse models including a 10- to 24-day increase in the life span of mutant mice submitted to training in comparison to their sedentary counterparts (Kirkinetzos *et al.* 2003; Veldink *et al.* 2003; Liebetanz *et al.* 2004; Kaspar *et al.* 2005). It should be noted, however, that one study reported deleterious effects of high-intensity exercise in ALS mice (Mahoney *et al.* 2004).

Whether there is an exercise-induced neuroprotection is still a matter of debate. According to Veldink *et al.* (2003), the analysis of the spinal cord anatomy of trained *vs* untrained mice revealed no difference in neuron distribution and survival. In contrast, Kaspar *et al.* (2005) reported that physical exercise significantly protected motoneurons from death. These contradictory data concerning the effects of exercise in neuroprotection outline the specific effect exerted by any given exercise protocol *i.e.* treadmill running for Veldink *et al.* (2003) and wheel running for Kaspar *et al.* (2005). Furthermore, although the molecular mechanism(s) underlying the exercise-induced effects is still unknown, the latter results do show that the effect of IGF-1 delivery and exercise are mediated through different molecular mechanisms, which in combination result in synergistic survival (Kaspar *et al.* 2005). If the exercise-induced neuroprotection is not reflecting the action of diffusible factors, such as IGF-1, then, which mechanism(s) could account for both the generally increased resistance of exercised motoneurons to cell death and the specific effect of a given exercise protocol? One cue for resolving this controversy may be to consider a causal link between the motoneuron activation, the adaptation of neuron intrinsic properties and neuroprotection. Indeed, the activation level of selected motoneuron sub-populations is dependent on the exercise type as shown by Grondard *et al.* (2008). Briefly, a swimming-based program was associated with high hindlimb movement amplitude and frequency exercise (4.86 ± 0.40 cm and 373.9 ± 47.6 cycles min^{-1}) preferentially activating a sub-population of large motoneurons (with soma area greater than $700 \mu\text{m}^2$) and a running-based training, described as a low hindlimb movement amplitude and frequency exercise (3.79 ± 0.23 cm and 234.2 ± 24.5 cycles min^{-1}), preferentially activating a sub-population of small motoneurons (with soma area less than $300 \mu\text{m}^2$). Furthermore, only specific sub-populations of small lumbar motoneurons ($<300 \mu\text{m}^2$) adapted their electrophysiological properties in running rats (Beaumont & Gardiner, 2002). Thus, an essential requirement would be to test whether motoneuron activation leads to their specific resistance to ALS-induced cell death, in contrast to resting neurons.

To directly address the importance of exercise intensity regulation and the existence of an exercise-induced neuroprotection in ALS mice, we have compared the efficiency of either a daily swimming- or running-based training, on the basis of our previous experiments on control mice (Grondard *et al.* 2008). We provide experimental evidence suggesting a relationship between exercise-induced motoneuron activation and their subsequent protection. Furthermore, our data revealed an unexpected link between exercise-induced neuroprotection and the maintenance of the motoneuron cell environment, in particular, the astrocytes that have been recently pointed out as regulators of ALS progression (Yamanaka *et al.* 2008).

Methods

Mice

The care and treatment of animals followed the national authority (Ministere de la Recherche et de la Technologie, France) guidelines for the detention, use and the ethical treatment of laboratory animals. All experimental procedures which include minimizing the number of animals used and their suffering were approved by the policies of the French Agriculture and Forestry Ministry.

Transgenic male mice with the G93A human SOD1 mutation B6SJL-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J (ALS mice) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Male mice B6SJL (Janvier, le Genest, France) served as control for this mutant strain.

Disease onset was defined as the time corresponding to the first observation of myotony symptoms in the mice hind limb. Death was scored when mice were unable to stand on their feet 30 s after having been placed on their side. Then, the moribund mice were killed with CO_2 .

All the experiments using mice were performed in a blind systematic fashion so as to minimize bias.

Training protocol

At 70 days of age, colour randomly assigned transgenic male were trained 30 min a day, 5 days a week as performed in previous studies using ALS mice (Kirkinetzos *et al.* 2003; Veldink *et al.* 2003). Training was performed until 115 days of age or until death. Twenty ALS mice (running ALS) were submitted to a running-based training on a speed-regulated treadmill (max. 13 m min^{-1}) and 25 ALS mice (swimming ALS) were submitted to a swimming-based training in an adjustable-flow swimming pool (max. 51 min^{-1}), as previously described (Grondard *et al.* 2008). A third group of 50 ALS mice (sedentary ALS) and 10 control mice were placed in the pool without flow (25 ALS

mice and 5 controls) and floated at the water surface accordingly exhibiting a poor activity or on the treadmill without speed (25 ALS mice and 5 controls). Likewise, these untrained animals which were studied in parallel only displayed an exploratory activity for the whole duration of training of the previously described animal groups.

Core body temperature was determined using a calibrated digital thermometer (Fischer Scientific Company) equipped with a rectal probe designed for rodents.

Behavioural study

General characteristics of mice were given using weight, forelimb grip strength and spontaneous activity ($n = 8$ in each group). Sedentary and trained mice between 70 and 126 days old were tested once a week and all of the tests were performed blindly (the group assignment being unknown to the observers). The time during which the animals were able to sustain their weight holding onto a metal rail suspended in midair was recorded with the maximum time being 180 s. Each mouse was subjected to three trials with at least a 10 min resting period between tests. The ambulatory behaviour was assessed in an open-field test. The apparatus consisted of a wooden box measuring 50 cm \times 50 cm \times 20 cm. The floor of the arena was divided into 25 equal squares of 10 cm. Squares adjacent to walls were referred to as periphery and the nine remaining squares were referred to as centre. The mice were tested individually and the open field was washed after each session. Each mouse was placed in a central square on the open field and was allowed to move freely for 5 min. The number of peripheral and central square crossings was scored manually by the experimenter.

Histological evaluation

Mice at 115 days old ($n = 8$ in each group) were anaesthetized by intraperitoneal injection of 3.5% chloral hydrate and perfused transcardially with buffered saline and 4% paraformaldehyde. The L1 to L5 lumbar region of the spinal cord was processed for vibratome sectioning at 40 μ m thickness and one out of every six sections was subsequently processed for immunostaining on free-floating sections. The immunohistochemical analysis was based on detection of choline acetyl-transferase (goat anti-ChAT, 1/800, Chemicon International, Temecula, CA, USA) to stain motoneurons, glial fibrillary acidic protein (rabbit anti-GFAP, 1/100, Dako, Glostrup, Germany) to stain astrocytes, carbonic anhydrase II (rabbit anti-CA II, 1/100; Ghandour *et al.* 2000) to stain oligodendrocytes and nestin (mouse anti-nestin, 1/300, Chemicon International)

to stain neural progenitor cells (NPCs). Secondary antibodies used were donkey anti-species-specific antibodies associated with the fluorophores Alexa Fluor 568 anti-goat IgG (1/500, Molecular Probes), Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1/500, Jackson-ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA, USA) and Cy2 anti-mouse (1/500, Jackson-ImmunoResearch laboratories). Sections were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and visualized using a BX51 Olympus microscope and Q Imaging Fast 1394 Retiga 2000 R camera.

For each mouse, 10 sections of lumbar spinal cord were studied. All cells were counted from within the ventral horn below a lateral line across the spinal cord and from the basis of the central canal. Only neuronal cells with the presence of a nucleolus located within the nucleus were counted. Motoneuron soma areas were evaluated using Image J v1.33 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Muscle typology immunofluorescence

At 115 days old ($n = 5$), soleus, plantaris and tibialis muscles were frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and transverse 10 μ m cryostat sections were used for muscle typology. Fresh-frozen sections of each muscle were fixed with acetone and incubated with mouse antibodies raised against myosin heavy chains (MyHC): NCL-MyHCs (anti-MyHC I, slow), NCL-MyHCf (anti-MyHC II, fast) (Novocastra, Newcastle, UK), A4.74 (anti-MyHC IIa) and BF.F3 (anti-MyHC IIb) (DSHB, IA, USA) at a dilution of 1 : 20. Secondary antibodies used were rabbit anti-species-specific antibodies conjugated with Cy2 or Cy3 (1 : 20, Dako). Sections were visualized as described above. For each mouse, three sections of each muscle were studied. Each MyHC count and soma areas were evaluated using Image J v1.33 software. The percentage of fibre IIX was determined as the difference between the total number of type II fibres and the sum of type IIa and IIb fibres [IIX = II - (IIb + IIa)].

Apoptosis evaluation

For immunohistochemical analysis, the activated caspase-3 was detected by a rabbit anti-activated caspase-3 antibody (1 : 20, Chemicon International) and motoneurons were detected as described above. Donkey anti-species-secondary antibodies were associated with the fluorophores Alexa Fluor 568 anti-goat IgG (1 : 500, Molecular Probes) and Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1 : 500, Jackson-ImmunoResearch).

For Western blot analysis, the ventral horn part of the lumbar spinal cord of 115-day-old mice ($n = 3$ in each group) was frozen in isopentane and lysed

with RIPA buffer supplemented with protease inhibitors (20 mM orthovanadate, 25 mM pyrophosphate; Sigma, Saint Quentin, Fallavier, France). Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 min, 12 000g) was determined using the Bradford protein microassay procedure (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). After addition of a loading buffer, protein samples were electrophoresed on a 10% SDS–polyacrylamide gel and transferred on to PVDF membranes (Biorad Laboratories). The activated caspase-3 was detected with an antibody specific for cleaved forms of caspase-3 (1 : 1000, rabbit anti-activated caspase-3, Promega, Madison, WI, USA) and revealed with a goat peroxidase-conjugated secondary antibody directed against rabbit immunoglobulins (1 : 7500, Jackson Immunoresearch). Bound antibody complexes were developed using the ECL plus kit and exposed to hyperfilm ECL-plus X ray film (Amersham Biotech, Les Ulis, France). After stripping, membranes were incubated with a mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase monoclonal antibody (1 : 5000, Chemicon International) and revealed with a goat peroxidase-conjugated secondary antibody directed against mouse immunoglobulins (1 : 5000, Jackson Immunoresearch).

Statistical analysis

For the behavioural study, data are presented as mean and standard error of mean ($n = 8$). A one-way ANOVA for repeated measures with Tukey's *post hoc* analysis was performed on the data. For the other studies, all values are displayed as means and standard deviation within each group. A Kolmogorov–Smirnov normal distribution analysis was performed on all data followed by either a Student's *t* test for normally distributed data or a non-parametric Kruskal–Wallis test, to verify significant differences between groups (Systat v 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All the analyses have been statistically powered to ensure significant scientific statements. All the data presented in this study have a statistical power of 90% (AnaStats.fr, France).

Results

Life span extension and behavioural improvement depend on the exercise type in ALS mice

We submitted two populations of ALS mice to a daily swimming- or running-based training, on the basis of our previous experiments on control mice (Grondard *et al.* 2008). These protocols started in the asymptomatic phase of the disease (70 days). The swimming programme resulted in the significant delay of 16 days ($P < 0.001$) for the appearance of symptoms, from 93 ± 8 days in sedentary ALS mice to 109 ± 15 days in swimming ALS

mice (Fig. 1A). Furthermore, the mean survival increased from 127 ± 9 days in sedentary ALS mice to 153 ± 24 days in swimming ALS mice, corresponding to an improvement of 25 days ($P < 0.01$) in the survival of ALS mice (Fig. 1B). In contrast, no effect on the appearance of symptoms or in survival could be recorded with the running-based training.

In order to evaluate the motor function benefits induced by each exercise programme, we subjected the mice of each group to a grip test and to an open field test. All ALS mice presented a reduced body weight compared to controls (Fig. 1C). The weight of sedentary and running ALS mice decreased from 112 days until death. In contrast, the weight of the swimming ALS mice remained constant until 120 days ($P < 0.05$). In the grip test, the average time sedentary and running ALS mice could sustain their weight using their forelimb muscles decreased from 105 days and these mice were unable to grip after 119 days (Fig. 1D). In contrast, the swimming ALS mice had enough strength to grip for a time comparable to controls, up to 119 days ($P < 0.05$). Near death, the swimming ALS mice showed difficulties to sustain the grip.

We then compared the spontaneous activity of the mice in an open field test (Fig. 1E). A significant decrease in locomotion activity was found in running ALS from 91 days of age and in sedentary ALS mice from 105 days of age when compared to controls ($P < 0.05$). In contrast, the swimming ALS mice maintained a near to normal locomotion activity until 112 days of age.

Motoneuron protection depends on the exercise type

The comparison of the lumbar motoneuron populations in the trained and sedentary ALS mice at 115 days of age showed remarkable differences in the neuroprotective potentials of each exercise (Fig. 2). A dramatic motoneuron loss was recorded in the ventral horns of the sedentary and the running ALS mice with a 49% and 45% reduction, respectively (Fig. 2B). Likewise, the motoneuron distribution in sedentary and the running ALS mice exhibited a decrease in the proportion of motoneurons exhibiting medium (between 300 and $700 \mu\text{m}^2$) and large (greater than $700 \mu\text{m}^2$) soma in comparison to control mice, with a slight reduction in the absolute number of motoneurons exhibiting soma larger than $500 \mu\text{m}^2$ (Fig. 2C). As a consequence, an increased proportion of motoneurons exhibiting small soma area (less than $300 \mu\text{m}^2$) was observed. In contrast, the swimming-based training in ALS mice exhibited a neuroprotective potential with only a 28% reduction of motoneurons in comparison to controls. Interestingly, the swimming-induced protection from neuronal loss was readily apparent for motoneurons exhibiting medium size soma (between 300 and $700 \mu\text{m}^2$).

The relative maintenance of the muscle phenotype is also dependent on the exercise type

Since muscle weakness is a major cause of disability in ALS, we investigated whether the running- and the swimming-induced protection of motoneurons led to the maintenance of the muscle phenotype. Our count of neurons was performed in the lumbar spinal cord from which the sciatic nerve originates, then we analysed the phenotype of three muscles of the calf innervated by the sciatic nerve, namely two extensor muscles of the ankle, the slow-twitch soleus and the fast-twitch plantaris, and a flexor muscle of the ankle, the fast-twitch tibialis. According to all the phenotypic criteria we used (i.e. the number of myofibres, their cross-section area and the muscle typology), only the swimming-based training efficiently preserved the ALS muscle phenotype close to the corresponding control muscles (Fig. 3). The ALS muscles displayed a significant hypoplasia that appeared

particularly severe for the slow-twitch soleus, suggesting that the level of muscular impairment was related, at least in part, to the muscle type (Fig. 3A). Unlike running, swimming efficiently counteracted the hypoplasia in the soleus. Furthermore, the ALS soleus muscle displayed a dramatic atrophy that was rescued by both training programmes (Fig. 3D). In the fast-twitch muscles, only the fast IIB fibres were atrophied in ALS mice. Both exercises limited this atrophy. In sedentary ALS fast-twitch muscles, we found a significant fast-to-slow transition from fast-twitch type II fibres to slow-twitch type I fibres and, within the type II fibre population, from type IIB/IIx to IIA fibres, concurring with the findings of Hegedus *et al.* (2008) (Fig. 3C). In contrast, the typology of the slow-twitch soleus indicated a slow-to-fast transition. The running programme induced opposite effects on the three muscle typology, counteracting the fast-to-slow transition in the tibialis, but worsening those of the

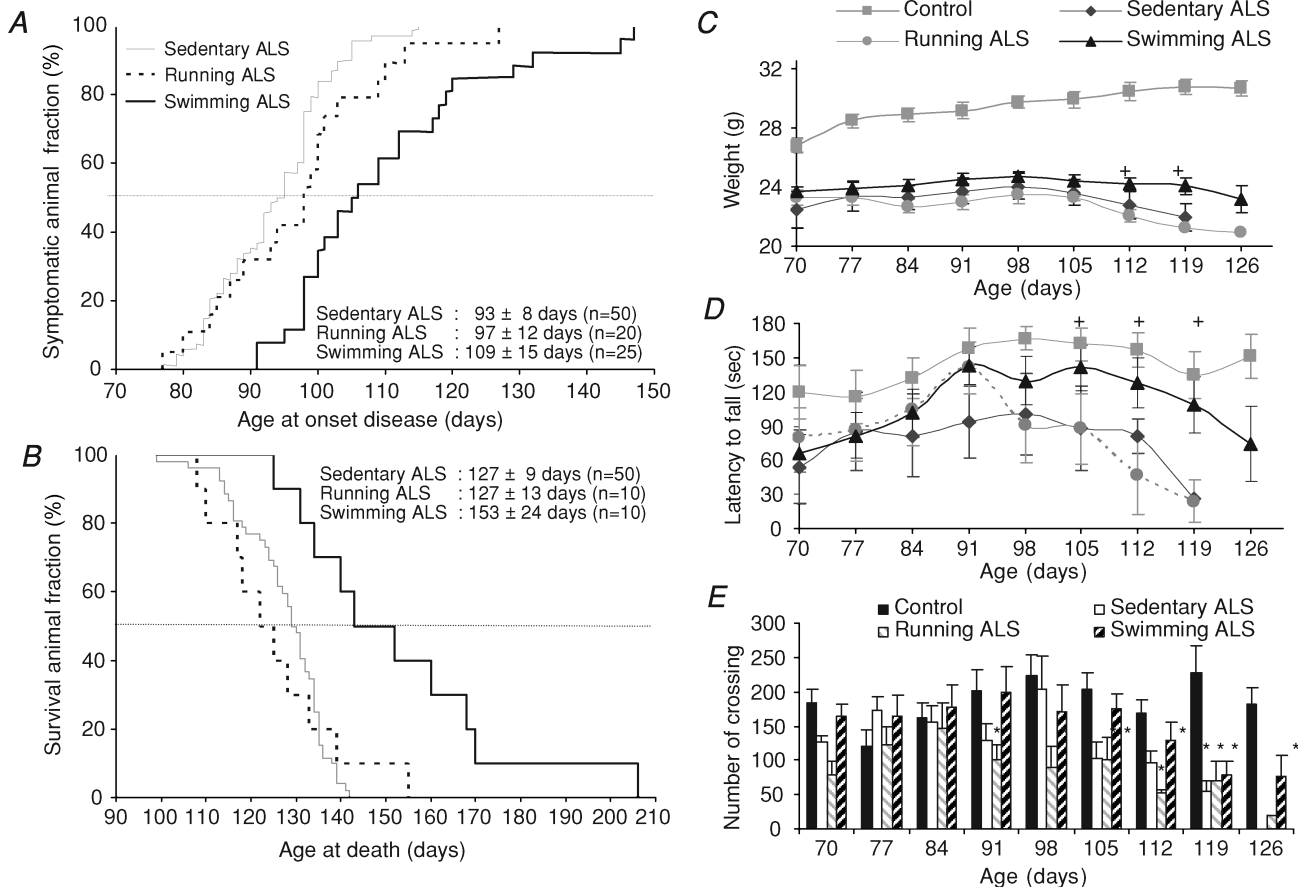


Figure 1. Differential effects of either a swimming- or a running-based training in ALS mice

Only the swimming programme delays disease onset (A) and extends survival (B) in ALS mice as shown by Kaplan–Meier curves. The mean time to disease onset was delayed by 2 weeks ($P < 0.001$) and the mean time to death was delayed by 3 weeks ($P < 0.01$) for the swimming ALS mice compared to the sedentary and the running ALS mice. Swimming delays the onset of disease symptoms, including a stabilization of the body weight (C), a delay in disease-related weakness as shown by the performance assessment of forelimb strength (grip test) (D) and the level of spontaneous exploratory activity (open field) (E). The behavioural data are shown as mean \pm s.e.m. ($n = 8$; $*0.01 < P < 0.05$), *control versus ALS mice or +swimming ALS versus other ALS groups).

plantaris, leading to a decrease of type IIb fibres and being unable to correct the slow-to-fast transition in the soleus. However, the swimming-based training led to the maintenance of muscle typology in all three muscles.

Exercise-induced control of non-neuronal spinal cell populations in ALS mice

Several studies support the hypothesis that multiple cell types drive the motor degeneration in ALS mice, in association with a direct damage of motoneurons (Hall *et al.* 1998; Yamanaka *et al.* 2008). We therefore analysed the influence of each exercise mode on the cell types that lay beyond the motoneurons in ALS mice at 115 days of age. We first analysed the astrocyte population in the spinal cord of control mice and sedentary, running and swimming ALS mice (Fig. 4A). Astrogliosis and astrocytic activation as assessed by using GFAP immunostaining were significantly increased in sedentary and running ALS mice. A significant increase in astrocyte density was noted throughout the lumbar

spinal cord (about 40% in sedentary and running ALS mice and only 3% in swimming ALS mice), with a high concentration in the ventral horn (Fig. 4B). Furthermore, compared with the long, thin, filament-like GFAP staining observed in controls, GFAP staining in ALS astrocytes was more condensed and brightly fluorescent, although the filaments often appeared shorter in length. In contrast, no significant astrogliosis was detected in the swimming ALS mice. We secondly evaluated the oligodendrocyte population, on a type II carbonic anhydrase immunostaining basis (Fig. 4C). We found a 30% decrease in oligodendrocytes in the ventral spinal cord of sedentary and running ALS mice compared with controls (Fig. 4D). Interestingly, the swimming-based training led to the maintenance of the oligodendrocyte population in the ALS spinal cord. Finally, we evaluated the neural progenitor cells (NPC) population through the count of nestin-positive cells (Fig. 4E). We observed a significant increase in NPCs throughout the spinal cord of sedentary ALS mice compared to a very discrete presence of NPCs in controls, in agreement with previous studies (Chi *et al.*

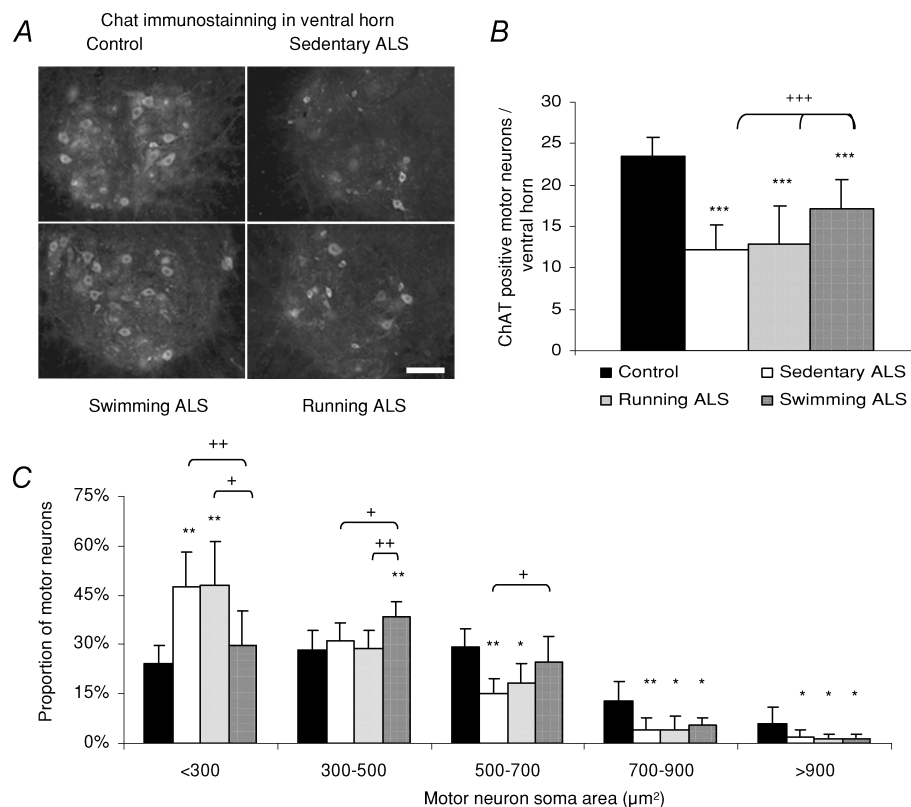


Figure 2. Only the swimming-based training significantly protects lumbar motoneurons in ALS mice

A, representative images showing motoneuron populations identified using ChAT immunostaining in the ventral horn of the lumbar spinal cord from control mice and sedentary, running and swimming ALS mice (scale bar: 50 μm). B, quantification of surviving motoneurons in control mice and sedentary, running and swimming ALS mice at 115 days of age. Data are shown as mean \pm s.d. C, morphometric evaluation of surviving motoneurons in control mice and sedentary, running and swimming ALS mice at 115 days of age. Percentage of motoneurons by soma area (distribution: 200 μm^2) are shown as mean \pm s.d. ($n = 8$; *** $P < 0.001$, ** $0.001 < P < 0.01$, * $0.01 < P < 0.05$), *control versus ALS mice or +swimming ALS versus other ALS groups.

2006). The running- and the swimming-based training induced a significant decrease in the number of NPCs, with, respectively, a 39% and a 58% reduction compared to sedentary ALS mice.

The swimming programme limits apoptosis in the lumbar spinal cord of ALS mice

To verify whether the swimming-based training limits the apoptosis process in the spinal cord of ALS mice, we evaluated the activation of the caspase pathway at 115 days of age. The quantification of the active form of caspase-3 in the ventral spinal cord of sedentary ALS mice showed that

the apoptosis process was limited in swimming-trained compared to sedentary and running-trained ALS spinal cords (Fig. 5).

Exercise protocols do not modify body core temperature

A difference between the two exercise conditions could be a change in core temperature during exercise and this could influence neuroprotective mechanisms (Dietrich *et al.* 2009). The core body temperature was determined in 12 trained control animals. No significant difference in body temperature of the trained control mice was found before (T0) and after training (T30) (Fig. 6).

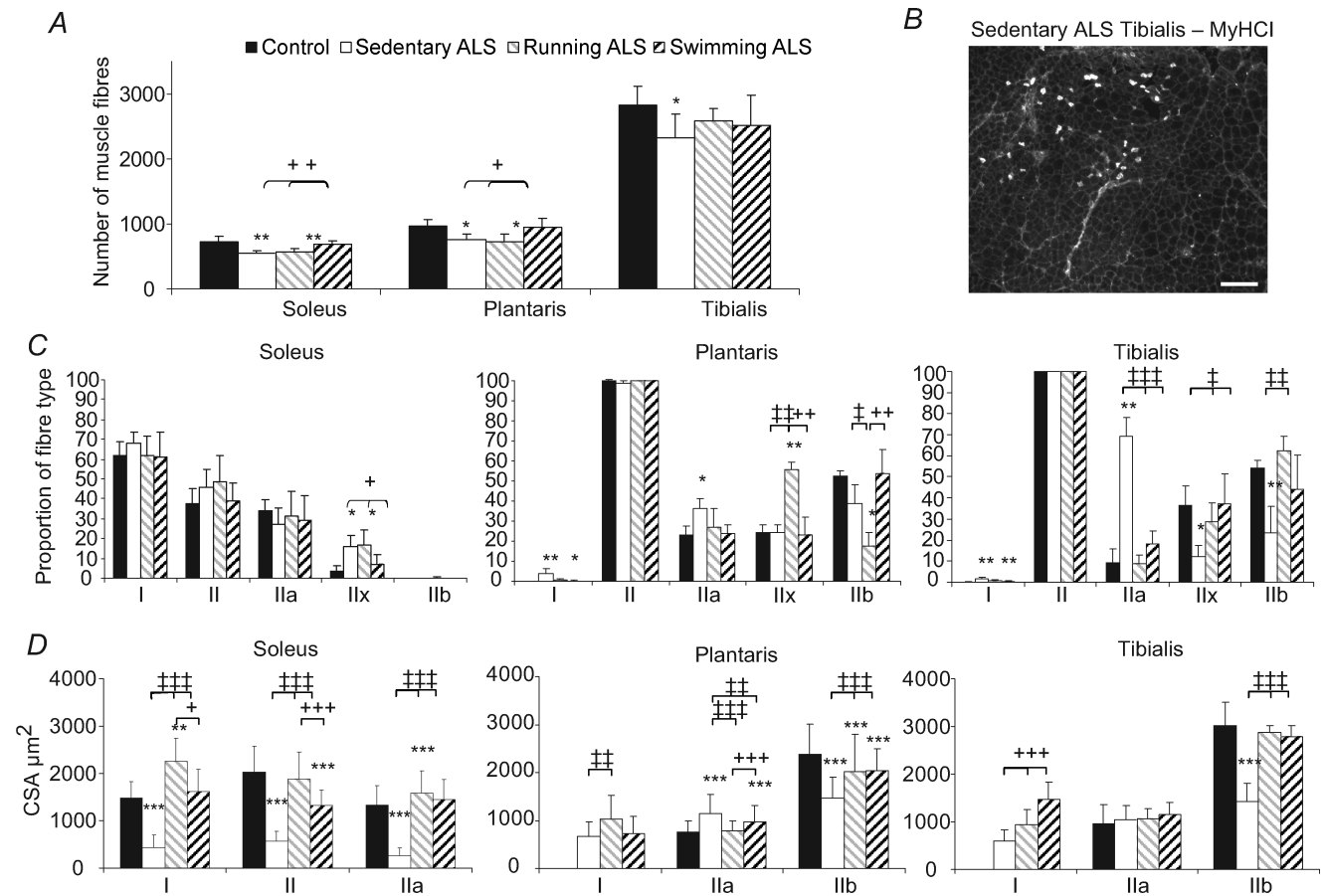


Figure 3. Differential effects of swimming- and running-based training programmes in sustaining the skeletal muscle phenotype in ALS mice

Only the swimming programme limits the hypoplasia affecting the two extensor muscles, namely the slow-twitch soleus and the fast-twitch plantaris from ALS mice at 115 days of age (A). Both exercises limit the hypoplasia detected in the fast-twitch flexor tibialis. B, representative image showing a type I fibre appearance in a fast-twitch tibialis in sedentary ALS mice. Scale bar: 200 µm. Analysis of the muscle typology in ALS muscles compared to controls (C) reveals a slow-to-fast myofibre transition in the slow-twitch soleus, and a fast-to-slow myofibre transition in the fast-twitch plantaris and tibialis that are significantly limited by the swimming programme. The running- and the swimming-based training programmes significantly decrease the severe muscular atrophy detected in all myofibre types in soleus, and in IIb myofibre in plantaris and tibialis ALS muscles as shown by the evolution of the cross-section area (CSA) of each fibre type (D). Data are shown as mean ± s.d. (n = 5; an average of 3 sections of each muscle per animal at 115 days old was used; *0.01 < P < 0.05, **0.001 < P < 0.01, ***P < 0.001, *control versus ALS groups, ‡sedentary ALS versus training ALS groups, +swimming ALS versus other ALS groups).

Discussion

This study provides evidence for significant beneficial effects of forced swimming on the life span of ALS mice as well as on the associated clinical symptoms. Survival was extended by about 20% of life span, which can be considered as one of the best treatments tested on ALS animals when starting at the onset of symptoms (Carri *et al.* 2006).

