



HAL
open science

Rôle de la stéaroyl-coenzyme A désaturase 1, une enzyme de synthèse des acides gras mono-insaturés, dans un modèle transgénique d'étude de la Sclérose Latérale Amyotrophique

Florent Schmitt

► **To cite this version:**

Florent Schmitt. Rôle de la stéaroyl-coenzyme A désaturase 1, une enzyme de synthèse des acides gras mono-insaturés, dans un modèle transgénique d'étude de la Sclérose Latérale Amyotrophique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ085 . tel-01198377

HAL Id: tel-01198377

<https://theses.hal.science/tel-01198377>

Submitted on 12 Sep 2015

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.

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé (ED 414)

INSERM U1118 Mécanismes Centraux et Périphériques de la
Neurodégénérescence

THÈSE présentée par :

Florent SCHMITT

soutenue le : 11 septembre 2013

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

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

**Rôle de la stéaroyl-coenzyme A désaturase 1,
une enzyme de synthèse des acides gras mono-insaturés,
dans un modèle transgénique d'étude de
la Sclérose Latérale Amyotrophique**

THÈSE dirigée par :

Mr LOEFFLER Jean-Philippe

Directeur de Recherches, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr CHARBONNIER Frédéric

Mr LIZARD Gérard

Professeur des Universités, Université Paris Descartes

Chargé de Recherches, Université de Bourgogne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr POTIER Serge

Mr SALACHAS François

Mr SELLAL François

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Médecin Hospitalier, Hôpital Pitié Salpêtrière Paris

Médecin Hospitalier, Hôpitaux Civils, Strasbourg-Colmar

Qui recherche la Lune ne voit pas les étoiles.

[Proverbe français]

Remerciements

Cette thèse sur le rôle de la stéaroyl-coenzyme A désaturase 1, dans un modèle transgénique d'étude de la Sclérose Latérale Amyotrophique a été réalisée au sein du Laboratoire des Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence (INSERM U1118).

Je voudrais en premier lieu remercier très chaleureusement le Dr. Jean-Philippe Loeffler qui a accepté de m'accueillir au sein du laboratoire et m'a soutenu dans toutes les étapes de ma thèse. Je lui fais part de toute ma gratitude pour son action à mon égard qui a permis que ma thèse se déroule dans les meilleures conditions. Je lui suis reconnaissant de s'être toujours rendu disponible dans son rôle de Directeur de thèse, malgré les nombreuses sollicitations liées à son poste de Directeur de laboratoire. Je garderai en mémoire ses grandes connaissances, sa soif de savoir, sa rigueur, son exigence, mais aussi sa profonde humanité.

Je tiens également à remercier tout particulièrement le Dr. José-Luis Gonzalez de Aguilar qui a été pour moi un véritable guide dans l'organisation des "manips", ainsi que dans la compréhension et l'apprentissage du métier de chercheur. Merci pour ses nombreux conseils, pistes de réflexions, discussions, soutiens.

Un grand merci aussi au Dr. Alexandre Henriques (Alex) pour m'avoir transmis, toujours avec beaucoup d'enthousiasme, sa motivation quotidienne et pour m'avoir enseigné sa rigueur et son savoir-faire.

Je remercie respectueusement les membres du jury, le Pr. Frédéric Charbonnier, le Dr. Gérard Lizard, le Pr. Serge Potier, le Dr François Salachas ainsi que le Dr François Sellal, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Ces travaux n'ont pu être réalisés que grâce au soutien financier de l'association AREMANE et de l'Association Française contre les Myopathies (AFM). Je les remercie de m'avoir accordé cette aide précieuse.

Je souhaite remercier le Dr. Françoise Bindler et le Pr. Eric Marchioni de l'UMR7178, Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, équipe de chimie analytique des molécules bioactives, pour leur aide et pour l'analyse des chromatographies en phase gazeuse.

Un grand merci à tous les membres du labo qui m'ont apporté leurs conseils et savoir-faire techniques en fonction de leurs spécialités respectives. Merci à Frédérique (Fred) pour ses indispensables apports en histologie et en expérimentation animale et à Sylvie pour l'imagerie et les western blots. Je suis reconnaissant à Luc pour ses conseils et sa transmission de connaissances et à Hugues pour sa gentillesse et ses conseils concernant les études métaboliques.

Je tiens également à remercier Annie, Marie-Jo et Brigitte pour leurs aides techniques et administratives. Merci à Laurette et Christian, ainsi qu'à Marc, Michèle, Caroline, Yves et Martine. Je souhaite aussi saluer les autres membres de l'équipe avec qui j'ai pu travailler, échanger des idées, des projets, des moments de détente, d'humour, d'amitié : Aurélia, Hajer, Jelena, Laura, Lavinia, Pauline, "Alex", "Huss", Jérôme et Thiebault. Mes remerciements aux anciens qui m'ont fait découvrir le fonctionnement du labo, les moindres recoins et les faces cachées de cette machine à chercher... et comprendre : Benoît, Judith, Fahad, Pauline-bis, Yannick, Yann, Marjorie, Orphée, Cynthia, Olivier, Vania et Romain. Merci enfin aux personnages invisibles avec qui certains membres du labo parlent régulièrement, seuls face à un congélateur ou une étagère. Ils semblent souvent leur être d'une grande utilité.

Je ne peux terminer ces remerciements sans évoquer le soutien de mes parents, de Vivi, Thierry et Margot, qui ont été présents pour moi tout au long de mes études. Merci de m'avoir conseillé, soutenu et encouragé dans mes choix. J'ai aussi une pensée émue pour mes grands-parents aujourd'hui disparus, qui, par leur patience, leur présence, leur attention, ont partagé mes projets d'enfant et m'ont transmis leurs valeurs.

Sommaire

ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	6
I) La sclérose latérale amyotrophique (SLA)	7
I.1 Généralités.....	7
I.2 Epidémiologie	8
I.3 Diversité de la SLA	10
I.3.1 Génétique de la SLA	11
I.3.1.a Formes familiales.....	11
I.3.1.b Formes sporadiques	19
I.3.2 Aspects cliniques	22
I.3.3 Critères d'évaluation et diagnostic différentiel	23
I.3.3.a Echelles fonctionnelles	25
I.3.3.b Techniques d'évaluation	26
I.3.3.c Biomarqueurs.....	27
I.4 Caractéristiques histopathologiques de la SLA.....	29
II) Hypothèses physiopathologiques et recherches	29
II.1 Les modèles animaux : une aide précieuse.....	30
II.2 La SLA, une pathologie pluricellulaire : Les acteurs cellulaires.....	34
II.2.1 Les motoneurons.....	34
II.2.2 Les cellules myélinisantes.....	36
II.2.3 Les microglies.....	38
II.2.4 Les astrocytes.....	39
II.3 La SLA, une pathologie multifactorielle : Mécanismes physiopathologiques	41
II.3.1 Stress oxydant : la SOD1 mutée	41
II.3.1.a Formation d'agrégats toxiques de la SOD1 mutée.....	42
II.3.1.b Stress du réticulum endoplasmique, dysfonctionnement mitochondrial et apoptose	43
II.3.2 Excitotoxicité glutamatergique	46
II.4 Altérations métaboliques : une histoire de lipides	47
II.4.1 L'hypermétabolisme dans la SLA	47
II.4.1.a Dysfonctionnements métaboliques.....	47
II.4.1.b Un muscle énergivore	48
II.4.1.c Le muscle un acteur suicidaire ?	50
II.4.2 Influence lipidique sur la balance pathologique.....	53
Revue 1	56

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIF DE THESE.....	57
RESULTATS.....	60
CHAPITRE I :.....	61
ANALYSE DU PROFIL D'ACIDES GRAS DES SOURIS SOD1M	61
I.1 Profil d'acides gras	62
I.1.1 Utilisation d'une chromatographie gazeuse	62
I.1.2 Chromatographie gazeuse	62
I.2 Stratégie et plan expérimental	63
I.2.1 Levée de rideau sur SCD1 : Historique et implication dans la pathologie.....	63
I.2.2 Données du transcriptome et justification du choix de la SCD1.....	64
I.3 Résumé des résultats	65
I.3.1 Altération du profil d'acides gras dans le sérum des souris SOD1m	65
I.3.2 Altération du profil d'acides gras dans le foie des souris SOD1m.....	65
I.3.3 Baisse de l'activité de la SCD1 et modulation pharmacologique	66
I.3.4 Restauration de l'activité de la SCD1 chez les souris SOD1m	66
Article 1	68
I.3.5 Données complémentaires sur l'état d'innervation des souris SOD1m dont l'activité de la SCD1 a été restaurée.	69
Conclusion de l'étude.....	70
CHAPITRE II :	71
INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE LA SCD1 SUR L'AXE NEUROMUSCULAIRE	71
II.1 Objectif de l'étude.....	72
II.2 Résumé et discussion des résultats	73
Article 2	75
II.3 Intérêt de cette étude dans la recherche sur la SLA.....	76
CHAPITRE III:.....	77
ETUDE D'UNE INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA SCD1 SUR LES SOURIS SOD1M.....	77
III.1 Une diminution systémique de la SCD1 a-t-elle un effet bénéfique sur les souris SOD1m ?.....	78
III.2 Stratégie expérimentale.....	78
III.3 Résultats et discussion	79
III.3.1 Contrôle de l'expression et de l'activité de la SCD1.....	79
III.3.2 Examen électromyographique et analyse de l'innervation.....	80
III.3.3 Analyse de l'état métabolique musculaire	81
III.3.4 Evaluation de la neuroprotection motoneuronale	82

III.4 Apports de cette étude dans la recherche sur la SLA	83
DISCUSSION	84
I) Contexte originel : le phénotype métabolique de la SLA	85
II) Les acides gras dans la SLA : implications multiples	87
III) SCD1 dans un contexte neurodégénératif	89
IV) Apport de l'inhibition pharmacologique de la SCD1 dans la SLA	92
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	94
ANNEXES :	95
Revue 2	96
BIBLIOGRAPHIE	97

Abréviations

AAV	Adeno associated virus, virus adéno-associé
AG	Acides gras
AIF-1	allograft inflammatory factor 1
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARA	Acide Arachidonique
ATP	Adenosin triphosphate, adénosine triphosphate
CERT	Ceramide transfert protein, Protéine de transfert des céramides
CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2B, protéine coporelle multivésiculaire chargée 2B
CIVM	Contraction isométrique volontaire maximale
COX1	Cyclooxygénase 1
DFT	Démences fronto-temporales
DHA	Acide Docosahexaénoïque
EEAT2	Excitatory amino acid transporter, transporteur astrocytaire du glutamate
EMG	Electromyographie
EPA	Acide Eicosapentaénoïque
ESCRTIII	Endosomal secretory complex required for transport
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GDNF	Glial cell-line-derived neurotrophic factor, facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales
GEF	Guanine nucléotide exchange factor, facteur d'échange du GTP
GFAP	Glial fibrillary acidic protein, protéine acide fibrillaire gliale
HDL	High density lipoprotein, lipoprotéine de haute densité
HMGB1	High mobility group box1
HSP	Heat shock proteins, protéine de choc thermique
IBA1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IGF1	Insulin-like growth factor, facteur de croissance analogue à l'insuline
JNM	Jonction neuromusculaire
L-BMAA	L-Beta-Methylaminoalanine
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDL	Low density lipoprotein, lipoprotéines de basse densité
LOX	Lipoxygénase
LXR	Liver X receptor, récepteur X du foie
MBP	Protéine de myéline
MF-438	Inhibiteur de l'activité SCD1
MMT	Manual muscle testing
MN	Motoneurones
MUFA	Monounsaturated fatty acid, acides gras mono-insaturés
NFL	Neurofilaments
NGF	Nerve growth factor, facteur de croissance des nerfs

NMC	Neurones moteurs corticaux
NM	Neurones moteurs
NMDA	N-méthyl D-aspartate
OSPPs	Oxysterol binding proteins
P2X, P2Y	Récepteurs purinergiques
PCR	Polymerase chain reaction, réaction de polymérase en chaîne
PGC-1alpha	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PET	Tomographie par émission de positrons
PPAR	
gamma	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PUFA	Polyunsaturated fatty acid, acides gras poly-insaturés
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène
ROT	Réflexes ostéo-tendineux
RXR	Retinoid X receptor
SCD1	Stéaroyl-coenzyme-A désaturase 1
SFA	Saturated fatty acid, acides gras saturés
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SLAf	Sclérose Latérale Amyotrophique familiale
SLAs	Sclérose Latérale Amyotrophique sporadique
SLP	Sclérose Latérale Primitive
SMA	Spinal muscular atrophy, atrophie musculaire spinale
SMN	Survival of motor neuron, facteur de survie des motoneurones
SNC	Système nerveux centrale
SNP	Système nerveux périphérique
SOD1	Superoxyde dismutase à cuivre et zinc
SOD1m	Superoxyde dismutase à cuivre et zinc mutée
TDP-43	TARDP: TAR DNA-binding protein-43
TG	Triglycérides
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
UPR	unfolded protein response, réponse aux protéine déroulées
VAPB	VAMP associated membrane protein B, protéine B associée à la VAMP
VCP	Valosin containing protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VLDL	Very low density lipoprotein, lipoprotéines de très basse densité