In our exercise conditions, swimming can be described as a high movement amplitude and frequency exercise, and running as a low movement amplitude and frequency exercise (Grondard *et al.* 2008). Accordingly, swimming preferentially activates large motoneurons, belonging to fast motor units (i.e. a medium- and large-size soma motoneuron and a great number of large diameter muscle fibres, of the faster type II) and, in contrast, running preferentially activates small motoneurons belonging to slow motor units (i.e. a motoneurons of small soma

area and a low number of type I muscle fibres). Here, we show that swimming, in striking contrast to running, preferentially protects medium-size motoneurons (between 300 and 700 μm^2) in ALS spinal cord but not the smaller ones (less than 300 μm^2). Taken together, these data strongly suggest that the exercise-activated neurons are selectively protected against cell death, in contrast to resting neurons. Accordingly, the running programme led to a limited neuroprotection that is mainly observed for the motoneurons of small soma area (less than 300 μm^2). These data account for the evolution of the muscular phenotype in three skeletal muscles differing in their nature and function. Only the swimming-based training was able to completely counteract the hypoplasia detected in all muscles and notably in the soleus that unexpectedly appeared affected by a severe lost of muscle fibres. Furthermore, only the swimming-based training led to the maintenance of the faster myofibre population to a level comparable to

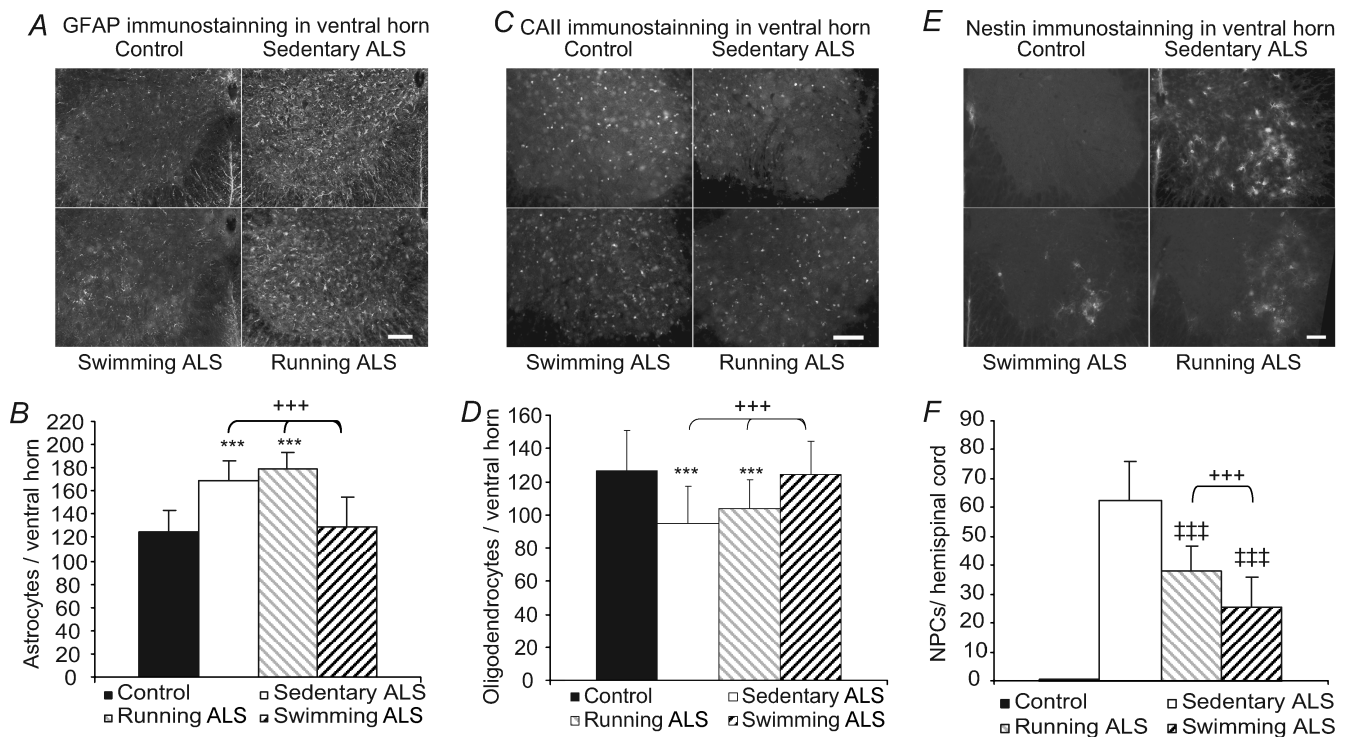


Figure 4. Differential effects of swimming- and running-based training programmes in maintaining the non-neuronal cell populations in the lumbar spinal cord of ALS mice

A, representative images showing a population of astrocytes in control mice and in sedentary, running and swimming ALS mice using glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunostaining. The quantification of astrocytes in the ventral horn of the lumbar spinal cord reveals a severe astrogliosis in sedentary and running ALS mice that is limited by swimming exercise (B). C, representative images showing a population of oligodendrocytes in control, sedentary, running and swimming ALS mice using CA11 immunostaining. The unexpected ALS-induced decrease of oligodendrocyte population is limited by swimming exercise (D). E, representative images showing a population of neural progenitor cells (NPC) in control mice and sedentary, running and swimming ALS mice using nestin immunostaining. Cell quantification in hemi-spinal cord reveals a limited NPC proliferation in swimming-exercised mice (E). All scale bars: 100 μm . Number of cells are shown as mean \pm s.d.; ($n = 5$; 10 sections of spinal cord per animal. *** $P < 0.001$, *control versus ALS mice or †swimming ALS versus other ALS groups or ‡sedentary ALS versus training ALS groups).

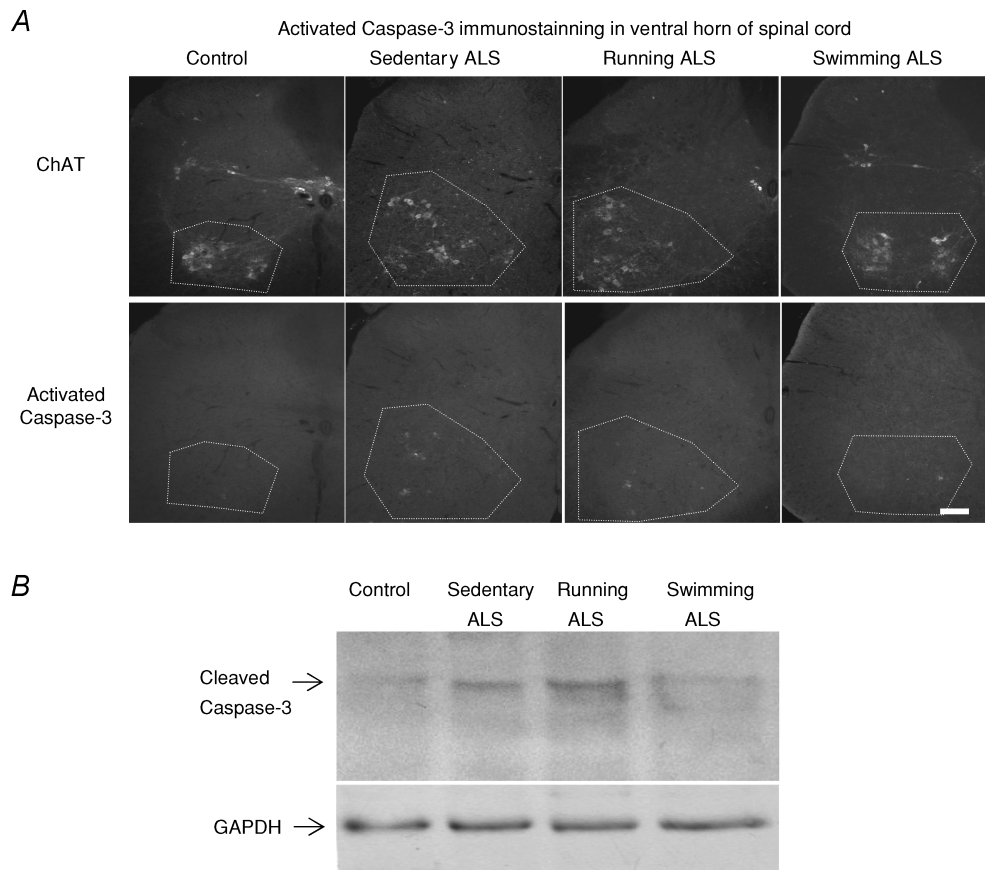


Figure 5. The swimming-based training limits cell death

The swimming programme induces a reduction of apoptotic cells as shown by immunodetection of active caspase-3 in the ventral horn of the lumbar spinal cord from control mice and sedentary, running and swimming ALS mice at 115 days of age (A) and by Western blot (B) ($n = 3$ in each group). Scale bar: 100 μm .

controls in the three tested muscles. Taken together, these results account for the swimming-induced enhancement of the fast motor-unit activity, probably leading to their maintenance and finally to their protection. Interestingly, both exercise programmes displayed comparable potential to counteract the muscular atrophy favouring the hypothesis of an exercise-induced production of a muscle trophic diffusible factor.

Consequently, the molecular mechanism(s) underlying swimming-induced neuroprotection reflects not so much the modulated expression of a diffusible factor, such as IGF-1, which would have indiscriminately protected the whole neuron population by an endocrine or paracrine way, but an intrinsic modification of activated neurons. This concurs with the result of Kaspar *et al.* (2005) showing distinct molecular mechanisms of action between the IGF-1 delivery and exercise, which, in combination, results in synergistic survival. In addition, the differential exercise effects found in the present study are unlikely to come from a difference in exercise intensity. Indeed, our swimming protocol, a high movement frequency and amplitude exercise when compared to our running

protocol (Grondard *et al.* 2008), should be detrimental according to Mahoney *et al.* (2004). In striking contrast with this assumption, swimming induced beneficial effects whereas running did not. Repeated electrical activation of the same neuronal network might induce an intrinsic

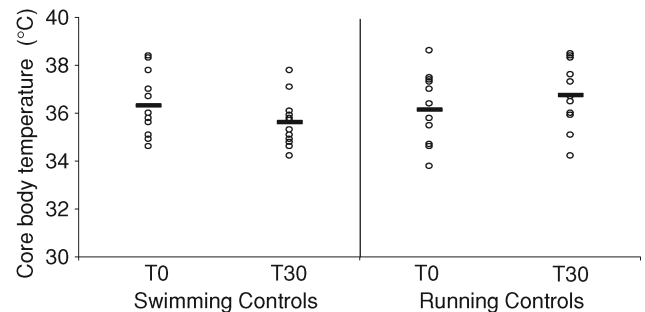


Figure 6. Effects of swimming and running-based training programmes on the core body temperature of control mice

Monitoring of core body temperature before (T0) and after training (T30). Chart representation of core body temperature for each animal ($n = 12$, \circ); means are indicated by a bar. No significant difference could be observed before and after swimming- ($P = 0.190$) or running-based ($P = 0.264$) training.

modification of the transcriptome of activated cells, as previously reported in a study of running-induced adaptations in rats showing that only the subpopulation of motoneurons of small soma area displayed an adaptation of their electrophysiological properties (Beaumont & Gardiner, 2002). According to our present results, it can be assumed that this neuronal subpopulation probably corresponds to the motoneurons specifically activated by the running exercise. In the specific case of ALS, the transcriptome modification of the selectively activated motoneuron may lead to an efficient protection against degeneration.

An alternative and non-exclusive mechanism that could be suggested to explain the specific neuroprotection induced by the swimming-based exercise implies an intrinsic modification of the energy metabolism in recruited muscles. On the one hand, the energy metabolism was shown to be highly dysfunctional in the whole organism of ALS mice (Dupuis *et al.* 2004; Fergani *et al.* 2007). On the other hand, the muscle might be a primary target site for ALS (Dobrowolny *et al.* 2008). In addition, the neuromuscular disruption, especially the post-synaptic cleft, appeared as the most prominent event that induces motoneuron death (Frey *et al.* 2000; Fischer *et al.* 2004). Thus, a strength training programme would modify the metabolism of the whole organism, more particularly in the muscle, where the swimming-induced preferential utilization of the glycolytic metabolism would entail a decrease in the reactive oxygen species (ROS) production that could be highly relevant in the ALS context of SOD1 mutation. Accordingly, a running-based training might preferentially use the aerobic metabolism that could worsen the ALS phenotype in particular conditions, such as those used by Mahoney *et al.* (2004). This hypothesis is substantiated by recent evidence suggesting beneficial effects of ROS reduction for skeletal muscles specifically expressing the mutated SOD1(G93A) protein (Dobrowolny *et al.* 2008).

Furthermore, we reported here, for the first time, that exercise impacts on all neural cell distribution in ALS spinal cord with an efficiency dependent on the nature of the exercise. Only the swimming-based training was able to limit the ALS-induced astrogliosis, reducing both proliferation and hypertrophic processes. Importantly, mutant SOD1 damage in astrocytes was recently shown to accelerate ALS disease progression (Yamanaka *et al.* 2008). Our data are indicative of a strong relationship between neuroprotection rate and astrocyte preservation, suggesting that the swimming-based training promotes cell survival not only on the motoneuron, but also on its surrounding cellular environment resulting in the maintained integrity of functional neuronal circuits. We also observed that the swimming-based training specifically promoted a significant maintenance of the oligodendrocyte population, which displayed a 30% loss

in sedentary and running ALS mice. While the role of oligodendrocytes in motoneuron and axonal degeneration in ALS remains elusive, a significant loss of large myelinated fibres in the corticospinal tract and ventral roots was observed in human ALS (Delisle & Carpenter, 1984). Furthermore, myelin degradation in endstage mice has furthermore been observed in the SOD1(G93A) model (Neusch *et al.* 2007). It is thus tempting to speculate that the corticospinal fibres involved in the neuronal network specifically activated by the swimming-based training are also protected. In contrast to the differentiated neural cells, neurons and glia, the neural progenitor cell (NPCs) proliferation, which was enhanced in ALS spinal cord, as previously described (Chi *et al.* 2006; Juan *et al.* 2007), was strongly inhibited by both running and swimming programmes. The fact that both exercises have the same impact on the exercise-induced loss of NPCs suggested a common mechanism, probably associated with the emission of a diffusible factor.

The importance of physical exercise in maintaining nervous system health and function has consistently emerged as a key factor of plasticity and cell survival but the mechanisms underlying the exercise-induced benefits still remain unclear. The present data strongly suggest that some of the exercise effects are specifically and directly exerted on activated motoneurons which probably adapt their proteome, becoming thus selectively more resistant to apoptosis. This concept has been recently substantiated in a spinal-muscular-atrophy model mouse in our laboratory (Biondi *et al.* 2008). Thus, analysing the molecular response of activated motoneurons to exercise and, more precisely, the modulation and activation of the cell-surface receptors is most likely to constitute a milestone in discovering relevant means of preventing motoneuron death in ALS.

References

- Beaumont E & Gardiner P (2002). Effects of daily spontaneous running on the electrophysiological properties of hindlimb motoneurons in rats. *J Physiol* **540**, 129–138.
- Biondi O, Grondard C, Lécolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C & Charbonnier F (2008). Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* **28**, 953–962.
- Boillée S, Vande Velde C & Cleveland DW (2006). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* **52**, 39–59.
- Carri MT, Grignaschi G & Bendotti C (2006). Targets in ALS: Designing mutidrug therapies. *Trends Pharmacol Sci* **27**(5), 267–273.
- Carro E, Nuñez A, Busiguina S & Torres-Aleman I (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* **20**, 2926–2933.

- Carro E, Trejo JL, Busiguina S & Torres-Aleman I (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* **21**, 5678–5684.
- Chi L, Ke Y, Luo C, Li B, Gozal D, Kalyanaraman B & Liu R (2006). Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells* **24**, 34–43.
- Delisle MB & Carpenter S (1984). Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **63**, 241–250.
- Dietrich WD, Atkins CM & Bramlett HM (2009). Protection in animal models of brain and spinal cord injury with mild to moderate hypothermia. *J Neurotrauma* **26**, 301–312.
- 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, Fanò G, Sandri M, & Musarò A (2008). Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab* **8**, 425–436.
- Dupuis L, Oudart H, René F, Gonzalez de Aguilar JL & Loeffler JP (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11159–11164.
- Fergani A, Oudart H, Gonzalez De Aguilar JL, Fricker B, René F, Hocquette JF, Meininger V, Dupuis L & Loeffler JP (2007). Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Lipid Res* **48**, 1571–1580.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA & Glass JD (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* **185**, 232–240.
- 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. *J Neurosci* **20**, 2534–2542.
- Ghandour MS, Parkkila AK, Parkkila S, Waheed A & Sly WS (2000). Mitochondrial carbonic anhydrase in the nervous system: expression in neuronal and glial cells. *J Neurochem* **75**, 2212–2220.
- Grondard C, Biondi O, Pariset C, Lopes P, Deforges S, Lécolle S, Gaspera BD, Gallien CL, Chanoine C & Charbonnier F (2008). Exercise-induced modulation of calcineurin activity parallels the time course of myofibre transitions. *J Cell Physiol* **214**, 126–135.
- Hall ED, Oostveen JA & Gurney ME (1998). Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* **23**, 249–256.
- Heath PR & Shaw PJ (2002). Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **26**, 438–458.
- Hegedus J, Putman CT, Tyreman N & Gordon T (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* **586**, 3337–3351.
- Juan L, Dawei Z & Julie AD (2007). Increased number and differentiation of neural precursor cells in the brainstem of superoxide dismutase 1(G93A) (GIH) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* **29**, 204–209.
- Kaspar BK, Frost LM, Christian L, Umapathi P & Gage FH (2005). Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **57**, 649–655.
- Kirkinezos IG, Hernandez D, Bradley WG & Moraes CT (2003). Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **53**, 804–807.
- Liebetanz D, Hagemann K, von Lewinski F, Kahler E & Paulus W (2004). Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* **20**, 3115–3120.
- Mahoney DJ, Rodriguez C, Devries M, Yasuda N & Tarnopolsky MA (2004). Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **29**, 656–662.
- Neusch C, Bähr M & Schneider-Gold C (2007). Glia cells in amyotrophic lateral sclerosis: new clues to understanding an old disease? *Muscle Nerve* **35**, 712–724.
- Rosen DR (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **364**, 362.
- Shefner JM, Reaume AG, Flood DG, Scott RW, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Upton-Rice M & Brown RH Jr (1999). Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* **53**, 1239–1246.
- Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH & van den Berg LH (2003). Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord* **13**, 737–743.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H & Cleveland DW (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* **11**, 251–253.

Author contributions

S.D. conducted, designed and analysed the majority of experiments. J.B. and O.B. conducted the Western blot experiments. C.G. designed, and conducted partly, the training programme and the behavioural analyses. S.L. and C.P. assisted in the majority of experiments and C.P. helped in writing the manuscript. P.L. and P.P.V. helped in the analysis of behaviour data and P.L. helped in writing the manuscript. C.C. helped in the analysis of muscle data. F.C. supervised the project and wrote the manuscript.

Acknowledgments

The authors wish to thank C. L. Gallien for comments and advice, V. Mouly for the muscle antibodies and Q. Y. Zheng for helping in the animal model selection. This project was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM). O.B. and C.G. are the recipients of student fellowships from the Ministère de la Recherche et de la Technologie.

2. Conclusions de l'article 2

Plusieurs études utilisant le modèle souris SLA SOD1^{G93A high copy} ont rapporté une augmentation de la durée de vie des animaux entraînés, uniquement lorsqu'ils sont soumis à un protocole d'entraînement à la course à intensité modérée. De manière surprenante, dans nos conditions expérimentales, seul l'entraînement à la nage - un exercice de forte intensité, qui recrute préférentiellement les unités motrices rapides - a un effet bénéfique sur le développement de la SLA dans ce modèle murin. L'entraînement à la course - un exercice d'intensité plus modérée, qui recrute préférentiellement les unités motrices lentes - n'a pas d'effet. L'entraînement à la nage retarde l'apparition des symptômes de 16 jours et allonge la durée de vie des souris SLA de 26 jours en moyenne, tout en préservant leurs capacités motrices. Ces résultats placent l'entraînement à la nage parmi les stratégies thérapeutiques les plus efficaces rapportées à ce jour chez les souris SLA.

Au niveau de la moelle épinière lombaire, seul l'entraînement à la nage limite la disparition des motoneurones induite par la SLA. Il protège préférentiellement les motoneurones intermédiaires qui ont une surface de soma comprise entre 500 et 700 μm^2 . Il limite l'apoptose induite par la SLA, notamment au niveau des colonnes motrices où se situent les motoneurones. De plus, seul l'entraînement à la nage limite significativement la prolifération et l'activation des astrocytes induite par la SLA ; or, ce changement d'état des astrocytes est connu pour être impliqué directement dans les mécanismes physiopathologiques de la maladie (Gong et al., 2000 ; Yamanaka et al., 2008). Enfin, l'entraînement à la nage maintient la population d'oligodendrocytes fortement diminuée chez les souris SLA sédentaires et réduit, de façon plus efficace que l'entraînement à la course, la prolifération des NPCs concentrée au niveau des cornes ventrales chez les souris SLA sédentaires.

Au niveau musculaire, l'entraînement à la nage préserve les trois muscles étudiés de toutes les modifications induites par la maladie chez les souris SLA sédentaires : il limite l'aplasie, l'atrophie et maintient le phénotype musculaire. Il contre l'induction d'un phénotype plus lent dans les muscles rapides, mis en évidence par des transitions des fibres IIb/IIx vers IIa et I. L'entraînement à la course a également des effets bénéfiques sur les muscles des souris SLA : il limite l'atrophie dans les trois muscles étudiés. Dans le *Tibialis*, il limite également l'aplasie et les transitions des fibres rapides vers lents induites par la SLA. Cependant, il aggrave le phénotype

musculaire du *Plantaris* ; il induit un phénotype musculaire encore plus lent que chez les souris SLA sédentaires, en augmentant les transitions des fibres Iib vers Iix.

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la neuroprotection induite par l'exercice physique chez les souris SLA n'est pas dépendante de l'intensité mais plutôt du type d'exercice pratiqué. En effet, l'entraînement à la nage par l'activation des unités motrices les plus rapides sélectivement atteintes dans la SLA déclencherait des mécanismes neuroprotecteurs, selon au moins deux modes possibles : (1) La neuroprotection constatée pourrait être induite par des adaptations moléculaires intrinsèques des motoneurones de soma de large surface activés spécifiquement par la nage. Le maintien des motoneurones sensibles à la SLA induirait ainsi la protection des muscles et des cellules non-neuronales environnantes. (2) La sollicitation des fibres musculaires rapides de type Iib et Iix par la nage, particulièrement sensibles à l'action de la SOD1 mutée, protégerait les muscles des modifications phénotypiques et métaboliques induites par la SLA. L'adaptation moléculaire intrinsèque des fibres musculaires rapides induirait la neuroprotection constatée, grâce à la stabilisation des jonctions neuromusculaires rapides et à l'augmentation du métabolisme musculaire glycolytique.

Adaptations du métabolisme énergétique des souris SLA aux exercices de nage et de course

1- Introduction

Chez l'homme, l'activité physique influence le métabolisme énergétique en fonction du type d'exercice pratiqué. Un exercice de course d'intensité faible ou modérée favorise le métabolisme énergétique oxydatif et privilégie l'utilisation des lipides comme source d'énergie (Narkar et al., 2008). Cette adaptation métabolique est associée à l'instauration d'un phénotype plus lent dans les muscles rapides, caractérisée par des transitions de fibres de type II vers I (Narkar et al., 2008). Dans les muscles squelettiques, la course induit une diminution de la prise du glucose et une augmentation de l'oxydation des lipides (Narkar et al., 2008). Au contraire, un exercice de nage induit un métabolisme essentiellement glycolytique ; il privilégie l'utilisation du glucose comme source d'énergie dans les muscles squelettique (Karamouzis et al., 2002) notamment par la voie de la glycolyse anaérobie, ce qui a pour conséquence l'augmentation du taux de lactate sanguin.

Le métabolisme énergétique des patients (pour revue : Piquet, 2006) et des souris SLA (Dupuis et al., 2004) est fortement perturbé. Un hypermétabolisme lipidique a été constaté, notamment au niveau des muscles squelettiques des souris SLA (Dupuis et al., 2004 ; Fergani et al., 2007). La correction de la balance énergétique par une alimentation adaptée a des effets bénéfiques significatifs sur le développement de la SLA (Dupuis et al., 2004 ; Mattson et al., 2007). Nous avons donc émis l'hypothèse que les différentes adaptations métaboliques induites par les exercices de nage et de course pourraient expliquer, au moins en partie, les effets différents de ces deux exercices sur le développement de la SLA.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons défini, dans un premier temps, le statut métabolique de souris mâles SLA SOD1^{G93A high copy} et Contrôles sédentaires. Puis, nous avons évalué les adaptations métaboliques induites par des entraînements à la nage ou à la course, chez les souris SLA et Contrôles. Pour cela, nous avons mesuré pour ces différents groupes d'animaux, la masse corporelle et l'utilisation du glucose par des tests de tolérance au glucose, en phase asymptomatique avant le début de l'entraînement (P70) et au cours de la phase symptomatique précoce (P90) ou tardive (P115). Afin d'apprécier l'utilisation des lipides, l'état des réserves lipidiques a été évalué par la pesée du tissu adipeux blanc situé au niveau de l'épididyme, en phase symptomatique tardive à P115. Le foie, organe central de la gluconéogenèse et de la synthèse des lipoprotéines, a également été étudié à cet âge : le lobe majeur du foie a été pesé et d'éventuelles accumulations de lipides ont été recherchées.

2- Matériels et méthodes

2-1. Modèle murin et entraînements

La lignée B6SJL-Tg (SOD1^{G93A})1 GUR/J présentant environ 30 copies du transgène a été utilisée comme modèle SLA (souris SLA) ; cette lignée a été obtenue auprès des Laboratoires Jackson (Bar Harbor, ME, USA). La conservation de ce modèle résulte du croisement d'une souris mâle SLA et d'une souris femelle sauvage de fond génétique B6SJL (Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Après extraction d'ADN à partir des biopsies servant à l'identification des animaux, les souriceaux sont génotypés par PCR classique ciblant le transgène humain SOD1^{G93A}. Les souris mâles portant le transgène humain SOD1^{G93A} constituent la population de souris SLA et les souris mâles sauvages sont utilisées comme contrôles (Souris Contrôles). Les conditions d'élevage des souris sont en accord avec les directives du Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche, concernant l'utilisation et le stockage d'organismes génétiquement modifiés.

À partir de P70 jusqu'à P115, des groupes de souris SLA et Contrôles (n=16 par groupe) ont été entraînés à la nage - à un débit maximal de 5 l/min, ajusté à chaque animal - ou à la course - à la vitesse maximale de 13 m/min -, à raison de 30 minutes par jour et ce 5 jours par semaine, comme décrit précédemment (Deforges et al., 2009). Ces groupes de souris entraînées ont été comparés à des groupes de souris SLA et Contrôles sédentaires (n=16 par groupe).

2-2. Analyses métaboliques

Une analyse du métabolisme énergétique général a été réalisée sur les groupes de souris SLA et Contrôles, sédentaires et entraînées à la course ou à la nage.

La masse corporelle des animaux est mesurée à trois temps stratégiques au cours du développement de la SLA : en phase asymptomatique avant l'entraînement (P70), en phase symptomatique précoce (P90) et en phase symptomatique tardive (P115) lors du prélèvement des tissus.

2-2.1. Evaluation du métabolisme glucidique

L'utilisation du glucose a été évaluée par des tests de tolérance au glucose effectués à P70, P90 et P115. Une injection intra-péritonéale de glucose (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) à une dose de 2 g par kg de poids vif est pratiquée sur les différents groupes d'animaux à jeun depuis 4 h (n=8 par groupe). La glycémie est mesurée sur ces souris, à l'aide d'un glucomètre (Glucotrend®, Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne), avant (T0) puis toutes les 15 minutes après l'injection de glucose.

2-2.2. Evaluation du métabolisme lipidique

A P115, les animaux (n=8 par groupe) sont euthanasiés par surdosage d'hydrate de chlorale (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Le tissu adipeux blanc de l'épididyme (TA) et le lobe majeur du foie sont prélevés, pesés puis fixés une nuit à 4°C en paraformaldéhyde 4% (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Après fixation, les tissus sont conservés à 4°C en tampon phosphate.

Les TA et les foies des souris SLA et Contrôles sédentaires ou entraînées (n=3 par groupes) sont coupés en deux, déshydratés par bains successifs d'éthanol 70% - 90% - 100% et de butanol, puis inclus en paraffine. Des coupes transversales de 7 µm d'épaisseur de la région centrale sont réalisées au microtome (Stassnie, Paris, France). Ces coupes sont ensuite contrastées par une coloration histologique à l'hémalum et montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt (O'Klindler GmbH, Allemagne).

2-2.2.1. Analyse histologique du TA

Cette analyse histologique est réalisée suivant la méthode décrite par Holzemberger et ses collaborateurs (2001). Une observation histologique des coupes de TA colorées est effectuée au grossissement x200, au microscope Olympus BX51 équipé d'une caméra CCD Retiga 2000R (QImaging, Canada). La surface de section des adipocytes est mesurée à l'aide du logiciel Image J sur les clichés réalisés au microscope à l'aide du logiciel Image Pro-Plus v6.0 (MediaCybernetics Inc., Bethesda, MD, USA). La distribution de la surface de section des adipocytes est établie en catégories de 500 µm².

2-2.2.2. Analyse histologique du foie

L'accumulation de gouttelettes lipidiques (stéatose) est recherchée, lors d'une observation microscopique au grossissement x100, dans des coupes transversales de foie colorées. Seuls les foies des souris SLA et Contrôles sédentaires ont été analysés.