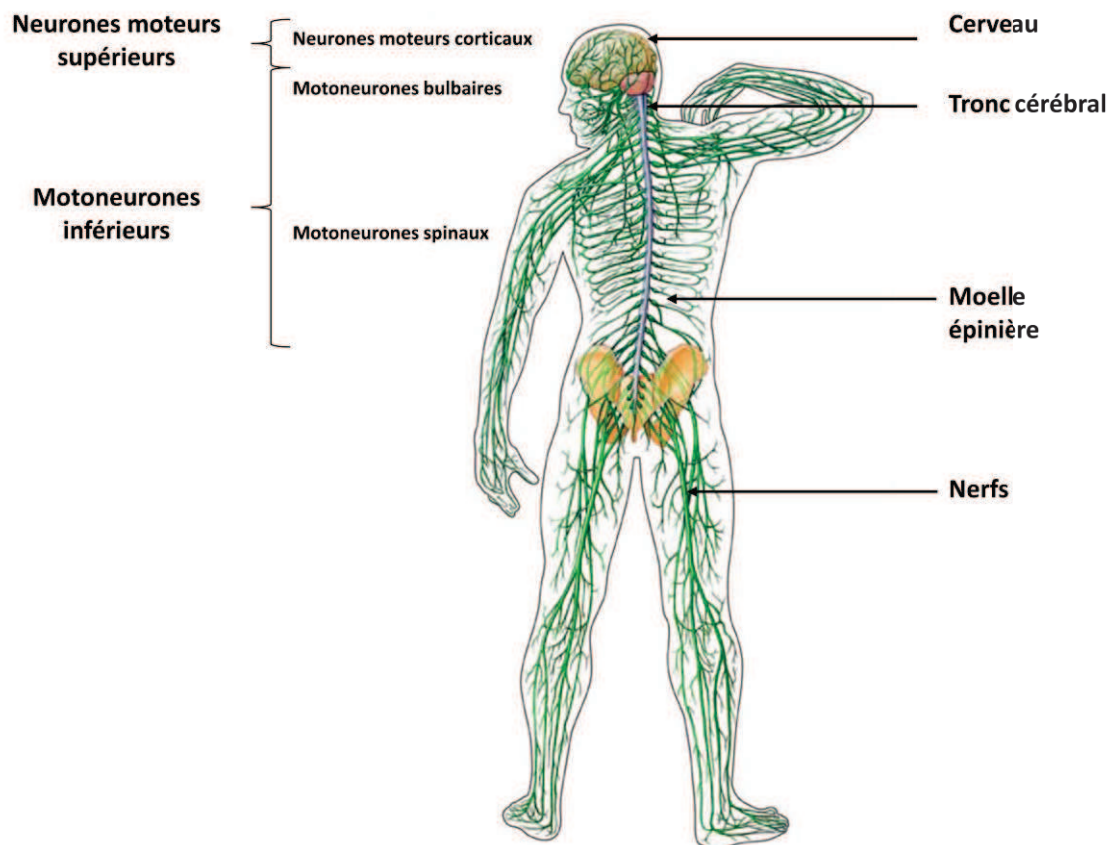
Introduction

I) La sclérose latérale amyotrophique (SLA)

I.1 Généralités

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative, aussi appelée maladie de Charcot, nom du médecin et neurobiologiste qui l'a décrite pour la première fois en 1869. Outre Atlantique, elle est aussi appelée maladie de Lou-Gehrig, du nom d'un célèbre joueur de Base-Ball, décédé de cette maladie en 1941. C'est à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière à Paris que Jean-Martin Charcot (1825-1893) présenta son étude sur cette pathologie. Il montra alors que les patients étaient atteints d'un rétrécissement des bords de la moelle épinière qu'il qualifia de "sclérose latérale", ainsi que d'une fonte de la masse musculaire " l'amyotrophie".

La SLA se caractérise par une affection progressive du système nerveux moteur volontaire. Elle atteint le système nerveux central et périphérique de l'adulte et plus particulièrement les neurones moteurs corticaux (NMC) ainsi que les motoneurones bulbaires et spinaux (MN) (Figure 1). A cette neurodégénérescence est associée une perte de masse musculaire squelettique conduisant à un déficit moteur progressif. Selon le type d'atteinte neuronale initiale (supérieure ou inférieure) on trouvera différents types de SLA. La SLA dite "bulbaire" affectera en premier lieu la région oro-faciale, alors que la SLA "spinale" touchera initialement les membres de l'individu se traduisant alors par une atrophie musculaire, des crampes et des fasciculations (Brooks 1994; Brooks et al. 2000; Li et al. 1990; Ravits et al. 2007a; Ravits et al. 2007b). Ces premiers signes apparaissent la plupart du temps au niveau des mains, qui se creusent progressivement avec l'atrophie, d'où l'appellation de mains de singes, associée aux premiers signes cliniques (crampes, affaiblissement musculaire, troubles d'élocution. Cf chapitre I.3.2 aspects cliniques). La perte des neurones moteurs corticaux conduit à une spasticité, une hyperréflexie, et une inversion du réflexe de Babinski, réflexe qui se traduit alors par une extension lente du gros orteil vers le haut, lors d'une stimulation fine par frottement de la plante externe du pied. Cette disparition de neurones traduit l'atteinte de la voie pyramidale, dont la fonction est la



<http://stevegallik.org/sites/histologyolm.stevegallik.org/images/nervoussystem2.jpg>

Figure 1 : Famille neuronale affectée dans la SLA

Les atteintes nerveuses dans la SLA se situent au niveau du cortex moteur pour les neurones moteurs supérieurs et au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière pour les motoneurones inférieurs

transmission du message nerveux du cortex moteur aux différents étages de la moelle épinière, à destination des muscles squelettiques. Quelle que soit la région d'atteinte initiale, la pathologie se généralise avec le temps, conduisant à une paralysie progressive des muscles respiratoires, entraînant le décès du patient 2 à 5 ans après l'apparition des premiers signes cliniques (Mulder et al. 1986). Il faut néanmoins préciser qu'il existe également une forme exclusivement corticale, dite sclérose latérale primitive (SLP), ainsi qu'une forme associée à des démences fronto-temporales (DFT). La SLP est considérée par certains comme une forme plus bénigne de SLA qui entraîne toutefois des atteintes motrices sévères et conduit à une fatigue musculaire, des troubles de l'élocution et de la déglutition. Affectant les patients vers l'âge de cinquante ans et ayant une vitesse d'évolution lente, la SLP n'est pas considérée comme une maladie mortelle. Le lourd tableau clinique auquel elle conduit nécessite néanmoins un suivi médical important. La SLA associée à des DFT sera développée dans le point I.3.

Les patients SLA ne disposent pour le moment d'aucun traitement thérapeutique capable de les soigner, mais un anti-glutamatergique, le riluzole (Rilutek®), permet d'améliorer leur survie de quelques mois (Lacomblez et al. 1996b; Miller et al. 2007).

I.2 Epidémiologie

Chez l'adulte, la SLA est la maladie du motoneurone la plus répandue. Dans la population caucasienne d'Europe et d'Amérique du Nord, elle touche entre 1,5 à 2,7 personnes sur 100 000 chaque année; c'est ce qu'on appelle l'incidence (Logroscino et al. 2010). Sa prévalence, qui correspond au nombre de cas par habitants, pourrait sembler modeste avec "seulement" 6 cas pour 100 000 (Armon et al. 1991; Cleveland and Rothstein 2001; Worms 2001). Elle s'explique par la faible espérance de vie des patients atteints. Avec un ratio de 1,6 hommes pour 1 femme, les hommes semblent plus touchés que les femmes. Néanmoins cette tendance tend à s'atténuer au vu des dernières études (Logroscino et al. 2010; Mitchell and Borasio 2007; Worms 2001; Zoccollella et al. 2008). Les premiers symptômes apparaissent en général entre 55 et 65 ans mais les atteintes s'étendent entre 20 à 80 ans (Hirtz et al. 2007).

La survenue de la SLA ne semble pas être imputable à l'appartenance à un groupe ethnique particulier. Il existe pourtant quelques descriptions de foyers à haute

incidence (32,2 à 1300 pour 100 000 habitants) dans certaines régions du monde, notamment sur l'île de Guam, sur la péninsule de Kii au Japon et à l'ouest de la Nouvelle Guinée (Figlewicz et al. 1994a). Ces formes de SLA sont atypiques car associées fréquemment à un syndrome parkinsonien et une démence (Gajdusek and Salazar 1982; Garruto et al. 1985; Kurland and Mulder 1954). Des facteurs environnementaux sont privilégiés dans ces cas de SLA, car les patients ne présentent pas de facteurs génétiques et l'incidence a tendance à baisser ces dernières années (Garruto et al. 1985).

Ainsi, dans la survenue de SLA sur l'Ile de Guam, l'hypothèse de l'implication de L-β-Méthylaminoalanine (L-BMAA), produit en quantité importante par des cyanobactéries, a été envisagée. L'effet délétère du L-BMAA est associé à ses propriétés d'agoniste glutamatergique, pouvant mener à une excitotoxicité (Cox et al. 2005; Spencer et al. 1986). Un faible taux de calcium et magnésium dans les sols de ces régions entraînant une neurotoxicité à l'aluminium (dont des forts dépôts neuronaux ont été observés) est également envisagé comme cause environnementale (Yasui and Ota 1998).

Il a également été envisagé une hypothèse liée aux traditions et coutumes de ces populations, notamment à leurs habitudes alimentaires. Leur consommation régulière de chauves-souris (*Roussette*) qui se nourrissent des noix du Cycas (*Cycas circinalis*) renfermant un composé neurotoxique (L-BMAA) pourrait induire des cas de SLA (Cox and Sacks 2002; Kurland 1988; Murch et al. 2004; Spencer 1987). L'avènement de nouvelles techniques de chasse a conduit à une surconsommation de ces animaux, et à une forte augmentation des cas de SLA dans l'île. La quasi extermination des chauves-souris présentes dans ces régions a ensuite réduit l'incidence de la pathologie.

Plus généralement, l'environnement socio-professionnel pourrait également influencer l'apparition de la pathologie, même si dans l'ensemble toutes les catégories socio-professionnelles peuvent être atteintes. En effet la SLA semble affecter davantage les personnes ayant une forte activité physique comme les sportifs ou les agriculteurs (Chio et al. 2005; Giagheddu et al. 1983; Granieri et al. 1988; Rosati et al. 1977). Par ailleurs des facteurs aggravants exogènes, comme le tabagisme chronique (Armon 2009; Nelson et al. 2000; Sutedja et al. 2007b) ou l'exposition au milieu industriel de la soudure (Strickland et al. 1996) peuvent également jouer un rôle dans

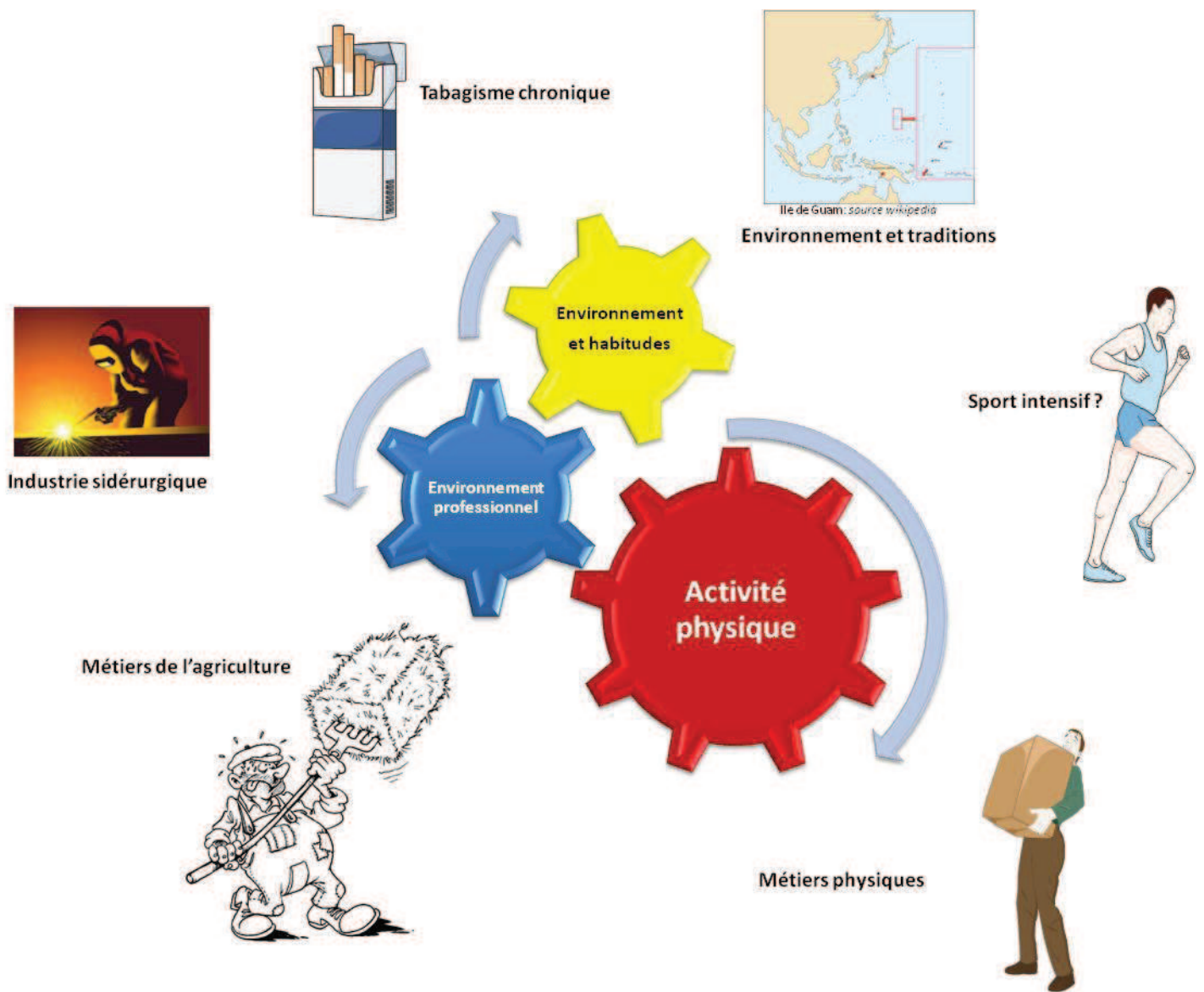


Figure 2 : Facteurs de risques associés au développement d'une SLA

Les facteurs de risques associés au développement d'une SLA sont nombreux. On retrouve l'influence de facteurs environnementaux, socio-professionnels, liés aux habitudes, physiques ou alimentaires ainsi qu'aux addictions diverses tel le tabagisme chronique.

la SLA. On peut aussi mentionner quelques études décrivant l'électrocution comme facteur de risque aggravant pour la SLA (Noonan et al. 2002; Savitz et al. 1998). Récemment, l'exposition aux pesticides a également fait l'objet d'études visant à montrer l'influence de ces derniers sur le développement de la SLA (Bonvicini et al. 2010; Malek et al. 2012; Vinceti et al. 2012) (Figure 2).

Bien que peu étudiés, les facteurs psychosociaux semblent également influencer la sévérité de la maladie. En effet, un état psychologique défailant lié au stress, à la dépression, à la colère, à la perte d'espoir etc.. a été associé à une survie plus courte des patients. Ainsi une progression rapide de la maladie et une baisse de la survie des patients ont été liées à une humeur sombre de ces derniers (Johnston 1999)

Parmi les cas de personnes célèbres ayant été atteintes de SLA, on peut citer outre le joueur de Base-ball Lou-Gehrig, le physicien Stephen Hawking, le médecin Roy Walford, le dirigeant chinois Mao Zedong, le guitariste Jason Becker et le chanteur Frank Alamo.

I.3 Diversité de la SLA

On trouve deux formes de SLA. La plus répandue est la forme dite "sporadique" (SLAs) qui touche des individus sans histoire familiale associée. L'autre est dite "familiale" (SLAf) liée à des origines génétiques. Dans la forme sporadique qui représente 90% des cas l'étiologie n'est pas connue à ce jour. Si les deux formes sont identiques au niveau clinique, elles diffèrent d'un point de vue épidémiologique. Les premiers symptômes apparaissent en moyenne à l'âge de 48 ans dans les cas de SLAf et à l'âge de 58 ans dans les cas de SLAs. La sévérité de la maladie est également plus forte dans les cas familiaux (Hand and Rouleau 2002). Toutefois, alors que les SLAs touchent davantage les hommes que les femmes (1,5 à 2 hommes pour 1 femme), les SLAf affectent les deux sexes dans les mêmes proportions. Cette dernière constatation tend à renforcer l'hypothèse de l'origine environnementale des formes sporadiques et notamment lorsque la maladie est associée aux efforts physiques intenses. Bien qu'il existe des différences entre les deux formes de SLA, l'évolution de ces dernières aboutit à une atteinte généralisée des muscles du patient, entraînant sa mort en quelques années.

I.3.1 Génétique de la SLA

I.3.1.a Formes familiales

Par une approche génétique, l'étude des formes familiales a permis une grande avancée des connaissances des mécanismes de la SLA. Néanmoins l'étude de ces formes familiales, qui ne représentent que 10% des cas de SLA, n'est pas toujours aisée. Les cas familiaux ne semblent pas tous se transmettre classiquement de manière dominante ou récessive. Dans bon nombre de familles possédant des antécédents SLA seuls deux ou trois individus atteints sont liés au premier degré. On ne trouve un grand nombre d'individus atteints que dans 30% des cas familiaux (n>4) (Valdmanis and Rouleau 2008). Le suivi génétique de ces familles a néanmoins permis d'identifier un certain nombre de gènes impliqués dans la pathologie. Voici un bref descriptif des fonctions des gènes identifiés à ce jour dans les 18 classes de SLA (ALS1-18) et de SLA-DFT. Un tableau récapitulatif est présenté en fin de section (Tableau 1).

- ALS1

C'est en 1991 que fut découvert le gène *ALS1*, le premier associé à la SLA. Il est localisé sur le chromosome 21 (Siddique et al. 1991) et a été cloné en 1993. Ce gène correspond au gène *SOD1* codant pour la superoxyde dismutase cytosolique à cuivre et à zinc (*SOD1*) (Rosen 1993). Cette enzyme ubiquitaire, de 153 acides aminés, permet la détoxification des radicaux libres présents dans le cytosol, en jouant un rôle d'antioxydant en transformant les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène. Ces produits seront ensuite dégradés par d'autres enzymes telles que la catalase et la glutathion peroxydase, protégeant ainsi la cellule des méfaits du stress oxydant (Figure 3).

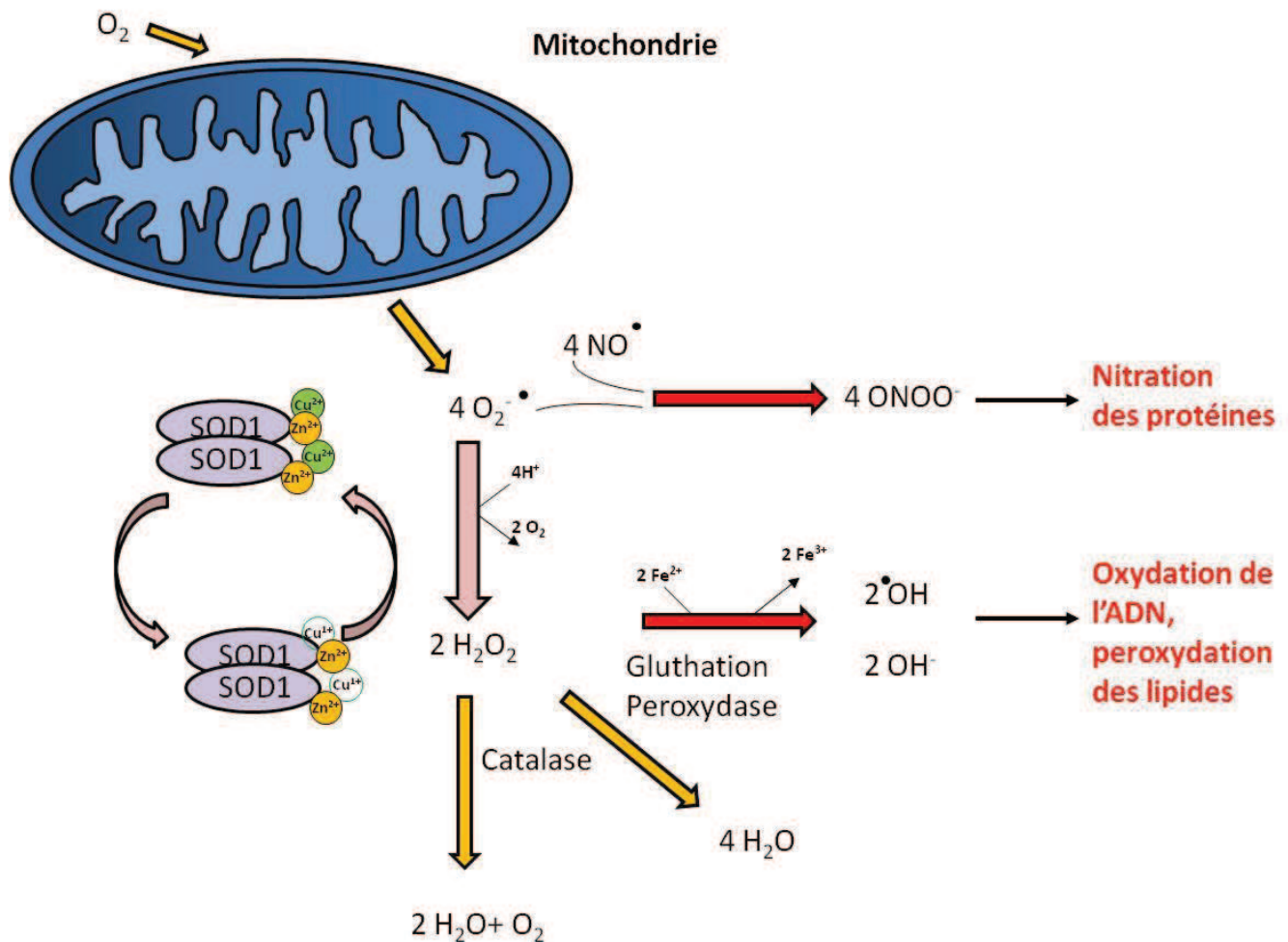


Figure 3 : Activité de la superoxyde dismutase à cuivre et zinc (SOD1) et ROS (reactive oxygen species)

La mitochondrie joue un rôle majeur dans la réduction tétravalente de l'oxygène. Cette réaction s'effectue dans la membrane interne de la mitochondrie. La réduction partielle de l'oxygène lors de la respiration mitochondriale produit des anions superoxydes radicalaires. Ces radicaux vont être dégradés en peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) par la SOD1. Le peroxyde d'hydrogène sera ensuite dégradé par la catalase et la glutathion peroxydase. Le peroxyde d'hydrogène peut également réagir selon la réaction de Fenton et entraîner la production de radicaux hydroxyles. Les anions superoxydes radicalaires peuvent également réagir avec l'oxyde nitrique et former des peroxynitrites hautement réactifs. Les radicaux hydroxyle et les peroxynitrites sont responsables des atteintes cellulaires menant à des dommages par oxydation de l'ADN, la nitration des protéines et la peroxydation des lipides.

Il a été décrit plus de 150 mutations du gène *SOD1* responsables de la SLA (Tortelli et al. 2013) (ALSOD consortium: <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>). L'impact de ces mutations sur l'évolution de la pathologie porte essentiellement sur l'âge d'apparition de la maladie et sur sa durée (Andersen 2006; Cudkowicz et al. 1997).

Ces mutations conduisent principalement à un gain de fonction de la protéine et sont transmises pour la plupart par mode autosomique dominant, bien que des formes récessives aient également été observées (Khoris et al. 2000; Siddique et al. 1991; Vucic and Kiernan 2009). Dans les modèles murins, une surexpression artificielle de la forme mutée conduit à un déficit moteur comparable à celui retrouvé dans les cas de SLA (Gurney et al. 1994; Ripps et al. 1995), alors que l'inactivation de ce gène n'induit aucun déficit moteur chez les souris invalidées pour ce gène (Reaume et al. 1996). Ces diverses mutations du gène *sod1* représentent à elles seules 20% des cas de SLA soit 2% de la totalité des SLA (Cudkowicz et al. 1997).

- ALS2

Une forme atypique de SLA a été découverte en 1994 avec l'étude de la mutation *ALS2*. Cette mutation affecte un gène codant pour la protéine alsine (184 kDa) dont la fonction exacte n'a pas encore été décrite (Hadano et al. 2001; Hentati et al. 1994). Cette mutation de transmission autosomique récessive entraîne une forme juvénile de SLA se déclarant entre 3 et 23 ans et évoluant lentement, en moyenne 10 à 15 ans. Bien qu'ubiquitaire, on retrouve l'alsine en abondance sur la face cytosolique des endosomes des neurones. Des domaines GEF (*guanine nucléotide exchange factor*) nécessaires à l'activation des protéines à activité GTPase ont ainsi été retrouvés sur cette protéine, ce qui lui confère un rôle dans la signalisation moléculaire, l'organisation du cytosquelette, mais aussi le transport membranaire, la croissance neuritique et la survie des motoneurones (Hadano et al. 2001; Jacquier et al. 2006; Otomo et al. 2003; Topp et al. 2004). Chez les souris, suite à l'inactivation du gène codant pour la protéine, il a été observé une altération du transport vésiculaire, une sensibilisation au stress oxydant, mais aucune perte de motoneurones n'a été constatée (Cai et al. 2005; Cai et al. 2008; Hadano et al. 2006; Lai et al. 2006). Chez l'homme, les mutations du gène de l'alsine touchent majoritairement les populations asiatiques, notamment au Japon, ainsi que les populations nord africaines (Figlewicz and Orrell 2003; Shirakawa et al. 2009).

- ALS3, ALS5, ALS7

Ces trois gènes responsables d'une SLA n'ont été pour le moment que peu étudiés, seuls les loci sont connus (Abalkhail et al. 2003; Hand et al. 2002; Hentati et al. 1998).