2-3. Analyses statistiques

Tous les résultats sont donnés sous la forme de moyenne et d'écart moyen. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Systat v8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La distribution des valeurs pour chaque groupe a été établie par un test de Kolmogorov-Smirnov. L'analyse de la variance a été réalisée sur l'ensemble des données, puis les groupes ont été comparés deux à deux par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

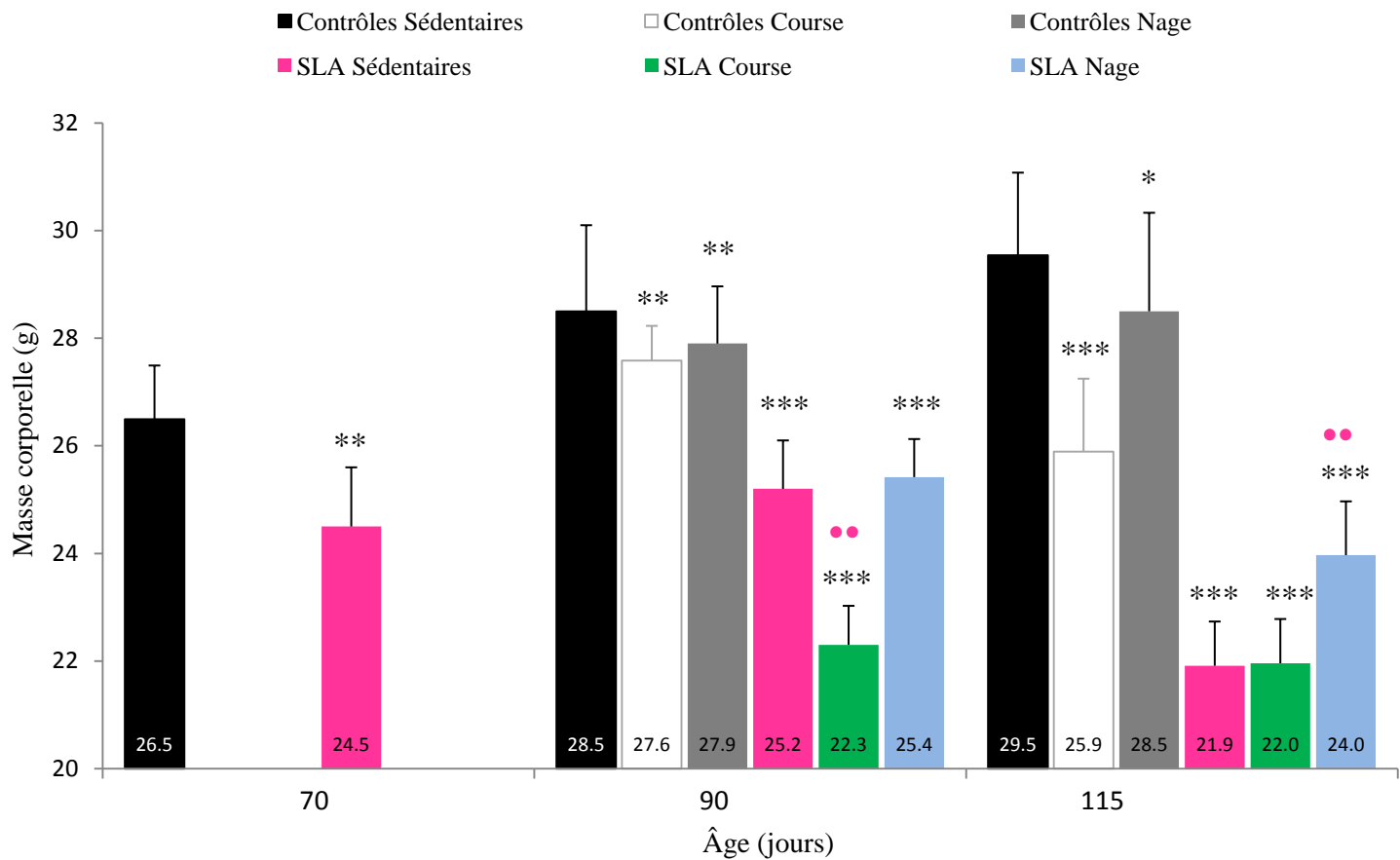


Figure 19 : Effet des entraînements sur la masse corporelle des souris SLA et Contrôles

Représentation graphique de la masse corporelle moyenne \pm écart moyen des souris SLA et Contrôles sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage (n=16 par groupe). La masse corporelle des souris a été mesurée au début de l'entraînement à P70, à P90 soit après 15 jours d'entraînement et à P115 soit après 30 jours d'entraînement. Les différences significatives sont indiquées par rapport au groupe de souris Contrôles sédentaires (*) et dans les groupes SLA par rapport aux souris SLA sédentaires (•) : * 0,05 \geq p > 0,01 ; ** 0,01 \geq p > 0,001 ; *** p \leq 0,001.

3- Résultats

3-1. Evolution de la masse corporelle

Entre P70 et P115, les souris Contrôles sédentaires présentent une augmentation constante de leur masse corporelle de 11,5% en moyenne. La masse corporelle des souris SLA sédentaires augmente significativement de 3% entre P70 et P90 ($p=0,001$), puis elle diminue de 13,1% avec le développement de la maladie entre P90 et P115 ($p<0,001$). Dès P70, les souris SLA sédentaires présentent une masse corporelle inférieure de 7,7% à celle des souris Contrôles sédentaires ($24,5\pm 1,1$ versus $26,5\pm 1,0$ g ; $p=0,007$) (Figure 19). Cette différence s'accroît lors de l'apparition des symptômes ; elle atteint 11,5% à P90 ($25,2\pm 0,9$ versus $28,5\pm 1,6$ g ; $p<0,001$) et 26% à P115, ($21,9\pm 0,8$ versus $29,5\pm 1,5$ g ; $p<0,001$).

A P90, après 15 jours d'exercice de course ou de nage, la masse corporelle des souris Contrôles entraînées diminue significativement par rapport aux souris Contrôles sédentaires (respectivement $27,6\pm 0,6$ et $27,9\pm 1,1$ versus $28,5\pm 1,6$ g ; $p=0,007$ et $p=0,008$) (Figure 19). A P115 soit après 33 jours d'entraînement, la course induit une diminution très significative de la masse corporelle des souris Contrôles par rapport aux souris sédentaires ($25,9\pm 1,4$ versus $29,5\pm 1,5$ g ; $p<0,001$), alors que la nage ne la réduit que légèrement ($28,5\pm 1,8$ g ; $p=0,049$).

Les exercices de course et de nage ont des effets contraires sur l'évolution de la masse corporelle des souris SLA entre P70 et P115 (Figure 19). A P90, après 15 jours d'exercice, la course induit une diminution de 12% de la masse corporelle des souris SLA ($22,3\pm 0,7$ versus $25,2\pm 0,9$ g pour les sédentaires ; $p=0,001$), alors que les souris SLA entraînées à la nage présentent une masse corporelle identique aux souris SLA sédentaires ($25,4\pm 0,7$; $p=0,902$). Mais à P115, les souris SLA entraînées à la course ont une masse corporelle identique aux sédentaires ($p=0,228$), alors que les souris SLA entraînées à la nage ont une masse corporelle supérieure ($24,1\pm 1,0$ versus $21,9\pm 0,8$ g pour les sédentaires ; $p=0,007$).

3-2. Analyse de l'utilisation du glucose

Afin d'évaluer l'importance du métabolisme glucidique dans les différents groupes de souris, nous avons mesuré l'utilisation du glucose comme source énergétique par des tests de

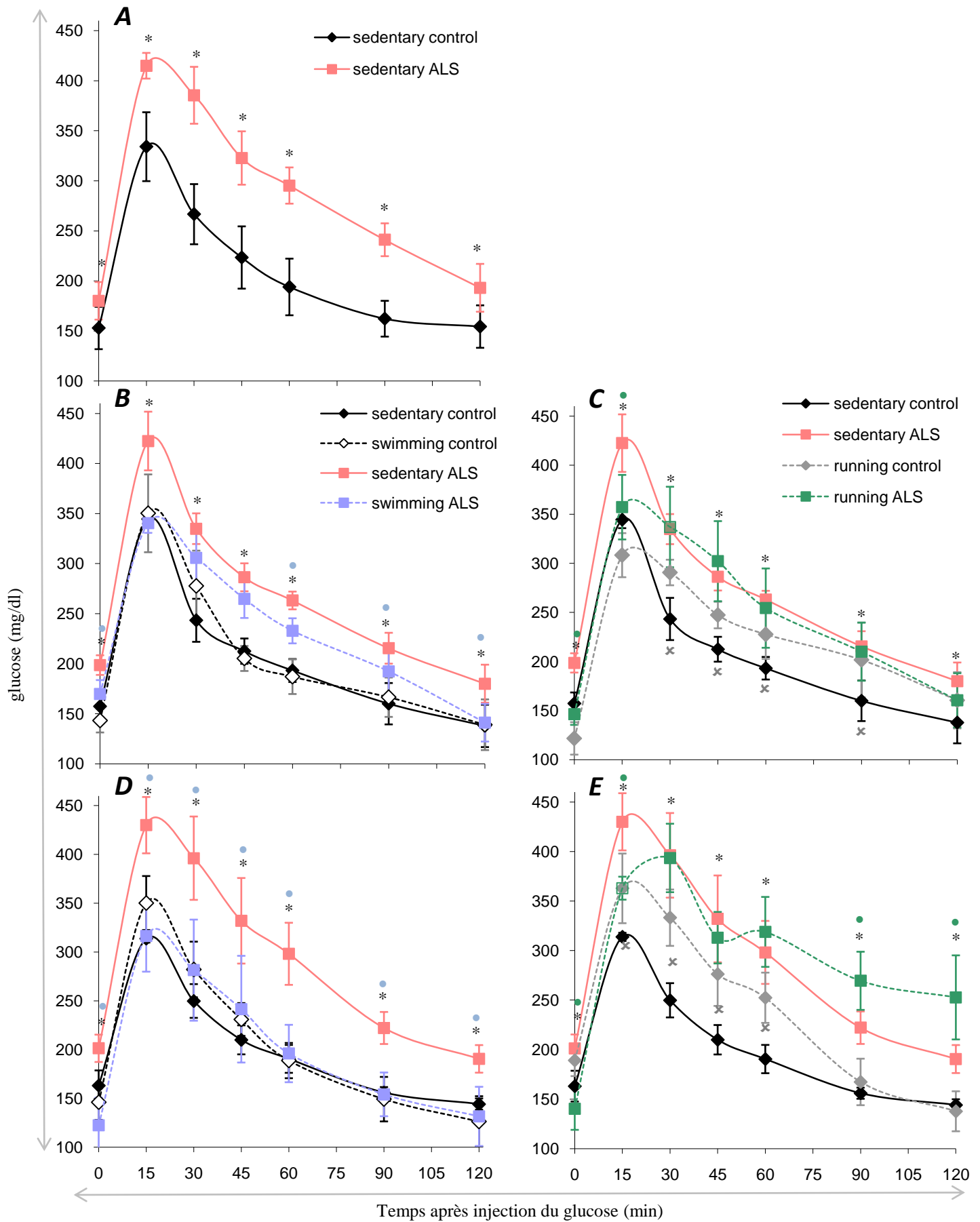


Figure 20 : Effet des entraînements sur l'utilisation du glucose par les souris SLA et Contrôles

Tests de tolérance au glucose au début de l'entraînement à P70 (A), à P90 (B,C) après 15 jours d'entraînement à la nage (B) ou à la course (C) et à P115 (D,E) après 30 jours d'entraînement à la nage (D) ou à la course (E) (n=8 par groupe). Les différences significatives sont indiquées par rapport aux souris Contrôles sédentaires (*), dans le groupe des souris Contrôles par rapport aux souris entraînées à la course (x) et dans le groupe SLA par rapport aux souris SLA entraînées à la nage (•) ou à la course (◦) : * 0,05 ≥ p > 0,01 ; ** 0,01 ≥ p > 0,001 ; *** p ≤ 0,001.

tolérance au glucose. Les résultats des tests réalisés sur les souris SLA sédentaires en phase pré-symptomatique et symptomatique précoce ou tardive sont similaires : ils révèlent une captation du glucose ralentie chez les souris SLA sédentaires par rapport aux souris Contrôles sédentaires (Figure 20). Quelque soit l'âge, la glycémie à jeun (T0) chez les souris SLA est supérieure à celui des souris Contrôles (P70 : 180 ± 19 versus 147 ± 18 dg/ml, $p=0,021$; P90 : 199 ± 10 versus 157 ± 16 dg/ml, $p=0,004$; P115 : 201 ± 14 versus 163 ± 16 dg/ml, $p=0,010$). De même après l'injection intra-péritonéale de glucose, les niveaux de glucose sanguin des souris SLA, bien qu'ils diminuent avec le temps, sont significativement plus élevés que ceux des Contrôles.

L'entraînement à la course retarde l'absorption du glucose par les souris Contrôles et SLA : les niveaux de glucose dans le sang sont augmentés par rapport aux sédentaires, lors des tests de tolérance au glucose dès 15 jours d'entraînement (P90) mais surtout après 33 jours (P115). Au contraire, l'entraînement à la nage augmente la captation du glucose chez les souris SLA dès P90 ; à P115, les niveaux de glucose dans le sang des souris SLA entraînées à la nage sont comparables à ceux des souris Contrôles sédentaires et entraînées à la nage (Figure 20).

3-3. Analyse des réserves lipidiques à P115

Afin d'évaluer l'importance du métabolisme lipidique dans les différents groupes de souris SLA et Contrôles sédentaires et entraînées à la nage ou la course, une analyse pondérale et histologique des réserves lipidiques accumulées au niveau de l'épididyme et du lobe majeur du foie ont été réalisées.

3-3.1. Analyse du tissu adipeux blanc de l'épididyme

La masse du TA de l'épididyme des souris SLA sédentaires est inférieure de 88% à celle des souris Contrôles sédentaires (30 ± 22 versus 264 ± 42 mg ; $p=0,007$) (Figure 21A) ; pour certaines souris SLA sédentaires, le TA est même inexistant. Cette perte de masse du TA est corrélée à une réduction de la surface de section des adipocytes qui le constituent (Figure 21C) ; les adipocytes apparaissent parfois vidés de leur contenu lipidique. Les proportions d'adipocytes de surface de section inférieure à $500 \mu\text{m}^2$ ou comprise entre 500 et $1000 \mu\text{m}^2$ sont significativement augmentées dans les TA des souris SLA sédentaires par rapport à celles des

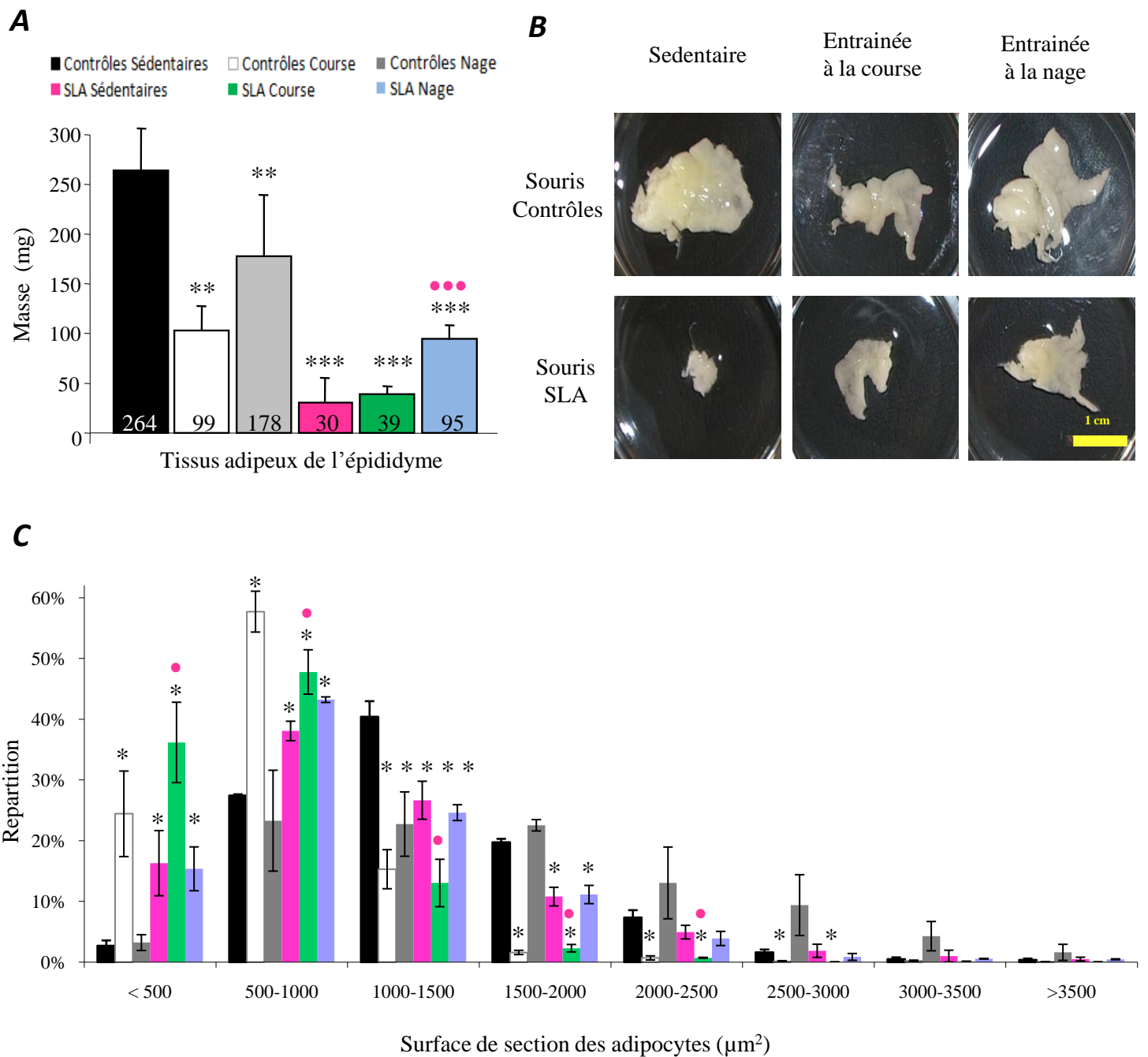


Figure 21 : Effet des entraînements sur les tissus adipeux au niveau de l'épididyme des souris SLA et Contrôles

(A) Représentation graphique de la masse moyenne \pm écart moyen ($n=8$ par groupes), à P115. (B) Photographies d'un tissu adipeux de l'épididyme droit, échelle 1 cm. (C) Distribution de la section des adipocytes par fractions de $500 \mu\text{m}^2$ ($n=3$). Les différences significatives sont indiquées par rapport aux souris Contrôles sédentaires (*) et dans les groupes SLA par rapport aux souris SLA sédentaires (●) : * $0,05 \geq p > 0,01$; ** $0,01 \geq p > 0,001$; *** $p \leq 0,001$.

souris Contrôles sédentaires ($p= 0,034$ et $0,032$), alors que les proportions d'adipocytes de surface de section comprises entre 1000 à $2500 \mu\text{m}^2$ sont significativement diminuées ($p= 0,034$).

Les entraînements à la course et à la nage agissent différemment sur les accumulations de lipides des souris. Ces effets sont similaires sur les souris Contrôles et les souris SLA.

Chez les souris Contrôles, les entraînements réduisent de façon significative l'accumulation de lipides au niveau de l'épididyme (99 ± 24 mg pour la course et 169 ± 63 mg pour la nage versus 264 ± 42 mg pour les sédentaires ; $p=0,002$ et $0,008$) (Figure 21A), mais la course induit une plus forte réduction que la nage (62% contre 33%) (Figure 21B). Les surfaces de sections des adipocytes du TA sont significativement diminuées chez les souris Contrôles entraînées à la course par rapport aux souris Contrôles sédentaires ou entraînées à la nage (Figure 21C).

Les souris SLA entraînées à la course présentent une réduction de l'accumulation de lipides au niveau de l'épididyme similaire aux souris SLA sédentaires (39 ± 10 versus 30 ± 22 mg $p=0,913$) (Figure 21A), mais les adipocytes qui le composent ont des aires de section significativement inférieures (Figure 21C). Au contraire, les souris SLA entraînées à la nage présentent trois fois plus de graisse au niveau de l'épididyme que les souris SLA sédentaires (95 ± 13 versus 30 ± 22 mg ; $p=0,001$) (Figure 21B), bien que la distribution des adipocytes en fonction de leur surface de section ne soit pas modifiée (Figure 21C).

3-3.2. Analyse du foie

Les souris SLA SOD1^{G93A high copy} sédentaires présentent une diminution de 32% de la masse du lobe majeur du foie par rapport aux souris Contrôles sédentaires (387 ± 86 versus 540 ± 51 mg ; $p=0,007$) (Figure 22A). Aucune stéatose n'a été observée dans le foie des souris SLA sédentaires (Figure 22B). Une réduction de la masse du foie du même ordre est constatée chez les souris SLA entraînées à la nage (423 ± 46 mg ; $p=0,004$) ou à la course (379 ± 15 mg ; $p=0,004$) par rapport aux souris Contrôles sédentaires.

Les souris Contrôles entraînées à la course présentent également une diminution significative de la masse du foie par rapport aux souris Contrôles sédentaires (465 ± 69 versus 540 ± 51 mg ; $p=0,031$), contrairement aux souris Contrôles entraînées à la nage (495 ± 46 mg ; $p=0,286$).

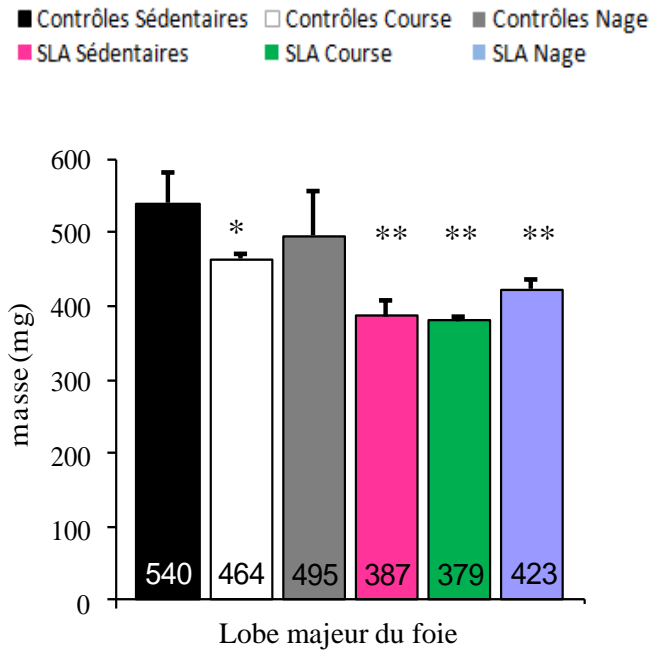
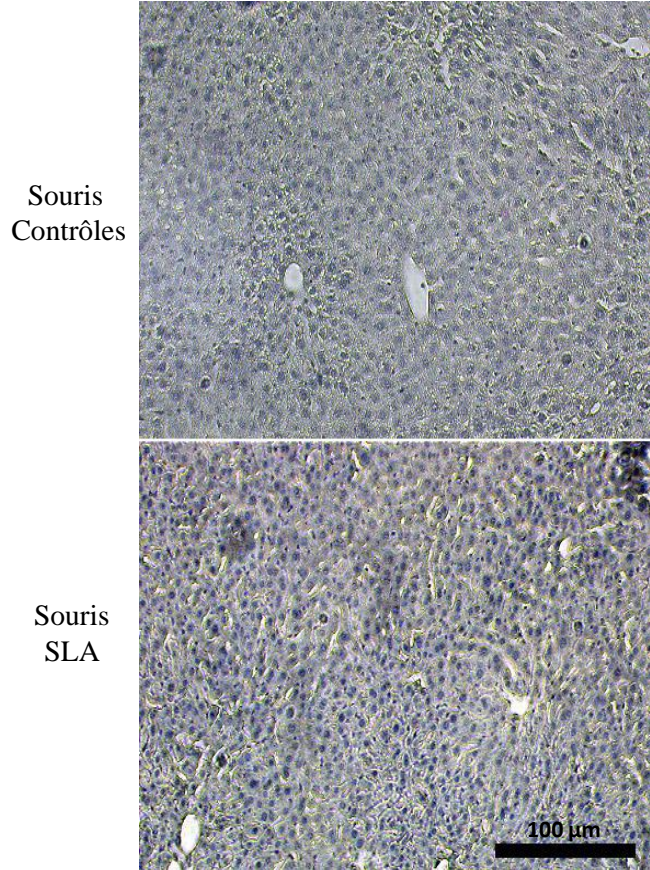
A**B**

Figure 22 : Effet des entraînements sur le foie des souris SLA et Contrôles

(A) Représentation graphique de la moyenne \pm écart moyen de la masse du lobe majeur du foie des souris SLA et Contrôles sédentaires, entraînées à la course ou à la nage (n=8 par groupes) mesurée après 33 jours d'entraînement à P115. Les différences significatives sont indiquées par rapport aux souris Contrôles sédentaires (*) et dans les groupes SLA par rapport aux souris SLA sédentaires (•) : * $0,05 \geq p > 0,01$; ** $0,01 \geq p > 0,001$. (B) Photographies de coupes de foie colorées à l'hémalum (x200), échelle 100 μ m.

4- Conclusions

Les souris SLA SOD1^{G93A high copy} sédentaires présentent un hypermétabolisme lipidique par rapport aux souris Contrôles sédentaires, comme précédemment décrit dans d'autres modèles de souris SLA (Dupuis et al., 2004). Chez les souris SLA SOD1^{G93A high copy} sédentaires en phase symptomatique tardive, l'utilisation accrue des lipides est marquée par une sévère diminution de la masse adipeuse au niveau de l'épididyme et une réduction de la surface de section des adipocytes qui le composent ; elles présentent également une diminution significative de la masse du foie sans stéatose. Cet hypermétabolisme lipidique est associé, à forte diminution de la captation et de l'utilisation du glucose sanguin, comme récemment décrit chez les patients SLA (Pradat et al., 2010). Cette diminution de l'utilisation du glucose chez les souris SLA sédentaires est observée dès la phase asymptomatique à P70 et n'évolue pas avec l'apparition des symptômes. Elle reste constante jusqu'à un stade avancée de la SLA.

Nos protocoles d'exercice de nage et de course induisent des adaptations métaboliques différentes chez les souris entraînées. Ces adaptations sont similaires chez les souris Contrôles et SLA ; elles suivent celles décrites chez l'homme pour ces intensités (Cheng et al., 2003) et ces types d'exercice (Karamouzis et al., 2002 ; Narkar et al., 2008). En effet, l'entraînement à la course favorise l'utilisation des lipides comme source d'énergie chez les souris Contrôles, comme le montre la diminution significative de la masse adipeuse au niveau de l'épididyme par rapport aux souris Contrôles sédentaires. Les adipocytes qui la composent sont vidés de leur contenu lipidique, comme le suggère la distribution de leur surface de section. Cette utilisation privilégiée des lipides est corrélée à une diminution de l'utilisation du glucose, qui s'affirme au cours de l'entraînement ; la diminution de l'utilisation du glucose est plus significative à P115 qu'à P90. Chez les souris SLA entraînées à la course, en raison de l'hypermétabolisme lipidique induit par la SLA, l'induction du métabolisme lipidique par la course est surtout visible sur l'utilisation du glucose, notamment à P115. Au contraire, l'entraînement à la nage favorise l'utilisation du glucose comme source d'énergie chez la souris. Cette adaptation énergétique est beaucoup plus marquée chez les souris SLA. A 115 jours, les réserves lipidiques des souris SLA entraînées à la nage sont préservées au niveau de l'épididyme et les niveaux de glucose sanguins sont identiques à ceux des souris Contrôles sédentaires, lors des tests de tolérance au glucose.

Ces résultats suggèrent donc que les effets bénéfiques que nous avons obtenu avec l'entraînement à la nage sur le développement de la SLA dans le modèle souris SOD1^{G93A high copy} sont corrélés à l'induction d'un métabolisme énergétique préférentiellement glycolytique, comme le montre l'augmentation de l'utilisation du glucose et la préservation des réserves lipidiques. De manière importante, nos résultats suggèrent également qu'un entraînement à la course pourrait être néfaste dans la SLA, car il aggraverait le déficit énergétique.

DISCUSSION

1- Les effets bénéfiques de l'exercice physique dans un modèle murin de SLA

Nos résultats montrent que l'exercice physique quotidien peut être bénéfique dans un modèle souris de SLA. Contrairement à un protocole de course sur tapis roulant motorisé, un protocole de nage en piscine à courant permet de ralentir le développement de la SLA. En effet, les souris SLA entraînées à la nage présentent un retard de l'apparition des symptômes et un allongement de 20% de leur durée de vie tout en conservant leurs capacités motrices, soit une augmentation de la survie de 26 jours en moyenne par rapport aux souris SLA sédentaires. L'ampleur de ce bénéfice est l'une des plus élevées parmi ceux induits par les stratégies thérapeutiques testées chez les souris SLA, dont l'augmentation de la survie constatée est en moyenne de 10 jours et l'effet sur l'apparition des symptômes souvent nul malgré le début du traitement en phase asymptomatique (pour revue : Turner et Talbot, 2008).

De plus, la nage, contrairement à la course, présente un effet neuroprotecteur. A P115, seulement 28% des motoneurons ont disparu au cours de la phase symptomatique dans la moelle épinière lombaire des souris SLA entraînées à la nage, contre 50% environ chez les souris SLA sédentaires ou entraînées à la course. La nage induit également, contrairement à la course, la protection des populations non-neuronales dans la moelle épinière lombaire (astrocytes, oligodendrocytes et progéniteurs neuraux) . Enfin, la nage limite de façon plus efficace que la course les modifications phénotypiques mises en évidence dans les muscles squelettiques des souris SLA sédentaires ; elle permet de maintenir le phénotype du *Soleus*, du *Plantaris* et du *Tibialis*.

Ces résultats ne confortent pas l'hypothèse selon laquelle un exercice physique doit être pratiqué à intensité modérée pour être bénéfique aux souris SLA (Mahoney et al., 2004). En effet, le protocole de nage que nous utilisons est un exercice de forte intensité, comme en témoigne l'importance de la fréquence et de l'amplitude des mouvements requis pour son exécution. Les résultats que nous avons obtenus avec le protocole de course d'intensité modérée, de par la faible fréquence et amplitude des mouvements qu'il nécessite, sont en accord avec les précédentes études qui ne montraient pas (Veldink et al., 2003) ou peu (Kirkinezos et al., 2003) d'effet sur la durée de vie des souris SLA. Il apparaît que l'effet de l'exercice physique sur les souris SLA dépend plutôt du type d'exercice pratiqué, comme le suggéraient McCrate et Kaspar (2008).

Sur la base de nos résultats, deux hypothèses non mutuellement exclusives pourraient expliquer les bénéfices du protocole de nage sur les souris SLA : (1) l'adaptation intrinsèque des motoneurones FF activés de manière privilégiée par la nage les protégerait ainsi que leur environnement cellulaire et (2) l'adaptation intrinsèque des fibres musculaires rapides sollicitées par la nage contrerait les modifications métaboliques induites par la SLA et renforcerait les JNM, protégeant ainsi les motoneurones FF.

Dans nos conditions expérimentales, les exercices de nage et de course recrutent des unités motrices distinctes. L'entraînement à la nage recrute préférentiellement les unités motrices FF : il active les motoneurones de large surface de soma – supérieure à $600\mu\text{m}^2$ – et sollicite les fibres musculaires les plus rapides, au métabolisme énergétique principalement glycolytique. A l'inverse, l'entraînement à la course recrute préférentiellement les unités motrices lentes : il active les motoneurones de surface de soma réduite – inférieure à $300\mu\text{m}^2$ – et induit des transitions de fibres musculaires rapides vers lentes, associées à un métabolisme principalement aérobie oxydatif. Les bénéfices du protocole de nage pour les souris SLA en comparaison au protocole de course de référence serait liés au type d'unités motrices spécifiquement activées par cet exercice.

En activant préférentiellement les motoneurones FF sensibles à la SLA (Saxena et al. 2009), l'entraînement à la nage déclencherait des mécanismes neuroprotecteurs en modulant leur transcriptome largement modifié par la SLA (Kirby et al., 2005 ; Ferraiuolo et al., 2007). La modulation des propriétés intrinsèques des motoneurones de large surface activés pourrait agir également sur les populations non-neuronales environnantes et ainsi rompre le « cercle vicieux » qui conduit à la mort sélective des motoneurones dans la SLA. Elle permettrait également de conserver le phénotype musculaire et réduirait l'invalidité motrice. Ainsi, l'analyse des modifications transcriptionnelles des motoneurones activés par l'exercice physique, constituerait une étape dans la découverte de voies moléculaires susceptibles de prévenir la mort des motoneurones dans la SLA.

D'autre part, la SLA est associée chez les patients à une augmentation du métabolisme basal corrélée à une diminution de la masse adipeuse (Kasarskis et al., 1996 ; Desport et al., 2001) et à une diminution de l'utilisation du glucose (Pradat et al., 2010). Ce déficit énergétique est un déterminant important de la pathogénèse SLA, car l'état nutritionnel est un facteur pronostique de survie (Vaisman et al., 2009) ; il peut être corrigé par un régime alimentaire adapté (pour revue : Mattson et al., 2007). Un régime enrichi en lipides ou en sucres augmente la durée de vie des souris SLA, limite la dénervation des JNM et induit une neuroprotection (Dupuis et al., 2004).