- ALS4

Cette forme juvénile de SLA est due à un gène codant pour une protéine, la senataxine (Arning et al. 2013; Avemaria et al. 2011). Ce type de SLA est généralement d'évolution lente et affecte préférentiellement les motoneurones périphériques. La senataxine possède une fonction encore peu connue. Toutefois il a été constaté qu'elle présente un domaine hélicase ADN/ARN semblable à celui des gènes humains *rent1* et *ighmbp2* servant à des transformations de l'ARN. On trouve cette protéine dans le cerveau, la moelle épinière et le muscle squelettique. La défaillance de son activité hélicase suite à une mutation du gène, pourrait ainsi être à l'origine de la dégénérescence observée dans ces cas de SLA (Chen et al. 2006; Chen et al. 2004; Hirano et al. 2011).

- ALS 6

Alors que les mutations du gène *FUS* ne sont que très rarement retrouvées dans les cas sporadiques, elles sont présentes dans 4% des cas familiaux (Mackenzie et al.; van Blitterswijk and Landers). *FUS* est une nucléoprotéine de 526 acides aminés, impliquée dans les transformations de l'ARN (Calvio et al. 1995; van Blitterswijk and Landers). La majorité des mutations trouvées affecte la région NLS (signal de localisation nucléaire) et conduit alors à la rétention de la protéine dans le cytoplasme (Kwiatkowski et al. 2009; Vance et al. 2009). Les mutations de perte de fonction conduisent généralement à la diminution ou l'absence de production de la protéine active. Les mutations de gain de fonction, avec l'acquisition d'une nouvelle fonction protéique, sont associées à un effet toxique délétère pour la cellule. Dans les deux cas cela se traduit par une défaillance au niveau de la signalisation intracellulaire, qu'il s'agisse de la séquestration d'ARNm ou d'agrégation protéique.

Dans le cas de l'ALS6, différentes hypothèses ont été envisagées pour expliquer les effets toxiques de ces mutations du gène *FUS*. L'une d'entre elles suggère une altération d'expression de nombreux gènes (Lagier-Tourenne et al. 2012; van Blitterswijk et al. 2013).

- ALS8

La mutation de ce gène codant pour la protéine VAPB (*vesicle associated membrane protein/synaptobrevin associated membrane protein B*) conduit à une SLA typique, affectant massivement les motoneurones mais également les neurones moteurs corticaux. La mutation P56S a été détectée au sein d'une famille brésilienne (Nishimura et al. 2004). Récemment, une nouvelle mutation a été découverte, et porte sur le changement d'une thréonine en isoleucine (codon 46) (Chen et al. 2010). VAPB est une protéine ubiquitaire intervenant dans le transport vésiculaire et notamment dans l'élimination de protéines à la conformation anormale (voie de l'UPR: *unfolded protein response*). Elle intervient également dans le contrôle du métabolisme lipidique et dans le transfert des lipides entre le réticulum endoplasmique et les organelles, notamment par interaction avec l'oxysterol-binding proteins (OSPPs) et la ceramide transfer protein (CERT) (Amarilio et al. 2005; Kawano et al. 2006; Ngo and Ridgway 2009). La forme mutée VAPB-P56S aurait une forte affinité pour la protéine sauvage VAPB ce qui conduirait à la pathologie par un mécanisme de perte de fonction, notamment par une incapacité de la protéine sauvage VAPB à induire la voie de l'UPR (Suzuki et al. 2009). On trouve également des agrégats protéiques induisant la mort des motoneurones. De plus, il a été montré récemment une baisse d'expression et de protéine VAPB dans la moelle épinière des patients SLA (Anagnostou et al. 2010). Cela renforce le rôle joué par la perte de fonction de la VAPB dans la SLA.

- ALS9

En 2006 une SLA a été associée à la découverte d'une mutation du gène codant pour l'angiogénine, un puissant facteur angiogénique (Greenway et al. 2006) et un facteur trophique pour les motoneurones (Kieran et al. 2008). Outre l'action vasculaire de l'angiogénine, cette dernière possède aussi une séquence de localisation nucléaire (NLS), ce qui lui confère une capacité à entrer dans le noyau cellulaire et à conditionner la transcription des ARN ribosomiques (Xu et al. 2002).

Plus de 7 mutations de l'angiogénine ont été identifiées dans différentes cohortes de patients, tant sporadiques que familiaux (Gellera et al. 2008; Padhi et al. 2013). Ces mutations peuvent conduire à la pathologie par différentes voies. La première, indirecte, serait due à une diminution de transcription du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), dépendante de la présence d'angiogénine. Diminution du taux de VEGF qui conduit à la dégénérescence des motoneurones chez la souris (Oosthuyse et al. 2001). La seconde voie, plus directe, diminue la croissance neuritique et l'expansion du cône de croissance (Subramanian and Feng 2007).

- ALS 10

Des mutations du gène codant pour la protéine TDP43 (*TARDP: TAR DNA-binding protein-43*) ont été découvertes en 2008 au sein de patients SLAs (Kabashi et al. 2008; Sreedharan et al. 2008) et SLAf (Van Deerlin et al. 2008; Yokoseki et al. 2008). C'est l'accumulation d'un fragment issu d'un clivage anormal de la protéine, suite à la mutation, qui conduit à une neurotoxicité (Rutherford et al. 2008). Cette neurotoxicité est associée à des défauts de transcription, d'épissage et de transport des ARNm. On trouve fréquemment une dégénérescence du lobe fronto-temporal, entraînant des syndromes de démence (Benajiba et al. 2009; Liscic et al. 2008). En effet, certains travaux rapportent l'observation d'une inclusion cytoplasmique de TDP-43 pour 95% des patients SLA et 50% des patients atteints d'une démence fronto-temporale.

- ALS 11

Des mutations du gène *FIG4*, un gène codant pour la Polyphosphoinositide phosphatase ont été trouvées dans certaines formes familiales de SLA mais aussi de sclérose latérale primitive (SLP) et de maladie de Charcot-Marie-Tooth. Le rôle de cette enzyme est de réguler la concentration cellulaire de PI(3,5)P2, un lipide de signalisation intracellulaire. PI(3,5)P2 module le transport rétrograde des vésicules endoplasmiques vers l'appareil de Golgi. Les mutations de *FIG4* sont trouvées dans 1 à 2 % des cas de SLA. D'autres travaux seront encore nécessaires pour préciser et définir la contribution de *FIG4* dans la SLA (Chow et al. 2009).

- ALS12

L'optineurine est connue pour son implication dans les glaucomes. C'est une protéine impliquée dans la morphogenèse cellulaire mais également dans le transport membranaire, vésiculaire ou encore dans l'activation de la transcription à travers son interaction avec RAB8. En 2010 il a été montré l'existence de mutations dans le gène *OPTN* codant pour cette protéine, au sein d'une famille japonaise atteinte de SLA (Maruyama et al. 2010). Ces mutations sont de type délétion homozygote, non-sens homozygote ou faux-sens hétérozygote, dans tous les cas induites par des unions consanguines. En 2012 d'autres mutations ont été détectées chez des patients SLA d'origines sporadiques et familiales (van Blitterswijk et al. 2012).

- ALS13

ATXN2 est un gène codant pour l'ataxine-2 une protéine polyglutamine qui interagit avec TDP-43. Des mutations de ce gène sont responsables de l'ataxie cérébelleuse de type 2. La plupart de ces mutations sont imputables à des répétitions de codon CAG. Dans l'ALS il est trouvé une expansion de l'ordre de 27 à 33 glutamines dans l'ataxine-2 (Elden et al. 2010).

- ALS14

De manière très rare il a été décrit une mutation dans le gène codant pour la valosin-containing protein (VCP) une protéine impliquée dans le transport vésiculaire de l'ATP. Des mutations de ce gène ont été également trouvées chez les patients atteints de la maladie de Paget et dans des démences fronto-temporales (Johnson et al. 2010).

- ALS15

L'ubiquiline 2 est associée au protéasome et à l'ubiquitine ligase, et joue ainsi un rôle important dans la dégradation protéique. Elle est codée par le gène *UBQLN2* qui s'est avéré muté chez certains patients SLA. Ces mutations altèrent la fonction de la protéine et entraînent une agrégation de protéines ubiquitinées non dégradées dans les neurones moteurs et les motoneurones (Deng et al. 2011). Ces formes de SLA sont très rarement décrites et semblent affecter peu de patients. Toutefois très récemment, un lien semble avoir été établi entre l'*UBQLN* et *C9ORF72* dans les cas de SLA et SLA à DFT (Brettschneider et al. 2012).

- ALS16

Une forme juvénile très rare de SLA a été décrite suite à la découverte, au sein d'une famille consanguine, d'une mutation dans le gène codant pour *SIGMAR1* un récepteur transmembranaire. Ce récepteur a des effets neuroprotecteurs, qui sont ainsi déficitaires suite à cette mutation. Récemment il a été montré que les souris modèles invalidées pour ce gène présentent des altérations motrices (Al-Saif et al. 2011).

- ALS17

Une poignée de patients SLA présente des mutations du gène *CHMP2B* codant pour la CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). En effet les patients portant la mutation Q206H présentent des agrégations protéiques dans les neurones moteurs

Tableau 1**Gènes associés aux formes familiales de SLA**

Classification	Gène	Localisation chromosomique	Age de déclaration de la pathologie	Type clinique	Référence
ALS 1	SOD 1	21q22.11	Adulte	classique	Rosen et al 1993
ALS 2	Alsine	2q33.2	Adolescence	lente / spasticité	Hadano et al 2001
ALS 3	/	/	Adulte	/	Hand et al 2002
ALS 4	SETX	9q32.13	Adolescence	lente	Chen et al 2004
ALS 5	SPAST	2p24	Adolescence	lente	Meyer et al 2005
ALS 6	FUS	16p11.2	Adulte	classique	Kwiatkowski et al 2009
ALS 7		20p13	Adulte	classique	Sapp et al 2003
ALS 8	VAPB	20q13.33	Adulte	classique, lente, SMA	Nishimura et al 2004
ALS 9	ANG	14q11.1	Adulte	/	Greenway et al 2006
ALS 10	TARDBP	1p36.22	Adulte	SLA+DFT	Van Deerlin et al 2008
ALS 11	FIG 4	6q21	Adulte	/	Chow et al 2009
ALS 12	OPTN	10p13	/	/	Maruyama et al 2010
ALS 13	ATXN2	12q23-q24.1	/	classique, lente	Eden et al 2010
ALS 14	VCP	9p13	Adulte	classique	Johnson et al 2010
ALS 15	UBQLN2	Xp11.21	Adulte	SLA+DFT	Deng et al 2011
ALS 16	SIGMAR1	9p13	Adolescence	classique	Al-Saif et al 2011
ALS 17	CHMP2B	3p12.1	Adulte	SLA+DFT	Parkinson et al 2006
ALS 18	PFN1	17p13.3	/	/	Wu et al 2012
ALS-DFT	/	9q21-22	Adulte	SLA+DFT	Hosler et al 2000
Dynactin	DCTN1	2p13	Adulte	lente	Puls et al 2003
ALS-DFT	/	9q13.2-21.3	Adulte	SLA+DFT	Vance et al 2006

DFT= démence frontotemporale

et une altération des motoneurones inférieurs (Parkinson et al. 2006). Des mutations similaires de ce gène sont, à l'origine, trouvées dans les cas de DFT et n'ont été identifiées dans la SLA que plus récemment (Parkinson et al. 2006; Skibinski et al. 2005).

- ALS18

La Profiline dont la fonction est la conversion des actines-(G) monomériques en actine-(F) filamenteuses, est codée par le gène *PFN1*. Ce gène a été décrit très récemment comme altéré dans certains cas familiaux de SLA. Ces mutations entraînent une diminution de la liaison de la protéine à l'actine et inhibent le développement axonal, suggérant ainsi l'implication du cytosquelette dans la mise en place de la pathologie (Wu et al. 2012).

- SLA associée à des démences fronto-temporales (DFT)

On trouve des cas de démences fronto-temporales (DFT) dans 15 % des SLA (Byrne et al. 2013). Si l'on tient compte des interactions sociales on peut considérer que 50 % des patients SLA présentent des troubles légers du comportement (Lomen-Hoerth et al. 2003). Le phénotype des patients atteints des mutations des loci 9p13.2-21.3 (Vance et al. 2006) et 9q21-22 (Hosler et al. 2000) est très atypique car les évolutions pathologiques sont très différentes selon les individus. En effet certains patients ne sont affectés que par une SLA typique, alors que d'autres présentent des syndromes de démence et d'autres enfin souffrent d'une SLA associée à une DFT (trouble du comportement, aphasie progressive et/ou démence sémantique).

D'autres cas de DFT ont été constatés chez des patients atteints d'une mutation d'un gène codant pour une protéine de transport et de dégradation, il s'agit du gène *CHMP2B* (*charged multivesicularbody protein 2B*). Cette protéine est associée au complexe multiprotéique ESCRTIII (*endosomal secretory complex required for transport*) (Parkinson et al. 2006). Dans l'ensemble, de nombreuses observations montrent qu'il existe des facteurs communs d'évolutions entre la SLA et les DFT (Ringholz and Greene 2006) (cf, TDP-43, C9ORF72,).