Dans nos conditions expérimentales, les exercices de nage et de course influencent différemment le métabolisme énergétique des souris sauvages et SLA. La nage privilégie l'utilisation du glucose par la voie de la glycolyse anaérobie comme source d'énergie, alors que la course privilégie la voie métabolique aérobie et notamment l'oxydation des lipides comme source d'énergie. Ainsi, le métabolisme énergétique glycolytique préférentiel développé au cours de l'entraînement à la nage améliore le statut métabolique des souris SLA. Ceci pourrait expliquer les effets bénéfiques de la nage sur le développement de la SLA et la neuroprotection constatée dans la moelle épinière.

Lors d'un exercice physique, le métabolisme énergétique est influencé par le métabolisme musculaire (pour revue : Inserm, 2008). L'effet de la nage dépendrait donc de l'action directe de cet exercice sur les propriétés intrinsèques des fibres musculaires rapides IIB/IIx sollicitées.

2- Modifications potentielles des propriétés intrinsèques des motoneurones sélectivement activés par la nage

Au cours de la phase symptomatique relativement avancée, la comparaison des populations motoneurales chez les souris SLA entraînées et sédentaires a montré des différences notables dans le potentiel neuroprotecteur de chaque exercice. Une perte comparable de motoneurones a été enregistrée dans les cornes ventrales de la moelle épinière lombaire des souris SLA sédentaires et entraînées à la course, à 115 jours. Dans ces souris, on ne dénombre plus que respectivement 51% et 55% des motoneurones en moyenne par rapport aux souris Contrôles. Au contraire, 72% de la population motoneuronale est encore présente au même âge, chez les souris SLA entraînées à la nage. Comme attendu, les motoneurones spinaux de surface de soma supérieure à 500 μm^2 ont disparu sélectivement chez les souris SLA sédentaires et entraînées à la course. L'entraînement à la nage protège les motoneurones spinaux de surface de soma moyenne, comprise entre 500 et 700 μm^2 .

Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent fortement que les motoneurones activés par l'exercice sont sélectivement protégés. Les motoneurones activés deviendraient donc résistants aux mécanismes de mort cellulaire induite par la SLA, contrairement aux motoneurones non-activés. En conséquence, en activant spécifiquement les motoneurones de larges surfaces

sensibles à la SLA (Saxena et al., 2009), la nage induit une neuroprotection, contrairement à la course qui active préférentiellement les motoneurones de surface de soma réduite – inférieure à 600 μm^2 – et résistants à la SLA (Saxena et al., 2009).

2-1. Modulation des propriétés électro-physiologiques

L'activation électrique répétée d'un même réseau neuronal induirait des modifications intrinsèques du transcriptome des motoneurones activés, notamment sous l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} via les récepteurs au glutamate (Turrigiano et al. 1994). L'activité neuromusculaire peut influencer les propriétés biophysiques des motoneurones, en modifiant le taux d'expression des canaux ioniques membranaires qui contrôlent ces propriétés (Beaumont et Gardiner, 2002).

L'étude des caractéristiques fonctionnelles des motoneurones chez le rat montre que seule la sous-population de motoneurones de faible surface spécifiquement activés par un entraînement à la course présente une adaptation des propriétés électro-physiologiques (Beaumont et Gardiner, 2002). Ces données sont en accord avec l'hypothèse d'une adaptation intrinsèque des motoneurones activés par un exercice donné.

Ainsi, l'activation répétée des motoneurones au cours d'un exercice physique modifierait spécifiquement leurs propriétés électro-physiologiques. Le polymorphisme des récepteurs NMDA, aussi bien au niveau des sous-unités NR1 que NR2, est un des événements moléculaires susceptibles d'être impliqués dans ces adaptations.

En effet, l'épissage alternatif de NR1 réglerait le nombre de récepteurs NMDA à la membrane, ainsi que leur fonction dans la réponse locale ou à long terme (Bradley et al., 2006). L'épissage de l'exon 21 conditionne l'absence du domaine C-terminal C1, impliqué dans la régulation de l'expression des gènes modulés directement par l'activation des récepteurs NMDA. En absence de C1, les récepteurs NMDA restent activables et la réponse moléculaire induite est uniquement dépendante de l'entrée du Ca^{2+} dans le cytoplasme. *In vitro*, une augmentation de l'épissage alternatif de l'exon 21 de la sous-unité NR1 a été mise en évidence, sans modulation des niveaux d'expression des sous-unités NR1 et NR2, dans les motoneurones corticaux qui survivent en culture à une forte concentration de K^+ (qui mime l'activité physique *in vitro*) (Jaekel et al., 2006). Cette modification intrinsèque des motoneurones activés participerait à leur neuroprotection contre l'excitotoxicité glutamatergique (Jaekel et al., 2006). *In vivo*, un

entraînement à la course induit une augmentation des transcrits codant pour plusieurs canaux K^+ et Ca^{2+} dépendants du voltage ainsi que des changements qualitatifs dans les récepteurs NMDA, notamment une augmentation de l'épissage alternatif de l'exon 21 de la sous-unité NR1 dans les motoneurones spinaux de souris adultes (Ferraiuolo et al., 2009).

D'autre part, l'expression différentielle de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA définirait la vulnérabilité ou la résistance des motoneurones à la SLA (Fuller et al., 2006) ; les populations neuronales sensibles exprimeraient la sous-unité NR2B. Au laboratoire, nous avons montré dans un modèle souris SMA, qu'un exercice de course en roue modifie le polymorphisme des récepteurs NMDA *in vivo*, notamment le type de sous-unité NR2 qui les compose (Biondi et al. 2008). Dans les motoneurones de souriceaux SMA entraînés, la transcription de la sous-unité NR2A est augmentée à P12. Dans ce contexte pathologique, les adaptations intrinsèques des motoneurones activés par l'exercice contribuent également à la plasticité neuromusculaire ; elles augmentent notamment la maturation des JNM (Biondi et al. 2008).

Les modifications du polymorphisme des récepteurs NMDA dans les populations motoneuronales sensibles à la SLA et spécifiquement activées par la nage permettraient de les protéger contre l'excitotoxicité glutamatergique, expliquant ainsi en partie la neuroprotection que nous avons pu constater. Ces modifications induites par la course dans les motoneurones de surface réduite n'auraient pas d'effet neuroprotecteur visible, ces motoneurones étant déjà résistants à la SLA.

2-2. Renforcement de la JNM

Chez les souris SLA, la disparition des somas des motoneurones dans la moelle épinière est constatée vers l'âge de 100 jours et reste constante jusqu'à la mort de l'animal (Fischer et al., 2004). Pourtant, seulement 10% du transport axonal persiste (Parkhouse et al., 2008) et les évènements de « sprouting » sont diminués (Gould et al., 2006).

Comme nous avons pu le mettre en évidence au laboratoire dans le modèle SMA (Biondi et al., 2008), les modulations transcriptionnelles des motoneurones activés par l'exercice pourraient favoriser la plasticité neuronale et la fonction synaptique. Elles pourraient renforcer l'innervation des JNM afin de contrer les phénomènes de dénervation induits par la SLA, assurer un retour à la normale de leur transport axonal et faciliter les évènements de « sprouting », afin de

permettre la ré-innervation des fibres musculaires initialement associées à un motoneurone FF dégénéré.

La protection par la nage des motoneurons de surface de soma moyenne - composants des unités motrices rapides - pourrait expliquer la réduction de l'invalidité motrice et la préservation de l'intégrité des muscles que nous avons observées chez les souris SLA entraînées à la nage. En effet, l'apparition localisée de fibres I et l'augmentation de la proportion des fibres lentes Iia dans les muscles rapides des souris SLA sédentaires, comme chez les souris SLA entraînées à la course, suggèrent des ré-innervations des fibres musculaires par des motoneurons S et FR résistants à la SLA, comme l'ont démontré auparavant Fischer et al. (2004) et Hegedus et al. (2008). A l'inverse, la protection des muscles rapides des souris SLA entraînées à la nage contre l'aplasie et les transitions de fibres mises en évidence chez les souris SLA sédentaires suggèrent fortement une ré-innervation des fibres dénervées, car 28% des motoneurons spinaux ont disparu. Ces ré-innervations proviendraient de motoneurons FF sensibles à la SLA devenus résistants par leur activation à la nage et qui auraient initié des processus de « sprouting ».

2-3. Diminution des mécanismes d'apoptose

Comme le suggèrent nos résultats, les modifications intrinsèques des motoneurons sensibles à la SLA activés sélectivement par la nage pourraient les protéger efficacement contre l'apoptose induite par les multiples mécanismes pathologiques mis en évidence dans la SLA. Nous avons montré que l'activation de la caspase-3 diminue dans les colonnes motrices des souris SLA entraînées à la nage par rapport aux souris SLA sédentaires. De plus, il a été montré que l'exercice physique augmenterait la résistance à l'apoptose des motoneurons des souris SLA ; les niveaux de protéines Bcl-2 ou Bcl-xl sont augmentés (Kaspar et al., 2005). La question reste à savoir si ces effets sont spécifiques des motoneurons activés. Dans cette hypothèse, on peut envisager que la modulation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-xl diminuées dans la SLA (Gould et al., 2006) et des protéines pro-apoptotiques Bad ou Bax surexprimées dans la SLA (Mu et al., 1996), spécifiquement dans les motoneurons activés par la nage, pourraient limiter l'apoptose dans ces motoneurons. Ils pourraient ainsi mieux résister aux mécanismes physiopathologiques de la SLA.

Dans ce contexte, le gène codant ATF-3 (activating transcription factor 3) pourrait être un gène candidat de l'adaptation du transcriptome des motoneurones activés par la nage. L'apparition des symptômes est corrélée à l'expression d'ATF3 dans les motoneurones des souris SLA SOD1^{G93A} (Vlug et al., 2004), SOD1^{G85R} (Lobsiger et al., 2007) et SOD1^{G37R} (Lobsiger et al., 2007), via l'activation accrue des voies de signalisation JNK et p38. ATF3 est normalement produit en réponse à des signaux de stress cellulaires de natures diverses ; il contribue à l'apoptose induite par la privation de K⁺ dans les neurones du granule cérébelleux (Mei et al., 2008) et par le stress oxydant en réprimant le facteur nucléaire Nrf2 (Brown et al., 2008) qui contrôle l'induction d'un vaste réseau de réponse au stress cellulaire lorsqu'il est complexé aux séquences ARE situées dans la région promotrice de gènes cibles. Dans les motoneurones des souris SLA, une diminution de la transcription des gènes ARE a été constatée (Perrin et al., 2006) en réponse à la diminution de l'expression du Nrf2 (Pehar et al., 2007). L'expression d'ATF3 précède l'apparition des marqueurs de l'apoptose ; elle constitue un marqueur de sensibilité des motoneurones à la SLA (Vlug et al., 2004). La neuroprotection des motoneurones spinaux chez les souris SLA entraînées à la nage nous laisse supposer une modulation négative de l'expression d'ATF3 dans les motoneurones activés, et donc une diminution de l'activation des voies de signalisation JNK et p38. En conséquence, la transcription des gènes ARE dans les motoneurones activés par la nage serait ainsi augmentée, ce qui leur conférerait une meilleure résistance au stress oxydant induit par la SOD1 mutée.

Cependant, comme précédemment décrit par plusieurs groupes (Gould et al., 2006 ; Rouaux et al., 2007 ; Dewil et al., 2007), le maintien des corps cellulaires des motoneurones ne suffit pas à expliquer l'allongement aussi remarquable de la durée de vie des souris SLA obtenu par l'entraînement à la nage. L'expression de la protéine SOD1 mutée restreinte aux motoneurones n'est pas suffisante pour induire la symptomatologie de la SLA (Lino et al., 2002) ; la coopération néfaste des cellules non-neuronales de leur environnement dans la moelle épinière est nécessaire (Clément et al., 2003). L'effet de l'entraînement à la nage sur les populations cellulaires non-neuronales impliquées dans la pathologie pourrait donc expliquer les bénéfices spécifiquement induits par ce type d'exercice pour les souris SLA.

Ainsi, la modulation de l'expression des récepteurs de surface et de la sécrétion de facteurs toxiques dans les motoneurones activés, comme par exemple la répression de l'expression anormale des récepteurs p75^{NTR} impliqués dans la toxicité du NGF produit par les astrocytes (Seeburger et al., 2003 ; Pehar et al., 2004) ou de celle de Fas et de FasL impliqués dans la boucle d'amplification du NO• produit par les cellules microgliales (Raoul et al., 2006),

pourraient moduler les communications toxiques entre les motoneurones et les cellules non-neuronales. Les modifications intrinsèques induites dans les motoneurones activés par l'exercice permettraient de rétablir des communications cellulaires nécessaires aux motoneurones.

2-4. Protection de l'environnement cellulaire par la modulation des communications cellulaires

Dans la moelle épinière lombaire, nous avons analysé les populations cellulaires non-neuronales, partenaires des motoneurones. Nous nous sommes intéressés aux oligodendrocytes sans qui la transmission de l'influx nerveux ne peut avoir lieu et aux astrocytes qui jouent un rôle central dans le métabolisme et l'excitation des motoneurones. Enfin, nous avons étudié les progéniteurs neuraux (NPCs) qui présentent la particularité de se différencier en neurones ou en oligoblastes qui donneront ensuite des oligodendrocytes ou des astrocytes.

Nos résultats montrent, pour la première fois, l'impact de l'exercice physique sur la distribution des cellules non-neuronales dans la moelle épinière lombaire des souris SLA. L'efficacité de l'exercice physique sur la protection de ces populations contre les modifications induites par la SLA semble également dépendre du type d'exercice réalisé, car seul l'entraînement à la nage a un effet bénéfique sur l'ensemble des populations étudiées. Nos données indiquent une relation forte entre le taux de neuroprotection et la préservation des cellules non-neuronales chez les souris SLA. Ces résultats sont importants si on considère toutes les études de la pathogénèse SLA qui démontrent largement le rôle des cellules non-neuronales dans l'induction de la mort des motoneurones (pour revue : Pettmann et al., 2006).

2-4.1. Préservation des oligodendrocytes

Nous avons observé que seul l'entraînement à la nage maintient la population des oligodendrocytes, qui diminue de 30% dans la moelle épinière des souris SLA sédentaires et entraînées à la course par rapport aux souris Contrôles.

Chez les souris SLA, la disparition des oligodendrocytes observée dans la moelle épinière résulterait du stress du RE par l'action de la SOD1 mutée (Ito et al., 2009). Cependant, la disparition des oligodendrocytes pourrait également être une conséquence physiologique de la

disparition massive des motoneurones. La protection des oligodendrocytes semble liée à la neuroprotection induite par l'entraînement à la nage chez les souris SLA, car la course qui n'induit pas de neuroprotection n'a pas d'effet sur cette population cellulaire.

Plusieurs protéines membranaires des oligodendrocytes interviennent dans le contrôle de l'activité neuronale et sont nécessaires à la survie des neurones (Neusch et al., 2007). Leur disparition dans la SLA pourrait donc contribuer à la mort des motoneurones, bien que le rôle des cellules myélinisantes dans les processus de dégénérescence des motoneurones et des axones dans la SLA reste à préciser. La préservation des oligodendrocytes dans la moelle épinière pourrait donc participer activement à la neuroprotection.

2-4.2. Protection contre l'astrogliose réactionnelle

Dans nos conditions expérimentales, l'entraînement à la nage protège les astrocytes des modifications qu'ils subissent dans la SLA. Il limite à la fois leur activation et leur prolifération constatée chez les souris SLA sédentaires. L'entraînement à la course n'a pas d'effet bénéfique sur cette population cellulaire.

Cet effet de l'entraînement à la nage est particulièrement intéressant, car l'activation des astrocytes jouent un rôle primordial dans la progression de la maladie (Yamanaka et al. 2008 ; Staats et Van den Bosch, 2009). L'activation des astrocytes est corrélée à l'apparition des symptômes chez les souris SLA. Elle est liée à la sur-activation de la voie de signalisation ERK (Chung et al., 2005), qui participe probablement à la forte modification de l'expression de leur génome (Vargas et al., 2008) et notamment à la modulation de leur profil sécrétoire (Ekestern et al., 2004 ; Brockington et al., 2006 ; Nagai et al., 2007). Dans la SLA, ce changement d'état est directement associé à la perte des fonctions vitales des astrocytes pour les motoneurones et au déclenchement de l'excitotoxicité glutamatergique (Trotti et al., 1999 ; Rao et al., 2003). Ainsi, l'entraînement à la nage en diminuant l'astrogliose réactionnelle chez les souris SLA nous laisse supposer une préservation du rôle fonctionnel et structural des astrocytes. Cette action de la nage sur les astrocytes pourrait participer, au moins en partie, à l'effet neuroprotecteur de cet exercice.

En effet, les astrocytes non-activés chez les souris SLA entraînées à la nage pourraient conserver leur rôle de support trophique aux motoneurones. Ils participeraient alors à la neuroprotection constatée dans la moelle épinière, en limitant leur sécrétion en facteurs neurotoxiques tels le NGF (Anand et al., 1995) et en conservant des niveaux suffisants de

sécrétion en facteurs neuroprotecteurs. Par exemple, l'exercice physique augmente la sécrétion des astrocytes en facteurs neurotrophiques agissant sur la résistance au stress cellulaire tels le CTNF et le BDNF (Siamilis et al., 2009) et en méthallothionéines (Hashimoto et al., 2009), dont les niveaux sont diminués dans la moelle épinière des patients SLA (Ekestern et al., 2004 ; Hozumi et al., 2008). La protection des astrocytes par l'entraînement à la nage pourrait ainsi favoriser leur sécrétion de ces molécules, ce qui permettrait de réduire le stress oxydant subit par les motoneurones.

D'autre part, suite à un exercice physique, la transcription du VEGF est augmentée dans les astrocytes (Tang et al., 2010). Il a été montré que la diminution de la sécrétion en VEGF par les astrocytes activés influence la composition des récepteurs AMPA des motoneurones, qui est directement impliquée dans le phénomène d'excitotoxicité glutamatergique (Van Den Bosch et al. 2004 ; Bogaert et al., 2009). L'augmentation de la sécrétion en VEGF par les astrocytes induit une réduction de l'astrogliose réactionnelle et une augmentation de la durée de vie des souris SLA (Barbeito et al., 2010). On peut donc supposer que l'entraînement à la nage augmenterait la production astrocytaire en VEGF, ce qui les protégerait de la réactivation et limiterait la sensibilité des motoneurones à l'excitotoxicité glutamatergique. On peut également supposer que les astrocytes à l'état non-activé pourraient conserver des niveaux de captation du glutamate proche de la normale, ce qui permettrait de lever l'inhibition de la voie de signalisation neuroprotectrice de l'IGF-1 dans les motoneurones (Garcia-Galloway et al., 2003).

Enfin, chez les patients SLA, les astrocytes activés présentent une diminution de l'expression des transporteurs au lactate (Magistretti, communication 2009). En limitant la réactivation astrocytaire, l'entraînement à la nage permettrait aux astrocytes de conserver leur fonction dans le couplage neuro-métabolique et de délivrer le lactate nécessaire au fonctionnement des motoneurones. L'activation des astrocytes participant également à la désorganisation de la BHE chez les souris SLA (Garbuzova-Davis et al., 2007), la protection des astrocytes pourrait donc contribuer à la conservation d'une BHE fonctionnelle chez les souris SLA entraînées à la nage. Les facteurs de croissance nécessaires à la survie des motoneurones seraient alors disponibles en quantité suffisante dans la moelle épinière, notamment l'IGF-1 circulant dont la disponibilité dans le SNC est conditionnée par son passage à travers la BHE (pour revue : Carro et Torres-Aleman, 2006).

2-4.3. Réduction de l'accumulation des progéniteurs neuraux

Les deux exercices physiques que nous avons étudiés limitent considérablement le nombre de NPCs apparus dans la moelle épinière des souris SLA sédentaires à P115. Mais l'entraînement à la nage est plus efficace que l'entraînement à la course : la nage diminue le nombre de NPCs de 60% par rapport aux souris SLA sédentaires, contre 40% pour la course.

Les NPCs présentent la particularité de pouvoir se différencier en oligodendrocytes, en astrocytes ou en neurones sous le jeu de facteurs de différenciation spécifiques (Hsieh et Gage, 2004). Bien que le devenir de ces NPCs n'a pas pu être précisé chez les souris SLA (Chi et al., 2006 et 2007 ; Juan et al., 2007), la prolifération des NPCs dans la moelle épinière des souris SLA pourrait être une réponse cellulaire physiologique normale. Elle pourrait être la conséquence de la prolifération des astrocytes ou de la perte massive des motoneurones dans le but de les remplacer. En effet, nous avons constaté que la localisation des NPCs était restreinte aux colonnes motrices dans la moelle épinière des souris SLA sédentaires ou entraînées.

Cependant, le fait que les deux exercices aient le même impact sur le nombre de NPCs suggère un mécanisme commun, probablement associé à l'émission d'un facteur diffusible. Les NPCs se différencient en neurones sous l'effet du GDNF produit notamment par les astrocytes ; ces nouveaux neurones générés ont la capacité de remplacer fonctionnellement les neurones dégénérés (Hsieh et Gage, 2004). On peut émettre l'hypothèse suivante : l'entraînement à la nage induirait, plus efficacement que l'entraînement à la course, la différenciation des NPCs en motoneurones, sous l'effet du GDNF produit par les astrocytes à l'état non-activé ; les motoneurones ainsi produits remplaceraient ceux dégénérés. La diminution des NPCs serait alors proportionnelle au nombre de cellules nouvellement différenciées. Malheureusement, nos essais de lignage des NPCs lors de l'entraînement à la nage, par des analyses de co-immunomarquage de chaque type cellulaire issu des NPCs et du Bromo-désoxyUridine (*BrdU*, un marqueur de l'ADN des cellules néo-synthétisées), sont restés infructueux (résultats non-présentés).

Par ailleurs, il a été décrit récemment que l'activation de Fas dans les NPCs induit de façon surprenante leur survie (Knight et al., 2010). La diminution de l'expression de FasL par les motoneurones activés par l'exercice pourrait limiter la survie des NPCs, expliquant ainsi la diminution de leur nombre que nous avons constatée dans les cornes ventrales de la moelle épinière des souris SLA entraînées à la nage à P115.

De manière générale, le maintien de la santé et des fonctions du SNC par l'exercice physique semble dépendre de la plasticité et de la survie cellulaire, mais les mécanismes qui sous-tendent ces effets demeurent inconnus. Pris dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que l'entraînement à la nage permettrait de maintenir l'intégrité fonctionnelle de l'ensemble des populations cellulaires de la moelle épinière.

3- Rôle du muscle dans les mécanismes potentiellement neuroprotecteurs induits par la nage

Une propriété importante des muscles squelettiques est leur grand potentiel d'adaptation, en réponse à une modification de la charge de travail. L'exercice physique est connu pour modifier les propriétés intrinsèques de l'ensemble des unités motrices sollicitées, que ce soit celles des motoneurones comme celles des fibres musculaires (pour revue : Bray, 2000). Il a été récemment proposé, d'après le décours de la pathogénèse SLA, que les dysfonctionnements dans les fibres musculaires seraient l'élément initiateur de la dénervation des JNM et de la dégénérescence rétrograde des motoneurones (Fischer et al., 2004). Au vu des mécanismes pathologiques de la SLA, il apparaît que la conservation des unités motrices rapides fonctionnelles nécessite la modulation de l'expression du génome des motoneurones mais également de celui des fibres musculaires.

Les effets différents obtenus sur les souris SLA par les exercices de nage et de course pourraient donc dépendre de l'action spécifique de chacun de ces exercices sur les muscles. Chez les souris, l'entraînement à la nage sollicite de manière privilégiée les fibres musculaires rapides. La modulation de l'expression du génome des fibres musculaires sollicitées par l'exercice pourrait contribuer à la conservation du phénotype musculaire rapide et, par voie de conséquence, à la protection des motoneurones des unités motrices rapides. Elle pourrait également améliorer le statut métabolique des souris SLA, en favorisant l'utilisation du glucose comme source d'énergie nécessaire à la contraction musculaire.

3-1. Modifications intrinsèques des fibres musculaires sollicitées de manière privilégiée par la nage

Mc Kenzie et Goldfard (2007) ont montré qu'une seule séance d'exercice physique influence l'expression d'un grand nombre de gènes, dans le *Soleus* d'un rat. Ces gènes sont impliqués dans différents processus cellulaires tels la signalisation cellulaire via la production des facteurs IGF-1 et VEGF, l'apoptose ou l'autophagie via l'inhibition des facteurs de transcription FOXO3 ou NFκB et de la myostatine, la régénération musculaire via l'activation de facteurs myogéniques, la contraction musculaire et le métabolisme énergétique via l'activation de l'AMPK et de PGC-1α.

3-1.1. Effets des exercices sur l'atrophie musculaire

Les exercices physiques de nage et de course limitent les atrophies musculaires observées chez les souris SLA sédentaires. Ils provoquent une hypertrophie des fibres musculaires de type IIB spécifiquement atteintes par la SLA dans les muscles rapides et de l'ensemble des fibres dans le muscle lent. Les deux exercices étudiés ont le même impact sur l'atrophie musculaire, ce qui suggère un mécanisme commun, probablement associé à l'émission d'un facteur trophique diffusible qui agirait sur les fibres musculaires.

L'atrophie musculaire peut être la conséquence d'un manque d'activité nerveuse, de la modification des propriétés intrinsèques des motoneurons ou de la dénervation des JNM ; elle peut également être la conséquence de défauts d'expression intrinsèque ou de l'induction de mécanismes d'autophagie dans les fibres musculaires (Pette et Staron et al., 2000). L'exercice physique active directement, dans le muscle squelettique, la production de plusieurs facteurs connus pour leur effets hypertrophiques sur le muscle, en particulier l'IGF-1 (pour revue : Otto et Patel, 2010). Il est donc probable que les exercices de nage et de course augmentent la production d'IGF-1 musculaire, ce qui expliquerait l'effet hypertrophique des deux exercices sur les fibres musculaires des souris SLA entraînées.

Dans le muscle squelettique, l'IGF-1 a la particularité d'inhiber la voie de signalisation de la myostatine (pour revue : Otto et Patel, 2010). Or, cette voie de signalisation aboutit à l'inactivation d'Akt, de manière prédominante dans les fibres IIB. La régulation négative de la voie de signalisation de la myostatine, par l'IGF-1 musculaire produit au cours des entraînements,

pourrait expliquer l'effet hypertrophique des deux exercices restreint aux fibres IIB, dans les muscles rapides.

La voie IGF-1 est la voie majeure de neuroprotection induite par l'exercice (Carro et al., 2001 ; Torres-Aleman et al., 2005). L'activation de cette voie permet notamment la protection des neurones contre l'excitotoxicité glutamatergique (Carro et al., 2001). La production musculaire d'IGF-1 induite par les exercices de course et de nage pourrait donc agir directement sur la survie des motoneurones, chez les souris SLA. Pourtant, l'entraînement à la course n'a pas d'effet neuroprotecteur, sur les populations motoneuronales spinales. L'ensemble de ces données suggèrent que la nage activerait, plus efficacement que la course, la voie de neuroprotection de l'IGF-1 dans la moelle épinière des souris SLA. La diminution de l'activation des astrocytes chez les souris SLA entraînées à la nage pourrait en être la cause. En effet, la conservation d'une BHE fonctionnelle dans les souris SLA entraînées à la nage permettrait le passage de l'IGF-1 circulant dans le SNC. De plus, la diminution supposée de la concentration synaptique en glutamate, en raison de la captation plus importante par les astrocytes non-activés, permettrait une meilleure réponse des motoneurones à l'IGF-1. A l'inverse, chez les souris SLA entraînées à la course, les dysfonctionnements de la BHE associés à l'activation des astrocytes ne permettraient pas la délivrance, au niveau du SNC, de l'IGF-1 produit par les muscles à l'exercice.

3-1.2. Effets des exercices sur l'aplasie musculaire

Lorsqu'une fibre musculaire est dénervée, soit elle est ré-innervée par un autre motoneurone, soit elle dégénère. Le phénotype plus lent induit dans les muscles rapides des souris SLA sédentaires suggère des ré-innervations des fibres rapides par des motoneurones S et FR résistants à la SLA. Cependant, ces ré-innervations sont peu nombreuses, car le nombre de fibres musculaires qui constituent le *Plantaris* et le *Tibialis* est diminué respectivement de 22 % et 18% chez les souris SLA sédentaires. Par ailleurs, le *Soleus* des souris Contrôles sédentaires comporte moins de 10% de fibres musculaires de type IIX et donc d'unité motrice FF sensibles à la SLA. Pourtant, les souris SLA sédentaires présentent une aplasie dans le *Soleus* de 25%. La disparition des fibres musculaires des unités motrices S et FR ne serait donc pas uniquement une conséquence de la mort des motoneurones spinaux, mais pourrait dépendre de la toxicité de la SOD1 particulièrement agressive dans les fibres musculaires (Leclerc et al., 2001 ; Dobrowolny et al., 2008b). Elle pourrait notamment être induite par la diffusion locale du NO• et des ONOO⁻ (Zhou et al., 2009), accumulés massivement dans les fibres rapides sous l'action de la SOD1

mutée (Muller et al., 2007). Dans les souris SLA, ces ROS sont responsables de la dénervation des JNM et de l'activation des mécanismes d'autophagie dans les fibres rapides (Muller et al., 2007).

Les souris SLA entraînées à la course, contrairement à celles entraînées à la nage, présentent le même niveau d'aplasie que les souris SLA sédentaires, dans les trois muscles que nous avons étudiés. La nage induit un stress mécanique inférieur à la course, car l'eau diminue les contraintes mécaniques liées à la masse corporelle. Le stress mécanique induit par la course pourrait fragiliser les fibres musculaires et ainsi accélérerait leur dégénérescence.

De plus, lors d'un exercice physique, l'adaptation des muscles à la commande nerveuse, à la demande métabolique et à la contrainte mécanique dépend de l'activation de voies de signalisation multiples, dont les effecteurs sont souvent des facteurs de transcription (pour revue : Westerblad et al., 2010). On peut donc envisager que les exercices de nage et de course induisent des modulations différentes et spécifiques de l'expression du génome des fibres musculaires des souris SLA.

3-1.2.1. Modulation du profil sécrétoire des muscles

Chez les souris SLA entraînées à la nage, la conservation de l'ensemble des fibres musculaires et notamment des fibres de type IIb/IIx pourrait être une conséquence de leur ré-innervation par des motoneurones FF résiduels. Le « sprouting » de ces motoneurones pourrait être stimulé via la production de facteurs diffusibles par les fibres rapides sollicitées par la nage.

En effet, les muscles adultes sécrètent normalement des facteurs qui conditionnent le maintien des JNM, la croissance axonale dans les processus de « sprouting » et la survie des neurones (pour revue : Cary et La Sprada, 2008). Or, Parkhouse et ses collaborateurs (2008) ont montré que les signaux de régénération envoyés par les fibres musculaires IIb dénervées chez les souris SLA n'étaient pas adéquats pour maintenir la fonction des motoneurones FF. D'après Beaumont et Gardiner (2002), les adaptations des motoneurones à l'exercice physique pourraient être influencées par l'action de facteurs trophiques sécrétés par les fibres musculaires sollicitées et captés par les terminaisons axonales au niveau des JNM.

Les fibres musculaires rapides sollicitées lors de l'exercice de nage pourraient donc produire des facteurs neurotrophiques qui, par action rétrograde, protégeraient les motoneurones FF. Ces facteurs trophiques pourraient également initier et guider les phénomènes de

« sprouting » issus des motoneurons FF protégés, permettant ainsi la ré-innervation des fibres musculaires rapides préalablement dénervées. Cette hypothèse expliquerait, en partie, le maintien de la typologie musculaire des souris SLA par l'entraînement à la nage. A l'inverse, l'exercice de course induirait la sécrétion de facteurs neurotrophiques dans les fibres lentes, qui signaleraient aux motoneurons S et FR. Privés de l'action protectrice de ces facteurs, les motoneurons FF sensibles à la SLA dégénéraient, ce qui expliquerait l'absence d'effet neuroprotecteur de la course chez les souris SLA.

La production de facteurs neurotrophiques par les fibres des muscles squelettiques est dépendante du type et de l'intensité de l'exercice pratiqué (Taylor et al., 2007). En réponse à l'exercice physique, le muscle produit notamment du MGF (McKoy et al., 1999) et du VEGF (Biro et al., 2003 ; Tang et al., 2010).

Dans le *Vastus lateralis*, l'expression du MGF n'est pas modifiée par un exercice d'élongation de faible intensité (Evans et al., 2010), mais elle est augmentée par un exercice en résistance de forte intensité (Wilborn et al., 2009). Bien que l'expression du MGF ne semble pas modifiée dans les muscles des patients SLA (Evans et al., 2010), l'ajout de MGF *in vitro* sur des cultures primaires de cellules musculaires de patients SLA accroît la prolifération des cellules satellites et facilite les réparations musculaires (Ates et al., 2007). *In vivo* chez les souris SLA, l'augmentation de la production de MGF dans le *Tibialis antérieur* permet de conserver la force de ce muscle et induit, par effet rétrograde, une neuroprotection dans la moelle épinière (Riddoch-Contreras et al., 2009). Ainsi, la nage, définie dans nos conditions expérimentales comme un exercice de forte intensité, pourrait induire la production de MGF dans les fibres musculaires, contrairement à la course – un exercice de moindre intensité –. La réduction de l'aplasie chez les souris SLA entraînées à la nage pourrait dépendre de l'augmentation de la régénération musculaire activée par le MGF (Bamman et al., 2004).

Après une séance d'exercice, l'augmentation des niveaux de transcription du VEGF a été spécifiquement observée dans les fibres musculaires glycolytiques de type IIb et IIx (Biro et al., 2003). Le VEGF musculaire pourrait ainsi avoir un effet bénéfique sur les muscles. Il pourrait notamment limiter les aplasies par son action trophique autocrine et paracrine sur les fibres musculaires et faciliter la ré-innervation des fibres musculaires dénervées, en favorisant les phénomènes de « sprouting » des axones (Taylor et al., 2007). Il pourrait également avoir un effet neuroprotecteur, par action rétrograde sur les motoneurons (Taylor et al., 2007). Ainsi, la conservation des fibres glycolytiques rapides chez les souris SLA par l'entraînement à la nage

permettrait une production importante de VEGF musculaire, contrairement à l'entraînement à la course qui induit des transitions des fibres rapides vers lentes.

La différence de production musculaire du MGF et du VEGF lors des exercices de nage et de course pourrait expliquer, au moins en partie, l'action différente de ces exercices obtenue sur l'aplasie musculaire et la dégénérescence motoneuronale, chez les souris SLA entraînées.

Aussi, les muscles des patients et des souris SLA produisent massivement des facteurs inhibant la croissance des neurites, tel Nogo-A (Dupuis et al., 2002) dont l'expression est corrélée au développement de la maladie (Jokic et al., 2005). La modulation négative de l'expression de ce facteur renforce les JNM et augmente la survie des souris SLA (Jokic et al., 2006). Il serait donc intéressant d'étudier les effets de l'exercice physique sur l'expression de ce facteur dans les fibres musculaires.

3-1.2.2. Augmentation de la résistance des fibres musculaires au stress oxydant

La vulnérabilité particulière des JNM des fibres Iib puis Iix explique la perte sélective des motoneurones de large surface qui constituent les unités motrices FF (Frey et al., 2000 ; Pun et al., 2006 ; Hegedus et al., 2008). Lors du début de l'entraînement à P70, plus de 50% des JNM dans les muscles rapides des souris SLA sont censées être dénervées (Fischer et al., 2004). Pourtant, aucune aplasie significative n'est observée dans les muscles des souris SLA entraînées à la nage par rapport aux souris Contrôles, malgré la perte de 28% des motoneurones. Ces résultats suggèrent une action directe de la nage sur les muscles ; il est probable que la sollicitation des fibres musculaires glycolytiques rapides par la nage module leur transcriptome et ainsi les protège des mécanismes pathologiques de la SOD1 mutée.

Chez les souris SLA, les fibres musculaires présentent une forte modification de la transcription de leur génome, comme le suggère l'augmentation importante de l'expression des kinases des voies de signalisation ERK, p38 et Akt, corrélée à l'évolution de la maladie (Parkhouse et al., 2008). L'expression massive d'Akt apparaît restreinte aux fibres musculaires dénervées dans le *Soleus* ; l'activation de cette voie dans le muscle suggère une réponse à l'activation des voies de dégradation des fibres par la dénervation (Parkhouse et al., 2008). Comme dans les motoneurones, l'augmentation de p38 dans les fibres musculaires aurait pour conséquence la réduction de l'expression des gènes ARE impliqués dans la défense au stress oxydant constatée chez les souris SLA (Gonzalez de Aguilar et al., 2008 ; Ferraiuolo et al., 2009).

Cette diminution de l'expression des gènes ARE est restreinte aux fibres rapides ; elle ne concerne pas les fibres I (Kraft et al., 2007). Dans les fibres musculaires rapides spécifiquement sollicitées par la nage, on peut imaginer que la modulation des voies de signalisation pourrait augmenter leur résistance contre le stress oxydant produit par la SOD1 mutée.

Pour se défendre contre la toxicité des ROS, le muscle fait appel à PGC-1 α , un puissant régulateur de l'expression génique et un effecteur transcriptionnel majeur de l'adaptation du muscle squelettique aux changements d'activité induits par l'exercice physique (pour revue : Tiraby et Langin, 2005). Il prévient l'atrophie musculaire, en inhibant le facteur de transcription pro-apoptotique FOXO3 et le facteur de transcription protéolytique NF κ B (Brault et al., 2010). De plus, PGC-1 α est un régulateur important du fonctionnement de la JNM (pour revue : Arnold, 2007)

L'expression de PGC-1 α est dépendante de l'intensité de l'exercice (Egan et al., 2010) ; elle est activée par de multiples voies de signalisation, notamment par l'AMPK (pour revue : Westerblad et al., 2010). En fonction du type d'exercice, PGC-1 α influence également le métabolisme énergétique des fibres musculaires en fonction des facteurs de transcription auxquels il se couple. Dans les exercices de course, la surexpression de PGC-1 α est restreinte aux fibres glycolytiques de type II (Russel et al., 2003). PGC-1 α est impliqué dans la conversion des fibres musculaires rapides glycolytiques de type II en fibres lentes oxydatives de type I (Lin et al., 2002). Il augmente également l'expression des enzymes de l'oxydation des lipides en se couplant à PPAR α (Russel et al., 2003). Dans les exercices de forte intensité, PGC-1 α est surexprimé via l'activation d'un promoteur alternatif (Yoshioka et al., 2009). Chez le rat, l'entraînement à la nage a été décrit par Ploug et ses collaborateurs (1990) comme favorisant l'utilisation du glucose par glycolyse anaérobie dans les muscles rapides et par glycolyse aérobie dans les muscles lents. PGC-1 α en se couplant à MEF2C augmente l'expression des transporteurs au glucose GLUT4 dont la translocation à la membrane est également augmentée, afin de favoriser l'utilisation du glucose comme source d'énergie (Michael et al., 2001 ; Baar et al., 2002).

La modulation de l'activation de l'AMPK et l'expression de PGC-1 α dans le muscle étant dépendante de l'intensité et du type d'exercice, les effets différents de la nage et de la course observés sur la SLA dans nos conditions d'exercice pourrait dépendre de l'orientation du métabolisme énergétique musculaire. Ces effets pourraient avoir des répercussions sur le métabolisme global de l'organisme.

3-2. Amélioration du statut métabolique des souris SLA par l'entraînement à la nage

Dans le muscle, les transitions de fibres II vers I sont associées à une modulation de l'expression du génome et à une reprogrammation métabolique, pour une oxydation privilégiée des lipides comme source d'énergie (Fluck et Hoppeler, 2003 ; Chen et al, 2003). Les modifications typologiques que nous avons mises en évidence dans les muscles des souris SLA sédentaires suggèrent une orientation du métabolisme énergétique musculaire vers un métabolisme oxydatif privilégié. La nage, contrairement à la course, protège les muscles rapides des modifications typologiques induites par la SLA, suggérant un maintien des caractéristiques du métabolisme énergétique musculaire.

Lors d'un exercice physique, le métabolisme musculaire influence le métabolisme général, de par la forte quantité d'énergie que demande la contraction musculaire (Inserm 2008). Si on considère les interactions du métabolisme sur le développement de la SLA, le maintien du métabolisme musculaire glycolytique par l'entraînement à la nage pourrait expliquer les effets bénéfiques de cet exercice sur les souris SLA. Afin de valider cette hypothèse, nous avons caractérisé le statut métabolique des souris SLA sédentaires et entraînées à la course ou à la nage au cours des phases asymptomatique et symptomatique.

Comme les patients SLA (Desport et al., 2001 ; Dupuis et al., 2008), les souris SLA SOD1^{G93A high copy} sédentaires développent un hypermétabolisme lipidique par rapport aux souris Contrôles sédentaires. A 115 jours, les souris SLA SOD1^{G93A high copy} sédentaires présentent une diminution de 26% de leur masse corporelle associée à une réduction de 88% des réserves lipidiques au niveau de l'épididyme. Leurs adipocytes ont une surface de section réduite par rapport à ceux des souris Contrôles ; ils apparaissent vidés de leur contenu lipidique. La masse du lobe majeur du foie est également diminuée de 32%, mais aucune stéatose n'est observée dans cette souche comme décrit chez les patients SLA (Dupuis et al., 2008). En parallèle, les souris SLA SOD1^{G93A high copy} sédentaires présentent une forte diminution de l'utilisation du glucose par rapport aux souris Contrôles sédentaires, comme récemment décrit chez les patients SLA (Pradat et al., 2010). Cette résistance au glucose est présente dès la phase pré-symptomatique et reste constante jusqu'à la mort de l'animal ; elle ne s'aggrave pas au cours de la phase symptomatique. Ces résultats renforcent le caractère isomorphe du modèle animal SOD1^{G93A high copy} pour la pathologie SLA humaine.

Nos protocoles d'exercice de nage et de course induisent des adaptations métaboliques différentes chez les souris, qui s'affirment au cours de l'entraînement. Ces adaptations métaboliques spécifiques du type d'exercice sont beaucoup plus marquées à P115, soit après 30 jours d'entraînement, qu'à P90. Ces adaptations sont similaires à celles décrites chez l'homme pour ces intensités (Cheng et al., 2003) et ces types (Karamouzis et al. 2002, ; Nakar et al., 2008) d'exercice.

La diminution significative de la masse corporelle des souris Contrôles entraînées à la course associée à une forte réduction de l'adiposité par rapport aux sédentaires suggère une augmentation du métabolisme oxydatif et une utilisation accrue des lipides. La course diminue également la vitesse d'utilisation du glucose. Suite à un exercice de course, les taux de lactate sanguin des souris sauvages entraînées ne sont pas différents de ceux des souris sédentaires. Nos résultats confirment donc bien l'induction par la course d'un métabolisme énergétique préférentiellement basé sur l'utilisation des lipides, chez la souris.

Suite à un exercice de nage, les taux de lactate sanguin des souris sauvages entraînées sont trois fois plus élevés que ceux des souris sédentaires, mais la vitesse d'utilisation du glucose n'est pas modifiée chez les souris Contrôles. Notre entraînement à la nage privilégierait donc un métabolisme énergétique préférentiellement glycolytique anaérobie. Au cours de l'entraînement, il semblerait cependant que les besoins énergétiques nécessaires à la réalisation de l'exercice de nage impliquent l'augmentation de l'utilisation des lipides comme source d'énergie. En effet, les souris Contrôles entraînées à la nage par rapport aux souris Contrôles sédentaires présentent une diminution significative de leur masse corporelle et de l'accumulation de graisse au niveau de l'épididyme, à P115.

Dans les conditions d'hypermétabolisme lipidique développées par la SLA, l'entraînement à la course semble aggraver le statut métabolique des souris SLA, comme le suggère la diminution significative de la masse corporelle des souris SLA entraînées à la course par rapport aux sédentaires, à P90. A P115, les transitions de fibres induites par la course pourraient expliquer, au moins en partie, le ralentissement de l'utilisation du glucose observé chez les souris SLA entraînées à la course par rapport aux souris SLA sédentaires. A l'inverse, la nage favorise l'utilisation du glucose chez les souris SLA. A P115, les souris SLA entraînées à la nage utilisent le glucose à la même vitesse que les souris Contrôles sédentaires. Le maintien du phénotype musculaire par l'entraînement à la nage chez les souris SLA est en accord avec l'orientation du métabolisme énergétique des muscles rapides vers la voie préférentielle de la glycolyse anaérobie.

L'induction d'un métabolisme énergétique glycolytique préférentiel par la nage est corrélée à la préservation des réserves lipidiques, chez les souris SLA.

Le fait qu'un exercice particulier puisse orienter de manière spécifique le métabolisme énergétique musculaire pourrait permettre d'expliquer, au moins en partie, les effets différents de chaque entraînement sur le développement de la maladie chez les souris SLA. L'aggravation du déficit énergétique est un déterminant important de la pathologie SLA (Hamadeh et al., 2005). En conséquence, l'induction d'un métabolisme énergétique privilégiant l'utilisation des lipides et l'augmentation du fonctionnement des mitochondries dans les fibres musculaires, comme c'est le cas avec la course, aggraverait les mécanismes pathologiques de la SLA. L'adaptation métabolique des muscles à la course pourrait expliquer l'effet néfaste de cet exercice sur les souris SLA constaté par Mahoney et ses collaborateurs (2004).

Ainsi, l'entraînement à la nage permettrait de limiter l'hypermétabolisme lipidique mis en évidence chez les souris SLA $SOD1^{G93A \text{ high copy}}$, en augmentant notamment l'utilisation du glucose. L'utilisation préférentielle du glucose par la voie de la glycolyse anaérobie, comme source d'énergie dans le muscle, aurait pour conséquence la diminution de la production des ROS. Ceci pourrait être très bénéfique pour les souris SLA basées sur la mutation de la SOD1.

CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

Nous avons montré que l'exercice physique a bien un effet bénéfique sur le développement de la SLA dans le modèle murin SOD1^{G93A}, mais tous les types d'exercices n'ont pas le même effet (Deforges et al., 2009). Dans nos conditions expérimentales, un entraînement à la nage, contrairement à un entraînement à la course, retarde l'apparition des symptômes et allonge la durée de vie des souris SLA, tout en préservant leur état général ainsi que leurs capacités motrices.

La majorité des modifications cellulaires mises en évidence au niveau central et périphérique chez les souris SLA et liées aux mécanismes physiopathologiques de la SLA apparaît limitée par l'entraînement à la nage (Deforges et al., 2009). Dans la moelle épinière, l'entraînement à la nage protège les motoneurones et les cellules non-neuronales. Il limite efficacement la prolifération et l'activation des astrocytes. Il prévient également la perte des oligodendrocytes, ainsi que la prolifération des progéniteurs neuraux. Au niveau des membres postérieurs, l'entraînement à la nage maintient l'intégrité des muscles lents et rapides : il prévient les modifications typologiques, l'aplasie et l'atrophie induites par la SLA. Dans les muscles rapides, il empêche les transitions de fibres vers un phénotype plus lent associées à une reprogrammation du métabolisme énergétique. Les souris SLA SOD1^{G93A} sédentaires développent une résistance au glucose et utilisent de manière privilégiée les lipides, comme le suggère la disparition de l'accumulation de graisse au niveau de l'épididyme (résultats 3). L'entraînement à la nage limite les modifications métaboliques induites par la SLA, dans le modèle souris SOD1^{G93A} ; il favorise l'utilisation du glucose comme source d'énergie et préserve les réserves lipidiques.

Ces résultats permettent de discuter l'hypothèse selon laquelle un exercice physique doit être pratiqué à intensité modérée pour être bénéfique pour les souris SLA (Mahoney et al., 2004). En effet, le protocole de nage que nous utilisons comparé au protocole de course est un exercice de plus forte intensité, comme en témoigne l'importance de la fréquence et de l'amplitude des mouvements requis pour son exécution (Grondard et al., 2008). Il apparaît que l'effet de l'exercice physique sur les souris SLA dépend plutôt du type d'exercice pratiqué, comme le suggéraient Mc Crate et Kaspar (2008).

Dans nos conditions expérimentales, les exercices de nage et de course recrutent des unités motrices distinctes (Grondard et al., 2008). L'entraînement à la nage recrute préférentiellement les unités motrices FF : il active les motoneurones de large surface de soma supérieure à 600µm² et sollicite les fibres musculaires les plus rapides au métabolisme principalement glycolytique

anaérobie. Il privilégie l'utilisation du glucose comme source d'énergie (Grondard et al., 2008 ; résultats 3). Au contraire, l'entraînement à la course recrute préférentiellement les unités motrices lentes : il active les motoneurones de surface de soma réduite inférieure à $600\mu\text{m}^2$ et induit des transitions de fibres rapides vers lentes associées à un métabolisme principalement aérobie oxydatif. Il favorise l'utilisation des lipides comme source d'énergie (Grondard et al., 2008 ; résultats 3). En comparaison du protocole de course, les bénéfices du protocole de nage pour les souris SLA seraient liés au type d'unités motrices activées de manière privilégiée par cet exercice. L'ensemble de nos résultats suggère que l'entraînement à la nage déclencherait des mécanismes neuroprotecteurs par l'activation spécifique des unités motrices les plus rapides sélectivement atteintes par la SLA.

L'exercice physique représente pour nous une façon expérimentale d'activer des mécanismes de neuroprotection responsables de l'allongement de la durée de vie des souris SLA. Nous souhaitons donc définir les mécanismes activés spécifiquement par la nage dans ces souris. Sur la base de nos résultats, deux hypothèses pourraient expliquer les bénéfices observés du protocole de nage : (1) l'adaptation des propriétés intrinsèques des motoneurones FF - sensibles à la SLA - activés sélectivement par la nage les protégerait de la dégénérescence, ainsi que leur environnement cellulaire ; (2) l'adaptation des fibres musculaires rapides sollicitées par la nage contrerait les modifications métaboliques induites par la SLA et renforcerait les JNM, protégeant ainsi les motoneurones FF.

Ainsi, l'analyse des modifications transcriptionnelles des motoneurones et le décryptage des voies métaboliques musculaires activées sélectivement par la nage constituent des étapes dans la découverte de voies moléculaires susceptibles de prévenir la mort des motoneurones dans la SLA. Dans ce but, nous avons initié des études cellulaires et moléculaires comparatives approfondies des modifications induites par les exercices de nage et de course chez les souris SLA, selon ces deux axes de recherche.

Tout d'abord, dans l'hypothèse d'une adaptation bénéfique et spécifique des propriétés intrinsèques des motoneurones sélectivement activés par un exercice donné, l'entraînement à la nage déclencherait des mécanismes neuroprotecteurs en activant préférentiellement les motoneurones FF sensibles à la SLA. Les communications cellulaires participent aux mécanismes

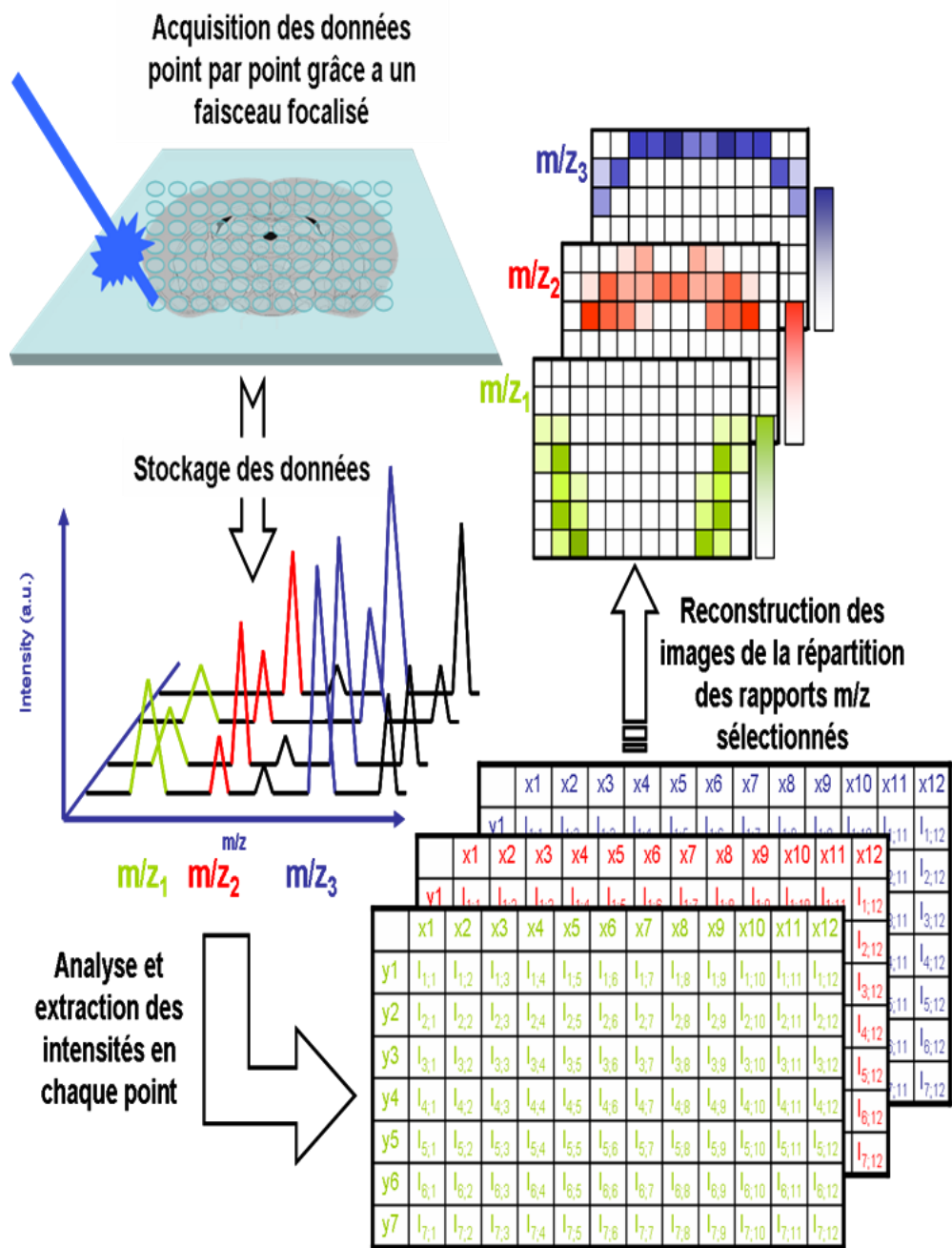


Figure 23 : Représentation schématique de la technique d'imagerie MALDI

pathologiques de la SLA ; le cercle « vicieux » entre les motoneurones et les cellules non-neuronales conduit à la mort sélective des motoneurones. La modulation des propriétés intrinsèques des motoneurones protégés par la nage pourrait améliorer leurs communications cellulaires avec les populations non-neuronales environnantes. Elle pourrait ainsi instaurer un « cercle vertueux » entre les cellules du SNC, notamment en prévenant la production de facteurs toxiques. Afin de valider cette hypothèse, nous avons initié une étude systématique des adaptations à la nage au niveau de la moelle épinière, à P115, par une analyse protéomique *in situ* par spectrométrie de masse (Figure 23).

La protéomique consiste à identifier et quantifier des protéines ou des peptides endogènes constitués d'une dizaine d'acides aminés, spécifiques d'un état physiologique d'une cellule ou d'un tissu. Elle permet notamment d'étudier les compositions en neurotransmetteurs, en neuropeptides modulateurs, en hormones ou en fragments de protéines fonctionnelles impliqués dans de nombreux processus biologiques essentiels. Les neuropeptides endogènes constituent un groupe important dans le protéome fonctionnel du SNC (pour revue : Hökfelt et al., 2000). Ils exercent notamment de puissants effets biologiques sur les voies respiratoires et cardiovasculaires, ainsi que sur les systèmes endocriniens, inflammatoires et nerveux. Dans le système nerveux central, la plupart des neurones contiennent des peptides biologiquement actifs impliqués dans la pathologie de divers troubles neurologiques comme la dépression, les maladies neurodégénératives et les troubles nutritionnels (pour revue : Hökfelt et al., 2000) ; l'exercice physique est connu pour favoriser l'expression et la libération des neuropeptides (pour revue : Hökfelt et al., 1991).

L'imagerie par spectrométrie de masse utilisant une source de type désorption/ionisation laser assistée par matrice (imagerie MALDI), permet de créer des images moléculaires de la distribution en composés connus ou inconnus à partir d'une coupe fine de tissu (Caprioli et al., 1997 ; Wisztorski et al., 2007). Cette technique permet de localiser avec une grande sensibilité plusieurs centaines de biomolécules en une seule analyse. Pour réaliser ces études, nous avons entamé une collaboration avec Isabelle Fournier et Maxence Wisztorski de l'équipe Imagerie MALDI, unité CNRS-Université de Lille 1 FRE 2933. Dans cette équipe, l'imagerie MALDI a par exemple déjà été utilisée avec succès pour l'identification de biomarqueurs dans la maladie de Parkinson (Stauber et al., 2008).

Dans un premier temps, nous avons réalisé des études de faisabilité de la méthode sur des coupes de moelle épinière lombaire de souris. La sensibilité de la technique d'imagerie MALDI a permis d'obtenir des images moléculaires de la composition en protéines (4-20 kDa), en peptides

endogènes (500-5000 Da) et en lipides (50-1500 Da) de coupe de moelle épinière de 10µm d'épaisseur. Ces images moléculaires sont obtenues avec une très bonne résolution (pas de 80µm) et sans délocalisation du signal (poster présenté lors du congré de la société française de spectrométrie de masse en septembre 2010 ; Annexe).

Dans un second temps, nous avons réalisé des expériences préliminaires de comparaison des profils d'expressions des peptides endogènes dans la moelle épinière de souris Contrôles et SLA, sédentaires ou entraînées à la nage (n=3 par groupe). Ces premiers résultats sont encourageants : les analyses statistiques révèlent des clusters d'expressions spécifiques de chaque groupe de souris, notamment au niveau des cornes ventrales de la moelle épinière où se situent les motoneurones. Les expériences complémentaires incluant également les groupes de souris Contrôles et SLA entraînées à la course sont en cours.

L'identification des molécules d'intérêt mises en évidence grâce à la technique d'imagerie MALDI pourra être réalisée grâce à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), afin d'obtenir l'enchaînement peptidique de ces molécules d'intérêt. Cette technique repose sur la comparaison des spectres MS/MS de fragments protéiques obtenus après digestion trypsique à des banques de données (peptide mass fingerprint). Cette seconde étape pourra être réalisée en imagerie MALDI directement sur les coupes, après digestion *in situ* ou par des techniques classiques de protéomique. Dans ce second cas, les molécules d'intérêt seront purifiées à partir d'extraits protéiques totaux de la corne ventrale de moelle épinière, par chromatographie liquide haute performance ou nano-chromatographie liquide, puis digérées à la trypsine avant d'être analysées par spectroscopie de masse.

En parallèle, afin d'étudier l'action moléculaire des exercices de nage et de course sur les motoneurone, l'analyse des voies de signalisation impliquées dans la dégénérescence et la protection des motoneurones sera réalisée dans les cornes ventrales de la moelle épinière lombaire des souris SLA entraînées comparées aux souris SLA sédentaires. Les niveaux d'expression et l'état d'activation des kinases JNK, p38, ERK et AKT seront estimés, dans les cornes ventrales de la moelle épinière lombaire, par la technique de western blot. Il serait également intéressant d'analyser l'expression d'ATF3 dans la moelle épinière ; cette étude pourrait être menée dans un premier temps par western blot ou par hybridation *in situ*, afin d'apprécier les niveaux d'expression de cette molécules dans les motoneurones. La voie IGF-1 étant la voie majeure de neuroprotection induite par l'exercice physique, il nous apparaît évident d'étudier cette voie de

signalisation au niveau de la moelle épinière. Notre attention se portera dans un premier temps sur l'expression de l'IGF-1R, qui sera analysée par hybridation *in situ*.

Nous souhaitons également étudier les modifications intrinsèques des motoneurones spinaux de large surface activés et protégés par l'entraînement à la nage chez les souris SLA. Pour cela, nous envisageons de réaliser une analyse différentielle par puces à ADN du transcriptome des motoneurones spinaux de large surface obtenus par microdissection laser de moelles épinières de souris SLA sédentaires et entraînées à la nage, au cours de la phase symptomatique.

D'autre part, dans nos conditions expérimentales, les exercices de nage et de course influencent différemment le métabolisme énergétique des souris SLA (résultats 3). La nage privilégie l'utilisation du glucose comme source d'énergie par la voie de la glycolyse anaérobie, alors que la course privilégie les voies métaboliques aérobies et notamment l'utilisation des lipides comme source d'énergie. La diminution de l'utilisation du glucose et l'épuisement des réserves lipidiques observées chez les souris Contrôles entraînées à la course refléterait l'adaptation du métabolisme musculaire aux transitions de fibres II vers I induites par cet exercice. Ainsi, le métabolisme énergétique glycolytique préférentiel développé au cours de l'entraînement à la nage améliorerait le statut métabolique des souris SLA.

Afin de confirmer l'hypothèse de l'influence des exercices physiques sur le métabolisme énergétique musculaire, nous envisageons d'étudier l'activité des principales enzymes du métabolisme musculaire des souris Contrôles et SLA sédentaires et entraînées à la nage ou à la course. Les ARNm codant les principaux acteurs des voies métaboliques musculaires seront quantifiés, par RT-PCR en temps réel, dans le muscle *Soleus* lent et le muscle *Tibialis* rapide, afin de définir l'orientation du métabolisme énergétique de chacun de ces muscles chez les souris SLA sédentaires, entraînées à la nage ou à la course. Cette analyse sera réalisée en collaboration avec le laboratoire de Claude Forest, unité Régulation Génique et Métabolisme INSERM UMR S747.

A long terme, la détermination des mécanismes cellulaires et moléculaires activés spécifiquement par la nage chez les souris SLA, nous permettrait de pouvoir proposer aux patients SLA de nouvelles voies thérapeutiques.