- Dynactine

D'autres protéines impliquées dans les transports vésiculaires ont été identifiées. La dynactine grâce à son association avec dynéine assure le transport rétrograde axonal. Des altérations des domaines de liaisons aux microtubules, suite à la mutation de la sous-unité p150 de la dynactine, entraînent une diminution de la liaison entre le système dynéine-dynactine et les microtubules, conduisant alors à un déficit de ce transport (Laird et al. 2008). Ce déficit se traduit par une maladie du motoneurone à évolution lente dont les premières conséquences sont l'altération de l'innervation des cordes vocales (Puls et al. 2003). Cependant, des études plus récentes suggèrent que ces mutations de la sous-unité p150 constituent seulement un facteur de risque et non un facteur déterminant de SLA (Dixit et al. 2008). Des SLA à DFT ont également été associées à d'autres mutations de la sous-unité p150 de la dynactine (Munch et al. 2005).

I.3.1.b Formes sporadiques

Même si près de 90% des cas de SLA sont associés à des formes sporadiques, un certain nombre de mutations de gènes identifiées comme facteurs de risques ont été découvertes au cours de ces dernières années.

- Gènes du métabolisme

Le gène *cyp2d6* associé au métabolisme des toxines exogènes a été associé à la SLA (Siddons et al. 1996). De même une mutation d'un gène impliqué dans le métabolisme du fer a été associée à ces risques de SLAs. Il s'agit du gène *hfe* (Sutedja et al. 2007a).

- Gène du *vegf*

Des modifications des facteurs trophiques impliqués dans la survie des motoneurones (Ogunshola et al. 2002) ont également été associées comme des facteurs de risques de développer une SLAs (Lambrechts et al. 2003). C'est le cas du VEGF (vascular endothelium growth factor), dont la fonction initiale est de réguler la croissance vasculaire. Diverses mutations ont été décrites, notamment dans la région du promoteur du *VEGF*, ce qui conduit à une maladie neurodégénérative proche de la SLA (Oosthuyse et al. 2001). Il a également été montré l'existence d'interactions entre la forme mutée de la SOD1 et l'extrémité 3'-terminale de l'ARNm du *VEGF*, conduisant alors à une instabilité de cet ARNm et donc une diminution de VEGF (Li et al. 2009). En 2007, Wang et ses collaborateurs ont constaté que la surexpression neuronale de VEGF apportait une protection contre la dégénérescence des motoneurones chez les souris modèles de la pathologie (souris SOD1m, cf partie modèles animaux), entraînant un retard d'apparition du déficit moteur et une augmentation de la survie des animaux (Wang et al. 2007b).

- Gènes de protection de l'ADN

Des gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydant, tels *APEX1* (*apurinic/aprimic endonucléase*) et *hOGG1* (*8-oxoG DNA glycosylase*) ont été identifiés en 1999 (Hayward et al. 1999) comme gènes d'intérêts dans la SLA mais leurs implications ne furent pas confirmées dans une seconde étude en 2004 (Greenway et al. 2004). Toutefois, la mutation S326C du gène *hOGG1* a été liée, chez les individus de sexe masculin, à une augmentation du risque de développer une SLAs (Coppede et al. 2007; Kikuchi et al. 2002).

- Gènes mitochondriaux

Dans certaines maladies du motoneurone, telle la SMA (*spinal muscular atrophy*), des mutations du gène codant pour la cyclooxygénase 1 (COX1) ont été retrouvées (Comi et al. 1998; Tarnopolsky et al. 2004). Les mutations de ce gène mitochondrial conduisent à des altérations motrices proches de celles décrites dans la SLA (Borthwick et al. 2006).

- Gène SMN

Dans la SMA qui affecte préférentiellement les motoneurones inférieurs, on trouve une altération du gène *smn* (*survival of motor neuron*). L'homme possède deux gènes codant pour SMN, *SMN1* et *SMN2*. Il a été montré que la perte de *SMN1* entraîne le développement de la pathologie, et que la gravité de cette dernière est conditionnée par le nombre de copies du gène *SMN2*. Bien que l'implication de SMN dans la SLA ait été fortement contestée (Corcia et al. 2002a; Corcia et al. 2002b; Echaniz-Laguna et al. 2002; Gamez et al. 2002; Parboosingh et al. 1999; Veldink et al. 2005; Veldink et al. 2001), il semblerait que SMN ait un rôle protecteur contre les effets délétères de la SOD1 mutée et que l'altération de ces gènes aggrave le phénotype des modèles SLA (Turner et al. 2009; Zou et al. 2007).

- Gènes du cytosquelette

Des études menées en Scandinavie et en Grande Bretagne ont montré que près de 1% des patients SLAs présentaient des variations alléliques des gènes qui codent pour les neurofilaments et plus particulièrement pour les sous-unités des chaînes lourdes (*nf-h*) et notamment d'un domaine répétitif KSP (Lysine-serine-proline) (Al-Chalabi et al. 1999; Figlewicz et al. 1994b). Ces mutations conduiraient à des perturbations du transport axonal ce qui faciliterait le développement de la pathologie. La dynamique des microtubules pourrait, elle aussi, être affectée suite à une mutation du gène qui code pour la spastine (SPG4) (Meyer et al. 2005).

- Gène de *C9ORF72*

Récemment il a été montré l'existence d'une interaction entre des gènes de susceptibilité à la SLA et ceux décrits dans les DFT (démences fronto-temporales). Une de ces correspondances implique le gène codant pour la *C9ORF72* (non donné par sa localisation sur le génome: phase ouverte de lecture 72 sur le chromosome 9) dont la fonction n'est pas encore bien établie à ce jour. La *C9ORF72* est trouvée dans différentes régions du cerveau, ainsi que dans le cytoplasme des neurones et la terminaison présynaptique. La mutation trouvée dans le gène *C9ORF72* correspond à la répétition d'une séquence nucléotidique répétée (GGGGCC), de l'ordre d'une centaine

de fois (Bigio 2011), alors que chez un individu sain, elle ne dépasse jamais les trente répétitions (Khan et al. 2012). La manière dont cette mutation entraîne la pathologie n'est pas encore identifiée. Cependant il pourrait s'agir d'une perte de fonction de la protéine associée à une accumulation d'ARN induisant un effet toxique sur la cellule.

1.3.2 Aspects cliniques

Quel que soit le type de SLA, qu'il s'agisse d'une SLAs ou SLAf les signes cliniques sont comparables. On trouve dans ces deux formes des atteintes musculaires se traduisant par une grande faiblesse de ces derniers, des fasciculations caractérisées par une contraction musculaire involontaire, mais également des crampes et une atrophie. Ces atteintes musculaires sont également associées à des augmentations des reflexes tendineux ainsi qu'à une augmentation générale du tonus musculaire. Ces aspects sont imputables aux altérations centrales telles que la dégénérescence des motoneurones bulbaires et spinaux, mais également celle des neurones moteurs corticaux de la voie pyramidale.

En fonction de la région d'atteinte initiale, les neurologues peuvent distinguer deux types (formes) de SLA.

- **Forme Bulbaire**

La forme bulbaire, trouvée dans 19 à 30 % des cas (voire 50% chez les femmes (Li et al. 1990; Traynor et al. 2000)), affecte majoritairement les motoneurones du tronc cérébral (Argyriou et al. 2005). Cette forme évolue globalement plus rapidement mais n'apparaît que plus tardivement (médiane de survie de 22 mois contre 38 pour les formes spinales) (del Aguila et al. 2003; Magnus et al. 2002). Elle entraîne des troubles de la phonation, de l'élocution (dysarthrie) et de la déglutition. Globalement, la voix devient éteinte, nasonnée, mal articulée et finalement, incompréhensible. La langue parcourue de fasciculation, est atrophique. L'atteinte corticale est plus tardive au cours de la pathologie.

- **Forme Spinale**

Comme son nom l'indique, la forme spinale affecte dans un premier temps les motoneurones localisés dans la corne ventrale de la moelle épinière. Cette forme se caractérise tout d'abord par une altération asymétrique des membres supérieurs ou inférieurs (Norris et al. 1993). Bien souvent ces altérations présentent une origine distale et ont tendance à se généraliser avec l'évolution de la pathologie.

Comme nous l'avons vu, c'est principalement la composante motrice volontaire du système nerveux central qui semble affectée par la pathologie. En effet les capacités intellectuelles (hors DFT), les fonctions oculaires, les neurones moteurs du système autonome et les sens semblent préservés.

Quelle que soit la forme clinique initiale, la SLA évolue inéluctablement vers une forme généralisée, affectant alors les quatre membres, le pharynx, le larynx, la langue et les muscles respiratoires. De plus, il est à noter que les patients atteints d'une forme initialement spinale touchant les membres supérieurs, présenteront une évolution vers la forme bulbaire plus rapide que les patients atteints d'une forme spinale touchant en premier lieu les membres inférieurs (Murray B. 2006). La mort du patient, par arrêt respiratoire, 3 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes moteurs, est vraisemblablement due à l'atteinte des muscles respiratoires. Toutefois, il existe des formes à évolution lente. En effet, si 25% des SLA évoluent en moins de 5 ans, il existe néanmoins 9,4% des SLA ayant une survie à plus de 10 ans (Haverkamp et al. 1995; Norris et al. 1993) et même un exemple relaté à plus de 44 ans (Grohme et al. 2001).

1.3.3 Critères d'évaluation et diagnostic différentiel

La SLA étant une pathologie à évolution rapide, il est nécessaire d'établir un diagnostic dès l'apparition des premiers symptômes. Hélas, seule l'évolution de la pathologie, caractérisée par des atteintes très étendues du système nerveux moteur, permet un diagnostic précis. En 1994 des experts ont listé des critères d'évaluation de l'avancée de la pathologie, sur la base d'observations des atteintes motrices, afin d'uniformiser les diagnostics et de mieux caractériser les patients.

Ces critères portent le nom de "El Escorial" du nom d'une petite ville située à une cinquantaine de kilomètres au nord ouest de Madrid, car ils ont été établis en Espagne lors du congrès de la Fédération Mondiale de Neurologie (Brooks 1994). Les critères de "El Escorial" tiennent compte des signes d'atteintes des neurones moteurs corticaux et des signes électrophysiologiques, mais également des altérations des motoneurones spinaux et de l'évolution progressive de ces atteintes dans les régions bulbaires et spinales. Les critères de "El Escorial" ont été révisés et affinés lors d'une conférence en Virginie quelques années plus tard, et portent aujourd'hui le nom de "critères révisés d'El Escorial" (Brooks et al. 2000). La révision de ces critères a ainsi permis de hiérarchiser la certitude d'atteinte des patients selon les critères suivants : SLA définie, probable, probable sur critères paracliniques, possible, suspectée (Tableau 2).

En effet, il est délicat d'affirmer avec certitude qu'il s'agit d'une SLA lors de l'apparition des premiers symptômes, car il existe bien d'autres pathologies affectant, elles aussi, les capacités motrices des individus. C'est le cas notamment des myosites à inclusions, de l'amyotrophie bulbaire et spinale ou encore de l'amyotrophie spinale progressive (Dezsi et al. 2013; Dubowitz 2009; Grunseich et al. 2013). Afin de cerner les différents aspects de cette pathologie complexe et évolutive et de mieux établir le diagnostic, les cliniciens utilisent trois types d'outils d'identification. En effet, il faut faire appel à des analyses plus fines, afin de distinguer les patients touchés par une atteinte corticale, trouvée spécifiquement dans la SLA. De ce fait, les cliniciens évaluent l'état du réflexe de Babinski (inversion de ce réflexe plantaire lors d'atteintes de la voie pyramidale), mais aussi l'état des réflexes ostéo-tendineux (ROT) ou encore l'état de spasticité musculaire. Spasticité musculaire qui correspond à un étirement rapide d'un muscle qui entraîne trop facilement sa contraction réflexe et qui dure un certain temps. Le traitement symptomatique de la spasticité est essentiellement basé sur l'utilisation de myorelaxants comme le baclofène (dérivé aromatique de l'acide gamma-aminobutyrique GABA) ou le dantrolène (qui diminue la concentration intracellulaire de calcium) (McClelland et al. 2008).

Voici à présent quelques explications sur les échelles fonctionnelles, les techniques d'évaluations et les biomarqueurs.

Tableau 2

Critères d'EI Escorial révisés

Classification diagnostique	Définition clinique
SLA définie	Atteinte définie du NMC et MNP dans 3 régions spinales ou 2 régions spinale et bulbaire
SLA probable	Atteinte du NMC et MNP dans au moins 2 régions avec NMC rostral/NMP. EMG positif dans 2 membres en l'absence d'anomalies biologiques
SLA probable au vue des examens cliniques	Atteinte du NMC dans au moins 1 territoire, et confirmation EMG d'une atteinte du MNP dans au moins 2 territoires
SLA possible	Atteinte du NMC et MNP dans 1 territoire ou atteinte de NMC dans 2 territoires ou atteinte MNP au dessus du territoire d'atteinte du NMC
SLA suspectée	Atteinte isolée du MNP ou du NMC dans au moins un territoire

Signes présents

- Atteinte du NMP clinique, EMG
- Atteinte du NMC
- Diffusion progressive des signes au sein d'une région atteinte, ou extension à d'autres région

Signes absents

- Signes cliniques ou EMG évoquant d'autres maladies du NMC, ou NMP
- Examens de neuro-imagerie mettant en évidence des anomalies expliquant les signes cliniques et EMG

NMC = Neurones moteurs centraux

MNP = Motoneurones périphériques

EMG = Electromyogramme

I.3.3.a Echelles fonctionnelles

Une fois le diagnostic établi, il est important d'évaluer la progression de la maladie. Dans ce but, différentes échelles fonctionnelles ont été établies au cours de ces dernières décennies: l'échelle de Norris (Norris et al. 1974), suivie par l'échelle de Appel (Appel et al. 1987), de l'ALSS (Hillel et al. 1989) et enfin par l'ALS-FRS (Cedarbaum et al. 1999). Cette dernière est la plus utilisée à ce jour et sera développée ci dessous et présentée dans le (Tableau 3).