Au vu des performances obtenues sur le développement de la SLA dans le modèle murin, un protocole de nage pourrait être proposé comme traitement kinésique aux patients SLA. Par ailleurs, ce protocole de nage présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et aisé à réaliser par des patients. En effet, la nage, par la diminution de la gravité, est moins contraignante que des exercices de course par exemple. Elle peut être pratiquée même en phase symptomatique, lors de faiblesses musculaires au niveau des membres inférieurs, grâce à des systèmes aidant la flottaison. Lors de l'entraînement des souris SLA, nous avons d'ailleurs pu constater que la plupart des souris présentant des paralysies des membres postérieurs aux stades avancés de la SLA continuaient à nager par la force de leurs membres antérieurs.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41-53.
- Abe T, Kumagai K, Brechue WF. Fascicle length of leg muscles is greater in sprinters than distance runners. *Med Sci Sports Exerc* 2000 ; 32:1125-9
- Abel EL. Football increases the risk for Lou Gehrig's disease, amyotrophic lateral sclerosis. *Percept Mot Skills.* 2007;104:1251-4.
- Adem A, Ekblom J, Gillberg PG. Growth factor receptors in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol.* 1994;9(1-3): 225-31.
- Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2005 Apr 27;25(17):4217-21.
- Afifi AK, Aleu FP, Goodgold J, MacKay B. Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1966;16:475-481
- Al-Shanti N, Stewart CE. Ca²⁺/calmodulin-dependent transcriptional pathways: potential mediators of skeletal muscle growth and development. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2009 Nov;84(4):637-52.
- Amendola J, Durand J. Morphological Differences Between Wild-Type and Transgenic Superoxide Dismutase 1 Lumbar Motoneurons in Postnatal Mice. *J. Comp. Neurol.,* 2008 ; 511:329–341.
- Amendola J, Gueritaud JP, d'Incamps BL, Bories C, Liabeuf S, Allene C, Pambo-Pambo A, Durand J. Postnatal electrical and morphological abnormalities in lumbar motoneurons from transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol.* 2007 Nov;145(3-4):311-23.
- Anand P, Parrett A, Martin J, Zeman S, Foley P, Swash M, Leigh PN, Cedarbaum JM, Lindsay RM, Williams-Chestnut RE. Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease. *Nat Med.* 1995 ; 1(2):168-72.
- Andersen P.M, Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2006; 6: 37–46
- Arnold AS, Egger A, Handschin C. PGC-1alpha and Myokines in the Aging Muscle - A Mini-Review. *Gerontology.* 2011;57(1):37-43.
- Arnold AS. [PGC-1alpha controls neuromuscular junction and offers a novel therapeutic target in Duchenne dystrophy?]. *Med Sci (Paris).* 2007 Nov;23(11):1034-6.
- Arnold A, Edgren DC, Palladino VS. Amyotrophic lateral sclerosis; fifty cases observed on Guam. *J Nerv Ment Dis.* 1953 Feb; 117(2):135-9.
- Ates K, Yang SY, Orrell RW, Sinanan AC, Simons P, Solomon A, Beech S, Goldspink G, Lewis MP. The IGF-I splice variant MGF increases progenitor cells in ALS, dystrophic, and normal muscle. *FEBS Lett.* 2007 Jun 12;581(14):2727-32.
- Atkin, J.D., Farg, M.A., Turner, B.J., Tomas, D., Lysaght, J.A., Nunan, J., Rembach, A., Nagley, P., Beart, P.M., Cheema, S.S., Horne, M.K. Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J. Biol. Chem.* 2006 ; 281: 30152–30165.
- Aubert A, Costalat R, Magistretti PJ, Pellerin L. Brain lactate kinetics: Modeling evidence for neuronal lactate uptake upon activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005b Nov 8;102(45):16448-53.
- Aubert A, Costalat R. Interaction between astrocytes and neurons studied using a mathematical model of compartmentalized energy metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005a Nov;25(11):1476-90.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO. Adaptations of skeletal muscle to exercise : rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* 2002 ; 16 : 1879-86.
- Bamman MM, Ragan RC, Kim JS, Cross JM, Hill VJ, Tuggle SC, Allman RM. Myogenic protein expression before and after resistance loading in 26- and 64-yr-old men and women. *J Appl Physiol.* 2004 Oct;97(4):1329-37.
- Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem.* 2003;253:307-12.
- Barbeito AG, Martinez-Palma L, Vargas MR, Pehar M, Mañay N, Beckman JS, Barbeito L, Cassina P. Lead exposure stimulates VEGF expression in the spinal cord and extends survival in a mouse model of ALS. *Neurobiol Dis.* 2010 Mar;37(3):574-80.

- Barkovich AJ, Good WV, Koch TK, Berg BO. Mitochondrial disorders: analysis of their clinical and imaging characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1993 Sep-Oct;14(5):1119-37.
- Bartfeld H, Dham C, Donnenfeld H, Ollar RA, deMasi MT, Kascsak R. Enteroviral-related antigen in circulating immune complexes of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Intervirology.* 1989;30(4):202-12.
- Beaumont E, Gardiner P. Effects of daily spontaneous running on the electrophysiological properties of hindlimb motoneurons in rats. *J Physiol.* 2002 ; 540(Pt 1):129-38.
- Bello-Haas VD, Florence JM, Kloos AD, Scheirbecker J, Lopate G, Hayes SM, Piro EP, Mitsumoto H. A randomized controlled trial of resistance exercise in individuals with ALS. *Neurology.* 2007 Jun 5;68(23):2003-7.
- Benhar M, Dalyot I, Engelberg D, Levitzki A. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 2001 Oct;21(20):6913-26
- Beretta S, Carri MT, Beghi E, Chio A, Ferrarese C. The sinister side of Italian soccer. *Lancet Neurol.* 2003;2:656-7.
- Bergemalm D, Forsberg K, Srivastava V, Graffmo KS, Andersen PM, Brännström T, Wingsle G, Marklund SL. Superoxide dismutase-1 and other proteins in inclusions from transgenic amyotrophic lateral sclerosis model mice. *J Neurochem.* 2010 Jul;114(2):408-18.
- Bergemalm D, Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brännström T, Rehnmark A, Marklund SL. Overloading of stable and exclusion of unstable human superoxide dismutase-1 variants in mitochondria of murine amyotrophic lateral sclerosis models. *J Neurosci.* 2006 Apr 19;26(16):4147-54.
- Berger MM, Kopp N, Vital C, Redl B, Aymard M, Lina B. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology.* 2000 Jan 11;54(1):20-5.
- Bilic E, Bilic E, Rudan I, Kusec V, Zurak N, Delimar D, Zagar M. Comparison of the growth hormone, IGF-1 and insulin in cerebrospinal fluid and serum between patients with motor neuron disease and healthy controls. *Eur J Neurol.* 2006 Dec;13(12):1340-5.
- Bilsland LG, Nirmalanathan N, Yip J, Greensmith L, Duchen MR. Expression of mutant SOD1 in astrocytes induces functional deficits in motoneuron mitochondria. *J Neurochem* 2008 ;107 : 1271–1283
- Biondi O, Grondard C, Lécolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C, Charbonnier F. Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci.* 2008 Jan 23;28(4):953-62.
- Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, Pariset C, Lécolle S, Côté J, Chanoine C, Charbonnier F. In Vivo NMDA Receptor Activation Accelerates Motor Unit Maturation, Protects Spinal Motor Neurons, and Enhances SMN2 Gene Expression in Severe Spinal Muscular Atrophy Mice. *J Neurosci.* 2010 Aug 25;30(34):11288-99.
- Birot OJ, Koulmann N, Peinnequin A, Bigard XA. Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. *J Physiol.* 2003 Oct 1;552(Pt 1):213-21.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006;312 :1389–1392.
- Bogaert E, Van Damme P, Poesen K, Dhondt J, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Robberecht W, Van Den Bosch L. VEGF protects motor neurons against excitotoxicity by upregulation of GluR2. *Neurobiol Aging.* 2010 Dec;31(12):2185-91.
- Bogdanov MB, Ramos LE, Xu Z, Beal MF. Elevated “hydroxyl radical” generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 1998;71: 1321–1324.
- Borasio GD, Robberecht W, Leigh PN, Emile J, Guiloff RJ, Jerusalem F, Silani V, Vos PE, Wokke JH, Dobbins T. A placebo controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 1998 ; 51 : 583–586.
- Boston-Howes W, Gibb SL, Williams EO, Pasinelli P, Brown RH Jr, Trotti D. Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2. *J Biol Chem.* 2006 May 19;281(20):14076-84.
- Bradley LJ., Taanman JW., Kallis C., Orrell RW. Increased sensitivity of myoblasts to oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis peripheral tissues. *Exp. Neurol.* 2009 ; 218, 92–97.
- Bradley J, Carter SR, Rao VR, Wang J, Finkbeiner S. Splice variants of the NR1 subunit differentially induce NMDA receptor-dependent gene expression. *J Neurosci.* 2006 Jan 25;26(4):1065-76.

- Brault JJ, Jespersen JG, Goldberg AL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *J Biol Chem*. 2010 Jun 18;285(25):19460-71.
- Bray MS. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. *J Appl Physiol*. 2000;88(2):788-92.
- Brockington A, Wharton SB, Fernando M, Gelsthorpe CH, Baxter L, Ince PG. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the central nervous system in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:26–36
- Brooks RB, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1:293-299
- Brooks RB. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1994; 124 suppl:96-107
- Brown SL, Sekhar KR, Rachakonda G, Sasi S, Freeman ML. Activating transcription factor 3 is a novel repressor of the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2)-regulated stress pathway. *Cancer Res*. 2008 Jan 15;68(2):364-8.
- Browne SE, Bowling AC, Baik MJ, Gurney M, Brown RH Jr, Beal MF. Metabolic dysfunction in familial, but not sporadic, amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 1998 Jul;71(1):281-7.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama ., Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 1998;281: 1851–1854
- Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 1997 ;18, 327–338
- Burghes AH, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci*. 2009 Aug;10(8):597-609.
- Burke RE. Physiology of motor units. In : *Myology*, 1994 ; 464-484
- Bryson HM, Fulton B, Benfield P. Riluzole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs*. 1996 Oct;52(4):549-63. Review.
- Camu, W., Khoris, J., Moulard, B., Salachas, F., Briolotti, V., Rouleau, G.A. and Meininger, V. Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. French ALS Research. Group. *J Neurol Sci* 1999 ; 165 Suppl 1 , S21-26.
- Caprioli R.M., Farmer T.B., Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem*, 1997; 69(23): 4751-60.
- Carreras I, Yuruker S, Aytan N, Hossain L, Choi JK, Jenkins BG, Kowall NW, Dedeoglu A. Moderate exercise delays the motor performance decline in a transgenic model of ALS. *Brain Res*. 2010 Feb 8;1313:192-201.
- Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, Weiss JH. AMPA exposures induce mitochondrial Ca²⁺ overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci* 2000; 20 : 240–250
- Carro E, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor I in brain function. *Keio J Med*. 2006 Jun;55(2):59-63. Review.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci*. 2001 Aug 1;21(15):5678-84.
- Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci*. 2000 Apr 15;20(8):2926-33.
- Cary GA, La Spada AR. Androgen receptor function in motor neuron survival and degeneration. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2008 Aug;19(3):479-94, viii. Review.
- Cereda C, Baiocchi C, Bongioanni P, Cova E, Guareschi S, Metelli MR, Rossi B, Sbalsi I, Cuccia MC, Ceroni M. TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients. *J Neuroimmunol* 2008;194:123–131
- Chada SR, Hollenbeck PJ. Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr Biol*. 2004 Jul 27; 14(14):1272-6.
- Charcot JM., Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-latéraux de la moelle epiniere. *Arch.Physiol. Neurol. Pathol.*, 1869 ; 2: 744–754.

- Cheah BC, Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Med Chem.* 2010;17(18):1942-199. Review.
- Cheah BC, Boland RA, Brodaty NE, Zoing MC, Jeffery SE, McKenzie DK, Kiernan MC. INSPIRATIOnAL--INSPIRAtory muscle training in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009;10(5-6):384-92.
- Chen K, Northington FJ, Martin LJ. Inducible nitric oxide synthase is present in motor neuron mitochondria and Schwann cells and contributes to disease mechanisms in ALS mice. *Brain Struct Funct.* 2010;214(2-3):219-34.
- Chen D, Shen L, Wang L, Lu A, Zhang H, Zhang X, Zhang Y, Shui W, Li L, Fan D, Zhang J. Association of polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene with the age of onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 2007 Jun;8(3):144-9.
- Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters LA, Kemp BE, McConell GK. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes.* 2003 Sep;52(9):2205-12.
- Cheroni C, Marino M, Tortarolo M, Veglianesi P, De Biasi S, Fontana E, Zuccarello LV, Maynard CJ, Dantuma NP, Bendotti C. Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009 ;18(1):82-96
- Cheroni C, Peviani M, Cascio P, De Biasi S, Monti C, Bendotti C. Accumulation of human SOD1 and ubiquitinated deposits in the spinal cord of SOD1G93A mice during motor neuron disease progression correlates with a decrease of proteasome. *Neurobiol Dis* 2005; 18:509–522
- Cheung EC, McBride HM, Slack RS. Mitochondrial dynamics in the regulation of neuronal cell death. *Apoptosis.* 2007 May;12(5):979-92. Review.
- Chi L, Gan L, Luo C, Lien L, Liu R. Temporal response of neural progenitor cells to disease onset and progression in amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mice. *Stem Cells Dev.* 2007;16(4):579-88.
- Chi L, Ke Y, Luo C, Li B, Gozal D, Kalyanaraman B, Liu R. Motor Neuron Degeneration Promotes Neural Progenitor Cell Proliferation, Migration, and Neurogenesis in the Spinal Cords of Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *Stem Cells* 2006; 24 :34-43
- Chin CN, Dallas-Yang Q, Liu F, Ho T, Ellsworth K, Fischer P, Natasha T, Ireland C, Lu P, Li C, Wang IM, Strohl W, Berger JP, An Z, Zhang BB, Jiang G. Evidence that inhibition of insulin receptor signaling activity by PC-1/ENPP1 is dependent on its enzyme activity. *Eur J Pharmacol.* 2009 Mar 15;606(1-3):17-24.
- Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain.* 2005;128:472-6.
- Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 15;14(20):6364-70.
- Chiu, A.Y., Zhai, P., Dal Canto, M.C., Peters, T.M., Kwon, Y.W., Prattis, S.M., Gurney, M.E. Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Cell. Neurosci.* 1995 ; 6 : 349–362.
- Choi JK, Küstermann E, Dedeoglu A, Jenkins BG. Magnetic resonance spectroscopy of regional brain metabolite markers in FALS mice and the effects of dietary creatine supplementation. *Eur J Neurosci* 2009 Dec;30(11):2143-50
- Chou SM, Wang HS, Taniguchi A. Role of SOD-1 and nitric oxide/cyclic GMP cascade on neurofilament aggregation in ALS/MND. *J Neurol Sci.* 1996 Aug;139 Suppl:16-26.
- Chung YH, Joo KM, Lim HC, Cho MH, Kim D, Lee WB, Cha CI. Immunohistochemical study on the distribution of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the central nervous system of SOD1G93A transgenic mice. *Brain Res.* 2005 Jul 19;1050(1-2):203-9.
- Chung YH, Joo KM, Shin CM, Lee YJ, Shin DH, Lee KH, Cha CI. Immunohistochemical study on the distribution of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor in the central nervous system of SOD1(G93A) mutant transgenic mice. *Brain Res.* 2003 Dec 24;994(2):253-9.
- Clarkson PM, Nosaka K, Braun B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med Sci Sports Exerc.* 1992 May;24(5):512-20.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003;302:113-117

- Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Nov;2(11):806-19. Review.
- Cleveland DW, Liu J. Oxidation versus aggregation - how do SOD1 mutants cause ALS? *Nat Med*. 2000 Dec;6(12):1320-1.
- Collard JF, Côté F, Julien JP. Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1995 May 4;375(6526):61-4.
- Corcia P, Camu W, Praline J, Gordon PH, Vourch P, Andres C. The importance of the SMN genes in the genetics of sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009 Mar 6:1-5.
- Corcia P, Praline J, Vourch P, Andres C. Genetics of motor neuron disorders *Rev Neurol (Paris)*. 2008 Feb;164(2):115-30. Review.
- Corcia P, Camu W, Halimi JM, Vourch P, Antar C, Vedrine S, Giraudeau B, de Toffol B, Andres CR; French ALS Study Group. SMN1 gene, but not SMN2, is a risk factor for sporadic ALS. *Neurology*. 2006;67(7):1147-50.
- Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioural intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*. 2002; 25: 295-301.
- Crews LL, Wigston DJ. The dependence of motoneurons on their target muscle during postnatal development of the mouse. *J Neurosci*. 1990 May;10(5):1643-53.
- Crow J.P., Sampson J.B., Zhuang Y., Thompson J.A., Beckman J.S. Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J Neurochem*. 1997; 69:1936-1944
- Dal Canto, M.C., Gurney, M.E. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res*. 1995; 676: 25-40.
- Dal Canto, M.C., Gurney, M.E. 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 Neuropathol*. 1997; 93:537-550.
- Damiano M, Starkov AA, Petri S, Kipiani K, Kiaei M, Mattiazzi M, Flint Beal M, Manfredi G. Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem*. 2006 Mar;96(5):1349-61.
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1982;107: 1198_205.
- De Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H, Shefner J, Swash M. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol*. 2008 Mar;119(3):497-503.
- Deforges S, Branchu J, Biondi O, Grondard C, Pariset C, Lécolle S, Lopes P, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F. Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol*. 2009 Jul 15;587(Pt 14):3561-72.
- De Hemptinne I, Boucherie C, Pochet R, Bantubungi K, Schiffmann SN, Maloteaux JM, Hermans E. Unilateral induction of progenitors in the spinal cord of hSOD1(G93A) transgenic rats correlates with an asymmetrical hind limb paralysis. *Neurosci Lett*. 2006; 401(1-2):25-9.
- Deldicque L, Theisen D, Francaux M. Regulation of mTOR by amino acids and resistance exercise in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2005, 94 : 1-10.
- Delisle MB, Carpenter S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 1984 ; 63(2):241-50.
- Deng H, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, Warner C, Deng G., Soriano, E, Smyth C, Parge HE, Ahmed A, Roses AD, Hallewell R, Pericak-Vance M, Siddique T. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 1993;261: 1047-1051.
- De Paul R, Abbs JH. Manifestations of ALS in the cranial motor nerves. *Neurologic clinics*, 1987 ; 5: 231-2151.
- Desport JC, Torry F, Lacoste M, Preux PM, Couratier P. Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegener Dis*. 2005;2(3-4):202-7.
- Desport JC, Preux PM, Magy L, Boirie Y, Vallat JM, Beaufrère B, Couratier P. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2001 Sep;74(3):328-34.

- De Vos KJ, Chapman AL, Tennant ME, Manser C, Tudor EL, Lau KF, Brownlees J, Ackerley S, Shaw PJ, McLoughlin DM, Shaw CE, Leigh PN, Miller CC, Grierson AJ. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet.* 2007 Nov 15;16(22):2720-8.
- Dewil M, dela Cruz VF, Van Den Bosch L, Robberecht W: Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase activation and mutant SOD1(G93A)-induced motor neuron death. *Neurobiol Dis* 2007, 26:332-341.
- Dietrich WD, Atkins CM, Bramlett HM. Protection in animal models of brain and spinal cord injury with mild to moderate hypothermia. *J Neurotrauma.* 2009 Mar;26(3):301-12. Review.
- Ding YH, Luan XD, Li J. Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke. *Current Neurovascular Research* 2004 ; 1:411–420.
- 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, Fanò G, Sandri M, Musarò A. Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab.* 2008b ; 8(5):425-36. Erratum in: *Cell Metab.* 2009 ; 9(1):110.
- Dobrowolny G, Aucello M, Molinaro M, Musarò A. Local expression of mIgf-1 modulates ubiquitin, caspase and CDK5 expression in skeletal muscle of an ALS mouse model. *Neurol Res.* 2008a ; 30(2):131-6.
- Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musarò A. Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol* 2005 ;168(2):193-9.
- Dodge JC, Haidet AM, Yang W, Passini MA, Hester M, Clarke J, Roskelley EM, Treleaven CM, Rizo L, Martin H, Kim SH, Kaspar R, Taksir TV, Griffiths DA, Cheng SH, Shihabuddin LS, Kaspar BK. Delivery of AAV-IGF-1 to the CNS extends survival in ALS mice through modification of aberrant glial cell activity. *Mol Ther.* 2008 Jun;16(6):1056-64.
- Doré S, Kar S, Quirion R. Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 1997 Aug;20(8):326-31. Review.
- Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2006 Oct 15;576(Pt 2):613-24.
- Drory VE, Goltsman E, Reznik JG, Mosek A, Korczyn AD. The value of muscle exercise in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2001 Oct 15;191(1-2):133-7.
- Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:79-101.
- Dupuis L. Oxidative stress sensitivity in ALS muscle cells. *Exp Neurol.* 2009b ;220(2):219-23.
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Eschbach J, Rene F, Oudart H, Halter B, Huze C, Schaeffer L, Bouillaud F, Loeffler JP. Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One.* 2009a;4(4):e5390.
- Dupuis L and Loeffler JP. Neuromuscular junction destruction in ALS. *Current Opinion in Pharmacology* 2009 ; 9:341–346
- Dupuis L, Loeffler JP. Amyotrophic lateral sclerosis: role of energy deficiency in neuromuscular junction dismantlement. *Med Sci (Paris).* 2008 Dec;24(12):1077-82. Review.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Roussel D, Bittar R, Seilhean D, Hauw JJ, Lacomblez L, Loeffler JP: Dyslipidemia is a protective factor in ALS. *Neurology* 2008 ; 70:1004-1009.
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Loeffler JP. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis also affects skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 2006 ; 34(2):253-4.
- Dupuis L, Oudart H, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:11159-11164.
- Dupuis L, di Scala F, Rene F, de Tapia M, Oudart H, Pradat PF, Meininger V, Loeffler JP. Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *Faseb J* 2003;17:2091-2093

- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, di Scala F, Rene F, de Tapia M, Pradat PF, Lacomblez L, Seihlan D, Prinjha R, Walsh FS, Meininger V, Loeffler JP. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2002 Aug;10(3):358-65.
- Egan B, Carson BP, Garcia-Roves PM, Chibalin AV, Sarsfield FM, Barron N, McCaffrey N, Moyna NM, Zierath JR, O'Gorman DJ. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2010 May 15;588(Pt 10):1779-90.
- Ekesterne, E. Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2004;1, 88–100
- Engesser-Cesar C, Anderson AJ, Basso DM, Edgerton VR, Cotman CW. Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2005 ; 22:157–171.
- Essig DA, Alderson NL, Ferguson MA, Bartoli WP, Durstine JL. Delayed effects of exercise on the plasma leptin concentration. *Metabolism*. 2000 Mar;49(3):395-9.
- Estevez AG, Crow JP, Sampson JB, Reiter C, Zhuang Y, Richardson GM, Tarpey MM, Barbeito L, Beckman, J.S. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* 1999 ;286 : 2498–2500.
- Febbraio MA: Exercise and inflammation. *J Appl Physiol* 2007; 103: 376–377
- Felmus MT, Patten BM, Swanke L. Antecedent events in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 1976 Feb;26(2):167-72.
- Fergani A, Oudart H, Gonzalez De Aguilar JL, Fricker B, René F, Hocquette JF, Meininger V, Dupuis L, Loeffler JP. Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Lipid Res* 2007 Jul;48(7):1571-80
- Ferraiuolo L, De Bono JP, Heath PR, Holden H, Kasher P, Channon KM, Kirby J, Shaw PJ. Transcriptional response of the neuromuscular system to exercise training and potential implications for ALS. *J Neurochem*. 2009 Jun;109(6):1714-24.
- Ferraiuolo L, Heath PR, Holden H, Kasher P, Kirby J, Shaw PJ. Microarray analysis of the cellular pathways involved in the adaptation to and progression of motor neuron injury in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J Neurosci*. 2007 Aug 22;27(34):9201-19.
- Ferrante RJ, Shinobu LA, Schulz JB, Matthews RT, Thomas CE, Kowall NW, Gurney ME, Beal MF. Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Ann Neurol*. 1997 ; 42: 326–334.
- Ferrer-Alcon M, Winkler-Hirt C, Madani R, Perrin FE, Kato AC. Low intensity exercise attenuates disease progression and stimulates cell proliferation in the spinal cord of a mouse model with progressive motor neuronopathy. *Neuroscience*. 2008 Mar 18;152(2):291-5.
- Figlewicz DA, Orrell RW. The genetics of motor neuron diseases. *ALS Other Motor Neuron Disord* 2003;4:225–231
- Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA, Julien JP. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 1994 Oct;3(10):1757-61.
- Figlewicz DA, Garruto RM, Krizus A, Yanagihara R, Rouleau GA. The Cu/Zn superoxide dismutase gene in ALS and parkinsonism-dementia of Guam. *Neuroreport*. 1994 Jan 31;5(5):557-60.
- Fimrite R. The battle of this life : Bob Waters is looking for answers to a deadly illness affecting former 49ers. *Sports illustrated* 1987 ; 67:72.
- Finsterer J, Stollberger C. Stroke in myopathies. *Cerebrovasc Dis*. 2010;29(1):6-13.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD: Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 2004, 185:232-240.
- Fisher BE, Petzinger GM, Nixon K, Hogg E, Bremner S, Meshul CK, Jakowec MW. Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinelesioned mouse basal ganglia. *J Neurosci Res* 2004 ; 77:378–390.
- Fluck M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity : from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 146:159-216.
- Foufelle F, Ferré P. Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology. *Med Sci (Paris)*. 2007;23(3):291-6.

- Fray, AE, Ince, PG, Banner, SJ, Milton, ID, Usher, PA, Cookson, MR, Shaw, PJ. The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 1998 ;10 :2481–2489
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci*. 2000 Apr 1;20(7):2534-42.
- Fulle S, Protasi F, Di Tano G, Pietrangelo T, Beltramin A, Boncompagni S, Vecchiet L, Fanò G. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp Gerontol*. 2004 Jan;39(1):17-24.
- Fuller PI, Reddrop C, Rodger J, Bellingham MC, Phillips JK. Differential expression of the NMDA NR2B receptor subunit in motoneuron populations susceptible and resistant to amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2006 May 15;399(1-2):157-61.
- Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, Ibáñez CF. Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science*. 1995 Jun 9;268(5216):1495-9.
- Garbuzova-Davis S, Saporta S, Haller E, Kolomey I, Bennett SP, Potter H, Sanberg PR. Evidence of compromised blood-spinal cord barrier in early and late symptomatic SOD1 mice modeling ALS. *PLoS One*. 2007 ; 2(11):e1205
- Garcia-Galloway E, Arango C, Pons S, Torres-Aleman I. Glutamate excitotoxicity attenuates insulin-like growth factor-I pro-survival signaling. *Mol Cell Neurosci*. 2003 Dec;24(4):1027-37.
- Gardiner P, Dai Y, Heckman CJ. Effects of exercise training on alpha-motoneurons. *J Appl Physiol*. 2006 Oct;101(4):1228-36. Review.
- Gomez-Cabrera MC, Viña J, Ji LL. Interplay of oxidants and antioxidants during exercise: implications for muscle health. *Phys Sportsmed*. 2009 Dec;37(4):116-23.
- Gomez-Merino D, Drogou C, Chennaoui M, Tiollier E, Mathieu J, Guezennec CY. Effects of combined stress during intense training on cellular immunity, hormones and respiratory infections. *Neuroimmunomodulation*. 2005;12(3):164-72.
- Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 2000;20:660-665
- Gonzalez de Aguilar JL, Niederhauser-Wiederkehr C, Halter B, De Tapia M, Di Scala F, Demougin P, Dupuis L, Primig M, Meininger V, Loeffler JP. Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiol Genomics* 2008 Jan 17;32(2):207-18
- Gonzalez de Aguilar JL, Gordon JW, René F, de Tapia M, Lutz-Bucher B, Gaiddon C, Loeffler JP. Alteration of the Bcl-x/Bax ratio in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: evidence for the implication of the p53 signaling pathway. *Neurobiol Dis*. 2000 Aug;7(4):406-15.
- Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW: Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 2006, 26:8774-8786.
- Grondard C, Biondi O, Pariset C, Lopes P, Deforges S, Lécolle S, Gaspera BD, Gallien CL, Chanoine C, Charbonnier F. Exercise-induced modulation of calcineurin activity parallels the time course of myofibre transitions. *J Cell Physiol*. 2008 Jan ; 214(1):126-35.
- Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lecolle S, Della GB, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F. Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 2005 ; 25:7615–7622.
- Gros-Louis F., Gaspar C., Rouleau G.A. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys. Acta* 2006 ; 1762 : 956–972.
- Guégan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S. Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*. 2001 Sep 1;21(17):6569-76.
- 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. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; 264: 1772–1775.
- Haase G, Pettmann B, Raoul C, Henderson CE. Signaling by death receptors in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2008 ;18(3):284-91

- 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 Jr., R.H., Scherer, S.W., Rouleau, G.A., Hayden, M.R., Ikeda, J.E. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 2001 ;29: 166–173
- Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 1998 ;23 : 249–256
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006 Jun;97(6):1634-58.
- Halter B, Gonzalez de Aguilar JL, Rene F, Petri S, Fricker B, Echaniz-Laguna A, Dupuis L, Larmet Y, Loeffler JP. Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2010 Apr 1;48(7):915-23.
- Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA. Transient caloric restriction in early adulthood hastens disease endpoint in male, but not female, Cu/Zn-SOD mutant G93A mice. *Muscle Nerve.* 2006 Dec;34(6):709-19.
- Hamadeh MJ, Rodriguez MC, Kaczor JJ, Tarnopolsky MA. Caloric restriction transiently improves motor performance but hastens clinical onset of disease in the Cu/Zn-superoxide dismutase mutant G93A mouse. *Muscle Nerve.* 2005 Feb;31(2):214-20.
- Hamilton NB, Attwell D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci.* 2010 Apr;11(4):227-38. Review.
- Harman D. Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956 ; 11 : 298-300.
- Harwood CA, McDermott CJ, Shaw PJ. Physical activity as an exogenous risk factor in motor neuron disease (MND): a review of the evidence. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009 Aug;10(4):191-204. Review.
- Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T, Hozumi I. Exercise induces metallothioneins in mouse spinal cord. *Neuroscience.* 2009 Sep 29;163(1):244-51.
- Hayward C, Colville S, Swingler RJ, Brock DJ. Molecular genetic analysis of the APEX nuclease gene in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 1999 Jun 10;52(9):1899-901
- Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T. Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol.* 2008 Jul 15;586(14):3337-51.
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2007 Nov;28(2):154-64.
- Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009 Dec;4(4):389-98. Review.
- Henneman E, Mendell LM. Functional organisation of the motoneuron pool and its inputs. In *Handbook of physiology : the nervous system II*, 1991 ; 423-507
- Hensley K, Mhatre M, Mou S, Pye QN, Stewart C, West M, Williamson KS. On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2006 ;8:2075–2087
- Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol.* 2009 Jun;11(6):747-52.
- Hideyama T, Yamashita T, Nishimoto Y, Suzuki T, Kwak S. Novel etiological and therapeutic strategies for neurodegenerative diseases: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Sci.* 2010;113(1):9-13.
- Higgins CM, Jung C, Xu Z. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* 2003;4:16
- Hirtz D., Thurman D.J., Gwinn-Hardy K., Mohamed M., Chaudhuri A.R., Zalutsky R. How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology*, 2007;68: 326–337.
- Hillel AD, Miller RM, Yorkston K, McDonald E, Norris FH, Konikow N. Amyotrophic lateral sclerosis severity scale. *Neuroepidemiology* 1989; **8**: 142–50.
- Hökfelt T, Broberger C, Xu ZQ, Sergeev V, Ubink R, Diez M. Neuropeptides--an overview. *Neuropharma.* 2000;39(8):1337-56.
- Hökfelt T. Neuropeptides in perspective: The last ten years. *Neuron* 1991 ; 7: 867–879.