L'ALS-FRS (amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale) est une échelle qui apprécie l'atteinte bulbaire (parole, déglutition, salivation..) l'atteinte fonctionnelle des membres (marche, écriture, habillage..) ainsi que les fonctions ventilatoires. Elle comprend 12 thèmes de la vie quotidienne auxquels on associe un niveau de capacité allant de 0 à 4 ("0" le patient n'a pas la capacité motrice suffisante pour réaliser la tâche, "4" le patient réalise la tâche normalement, pas d'atteinte marquée). Cette échelle permet ainsi d'évaluer l'autonomie du patient et de suivre au mieux l'évolution de la pathologie à travers une analyse simple et étendue des capacités motrices de l'individu. L'avantage de cette échelle est le suivi quotidien du patient à travers son autoévaluation, mais également grâce à l'aide de ses proches.

Les échelles d'évaluation de la pathologie ont toutefois leurs limites, car elles ne peuvent pas, par exemple, mesurer ou distinguer l'état psychologique ou motivationnel du patient. Elles ne tiennent compte également que de critères phénotypiques marqués, et non pas de l'état physiologique du patient. Ces limites conduisent à élaborer ou envisager d'autres critères d'évaluation complémentaires, afin d'obtenir une meilleure sensibilité d'analyse et ainsi optimiser les traitements et thérapies en fonction du stade d'évolution de la pathologie.

Très récemment, l'équipe anglaise d'Ammar Al Chalabi a présenté une nouvelle échelle d'évaluation. Cette échelle prend en compte deux aspects, répartis sur différents stades. Le premier aspect fait état de l'extension du déficit moteur dans différentes parties du corps (stade 1: une première région, stade 2: une seconde région et stade 3: une troisième région). Le second aspect prend en compte l'état à

partir duquel on décide d'interventions pour pallier une atteinte nutritionnelle (par gastrotomie) ou respiratoire (par ventilation assistée) qui constitue alors le stade 4. Cette nouvelle échelle d'évaluation complémentaire, bien que prometteuse aux yeux des neurologues, souffre d'une absence de consensus international sur les moments où ces différentes interventions sont décidées (Roche et al. 2012). De son côté Chio et ses collaborateurs ont également proposé une nouvelle échelle, ou du moins une réévaluation de l'ALS-FRS (Franchignoni et al. 2013). En effet, l'échelle proposée reprend les thèmes de l'ALS-FRS et les regroupe par fonctions principales (communiquer, se déplacer, respirer, manger). L'évaluation du stade pathologique est ensuite basée sur le nombre de fonctions affectées (stade 0: aucune fonction atteinte, stade 1: perte d'une fonction etc..). Cette échelle présente l'avantage de mieux caractériser le niveau de vie des patients SLA, et apporte une relative simplicité, car reprenant des items existants dans l'ALS-FRS.

I.3.3.b Techniques d'évaluation

L'imagerie a permis au cours de ces dernières années d'améliorer considérablement la précision des diagnostics cliniques et l'évaluation de l'avancée de la pathologie.

Ainsi l'IRM (imagerie par résonance magnétique) apporte une information complémentaire permettant aisément de distinguer le niveau d'atteinte cortical ou médullaire d'un individu pathologique par rapport à un individu sain (Cheung et al. 1995; da Rocha et al. 2004; Hofmann et al. 1998). De même l'utilisation du PET scan (la tomographie par émission de positrons) permet d'avoir une estimation du niveau d'atteinte neuronale. La diminution de l'utilisation du glucose met ainsi en évidence les zones d'altérations métaboliques et de neurodégénérescences. Le recours au PET scan présente néanmoins l'inconvénient d'être coûteux et de ne pouvoir être effectué régulièrement en raison de l'utilisation de radioisotopes (Abrahams et al. 1996; Lloyd et al. 2000).

La SLA étant caractérisée par une forte atteinte des neurones moteurs supérieurs et des motoneurones inférieurs, l'analyse de l'état de fasciculation musculaire à l'aide d'EMG (électromyographie) permet également d'affiner le diagnostic et le suivi de la pathologie. Quatre critères sont utilisés par les praticiens pour

Evaluation	Performances
1 Parole	4- normale 3- perturbations détectables 2- intelligible avec répétition 1- utilise occasionnellement une communication non verbale 0- perte de la parole
2 Salivation	4- normale 3- hypersialorrhée discrète avec bavage nocturne 2- hypersialorrhée modérée mais permanente 1- hypersialorrhée gênante 0- bavage continu nécessitant l'utilisation d'un mouchoir
3 Déglutition	4- alimentation normale 3- quelques fausses routes 2- consistance des aliments modifiée 1- suppléments alimentaires 0- alimentation parentérale exclusive
4 Ecriture	4- normale 3- lente et imprécise mais compréhensible 2- tous les mots ne sont pas compréhensibles 1- tient un stylo mais incapable d'écrire 0- incapable de tenir un stylo
5 Hygiène	4- normale 3- autonome mais avec efficacité diminuée 2- assistance occasionnelle ou substitution 1- assistance d'une tierce personne requise 0- assistance permanente totale
6a Préparation des aliments	4- normale 3- lente et maladroit mais seul 2- aide occasionnelle pour couper les aliments 1- les aliments sont préparés mais mange seul 0- doit être nourri
6b En cas de gastrostomie	4- utilisation normalement autonome 3- maladroit mais toutes les manipulations sont effectuées seul 2- aide nécessaire pour la mise en place 1- fournit une aide minime aux soignants 0- doit être nourri

7 Mobilisation au lit	<ul style="list-style-type: none"> 4- normale 3- lenteur et maladresse mais autonome 2- ajuste les draps avec difficulté 1- peut bouger mais pas se retourner dans le lit 0- dépendant
8 Marche	<ul style="list-style-type: none"> 4- normale 3- difficultés de déambulation 2- marche avec assistance 1- mouvements sans déambulation 0- pas de mouvements des jambes
9 Montée d'escaliers	<ul style="list-style-type: none"> 4- normale 3- lente 2- fatigue 1- aide nécessaire 0- impossible
10 Dyspnée	<ul style="list-style-type: none"> 4- absente 3- à la marche 2- dans une ou plus des situations suivantes: repas toilette, habillage 1- au repos, difficultés respiratoires en positions assise ou allongée 0- difficulté importante, envisage l'utilisation d'un appareil de ventilation mécanique
11 Orthopnée	<ul style="list-style-type: none"> 4- absence 3- quelques difficultés pour dormir la nuit en raison d'un souffle court, n'utilise pas plus de deux oreillers 2- besoin de plus de deux oreillers pour dormir 1- ne peut dormir qu'assis 0- ne peut pas dormir
12 Insuffisance respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> 4- absente 3- utilisation intermittente d'une assistance ventilatoire 2- utilisation continue d'une VNI la nuit 1- utilisation continue d'une VNI jour et nuit 0- ventilation mécanique invasive par intubation ou trachéotomie

VNI : ventilation non invasive

interpréter les résultats de l'EMG. Appelés critères de Lambert, ils prennent en compte la vitesse de conduction nerveuse sensorielle normale, la vitesse de conduction motrice, le potentiel de fibrillation et fasciculation, et enfin le potentiel d'unité motrice (Lambert and Mulder 1957; Wilbourn 1998). Il est également possible, à l'aide d'une analyse relativement proche, d'évaluer le nombre d'axones innervant le muscle et ainsi d'estimer le nombre d'unités motrices au cours de l'évolution de la pathologie (Banach and Rakowicz 2010; Bromberg et al. 1993).

Pour améliorer la précision du diagnostic et du suivi, il est également possible de recourir à la biopsie musculaire ou de la moelle osseuse, ainsi qu'à la ponction lombaire. Ces pratiques permettent alors d'exclure d'autres pathologies, telles que les myosites à inclusions ou encore certains lymphomes (Pradat and Bruneteau 2006).

La mesure de la contraction isométrique volontaire maximale (CIVM) par dynamométrie est également utilisée afin de mesurer de manière indirecte l'état de dénervation du muscle (Andres et al. 1986; Miller et al. 2009; Miller et al. 1999). Cette mesure de la force musculaire permet de suivre et d'estimer l'efficacité d'un traitement. Elle s'avère être un bon compromis de diagnostic et de suivi car peu onéreuse et peu chronophage. Elle présente toutefois l'inconvénient de ne pouvoir être employée que pour l'expertise de certains muscles, et s'avère très dépendante de l'état de fatigue du patient. Il est ainsi possible d'utiliser le MMT (manual muscle testing) plus facile d'utilisation (Leigh and Mitsumoto 2003). Certains font également appel à la mesure de la capacité vitale forcée, qui mesure lors d'une expiration forcée, le volume maximal d'air expiré (Magnus et al. 2002).

I.3.3.c Biomarqueurs

La recherche apporte aujourd'hui d'autres pistes d'analyse et de suivi à l'aide de biomarqueurs. La recherche sur les biomarqueurs est devenue incontournable depuis quelques années, de par son apport diagnostique et pronostic. En effet l'appellation de biomarqueurs s'applique à toutes les molécules présentes dans l'organisme d'un individu qui permettent d'informer sur son état pathologique. On trouve ainsi des biomarqueurs permettant de diagnostiquer la pathologie et de la différencier d'une autre, mais également des biomarqueurs permettant d'en suivre l'avancée dès lors qu'elle a été identifiée. La grande variabilité inter-individu nécessite une forte sélection

de ces biomarqueurs. Pour être considérée comme un biomarqueur, il est nécessaire que la molécule en question soit retrouvée dans plus de 90% des patients afin de garantir une fiabilité d'analyse suffisante. Ce dernier point est primordial concernant la réalisation d'essais cliniques, notamment dans le but d'éviter d'associer des patients mal diagnostiqués à des essais thérapeutiques inadaptés qui pourraient fausser les résultats.

Dans le cas de la SLA on trouve classiquement des biomarqueurs sanguins, plasmatiques ou sériques. C'est ainsi qu'on a pu constater l'augmentation de la concentration de tyrosine et de glutamate (Ilzecka et al. 2003). De même la forte augmentation de cytokines proinflammatoires dans le sérum des patients SLA, telles IL-6, a été associée à la durée de la pathologie (Ono et al. 2001). Plus récemment, il fut décrit un taux sérique élevé d'auto-anticorps anti HMGB1 (high mobility group box1), très présent dans la moelle épinière. La détection de ce nouveau biomarqueur pourrait être utilisée à des fins diagnostiques mais également pour évaluer la progression de la maladie (Hwang et al. 2013).

Depuis peu le prélèvement quasi systématique de liquide céphalo-rachidien (LCR) chez les patients SLA a permis l'élargissement des connaissances sur les biomarqueurs signant cette pathologie. Ainsi on retrouve la présence de TDP-43 en forte concentration dans le LCR des patients SLA (Neumann et al. 2009), mais également de GDNF (Glial cell-line-derived neurotrophic factor) (Grundstrom et al. 2000), de la substance P (Matsuishi et al. 1999) ou de la chaîne légère des neurofilaments (NFL) (Tortelli et al. 2012). Néanmoins les études sur le LCR présentent des limites concernant l'appariement à des contrôles sains, étant donné le fort potentiel invasif du prélèvement.

Nous verrons par la suite qu'au sein du laboratoire nous avons contribué à l'avancée des connaissances de ces biomarqueurs, notamment au niveau musculaire, grâce à la découverte de l'augmentation d'expression protéique de Nogo A (Dupuis et al. 2002). Bien que Wojcik et ses collaborateurs aient signalé la présence de ce marqueur dans certaines myopathies (Wojcik et al. 2006), il peut être considéré comme un bon facteur pronostic de la SLA car il existe une forte corrélation entre son niveau d'expression et l'avancée de la maladie (Pradat et al. 2007).

Nous avons également montré une forte corrélation entre les niveaux lipidiques plasmatiques et la survie des patients. Nous y reviendrons dans le point II.4.1.b (Dupuis et al. 2008).

I.4 Caractéristiques histopathologiques de la SLA

Les cellules les plus affectées, ou en tout cas les plus responsables de l'état pathologique du patient, sont sans aucun doute les neurones moteurs corticaux et les motoneurones spinaux. L'implication du cytosquelette et d'inclusions intraneuronales semble aujourd'hui évidente (Strong et al. 2005). En effet des agrégats intracytoplasmiques de neurofilaments ont été observés tout au long de l'axone, facilitant ainsi des lésions cytologiques. De même des corps de Bunina ont été décrits dans les corps cellulaires des neurones moteurs encore présents (Kato 2008; Wada et al. 1999). Ces corps de Bunina correspondraient à une accumulation protéique associée à l'appareil de Golgi en voie de fragmentation. Il existe également des anomalies mitochondriales traduisant les atteintes énergétiques décrites dans la SLA (Bowling et al. 1993; Higgins et al. 2003; Shi et al. 2010). Il est à présent classique d'associer les troubles histopathologiques aux agrégats protéiques intracellulaires. Nous verrons par la suite les cas d'agrégats de la SOD1 (superoxyde dismutase à cuivre et zinc 1).

II) Hypothèses physiopathologiques et recherches

Pendant de nombreuses années la SLA fut considérée comme une pathologie exclusivement neuronale. En effet, la chronologie des lésions anatomo-pathologiques observées est difficile à établir car l'analyse repose bien souvent sur une autopsie du patient à un stade très avancé voire terminal de la SLA (Kato 2008). Or depuis près d'une décennie il semble accepté que la SLA est en réalité une maladie multifactorielle à l'origine pluricellulaire. Même si l'étiologie n'est pas encore parfaitement définie de nombreux acteurs cellulaires ont été identifiés.

L'avènement de la génétique et ses nombreuses avancées aux cours de ces dernières décennies sont à l'origine de la découverte de la forme mutée de la SOD1 (Rosen 1993). Cette découverte a conduit rapidement à de nombreuses études basées sur l'utilisation de souris transgéniques portant ces mutations, les souris SOD1m (Gurney et al. 1994; Ripps et al. 1995).

II.1 Les modèles animaux : une aide précieuse

A partir des années 90, l'étude des formes familiales de la SLA et les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'identifier un grand nombre de gènes impliqués dans la pathologie. Cela a constitué un catalogue de gènes permettant de générer des animaux transgéniques pour en étudier les aspects physiopathologiques. Longtemps les recherches sur la SLA avaient souffert de l'absence de modèle animal.

La découverte de mutations sur le gène de la SOD1 fut à l'origine du premier modèle de souris transgénique pour l'étude de la SLA (Gurney et al. 1994). Se sont ensuite succédés d'autres modèles basés sur d'autres mutations du gène de la SOD1 (pour revue, voir (Turner and Talbot 2008)), mais également basés sur bien d'autres gènes. Nous verrons ici certains de ces modèles.

- Les souris surexprimant la SOD1 mutée: les souris SOD1m

Les souris surexprimant la SOD1 mutée sont les premières souris transgéniques dévolues à l'étude de la SLA (Gurney et al. 1994); elles représentent encore à l'heure actuelle le modèle le plus utilisé en recherche.

Ces souris SOD1m portent plusieurs copies du transgène humain SOD1 muté. Cette mutation résulte en une substitution de la Glycine en position 93 par une Alanine (Gurney et al. 1994). Ces caractéristiques ont donné leur nom à ces souris, les SOD1^{G93A}. Il a été montré que le nombre de copies intégrées du transgène conditionne la sévérité du phénotype clinique des animaux ainsi que leur durée de vie (entre 5 et 8 mois) (Dal Canto and Gurney 1995; Dal Canto and Gurney 1997). Deux modèles basés sur cette mutation du codon de l'acide aminé en position 93 ont été caractérisés, ceux

qui portent un petit nombre de copies (<5) dit "low copy", et ceux qui portent un nombre élevé de copies (>30) dit "high copy".

Un autre modèle de souris SOD1 muté a également vu le jour en 1995 : les souris SOD1^{G86R} (Ripps et al. 1995). C'est ce modèle qui est actuellement utilisé au sein de notre laboratoire. Ces souris portent un nombre élevé de copies du gène *sod1* murin muté, dont la protéine contient une substitution de la Glycine en position 86 par une Arginine, équivalente à la G85R dans la SOD1 chez l'homme. Ces souris vivent en moyenne 110 jours et ont une phase symptomatique relativement courte. Différents âges ont été déterminés pour l'étude de ce modèle G86R. A 75 jours on considère que les animaux sont asymptomatiques et ne présentent aucun signe de dénervation ou d'altérations motrices. A 90 jours, la moitié des animaux présente un état de dénervation marqué, détectable à l'électromyographie (EMG), sans pour autant présenter de paralysie. Les premiers signes moteurs importants sont observés entre 95 et 105 jours et se caractérisent par une paralysie motrice prononcée et progressive, conduisant à la mort de l'animal à l'âge de 110 jours (Figure 4).

Les souris SOD1^{G86R} bien que moins utilisées que les souris SOD1^{G93A} présentent de nombreux avantages. En effet, ces souris portent la mutation G86R, dans le gène *sod1* murin, ce qui empêche toute toxicité inter-espèce. De même, aucun biais transcriptionnel n'est possible, puisque le promoteur est cloné avec le gène, contrairement aux souris SOD1^{G93A} qui portent le promoteur du gène humain. Les souris SOD1^{G86R} permettent également l'utilisation des souris sauvages comme contrôle, puisqu'elles ne possèdent plus d'activité dismutase endogène, contrairement aux souris SOD1^{G93A}. En effet les souris SOD1^{G93A} conservent une activité dismutase normale et nécessitent donc d'utiliser des souris contrôles surexprimant la forme sauvage de la SOD (Hayward et al. 2002). Enfin, la forme G86R semble être plus instable, et s'agrège moins dans les mitochondries que la forme G93A, ce qui correspond davantage à ce qui est observé chez les patients (Bergemalm et al. 2006). Le modèle SOD1^{G86R} semble ainsi plus isomorphe, et de ce fait plus représentatif de la pathologie.

Cependant d'un point de vue histopathologique l'étude des souris SOD1^{G93A} est intéressante. Elles présentent une fragmentation de l'appareil de Golgi (Mourelatos et al. 1996), ainsi qu'une vacuolisation progressive intracytoplasmique, reflétant les altérations du réticulum endoplasmique (RE) et des mitochondries (Dal Canto and

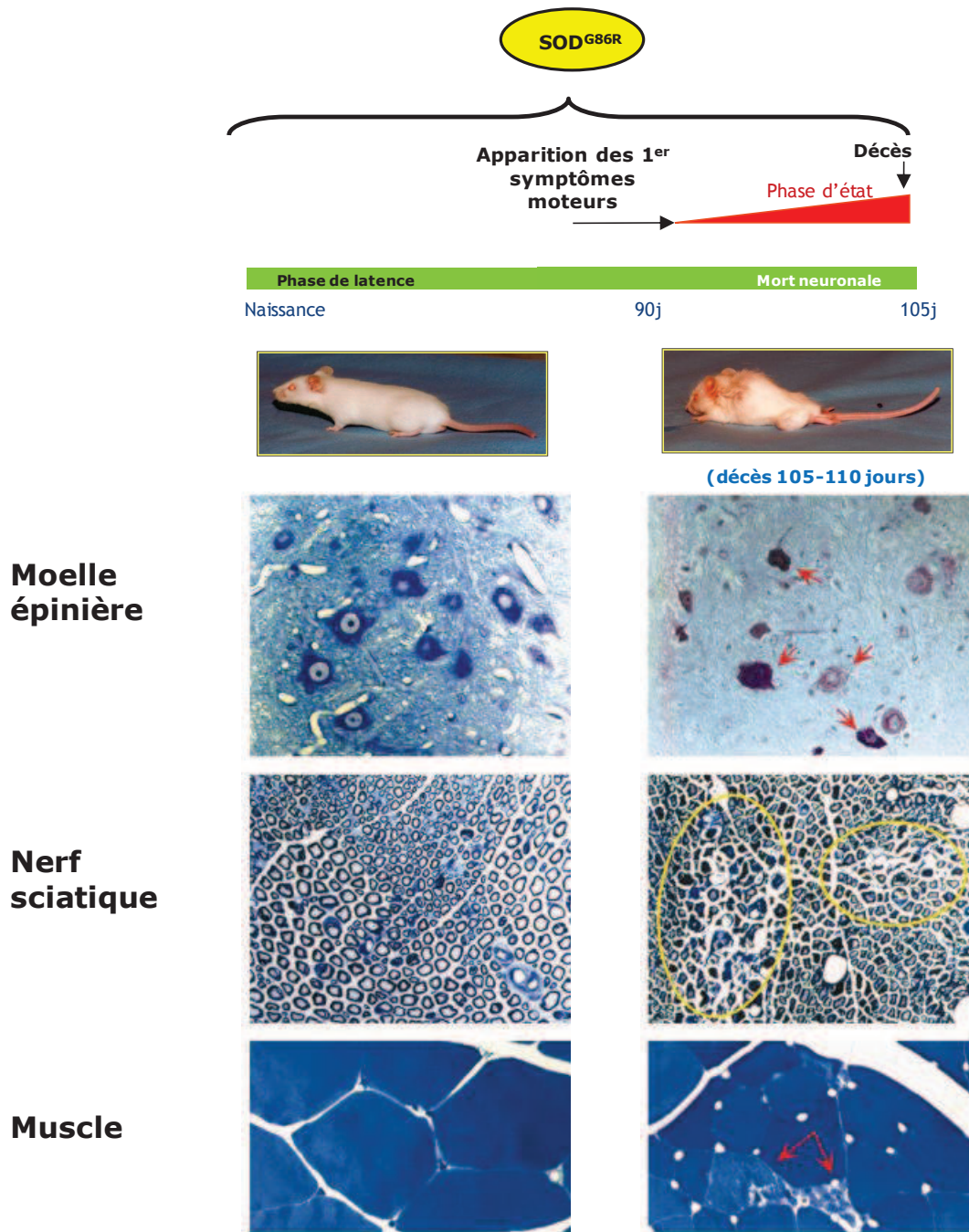


Figure 4 : Caractéristiques histopathologiques de la SLA dans le modèle de souris SOD1^{G86R}

Les souris SOD1^{G86R} ont une espérance de vie de 105-110 jours et la phase asymptomatique dure 90 jours. Les premiers symptômes moteurs apparaissent vers 90 jours et s'aggravent jusqu'au stade terminal où on observe une cyphose chez l'animal (image supérieure droite). Les motoneurones dégénèrent progressivement dans la corne ventrale de la moelle épinière (flèches rouges dans la moelle) et les axones de ces motoneurones dégénèrent dans le nerf sciatique (cercles jaunes). Une atrophie musculaire est observée chez ces animaux durant la phase symptomatique (flèches rouges muscle).

Gurney 1995; Wong et al. 1995). De nombreuses inclusions cytoplasmiques sont également trouvées dans les motoneurones (MN) des animaux (Bruijn et al. 1997; Shibata et al. 1998). Ainsi la perte progressive des MN dans la corne ventrale de la moelle épinière et l'amyotrophie progressive font de ces modèles des outils d'étude efficaces de la maladie.

Néanmoins, chez l'homme, les mutations du gène SOD1 n'étant trouvées que dans 10 à 20% des cas de SLAF, elles-mêmes ne représentant que 10% des cas de SLA, il apparaît pertinent d'étudier des modèles de souris transgéniques basés sur l'utilisation de mutations associées à d'autres gènes que le gène codant pour la SOD1. En voici à présent quelques exemples.

- Les modèles murins de SLA, non associés aux mutations SOD1

Les souris Wobbler:

Leur phénotype a été décrit comme relativement proche de celui d'une SLA, et est lié à une mutation du gène *VPS54* codant pour la protéine GARP (Golgi-associated retrograde protein) impliquée dans les transports vésiculaires avec le Golgi (Schmitt-John et al. 2005). Ces souris présentent une dégénérescence des MN spinaux et des NM corticaux, aboutissant à une atrophie musculaire (Duchen and Strich 1968). L'évolution de la pathologie semble cependant très variable d'un fond génétique à un autre (Kaupmann et al. 1992; Ulbrich et al. 2002). Ce modèle fut initialement considéré comme un bon modèle de pathologie du MN. Cependant la perte de MN et l'atteinte des astrocytes et des microglies dans la moelle épinière semblent précédées par de nombreuses autres altérations au niveau du thalamus et du cervelet (Rathke-Hartlieb et al. 1999).

Les souris TDP-43:

Les souris transgéniques obtenues après mutation du gène TDP-43 présentent une dégénérescence des MN, et NM corticaux (Wils et al. 2010). Les souris présentent des inclusions intracytoplasmiques et ont une durée de vie d'environ 5 mois. La sévérité de la pathologie apparaît, comme pour les SOD1m, corrélée au nombre de copies du transgène. Toutefois la pertinence d'utilisation de ce modèle a été ébranlée à la découverte d'une neurodégénérescence associée à la surexpression de la protéine

TDP-43 sauvage, suggérant que la mutation n'est pas nécessairement le facteur déclencheur de la pathologie (Xu et al. 2010).

Les souris portant des altérations des neurofilaments :

Les neurofilaments (NF) sont les filaments intermédiaires les plus abondants dans les neurones, et sont constitués de différentes sous-unités: NF-L, NF-M et NF-H. Différentes études ont montré l'existence d'une accumulation de neurofilaments dans les motoneurones des SFAs et SLAf (Hirano et al. 1984; Rouleau et al. 1996). De nombreux modèles basés sur des invalidations de l'une ou l'autre des sous-unités ont été construits, sans pour autant conduire à des phénotypes clairs. Par exemple, on peut citer l'invalidation de la chaîne légère NF-L qui a conduit à une diminution du nombre d'axones moteurs et une forte perturbation du transport axonal, sans toutefois mener à une mort du MN (Elder et al. 1998; Jacomy et al. 1999; Rao et al. 1998).