- Holl N, Echaniz-Laguna A, Bierry G, Mohr M, Loeffler JP, Moser T, Dietemann JL, Kremer S. Diffusion-weighted MRI of denervated muscle: a clinical and experimental study. *Skeletal Radiol.* 2008 Dec;37(12):1111-7.
- Holzenberger M, Hamard G, Zaoui R, Leneuve P, Ducos B, Beccavin C, Périn L, Le Bouc Y. Experimental IGF-I receptor deficiency generates a sexually dimorphic pattern of organ-specific growth deficits in mice, affecting fat tissue in particular. *Endocrinology.* 2001 Oct;142(10):4469-78.
- Holzer N, Ziltener JL, Menetrey J. Plasticity of striated skeletal muscle: training effect and perspectives. *Rev Med Suisse.* 2006 ; 2(74):1798-804.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99:1604–1609
- Hoyle G. Muscle and their neural control. John Wiley and Son Eds, New-York, 1983
- Hozumi I, Yamada M, Uchida Y, Ozawa K, Takahashi H, Inuzuka T. The expression of metallothioneins is diminished in the spinal cords of patients with sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler.* 2008 Oct;9(5):294-8.
- Hsieh J and Gage FH. Epigenetic control of neural stem cell fate. *Current Opinion in Genetics & Development* 2004 ; 14:461–469
- Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development.* 1993 Aug;118(4):1137-47.
- Huxley AF. The mechanism of muscular contraction. *Science* 1969, 164 :1356-1475
- Ince PG, Shaw PJ, Slade JY, Jones C, Hudgson P. Familial amyotrophic lateral sclerosis with a mutation in exon 4 of the Cu/Zn superoxide dismutase gene: pathological and immunocytochemical changes. *Acta Neuropathol.* 1996 Oct;92(4):395-403. Review.
- Inserm. *Activité physique : Contextes et effets sur la santé.* Collection Expertise collective, Éditions Inserm, 2008.
- Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, Cleveland DW. Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron.* 2010 Aug 26;67(4):575-87.
- Ito Y, Yamada M, Tanaka H, Aida K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hozumi I, Inuzuka T, Takahashi H, Hara H. Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol Dis.* 2009 Dec;36(3):470-6
- Itoh H, Ohkuwa T, Yamamoto T, Sato Y, Miyamura M, Naoi M. Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. *Life Sci* 1998, 63 : 1921-1629
- Jacquier A, Buhler E, Schäfer MK, Bohl D, Blanchard S, Beclin C, Haase G. Alsin/Rac1 signaling controls survival and growth of spinal motoneurons. *Ann Neurol.* 2006 Jul;60(1):105-17.
- Jackson M, Al-Chalabi A, Enayat ZE, Chioza B, Leigh PN, Morrison KE. Copper/zinc superoxide dismutase 1 and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: analysis of 155 cases and identification of a novel insertion mutation. *Ann Neurol.* 1997 ;42(5):803-7.
- Jaekel B, Mühlberg K, Garcia de Arriba S, Reichenbach A, Verdaguer E, Pallas M, Camins A, Nörenberg W, Allgaier C. Neuroprotection associated with alternative splicing of NMDA receptors in rat cortical neurons. *Br J Pharmacol.* 2006 ;147(6):622-33.
- Jaiswal, M.K., Keller, B.U., Cu/Zn superoxide dismutase typical for familial amyotrophic lateral sclerosis increases the vulnerability of mitochondria and perturbs Ca²⁺ homeostasis in SOD1G93A mice. *Mol. Pharmacol.* 2009 ; 75, 478–489.
- Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J Neurosci.* 2008 Feb 27;28(9):2075-88.
- Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, London J, Holstege JC. Human Cu/Zn superoxide dismutase overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial ALS mutant SOD1. *Neurobiol Dis* 2000, 7:623-643.

- Jensen TE, Schjerling P, Viollet B, Wojtaszewski JF, Richter EA. AMPK α 1 activation is required for stimulation of glucose uptake by twitch contraction, but not by H₂O₂, in mouse skeletal muscle. *PLoS One*. 2008 May 7;3(5):e2102.
- Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2005 Feb;57(2):236-51.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96:25–34
- Johnson FO, Atchison WD. The role of environmental mercury, lead and pesticide exposure in development of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology* 2009 ;30(5):761-5
- Johnston, J.A., Dalton, M.J., Gurney, M.E., Kopito, R.R. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97: 12571–12576.
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Dimou L, Lin S, Fergani A, Ruegg MA, Schwab ME, Dupuis L, Loeffler JP: The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* 2006;7:1162-1167.
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Pradat PF, Dupuis L, Echaniz-Laguna A, Muller A, Dubourg O, Seilhean D, Hauw JJ, Loeffler JP. Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* 2005, 57:553-556.
- Jokic N, Di Scala F, Dupuis L, Rene F, Muller A, Gonzalez De Aguilar JL, Loeffler JP. Early activation of antioxidant mechanisms in muscle of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase-linked amyotrophic lateral sclerosis mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec ; 1010:552-6.
- Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*. 1995 Feb;16(1):3-34.
- Jones DA, Newham DJ, Round JM, Tolfree SE. Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. *J Physiol*. 1986 Jun;375:435-48.
- Jørgensen SB, Richter EA, Wojtaszewski JF. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol*. 2006 Jul 1;574(Pt 1):17-31.
- Juan L, Dawei Z, Julie AD. Increased number and differentiation of neural precursor cells in the brainstem of superoxide dismutase 1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 2007 Mar;29(2):204-9
- Jung C, Higgins CM, Xu Z. A quantitative histochemical assay for activities of mitochondrial electron transport chain complexes in mouse spinal cord sections. *J Neurosci Methods*. 2002 Mar 15;114(2):165-72.
- Kanai K, Kuwabara S, Misawa S, Tamura N, Ogawara K, Nakata M, Sawai S, Hattori T, Bostock H. Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain*. 2006 ;129(Pt 4):953-62
- Karamouzis I, Karamouzis M, Vrabas IS, Christoulas K, Kyriazis N, Giannoulis E, Mandroukas K. The effects of marathon swimming on serum leptin and plasma neuropeptide Y levels. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Feb;40(2):132-6.
- Kasarskis EJ, Berryman S, Vanderleest JG, Schneider AR, McClain CJ. Nutritional status of patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to the proximity of death. *Am J Clin Nutr*. 1996 Jan;63(1):130-7.
- Kaspar BK, Frost LM, Christian L, Umaphathi P, Gage FH. Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2005 ; 57:649–655.
- Kaspar BK, Lladó J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 2003;301(5634):839-42.
- Kato AC, Vingerhoets FJ, Magistris MR, Kuntzer T, Burkhard PR. Pathogenic mechanisms of neurodegenerative diseases: amyotrophic lateral sclerosis. *Rev Med Suisse* 2006 May 3;2(64):1152-4
- Kato S, Kato M, Abe Y, Matsumura T, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E. Redox system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated familial ALS, and SOD1-mutated ALS animal models. *Acta Neuropathol* 2005 Aug;110(2):101-12

- Kato S, Shimoda M, Watanabe Y, Nakashima K, Takahashi K, Ohama E. Familial amyotrophic lateral sclerosis with a two base pair deletion in superoxide dismutase 1: gene multisystem degeneration with intracytoplasmic hyaline inclusions in astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 Oct;55(10):1089-101.
- Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature.* 2004 Feb 26;427(6977):801.
- Kennel PF, Finiels F, Revah F, Mallet J. Neuromuscular function impairment is not caused by motor neurone loss in FALS mice: an electromyographic study. *Neuroreport* 1996 ; 7(8):1427-31.
- Kieran D, Hafezparast M, Bohnert S, Dick JR, Martin J, Schiavo G, Fisher EM, Greensmith L. A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J Cell Biol.* 2005 May 23;169(4):561-7.
- Kiernan MC. Amyotrophic lateral sclerosis and the neuroprotective potential of exercise. *J Physiol.* 2009 Aug 1;587(Pt 15):3759-60.
- Kikuchi H., Almer G., Yamashita S., Guegan C., Nagai M., Xu Z., Sosunov AA., McKhann GM., Przedborski S. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 6025–6030.
- Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(4):396-405.
- Kim J, Kim TY, Hwang JJ, Lee JY, Shin JH, Gwag BJ, Koh JY. Accumulation of labile zinc in neurons and astrocytes in the spinal cords of G93A SOD-1 transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 2009 May;34(2):221-9.
- Kino-Québec. Quantité d'activité physique requise pour en retirer des bénéfices pour la santé. Avis du comité scientifique du secrétariat au loisir et au sport et ministère de la Santé et des Services sociaux, gouvernement du Québec, 1999.
- Kirby J, Halligan E, Baptista MJ, Allen S, Heath PR, Holden H, Barber SC, Loynes CA, Wood-Allum CA, Lunec J, Shaw PJ. Mutant SOD1 alters the motor neuronal transcriptome: implications for familial ALS. *Brain* 2005 Jul; 128(7):1686-706
- Kirkinezos IG, Hernandez D, Bradley WG, Moraes CT. Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2003 ; 53:804–807.
- Klintsova AY, Cowell RM, Swain RA, Napper RM, Goodlett CR, Greenough WT. Therapeutic effects of complex motor training on motor performance deficits induced by neonatal binge-like alcohol exposure in rats. *Brain Res.* 1998 Jul 27;800(1):48-61.
- Knight JC, Scharf EL, Mao-Draayer Y. Fas activation increases neural progenitor cell survival. *J Neurosci Res.* 2010 ; 88(4):746-57.
- Koliatsos V.E., Crawford T.O., Price D.L. Axotomy induces nerve growth factor receptor immunoreactivity in spinal motor neurons. *Brain Res.* 1991; 549, 297–304.
- Kong, J., Xu, Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J. Neurosci.* 1998 ; 18: 3241–3250.
- Kostrominova TY, Pasyk KA, Van Remmen H, Richardson AG, Faulkner JA. Adaptive changes in structure of skeletal muscles from adult Sod1 homozygous knockout mice. *Cell Tissue Res.* 2007 Mar;327(3):595-605.
- Kraft AD, Resch JM, Johnson DA, Johnson JA. Activation of the Nrf2-ARE pathway in muscle and spinal cord during ALS-like pathology in mice expressing mutant SOD1. *Exp Neurol.* 2007 Sep;207(1):107-17.
- Kramer AF, Erickson KI. Capitalizing on cortical plasticity: influence of physical activity on cognition and brain function. *Trends Cogn Sci* 2007 ; 11:342–348.
- Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature.* 1999 Jul 29;400(6743):418-9.
- Kriegstein AR, Götz M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia.* 2003 Jul;43(1):37-43.
- Kuipers H. Exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med.* 1994 Apr;15(3):132-5.
- Kuo JJ, Siddique T, Fu R, Heckman CJ. Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J Physiol.* 2005 Mar 15;563(Pt 3):843-54.
- Kushner PD, Stephenson DT, Wright S. Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991 ; 50, 263–277

- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Powe L, Durrleman S, Delumeau JC, Meininger V. A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. *ALS/Riluzole Study Group-II. Neurology* 1996; 47:s242-250
- Lai E.C., Felice K.J., Festoff B.W, Gawel M.J., Gelinis D.F., Kratz R., Murphy M.F., Natter H.M., Norris F.H., Rudnicki S.A. Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS: a placebo-controlled study, *Neurology* 1997; 49: 1621–1630.
- 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. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.* 2003; 34: 383–394.
- Larsen JO, Skalicky M, Viidik A. Does long-term physical exercise counteract age-related Purkinje cell loss? A stereological study of rat cerebellum. *J Comp Neurol.* 2000 Dec 11;428(2):213-22.
- Leclerc N, Ribera F, Zoll J, Warter JM, Poindron P, Lampert E, Borg J. Selective changes in mitochondria respiratory properties in oxidative or glycolytic muscle fibers isolated from G93A human SOD1 transgenic mice. *Neuromuscul Disord* 2001 ;11(8):722-7.
- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995 Jan 13;80(1):155-65.
- Le Grand F, Rudnicki M. Satellite and stem cells in muscle growth and repair. *Development* 2007 Nov;134(22):3953-7.
- Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, Buller J, Swash M, Martin JE, Gallo JM, Weller RO, Anderton BH. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral : Morphology, distribution and specificity. *Brain* 1991 ; 114 (2) : 775-788
- Lepore AC, Haenggeli C, Gasmi M, Bishop KM, Bartus RT, Maragakis NJ, Rothstein JD. Intraparenchymal spinal cord delivery of adeno-associated virus IGF-1 is protective in the SOD1G93A model of ALS. *Brain Res.* 2007 Dec 14;1185:256-65.
- Li W, Brakefield D, Pan Y, Hunter D, Myckatyn TM, Parsadanian A. Muscle-derived but not centrally derived transgene GDNF is neuroprotective in G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Exp Neurol.* 2007 Feb;203(2):457-71.
- Li J, Ding YH, Rafols JA, Lai Q, McAllister JP, Ding Y. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neuroscience Letters* 2005; 386, 160–164.
- Li TM, Alberman E, Swash M. Clinical features and associations of 560 cases of motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1990 Dec;53(12):1043-5.
- Liebetanz D, Hagemann K, VonLewinski F, Kahler E, Paulus W. Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience* 2004, 20: 3115–3120.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 2002; 418:797-801.
- Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 2002 ; 22:4825-4832
- Llansola M, Sanchez-Perez A, Cauli O, Felipe V. Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *Cerebellum.* 2005;4(3):154-61.
- Llorens-Martín M, Torres-Alemán I, Trejo JL. Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol Cell Neurosci.* 2010 Jun;44(2):109-17.
- Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, Cleveland DW. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 Mar 17;106(11):4465-70
- Longstreth WT, McGuire V, Koepsell TD, Wang Y, van Belle G. Risk of amyotrophic lateral sclerosis and history of physical activity: a population-based case-control study. *Archives of Neurology.* 1998;55:201
- Longstreth WT, Nelson LM, Koepsell TD, van Belle G. Hypotheses to explain the association between vigorous physical activity and amyotrophic lateral sclerosis. *Med Hypotheses.* 1991 Feb;34(2):144-8.

- Ludolph, A.C., 2006. Matrix metalloproteinases—a conceptual alternative for disease-modifying strategies in ALS/MND? *Exp. Neurol.* 201, 277–280.
- Luquin N, Yu B, Trent RJ, Morahan JM, Pamphlett R. An analysis of the entire SOD1 gene in sporadic ALS. *Neuromuscul Disord.* 2008 Jul;18(7):545-52.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. Energy on demand. *Science.* 1999 Jan 22;283(5401):496-7.
- Malaspina A, Ngoh SF, Ward RE, Hall JC, Tai FW, Yip PK, Jones C, Jokic N, Averill SA, Michael-Titus AT, Priestley JV. Activation transcription factor-3 activation and the development of spinal cord degeneration in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience.* 2010 Aug 25;169(2):812-27.
- Mahoney, D. J., Rodriguez, C., Devries, M., Yasuda, N., Tarnopolsky, M. A. Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2004; 29: 656–662.
- Major LA, Hegedus J, Weber DJ, Gordon T, Jones KE. Method for counting motor units in mice and validation using a mathematical model. *J Neurophysiol.* 2007 Feb;97(2):1846-56.
- Martin LJ, Liu Z, Chen K, Price AC, Pan Y, Swaby JA, Golden WC. Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J Comp Neurol.* 2007 Jan 1;500(1):20-46.
- Martin LJ, Chen K, Liu Z. Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation. *J Neurosci.* 2005;25(27):6449-59.
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M.F., Manfredi, G. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2002;277: 29626–29633
- Mattson MP, Cutler RG, Camandola S: Energy intake and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromol Med* 2007,9:17-20
- McCrane ME, Kaspar BK. Physical activity and neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromol Med.* 2008 ; 10(2):108-17
- McKenzie MJ, Goldfarb AH. Aerobic exercise bout effects on gene transcription in the rat soleus. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 Sep;39(9):1515-21.
- McKenzie D, Bua E, McKiernan S, Cao Z, Aiken JM; Wanagat J. Mitochondrial DNA deletion mutations: a causal role in sarcopenia. *Eur J Biochem.* 2002 Apr;269(8):2010-5.
- Mei Y, Yuan Z, Song B, Li D, Ma C, Hu C, Ching YP, Li M. Activating transcription factor 3 up-regulated by c-Jun NH(2)-terminal kinase/c-Jun contributes to apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *Neuroscience.* 2008 Feb 6;151(3):771-9.
- Messi ML, Clark HM, Pevette DM, Oppenheim RW, Delbono O. The lack of effect of specific overexpression of IGF-1 in the central nervous system or skeletal muscle on pathophysiology in the G93A SOD-1 mouse model of ALS. *Exp Neurol.* 2007 Sep;207(1):52-63.
- Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 3820-5.
- Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umapathi P, Arnson H, Rizo L, Mendell JR, Gage FH, Cleveland DW, Kaspar BK. Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 Dec 19;103(51):19546-51
- Miller RG, Mitchell JD, Lyon DH, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) /motor neuron disease (MND). *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2003 ; 4 :191-206
- Millers JB. Myoblasts, myosins, MyoDs and the diversification of muscle fibers. *Disorders* 1991, 1 : 7-17
- Mitchell J, Morris A, de Belleruche J. Thioredoxin reductase 1 haplotypes modify familial amyotrophic lateral sclerosis onset. *Free Radic Biol Med* 2009 Jan 15;46(2):202-11
- Mitchell JD, Borasio GD. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2007 ; 369:2031-2041
- Morton JP, Kayani AC, McArdle A, Drust B. The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. *Sports Med.* 2009;39(8):643-62.

- Moulard B, Salachas F, Chassande B, Briolotti V, Meininger V, Malafosse A, Camu W. Association between centromeric deletions of the SMN gene and sporadic adult-onset lower motor neuron disease. *Ann Neurol*. 1998 May;43(5):640-4.
- Mourelatos, Z., Gonatas, N.K., Stieber, A., Gurney, M.E., Dal Canto, M.C. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93: 5472–5477.
- Mu X, He J, Anderson DW, Trojanowski JQ, Springer JE. Altered expression of bcl-2 and bax mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord motor neurons. *Ann Neurol*. 1996 Sep;40(3):379-86.
- Mulder DW, Kurland LT, Offord KP, Beard CM. Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 1986 Apr;36(4):511-7.
- Muller FL, Song W, Jang YC, Liu Y, Sabia M, Richardson A, Van Remmen H. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Sep;293(3):R1159-68.
- Munoz DG, Greene C, Perl DP, Selkoe DJ. Accumulation of phosphorylated neurofilaments in anterior horn motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1988 Jan;47(1):9-18.
- Muravchick S. Clinical implications of mitochondrial disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(13-14):1553-60.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S : Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 2007;10:615–622
- Nagano I, Ilieva H, Shiote M, Murakami T, Yokoyama M, Shoji M, Abe K. Therapeutic benefit of intrathecal injection of insulin-like growth factor-1 in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2005 ; 235 : 61–68
- Nagata T, Ilieva H, Murakami T, Shiote M, Narai H, Ohta Y, Hayashi T, Shoji M, Abe K. Increased ER stress during motor neuron degeneration in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*. 2007 Dec;29(8):767-71.
- Nakano Y, Hirayama K, Terao K. Hepatic ultrastructural changes and liver dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 1987 ; 44:103-106
- Narai H, Nagano I, Ilieva H, Shiote M, Nagata T, Hayashi T, Shoji M, Abe K. Prevention of spinal motor neuron death by insulin-like growth factor-1 associating with the signal transduction systems in SODG93A transgenic mice. *J Neurosci Res*. 2005;82(4):452-7.
- Narbonne P, Roy R. AMP-activated protein kinase (AMPK) allows prolonged energy stockpile. *Med Sci (Paris)* 2009;25(6-7):565-6.
- Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang YX, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, Evans RM. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell*. 2008 Aug 8;134(3):405-15.
- Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K. et coll. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006 ; 314 : 130-133.
- Neusch C, Bahr M & Schneider-Gold C. Glia cells in amyotrophic lateral sclerosis: new clues to understanding and old disease? *Muscle Nerve*, 2007 ; 35 : 712–724.
- Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev*. 2008;22(11):1451-64.
- Norris F, Shepherd R, Denys E, U K, Mukai E, Elias L, Holden D, Norris H. Onset, natural history and outcome in idiopathic adult motor neuron disease. *J Neurol Sci*. 1993 Aug;118(1):48-55.
- Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudenbach V, Vermylen P, Raat H, Acker T, Vlemminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciort R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*. 2001 ; 28(2):131-8.
- Otto A, Patel K. Signalling and the control of skeletal muscle size. *Exp Cell Res*. 2010 Nov 1;316(18):3059-66. Review.

- Ozdinler PH, Macklis JD. IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci.* 2006 Nov;9(11):1371-81.
- Palecek J, Lips MB, Keller BU. Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *J Physiol* 1999 ; 520(2): 485–502
- Pambo-Pambo A, Durand J, Gueritaud JP. Early excitability changes in lumbar motoneurons of transgenic SOD1G85R and SOD1G(93A-Low) mice. *J Neurophysiol.* 2009;102(6):3627-42.
- Pang TY, Stam NC, Nithianantharajah J, Howard ML, Hannan AJ. Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience* 2006 ;141:569–584.
- Parkhouse WS, Cunningham L, McFee I, Miller JM, Whitney D, Pelech SL, Krieger C. Neuromuscular dysfunction in the mutant superoxide dismutase mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 2008;9(1):24-34.
- Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PLoS One.* 2010 Feb 24;5(2):e9386.
- Patel BP, Hamadeh MJ. Nutritional and exercise-based interventions in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Nutr* 2009; 28(6):604-17
- Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, Brown RH. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 2004;43: 19–30.
- Pedersen WA, Fu W, Keller JN, Markesbery WR, Appel S, Smith RG, Kasarskis E, Mattson MP. Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Neurol.* 1998 ;44(5):819-24.
- Peihar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman S, Estevez AG, Barbeito L. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2004 ; 89 : 464–473
- Peihar M, Vargas MR, Robinson KM, Cassina P, Diaz-Amarilla PJ, Hagen TM, Radi R, Barbeito L, Beckman JS. Mitochondrial superoxide production and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in p75 neurotrophin receptor-induced motor neuron apoptosis. *J Neurosci* 2007 ; 27:7777–7785
- Pellerin L, Magistretti PJ. Neuroscience. Let there be (NADH) light. *Science.* 2004 Jul 2;305(5680):50-2.
- Perrie WT, Lee GT, Curtis EM, Sparke J, Buller JR, Rossi ML. Changes in the myelinated axons of femoral nerve in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm Suppl.* 1993;39:223-33.
- Pettmann B, Raoul C, Haase G. Death of the motor neurones in amyotrophic lateral sclerosis: suicide or murder? *Med Sci (Paris).* 2006 Nov;22(11):923-5.
- Perrin F, Boisset G, Lathuiliere A, Kato AC. Cell death pathways differ in several mouse models with motoneurone disease: analysis of pure motoneurone populations at a presymptomatic age. *J Neurochem.* 2006;98(6):1959-72.
- Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol.* 1997;170:143-223.
- Piquet MA. Nutritional approach for patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Rev Neurol.* 2006 ;162 Spec No 2:4S177-4S187.
- Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen O, Kahn BB, Ohkuwa T, Vinten J, Galbo H. Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1990 ;259(6 Pt 1):E778-86.
- Pradat PF, Bruneteau G, Gordon PH, Dupuis L, Bonnefont-Rousselot D, Simon D, Salachas F, Corcia P, Frochet V, Lacorte JM, Jardel C, Coussieu C, Le Forestier N, Lacomblez L, Loeffler JP, Meininger V. Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 2010;11(1-2):166-71
- Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 2001 May 15;21(10):3369-74
- Prouteau S. Physiopathology of anabolic androgenic steroids abuse. *Annales Médico-psychologiques, revue psychiatrique,* 2008 ; 166(10) : 841-842
- Pinto, A. C., Alves, M., Nogueira, A. Can amyotrophic lateral sclerosis patients with respiratory insufficiency exercise? *J. Neurological Sciences,* 1999; 169: 69–75.

- Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 2003 Feb;24(1):78-90. Review.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci.* 2006 Mar;9(3):408-19
- Puttapparthi K, Van Kaer L, Elliott JL : Assessing the role of immuno-proteasomes in a mouse model of familial ALS. *Exp Neurol* 2007 ; 206(1):53-8
- Puttapparthi K, Wojcik C, Rajendran B, DeMartino GN, Elliott JL. Aggregate formation in the spinal cord of mutant SOD1 transgenic mice is reversible and mediated by proteasomes. *J Neurochem* 2003 ; 87 : 851–860
- Puttapparthi K, Gitomer WL, Krishnan U, Son M, Rajendran B, Elliott JL. Disease progression in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis is dependent on both neuronal and non-neuronal zinc binding proteins. *J Neurosci.* 2002 Oct 15;22(20):8790-6.
- Radak, Z., Naito, H., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Cardozo-Pelaez, F., Goto, S. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.*, 2002 ; 445 : 273–278.
- Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem.* 2002 ;383(3-4):401-9.
- Ramsden, M., Berchtold, N.C., Patrick Kesslak, J., Cotman, C.W., Pike, C.J. Exercise increases the vulnerability of rat hippocampal neurons to kainate lesion. *Brain Res.*, 2003; 971 : 239–244.
- Rao SD, Yin HZ, Weiss JH. Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. *J Neurosci* 2003 ; 23:2627–2633
- Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997, 15 : 707-747
- Raoul C, Buhler E, Sadeghi C, Jacquier A, Aebischer P, Pettmann B, Henderson CE, Haase G. Chronic activation in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice of a feedback loop involving Fas, Daxx, and FasL. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6007
- Raoul, C., Estevez, A.G., Nishimune, H., Cleveland, D.W., deLapeyriere, O., Henderson, C.E., Haase, G., Pettmann, B.. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 2002;35: 1067–1083.
- Raoul C, Henderson CE, Pettmann B. Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J Cell Biol.* 1999 Nov 29;147(5):1049-62.
- Ravits J, Paul P, Jorg C. Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology.* 2007a May 8;68(19):1571-5.
- Ravits J, Laurie P, Fan Y, Moore DH. Implications of ALS focality: rostral-caudal distribution of lower motor neuron loss postmortem. *Neurology.* 2007b May 8;68(19):1576-82.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Scott RW, Snider WD. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 1996;13: 43–47
- Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J.* 2009 Mar 1;418(2):261-75.
- Riddoch-Contreras J, Yang SY, Dick JR, Goldspink G, Orrell RW, Greensmith L. Mechano-growth factor, an IGF-I splice variant, rescues motoneurons and improves muscle function in SOD1(G93A) mice. *Exp Neurol.* 2009 ; 215(2) : 281-9.
- 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., Hertzfeldt, 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. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362: 59–62.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 1996 ; 16:675–686

- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1995b ; 38 :73–84
- Rothstein JD : Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis *Adv Neurol* 1995a;68:7-20
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 1992 ; 326 :1464–1468
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1990 Jul;28(1):18-25.
- Rouaux C, Panteleeva I, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz- Laguna A, Dupuis L, Menger Y, Boutillier AL, Loeffler JP. Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J. Neurosci*. 2007 ; 27: 5535–5545.
- Rowland, L.P., Shneider, N.A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344:1688–1700.
- Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP, Dériaz O. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* 2003 ;52(12):2874-81.
- Sargsyan SA, Monk PN, Shaw PJ. Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*. 2005 Sep;51(4):241-53.
- Sasabe J, Chiba T, Yamada M, Okamoto K, Nishimoto I, Matsuoka M, Aiso S. D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 2007 ; 26(18):4149-59
- Sasaki S. Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010 Apr;69(4):346-55.
- Sasaki S, Warita H, Komori T, Murakami T, Abe K, Iwata M. Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivity in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res*. 2006 Apr 14;1083(1):196-203.
- Sasaki S, Warita H, Abe K, Iwata M. Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol*. 2005 Jul;110(1):48-56.
- Sasaki S, Iwata M. Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 1996; 204:53-56
- Sato T, Nakanishi T, Yamamoto Y, Andersen PM, Ogawa Y, Fukada K, Zhou Z, Aoike F, Sugai F, Nagano S, Hirata S, Ogawa M, Nakano R, Ohi T, Kato T, Nakagawa M, Hamasaki T, Shimizu A, Sakoda S. Rapid disease progression correlates with instability of mutant SOD1 in familial ALS. *Neurology* 2005;6: 1954–1957.
- Saxena S, Cabuy E, Caroni P. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci*. 2009 May;12(5):627-36.
- Scherer SS, Wrabetz L. Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies. *Glia*. 2008;56(14):1578-89.
- Schönfeld P, Reiser G. Ca²⁺ storage capacity of rat brain mitochondria declines during the postnatal development without change in ROS production capacity. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Feb;9(2):191-9.
- Schutz Y, Weinsier RL, Hunter GR. Assessment of free-living physical activity in humans: an overview of currently available and proposed new measures. *Obes Res* 2001, 9:368-379
- Seeburger J. L., Tarras S., Natter H., Springer J.E. Spinal cord motoneurons express p75NGFR and p145trkB mRNA in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*. 1993; 621, 111–115.
- Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000 ; 72(Suppl 2): S653-9.
- Shefner JM, Reaume AG, Flood DG, Scott RW, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Upton-Rice M, Brown RH Jr. Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology*. 1999 Oct 12;53(6):1239-46.
- Shibata N, Asayama K, Hirano A, Kobayashi M. Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurosci*. 1996;18(5-6):492-8.

- Shirakawa K, Suzuki H, Ito M, Kono S, Uchiyama T, Ohashi T, Miyajima H. Novel compound heterozygous ALS2 mutations cause juvenile amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Neurology*. 2009 Dec 15;73(24):2124-6.
- Siamilis S, Jakus J, Nyakas C, Costa A, Mihalik B, Falus A, Radak Z. The effect of exercise and oxidant-antioxidant intervention on the levels of neurotrophins and free radicals in spinal cord of rats. *Spinal Cord*. 2009 Jun;47(6):453-7.
- Siddique T, Figlewicz DA, Pericak-Vance MA, Haines JL, Rouleau G, Jeffers AJ, Sapp P, Hung WY, Bebout J, McKenna-Yasek D, et al. Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N Engl J Med*. 1991 May 16;324(20):1381-4.
- Simpson C.L., Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis as a complex genetic disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2006;1762:973–985.
- Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Always SE. Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscle after endurance training. *J Appl Physiol* 2004, 97 : 277-285
- Sondell M, Sundler F, Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci* 2000;12:4243–4254
- Sorenson EJ, Windbank AJ, Mandrekar JN, Bamlet WR, Appel SH, Armon C, Barkhaus PE, Bosch P, Boylan K, David WS, Feldman E, Glass J, Gutmann L, Katz J, King W, Luciano CA, McCluskey LF, Nash S, Newman DS, Pascuzzi RM, Pioro E, Sams LJ, Scelsa S, Simpson EP, Subramony SH, Tiryaki E, Thornton CA. Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. *Neurology*. 2008 ; 71(22):1770-5.
- Spencer PS. Guam ALS/parkinsonism-dementia: a long-latency neurotoxic disorder caused by "slow toxin(s)" in food? *Can J Neurol Sci*. 1987 Aug;14(3 Suppl):347-57. Review.
- Staats KA, Van Den Bosch L. Astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis: direct effects on motor neuron survival. *J Biol Phys* 2009 Oct;35(4):337-46
- Stauber J, Lemaire R, Franck J, Bonnel D, Croix D, Day R, Wisztorski M, Fournier I, Salzet M. MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting. *J Proteome Res*. 2008;7(3):969-78.
- Stieber A, Gonatas JO, Gonatas NK. Aggregation of ubiquitin and a mutant ALS-linked SOD1 protein correlate with disease progression and fragmentation of the Golgi apparatus. *J Neurol Sci*. 2000 Feb 1;173(1):53-62.
- Stipa G, Taiuti R, de Scisciolo G, Arnetoli G, Tredici MR, Biondi N, Barsanti L, Lolli F. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis as an infectious disease: a possible role of cyanobacteria? *Med Hypotheses*. 2006;67(6):1363-71.
- Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci*. 1998 Sep;1(5):366-73.
- Ström AL, Shi P, Zhang F, Gal J, Kilty R, Hayward LJ, Zhu H. Interaction of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related mutant copper-zinc superoxide dismutase with the dynein-dynactin complex contributes to inclusion formation. *J Biol Chem*. 2008 ; 283 (33) : 22795-805.
- Strong MJ. The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neurol Sci*. 2010 Jan 15;288(1-2):1-12.
- Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberté C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker K. Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. *J Neurosci*. 2005;25(11):2838-52.
- Taioli E. All-causes mortality in male professional soccer players. *European Journal of Public Health*. 2007;17:600-4.
- Tanaka Y, Tamoto H, Tozuka Z, Sato A, Kimura T. Metabolism and degradation products of recombinant human insulin-like growth factor-I in lysosomes of rat kidney. *Xenobiotica*. 1999 Mar;29(3):281-95.
- Tang K, Xia FC, Wagner PD, Breen EC. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010 Jan 31;170(1):16-22.
- Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T. Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Hum Mol Genet*. 2009 Mar 1;18(5):942-55.
- Taylor AR, Gifondorwa DJ, Newbern JM, Robinson MB, Strupe JL, Prevette D, Oppenheim RW, Milligan CE. Astrocyte and muscle-derived secreted factors differentially regulate motoneuron survival. *J Neurosci*. 2007 Jan 17;27(3):634-44.
- Terada S, Tabata I. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Feb;286(2):E208-16.

- Tiraby C, Langin D. PGC-1alpha, a transcriptional coactivator involved in metabolism. *Med Sci* 2005 ; 21(1):49-54
- Ticozzi N, Ratti A, Silani V. Protein aggregation and defective RNA metabolism as mechanisms for motor neuron damage. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010 Jul;9(3):285-96.
- Tölle TR, Berthele A, Zieglgänsberger W, Seeburg PH, Wisden W. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci*. 1993 Dec;13(12):5009-28.
- Tosca L, Chabrolle C, Dupont J. AMPK: a link between metabolism and reproduction? *Med Sci (Paris)*. 2008 Mar;24(3):297-300.
- Torres-Aleman I. Role of insulin-like growth factors in neuronal plasticity and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol*. 2005;567:243-58.
- Torres-Aleman I, Barrios V, Berciano J. The peripheral insulin-like growth factor system in amyotrophic lateral sclerosis and in multiple sclerosis. *Neurology*. 1998 Mar;50(3):772-6.
- Tortarolo M, Veglianese P, Calvaresi N, Botturi A, Rossi C, Giorgini A, Migheli A, Bendotti C. Persistent activation of p38 mitogen-activated protein kinase in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis correlates with disease progression. *Mol Cell Neurosci*. 2003 Jun;23(2):180-92.
- Towne C, Raoul C, Schneider BL, Aebischer P: Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Mol Ther* 2008, 16:1018-1025.
- Trejo JL, Llorens-Martín MV, Torres-Alemán I. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 2008 Feb;37(2):402-11.
- Trejo JL, Carro E, Garcia-Galloway E, Torres-Aleman I. Role of insulin-like growth factor I signaling in neurodegenerative diseases. *J Mol Med*. 2004 Mar;82(3):156-62. Review
- Troost D, Van den Oord JJ, Vianney de Jong JM. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1990 Oct;16(5):401-10.
- Troost D, van den Oord JJ, de Jong JM, Swaab DF. Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol*. 1989 Nov-Dec;8(6):289-94.
- Trotti, D, Rolfs, A, Danbolt, NC, Brown, RH, Jr, Hediger, MA. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 1999 ; 2 : 427–433
- Turner BJ, Ackerley S, Davies KE, Talbot K. Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. *Hum Mol Genet* 2010b ;19(5):815-24
- Turner MR, Scaber J, Goodfellow JA, Lord ME, Marsden R, Talbot K. The diagnostic pathway and prognosis in bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2010a Jul 15;294(1-2):81-5.
- Turner BJ, Parkinson NJ, Davies KE, Talbot K. Survival motor neuron deficiency enhances progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neurobiol Dis*. 2009b Jun;34(3):511-7.
- Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2009a; 8(1):94-109
- Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 2008 ; 85(1):94-134
- Turner BJ, Atkin JD, Farg MA, Zang DW, Rembach A, Lopes EC, Patch JD, Hill AF, Cheema SS. Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci*. 2005 ; 25: 108–117.
- Turner BJ, Lopes EC, Cheema SS. Neuromuscular accumulation of mutant superoxide dismutase 1 aggregates in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2003 Oct 23;350(2):132-6.
- Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2006 ; 9 :108–118
- Urushitani M, Kurisu J, Tsukita K, Takahashi R. Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2002 ; 83 : 1030–1042

- Urushitani M, Shimohama S. The role of nitric oxide in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2001 Jun;2(2):71-81. Review
- Vaisman N, Lusaus M, Nefussy B, Niv E, Comaneshter D, Hallack R, Drory VE. Do patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have increased energy needs? *J Neurol Sci.* 2009 Apr 15;279(1-2):26-9.
- Valdmanis PN, Rouleau GA. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2008 Jan 8;70(2):144-52. Review.
- Valenti M, Pontieri FE, Conti F, Altobelli E, Manzoni T, Frati L. Amyotrophic lateral sclerosis and sports: a casecontrol study. *Eur J Neurol.* 2005;12:223-5.
- Van Adel BA, Tarnopolsky MA. Metabolic myopathies: update 2009. *J Clin Neuromuscul Dis.* 2009;10(3):97-121.
- 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. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 :14825–14830
- Van Den Bosch L, Storkebaum E, Vlemminckx V, Moons L, Vanopdenbosch L, Scheveneels W, Carmeliet P, Robberecht W. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* 2004 ; 17 :21–28
- Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999 ; 96 :13427-13431.
- Vanacore N, Binazzi A, Bottazzi M, Belli S. Amyotrophic lateral sclerosis in an Italian professional soccer player. *Parkinsonism Relat Disord* 2006 Jun;12(5):327-9
- Vargas MR, Pehar M, Díaz-Amarilla PJ, Beckman JS, Barbeito L. Transcriptional profile of primary astrocytes expressing ALS-linked mutant SOD1. *J Neurosci Res* 2008 Dec;86(16):3515-25
- Veglianese P, Lo Coco D, Cutrona M Bao, Magnoni R, Pennacchini D, Pozzi B, Gowing G, Julien JP, Tortarolo M, Bendotti C. Activation of the p38 MAPK cascade is associated with upregulation of TNF alpha receptors in the spinal motor neurons of mouse models of familial ALS. *Mol Cell Neurosci* 2006 ; 31:218–231
- Veldink JH, Kalmijn S, Van der Hout AH, Lemmink HH, Groeneveld GJ, Lummen C, Scheffer H, Wokke JH, Van den Berg LH. SMN genotypes producing less SMN protein increase susceptibility to and severity of sporadic ALS. *Neurology.* 2005b Sep 27;65(6):820-5.
- Veldink JH, Kalmijn S, Groeneveld GJ, Titulaer MJ, Wokke JH, van den Berg LH. Physical activity and the association with sporadic ALS. *Neurology.* 2005a Jan 25;64(2):241-5.
- Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH, van den Berg LH. Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord.*, 2003 ; 13: 737–743.
- Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, Heinze HJ, Elger CE, Schubert W, Kunz WS. Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2000;123:1339-1348
- Vielhaber S, Winkler K, Kirches E, Kunz D, Buchner M, Feistner H, Elger CE, Ludolph AC, Riepe MW, Kunz WS. Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1999;169:133-139
- Vlug AS, Teuling E, Haasdijk ED, French P, Hoogenraad CC, Jaarsma D. ATF3 expression precedes death of spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis-SOD1 transgenic mice and correlates with c-Jun phosphorylation, CHOP expression, somato-dendritic ubiquitination and Golgi fragmentation. *Eur J Neurosci.* 2005 ; 22:1881–1894.
- Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC. Fatigue and activity dependent changes in axonal excitability in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007 Nov;78(11):1202-8.
- Vucic S, Kiernan MC. Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2006 Jul;117(7):1458-66.
- Wan IF, Wu IS, Shen CKJ. TDP-43 : an emerging new player in neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine* 2008; 14: 479-485.
- Wang X, Fan H, Ying Z, Li B, Wang H, Wang G. Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neurosci Lett.* 2010 Jan 18;469(1):112-6.

- Wang J, Farr GW, Zeiss CJ, Rodriguez-Gil DJ, Wilson JH, Furtak K, Rutkowski DT, Kaufman RJ, Ruse CI, Yates JR 3rd, Perrin S, Feany MB, Horwich AL. Progressive aggregation despite chaperone associations of a mutant SOD1-YFP in transgenic mice that develop ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 3;106(5):1392-7.
- Wang J, Xu G, Borchelt DR. High molecular weight complexes of mutant superoxide dismutase 1: age-dependent and tissue-specific accumulation. *Neurobiol Dis*. 2002 Mar;9(2):139-48.
- Warita H, Manabe Y, Murakami T, Shiote M, Shiro Y, Hayashi T, Nagano I, Shoji M, Abe K. Tardive decrease of astrocytic glutamate transporter protein in transgenic mice with ALS-linked mutant SOD1. *Neurol Res*. 2002 Sep;24(6):577-81.
- Westarp ME, Ferrante P, Perron H, Bartmann P, Kornhuber HH. Sporadic ALS/MND: a global neurodegeneration with retroviral involvement? *J Neurol Sci*. 1995 May;129 Suppl:145-7.
- Westerblad H, Bruton JD, Katz A. Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Exp Cell Res*. 2010 Nov 1;316(18):3093-9.
- Wiedau-Pazos, M., Goto, J.J., Rabizadeh, S., Gralla, E.B., Roe, J.A., Lee, M.K., Valentine, J.S., Bredesen, D.E. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 1996;271:515-518.
- Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem*. 2002 Feb;80(4):616-25.
- Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz WS. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1998;156:65-72
- Williams TL, Day NC, Ince PG, Kamboj RK, Shaw PJ. Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1997 Aug;42(2):200-7.
- Wisztorski M, Lemaire R, Stauber J, Ait Menguellat S, Jardin-Mathé O, Day R, Salzet M, Fournier I. [MALDI imaging: a new technology to discover and validate new biomarkers]. *Med Sci (Paris)* 2007 ; Spec No 1:31-6.
- Wilczak N., de Vos R.A., De Keyser J.. Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2003 ; 361 : 1007- 1011
- Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat. Neurosci*. 1999; 2: 50-56.
- Woodhoo A, Sommer L. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia*. 2008 Nov 1;56(14):1481-90.
- Wootz, H., Hansson, I., Korhonen, L., Lindholm, D. XIAP decreases caspase-12 cleavage and calpain activity in spinal cord of ALS transgenic mice. *Exp. Cell Res*. 2006; 312: 1890-1898.
- Wu D, Yu W, Kishikawa H, Folkert RD, Iafrate AJ, Shen Y, Xin W, Sims K, Hu GF. Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2007 Dec;62(6):609-17.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2008 Mar;11(3):251-3
- Yan Q, Snider WD, Pinzone JJ, Johnson EM Jr. Retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in motoneurons of developing rats: assessment of potential neurotrophic effects. *Neuron*. 1988 Jun;1(4):335-43.
- Yang Y, Hentati A, Deng H, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T. 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*. 2001;29:160-165
- Ye P, Price W, Kassiotis G, Kollias G, D'Ercole AJ. Tumor necrosis factor-alpha regulation of insulin-like growth factor-I, type 1 IGF receptor, and IGF binding protein expression in cerebellum of transgenic mice. *J Neurosci Res*. 2003 Mar 1;71(5):721-31.
- Yonashiro R, Sugiura A, Miyachi M, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Ogata Y, Suzuki T, Dohmae N, Yanagi S. Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. *Mol Biol Cell*. 2009 Nov;20(21):4524-30.
- Yoshii Y, Hadano S, Otomo A, Kawabe K, Ikeda K, Iwasaki Y. Lower serum lipid levels are related to respiratory impairment in patients with ALS. *Neurology*. 2010 Jun 15;74(24):2027; author reply 2027-8.

- Yoshioka T, Inagaki K, Noguchi T, Sakai M, Ogawa W, Hosooka T, Iguchi H, Watanabe E, Matsuki Y, Hiramatsu R, Kasuga M. Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1alpha gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 17;381(4):537-43.
- Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S. Glutamate receptors : RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 2004 ; 427 : 801
- Zang DW, Cheema SS. Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1(G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett*. 2002 ; 332: 99–102.
- Zhang D, Bar-Eli M, Meloche S, Brodt P. Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals. *J Biol Chem*. 2004;279(19):19683-90.
- Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, Appel SH. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia*. 2010 Jan 15 ; 58(2):231-43.
- Zhao CP, Zhang C, Wang YH, Zhou SN, Zhou C, Li WY, Yu MJ. Signals in pathological CNS extracts of ALS mice promote hMSCs neurogenic differentiation in vitro. *Cell Biol Int*. 2007 Nov;31(11):1428-35.
- Zhong Z, Deane R, Ali Z, Parisi M, Shapovalov Y, O'Banion MK, Stojanovic K, Sagare A, Boillee S, Cleveland DW, Zlokovic BV. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci* 2008 ; 11(4):420-2
- Zhou J, Yi J, Fu R, Liu E, Siddique T, Ríos E, Deng HX. Hyperactive intracellular calcium signaling associated with localized mitochondrial defects in skeletal muscle of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*. 2010 Jan 1;285(1):705-12.
- Zhu Z, Jiang W, Sells JL, Neil ES, McGinley JN, Thompson HJ. Effect of nonmotorized wheel running on mammary carcinogenesis: circulating biomarkers, cellular processes, and molecular mechanisms in rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Aug;17(8):1920-9.
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*. 2004 Nov 19;306(5700):1383-6.
- Zoccollella S, Beghi E, Palagano G, et al. Predictors of delay in the diagnosis and clinical trial entry of amyotrophic lateral sclerosis patients: a population-based study. *J Neurol Sci* 2006; 250: 45–49.

ABREVIATIONS

ACC : acetyl-coA carboxylase
 ADN : Acide DesoxyriboNucléique
 ADP : Adénosine Di-Phosphate
 AMP : Adénosine Mono-Phosphate
 AMPA : α Amino 3-hydroxy 5-Methyl 4-isoxazole Propionic
 AMPA_R : α Amino 3-hydroxy 5-Methyl 4-isoxazole Propionic recepteur
 AMPK : AMP-activated protein kinase
 ARE : Antioxidant Response Element
 ARN : Acide RiboNucléique
 ARNm : ARN messagers
 ASI : Amyotrophie Spinale Infantile
 ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
 ATF-3 : Activating Transcription Factor 3
 ATP : Adénosine Tri-Phosphate
 BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor
 BHE : Barrière Hemato-Encéphalique
 Ca²⁺ : ion calcium
 ChAT : acétyle choline transférase
 Cl⁻ : ion chlorure
 CPT-1: carnitine palmitoyl transférase
 CNTF : Ciliary NeuroTrophic Factor
 CREB : Cyclic AMP Response Element Binding Protein
 DMSO : dyméthyl sulfoxide
 E13 : âge de l'embryon calculé à partir de la fécondation
 eIF2 α : eukaryotic initiator factor 2alpha
 EAAT : transporteurs d'acides aminés excitateurs
 EMG : électromyogramme
 ERK : Extracellular-signal Regulated Kinase
 Fas : récepteur de mort de la famille des récepteurs au [TNF \$\alpha\$](#) , appelé également APO-1ou CD95
 FasL : ligand du récepteur Fas
 FF : Fast Fatiguable, unités motrices rapides et fatigables
 FOXO : Forkhead box o-class
 FR : Fast Resistant, unités motrices résistantes
 GDNF : Glial Derived Neurotrophic Factor
 GH : hormone de croissance (Growth Hormone ou somatropine ou somatotropine)
 GLUT4 : transporteur au glucose 4
 H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
 HDL : lipoprotéine de haute densité
 HSP : protéines de choc thermique
 IGF-1 : Insuline like Growth Factor type 1
 IGF-1R : Insuline like Growth Factor type 1receptor
 IGFBP : Insuline like Growth Factor binding proteins
 IL : Interleukine
 IR : récepteur de l'insuline
 IRS : Insuline Receptor Substrat
 JNK : c-Jun N-terminal Kinase
 JNM : Jonction Neuro-Musculaire
 K⁺ : ion potassium
 LDH : lactate deshydrogénase
 LDL : lipoprotéine de faible densité
 LPL : lipoprotéine lipase
 MDC : malonyl-coA décarboxylase
 mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

MGF : mecano growth factor
 MUNE : Motor Unit Number Estimation
 MyHC : Myosin Heavy Chain
 Na⁺ : ion sodium
 NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
 NFκB : Nuclear Factor κ B
 NGF : Nerve Growth Factor
 NMDA : N-Méthyl D-Aspartate
 NMDA_R : N-Méthyl D-Aspartate recepteur
 NO• : nitric oxyde, monoxyde d'azote radicalaire
 NOS : nitric oxyde synthase ; neuronale (nNOS) , endothéliale (eNOS) et inductible (iNOS)
 NPCs : Neural Progenitor Cells
 Nrf2 : nuclear factor erythroid 2-related factor 2
 O₂^{•-} : anion superoxyde radicalaire
 ONOO⁻ : ion peroxytriflate
 •OH : radical hydroxylé
 p38 : mitogen activating protein kinase p38
 p75^{NTR} : p75 neurotrophin receptor
 P90 : âge en jours post natal
 PCK : Phospho-Créatine Kinase
 PI3K/Akt : Phosphatidyl Inositol-3Kinase / Akt
 PGC-1α : peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1alpha
 PPAR : peroxisome proliferator activator receptor
 Rad : Ras associée au diabète
 RE : Réticulum Endoplasmique
 ROS : reactive oxygen species
 S : Slow, unités motrices lentes
 SLA : sclérose latérale amyotrophique
 SLAf : formes familiales d'origine génétique
 SLAs : formes sporadiques
 SMN : Survival of Motor Neuron
 SNC : Système Nerveux Central
 SOD1 : SuperOxyde Dismutase de type 1
 SOD1^{G93A} : protéine SOD1 mutée en position 93, substitution de la Glycine par une Alanine
 souris SLA : lignée transgénique SOD1^{G93A} sauf indications
 TDP-43 : TAR-DNA binding protein 43
 TNFα : Tumor Necrosis Factor alpha
 TNFR1 : récepteur de type 1 au TNFα
 UCP : UnCoupling Protein
 UPR : Unfolded Protein Response
 VDAC1 : Voltage-Dependent Anion Channel type 1
 VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor
 VLDL : lipoprotéine de très faible densité

Introduction

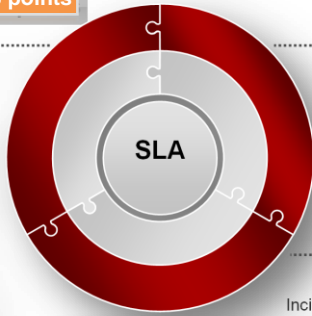
La sclérose amyotrophique latérale (SLA) est une maladie caractérisée par la mort des motoneurons supérieurs et inférieurs, ce qui affecte les cellules nerveuses dans le cerveau et la moelle épinière contrôlant la fonction musculaire. Dans le cas de la SLA dans l'espèce humaine, des mutations portant sur plusieurs gènes différents peuvent être responsables de la maladie, mais toutes ces mutations entraînent le même phénotype pathologique, en l'occurrence la production d'une enzyme mutante induisant la dégénérescence des motoneurons par excitotoxicité glutaminergique. Les signes cliniques apparaissent tardivement (vers 50-60 ans), l'issue est fatale (elle intervient en moyenne dans les 3 ans qui suivent l'apparition des symptômes).

Un modèle murin transgénique reproduit le phénotype de la SLA et permet son étude ; cette souris porte un grand nombre de transgène SOD1 humain muté (souris SLA). La souris porteuse du gène présente les premiers symptômes de la maladie vers 90 jours et meurt vers 120 jours. Des expériences ont montré que la pratique d'un exercice forcé retarde l'apparition des premiers symptômes et augmente de façon significative la durée de vie.

Deux types d'entraînements peuvent être pratiqués : la course ou la nage. L'entraînement à la nage permet d'augmenter la durée de vie des souris SLA de 25 jours en moyenne, alors que l'entraînement à la course n'a pas d'effet. L'entraînement à la nage permet également le ralentissement de la chute du nombre moyen de motoneurons et la réduction de la progression de la dégénérescence neuronale. La nage préserve les astrocytes et les populations d'oligodendrocytes de moelle épinière dans la SLA.

Dans le cadre de cette étude, l'imagerie MALDI a été utilisée pour étudier les modifications impliquées dans les neurones activés spécifiquement par l'entraînement et ainsi mieux comprendre les bénéfices de l'exercice de nage.

La SLA en 3 points



Historique

1850: maladie musculaire étudiée par Guillaume Duchenne de Boulogne

1853: mise en évidence d'une atteinte de la moelle épinière

1874: description des symptômes et des lésions macroscopiques et microscopique de la moelle par Charcot

La maladie

Atteinte spécifique des motoneurons
 Dérégulation cellulaire de la gestion du stress oxydatif (gène SOD)
 Phénomène d'excitotoxicité

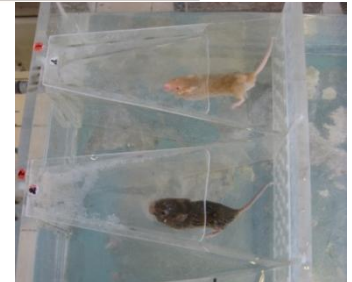
Epidémiologie

Incidence 1 pour 100 000 par an
 Prévalence de 5 à 7 pour 100 000
 Espérance de vie inférieure à 4 ans

Entraînement des souris

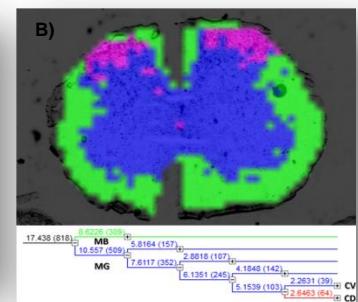
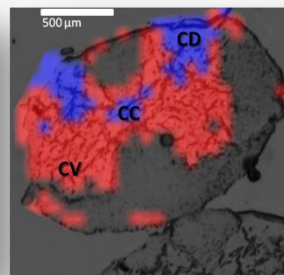
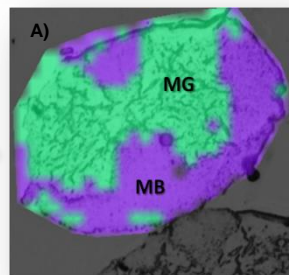
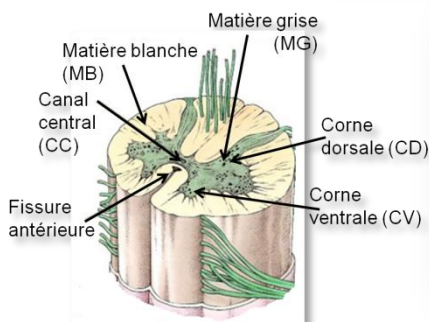


course



nage

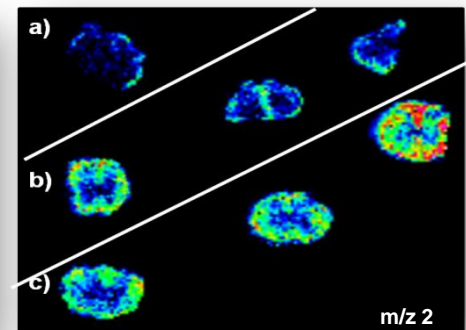
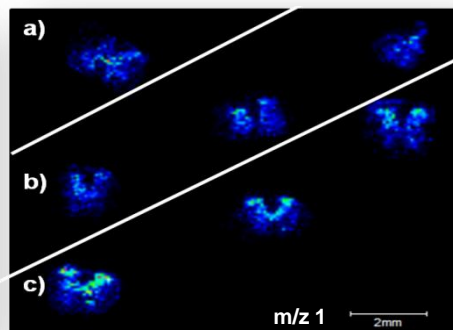
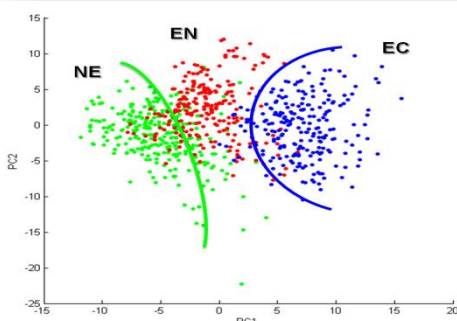
Classification hiérarchique



L'analyse statistique par classification hiérarchique permet de déterminer les différentes régions en corrélation avec les informations histologiques des coupes de moelle épinière. Ce type de représentation permet de distinguer les régions d'intérêt notamment pour les ME issues des souris SLA dont la structure ne permet pas de définir facilement la zone des cornes dorsales. Cette analyse peut-être faite sur les peptides, les protéines (A) et les lipides (B)

Les spectres des régions d'intérêt (ROI) sont ensuite extraits et analysés grâce à l'analyse par composante principale (PCA).

Analyse statistique par composante principale



La PCA permet de différencier les ME des souris SLA non entraînées (NE), entraînées à la course (EC), entraînées à la nage (EN). Cette analyse permet de définir des m/z ayant des localisations différentes suivant le type d'entraînement. La répartition du m/z 1 (B) est plus spécifique des souris (c) et disparaît lors de l'entraînement nage (b). La protéine m/z 2 est localisée dans la substance blanche des souris NE (c), diminue lors d'un entraînement nage (b) et semble pratiquement absente lors d'un entraînement course (a).

Conclusion

➤ Pour l'étude de la SLA l'imagerie par spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence :

- ✓ des modifications induites par l'entraînement nage
- ✓ des mécanismes de neuroprotection différents entre la nage et la course
- ✓ des différences à plusieurs niveaux: lipides, peptides, protéines

➤ MALDI-MSI

- ✓ Outil rapide de comparaison d'organismes dans différents états
- ✓ Permet de comprendre rapidement des modifications du métabolisme ou d'expression de lipides, peptides ou protéines suite à un traitement.

Conclusion

Remerciements

- Ministère de la recherche et des technologies
- Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
- Agence Nationale pour la recherche (ANR)
- Barbara Deltavica
- Shimada

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie du motoneurone la plus fréquente du sujet adulte, pour laquelle aucun diagnostic et aucun traitement curatif efficace n'existent à ce jour. Il existe des formes de SLA familiales héréditaires (10% des cas) ou sporadiques (90% des cas) qui résulteraient de l'interaction entre une prédisposition génétique et des facteurs exogènes de nature diversifiée, mais la similarité du tableau clinique de ces deux formes suggère des mécanismes pathologiques communs. L'implication de mutations sur le gène SOD1 dans la SLA a permis le développement de modèles rongeurs de la maladie (souris SLA). L'étude de ces modèles a démontré que la mort des motoneurones serait une conséquence de la dénervation des jonctions neuromusculaires induite par l'activité toxique de la SOD1 mutée dans le muscle qui génère un fort stress oxydant et un hypermétabolisme énergétique.

De par ces effets sur l'ensemble du système moteur et sur le métabolisme énergétique, l'exercice physique pourrait être envisagé comme traitement thérapeutique de la SLA. Malgré leurs bénéfices sur plusieurs maladies neurodégénératives, des exercices de course ont des effets controversés pour les souris SLA. Ils seraient bénéfiques et activeraient des mécanismes neuroprotecteurs lors d'une pratique à intensité modérée, alors qu'une pratique à intensité soutenue serait néfaste. Cependant, aucune hypothèse cellulaire ou moléculaire n'explique ces différences.

Dans ce contexte scientifique, au sein de l'équipe « dégénérescence et plasticité neuromusculaire » du CEsEM (UMR 8194 CNRS-Université Paris Descartes), nous avons développé un nouvel ergomètre pour souris : une piscine à courant ajustable. Dans un premier temps, nous avons comparé les adaptations neuromusculaires d'une population de souris sauvages soumise à un entraînement à la nage ou à la course sur tapis roulant motorisé. La nage - un exercice de forte intensité - recrute préférentiellement les unités motrices rapides : elle active les motoneurones de large surface et sollicite les fibres musculaires rapides au métabolisme glycolytique aérobie. Au contraire, la course à intensité modérée recrute préférentiellement les unités motrices lentes : elle active les motoneurones de surface réduite et induit des transitions des fibres musculaires rapides vers lentes au métabolisme anaérobie.

Dans un deuxième temps, nous avons soumis une population de souris SLA SOD1^{G93A} à un entraînement à la nage ou à la course. Dans nos conditions expérimentales, seule la nage a des effets bénéfiques sur les souris SLA ; elle retarde l'apparition des symptômes de 16 jours et allonge la durée de vie de 25 jours en moyenne. Au niveau de la moelle épinière, elle limite la mort des motoneurones et protège spécifiquement les motoneurones de surface de soma comprise entre 500 et 700 μm^2 . Elle protège également les populations non-neurales ; elle limite l'astrogliose réactionnelle et la disparition des oligodendrocytes. Au niveau des muscles squelettiques, elle contre les modifications typologiques, l'atrophie et l'aplasie induites par la SLA.

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans les effets de ces deux exercices chez les souris SLA, nous avons initié des études approfondies des adaptations spécifiques à chacun de ces exercices, notamment celles du métabolisme énergétique. Nous avons défini le statut métabolique des souris SLA SOD1^{G93A} : comme les patients SLA, ces souris présentent un hypermétabolisme lipidique associé à une diminution significative de l'utilisation du glucose dès la phase asymptomatique et caractérisé, à P115, par une perte de 26% de la masse corporelle, de 88% de la masse du tissu adipeux de l'épididyme et de 32% de la masse du foie sans stéatose. Chez les souris SLA, la nage contrairement à la course augmente l'utilisation du glucose et préserve les réserves lipidiques. Cette induction d'un métabolisme glycolytique par la nage pourrait expliquer en partie les effets bénéfiques de cet exercice sur le développement de la SLA.

Parmi les stratégies thérapeutiques testées sur les souris SLA, l'ampleur des bénéfices obtenus par un entraînement à la nage est l'une des plus élevées. Au vu de ces performances, un protocole de nage pourrait être proposé aux patients SLA comme traitement kinésique. A long terme, la détermination des mécanismes responsables des bénéfices de la nage sur les souris SLA nous permettrait de pouvoir proposer aux patients SLA, de nouvelles voies thérapeutiques médicamenteuses.

Mots clés : SLA, nage, survie, neuroprotection, métabolisme