Deux autres modèles peuvent également être mentionnés comme représentant des altérations des neurofilaments et du cytosquelette. Les modèles de souris dits Cra (cramping) et Loa (legs at odd angles) portent des mutations faux-sens dans le gène codant pour la chaîne lourde de la dynéine, un moteur de transport vésiculaire (Puls et al. 2003). Les perturbations du transport axonal résultant de ces mutations furent décrites dans un premier temps comme les symptômes d'une SLA tardive (LaMonte et al. 2002). Ces symptômes s'avèrent en réalité plus proches d'un modèle reproduisant une neuropathie sensorielle (Dupuis et al. 2009a; Ilieva et al. 2008).

Bien d'autres modèles ont été envisagés ou construits. Cependant ils ne reflètent souvent que partiellement les mécanismes physiopathologiques décrits dans la SLA et ne représentent que des modèles partiels. A ce jour, le plus utilisé et le plus isomorphe reste de toute évidence le modèle SOD1^{G86R}. Néanmoins ce modèle présente lui aussi des limites, en particulier le fait qu'il ne reflète qu'un faible pourcentage des cas de SLA. Il faut enfin garder à l'esprit que, "la souris n'étant pas un homme", les variations anatomiques entre les deux espèces peuvent aussi expliquer des difficultés de comparaisons, notamment en ce qui concerne la voie pyramidale ou l'organisation corticale.

II.2 La SLA, une pathologie pluricellulaire : Les acteurs cellulaires

II.2.1 Les motoneurones

Dans la SLA, le MN peut être considéré, très certainement, à la fois comme une victime et un acteur de la pathologie (Jaarsma et al. 2008). L'action du MN est associée à l'unité motrice, constituée d'un MN, des jonctions neuromusculaires (JNM), et des fibres musculaires qu'il innerve. Une complémentarité est établie entre les propriétés physiques et électriques du MN et les propriétés mécaniques (tonicité, élasticité) et contractiles des fibres musculaires. On peut ainsi distinguer trois types d'unités motrices: les unités motrices rapides et fatigables (FF, fast fatigable), les lentes (S, slow), et les résistantes et rapides (FR, fast resistant) (Figure 5).

- Les unités motrices rapides et fatigables (FF)

Ces unités FF sont constituées d'un MN au soma relativement grand ($600\mu\text{m}^2$) présentant un axone large à vitesse de conduction du signal élevée (120 m/s). Les nombreuses fibres musculaires innervées, dont le métabolisme est glycolytique, sont des fibres musculaires à activité et fatigabilité rapide. On les retrouve notamment dans les muscles des membres. Elles sont particulièrement développées chez les coureurs de *sprint* et les culturistes.

- Les unités motrices lentes (S)

La taille du soma des MN de cette unité motrice S est nettement plus faible que celle des FF, avec seulement $300\mu\text{m}^2$. La vitesse de conduction du signal est, elle aussi, plus faible (80m/s). Les fibres musculaires innervées sont plus petites et moins nombreuses; en revanche le métabolisme oxydatif qui les caractérise fait d'elles des fibres à forte résistance à l'effort et à faible fatigabilité. On trouve ces fibres dans les muscles de la posture générale, mais également dans les muscles des membres inférieurs des coureurs de fond.

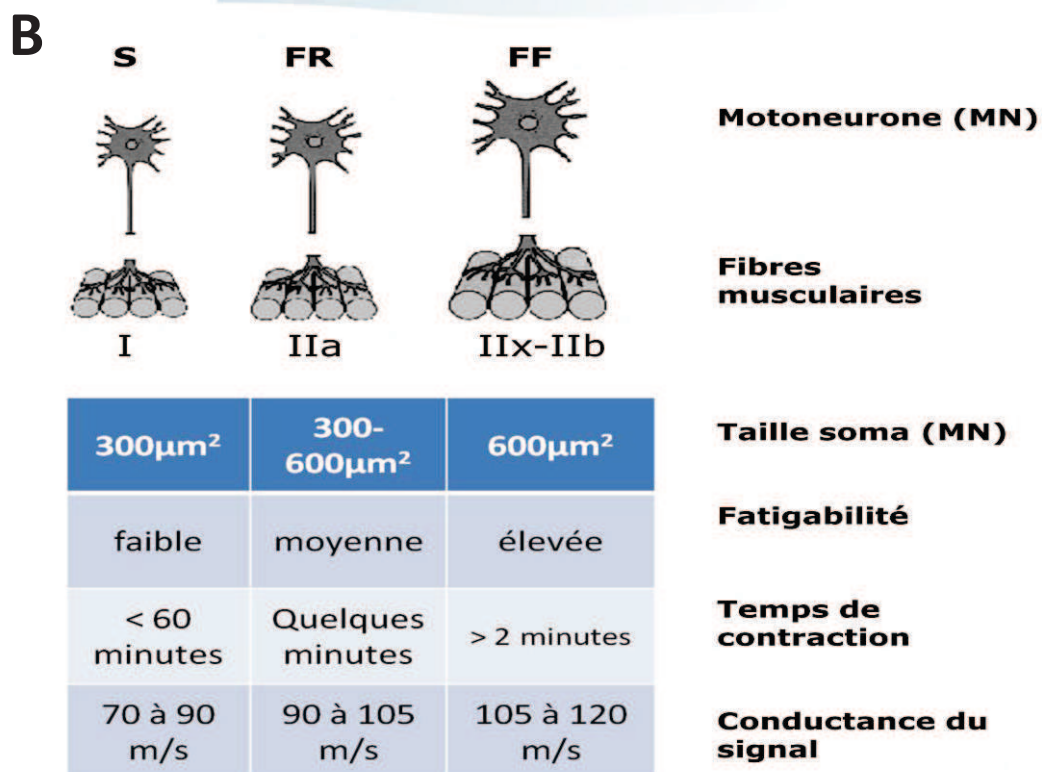
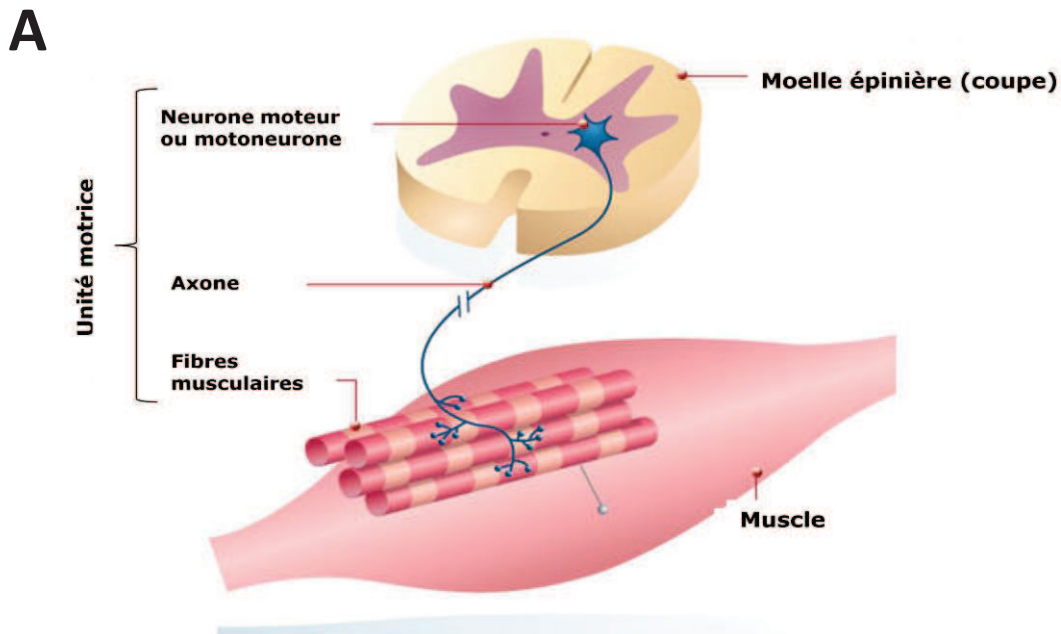


Figure 5 : Unités motrices et caractéristiques physiologiques

A) Schéma d'une unité motrice, constituée d'un motoneurone dans la corne ventrale de la moelle épinière, innervant des fibres musculaires à travers la jonction neuromusculaire. B) Caractéristiques des unités motrices lentes (S), modérées (FR) et rapides (FF).

D'après une image :

<http://www.mayo.edu/research/~media/KCMS/GBS/Research/Images/2013/03/07/12/49/mu.ashx>

<http://p9.storage.canalblog.com/91/74/251772/51432121.jpg>

- Les unités motrices résistantes (FR)

Ce type d'unité motrice reprend typiquement des caractéristiques intermédiaires aux FF et aux S. La taille de soma est comprise entre 300 et 600 μm^2 et innerve des fibres musculaires au métabolisme mixte, avec toutefois une dominance oxydative. La vitesse de contraction est modérée mais la contraction est intense et l'effort peut être prolongé.

Dans la SLA, il semblerait que les MN les plus touchés soient les MN au soma le plus important, qu'on retrouve liés aux unités motrices FF, et qu'à l'inverse les S et FR soient davantage résistantes face à la maladie (Frey et al. 2000; Gordon et al. 2010; Hegedus et al. 2007; Pun et al. 2006). Des anomalies de structure et d'expression de canaux ioniques (potassiques) seraient à l'origine des troubles électrophysiologiques détectés dans la SLA. On détecte ainsi une hyperexcitabilité axonale dans les MN des patients SLA (Kanai et al. 2006) de même qu'une hyperpolarisation membranaire (Vucic and Kiernan 2006; Vucic et al. 2007).

Même si les MN sont fortement touchés dans la SLA, l'origine de la dégénérescence exclusivement motoneuronale est aujourd'hui une hypothèse en passe d'être abandonnée. Cette hypothèse était basée sur le rôle prédominant des MN dans la pathologie, mais également sur le fait que la SOD1 mutée est capable d'entraîner la mort des motoneurons *in vitro* (Kirby et al. 2002; Raoul et al. 2002). En effet, la protéine SOD1 mutée induit une toxicité capable de conduire à un stress oxydant et à l'apoptose (Guegan and Przedborski 2003). Paradoxalement, il fut montré il y a quelques années qu'une surexpression de la SOD1 mutée, exclusivement dans les motoneurons de souris, ne permettait pas le déclenchement d'une SLA (Lino et al. 2002; Pramatarova et al. 2001). Il a été envisagé en 2004 que le promoteur Thy-1 utilisé pour cette étude pourrait se révéler trop faible pour atteindre un seuil de toxicité suffisant pour induire la pathologie (Liu et al. 2004). Néanmoins Jaarsma et ses collaborateurs ont rapporté en 2008 que l'expression de la SOD1 mutée exclusivement dans les MN, sous contrôle du promoteur Thy-1, est suffisante pour induire une SLA (Jaarsma et al. 2008). En 2006, une étude sur des souris SOD1^{G93A} a mis en évidence qu'une inactivation spécifique du transgène SOD1 muté dans les motoneurons permettait un retard d'apparition de la pathologie et une augmentation de la survie, de l'ordre de 20% (Boillee et al. 2006).

Néanmoins c'est certainement en 2003 qu'un véritable cap a été franchi, dans l'évolution de l'hypothèse d'une origine pluricellulaire de la pathologie, avec les travaux de Clément et de ses collaborateurs. En effet, cette étude met en évidence l'implication de cellules non neuronales dans le processus pathologique de la SLA. L'utilisation de souris chimères, constituées de cellules sauvages et de cellules surexprimant la forme mutée de la SOD1, a ainsi démontré que la présence de cellules sauvages saines pouvait retarder la dégénérescence des motoneurones portant la SOD1 mutée et ainsi prolonger la survie des animaux chimères. De même, des cellules porteuses de la SOD1 mutée peuvent entraîner la dégénérescence de motoneurones sains (Clement et al. 2003). Ainsi cette nouvelle vision de l'environnement cellulaire observé dans la SLA a conduit à l'étude de l'implication de nombreux autres types cellulaires dans la mise en place des processus pathologiques induisant cette maladie (Figure 6).

II.2.2 Les cellules myélinisantes

Afin d'assurer une bonne conduction nerveuse dans le système nerveux moteur, les axones des NM corticaux et des MN sont myélinisés. La myélinisation des axones est assurée par les olidodendrocytes dans le système nerveux central (SNC) et par les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (SNP).

Les cellules de Schwann ont un rôle actif au niveau périphérique, notamment par leur activité de soutien à la JNM (Woodhoo and Sommer 2008). Elles sont également impliquées dans les processus de régénérations nerveuses suite à une lésion, en particulier en phagocytant leur myéline pour permettre une meilleure repousse axonale. De plus, elles ont la capacité de synthèse de facteurs trophiques tels que le GDNF, IGF-1 ou le CNTF, qui permettent une attractivité de la fibre en croissance par un phénomène de "sprouting" ou pousse. Une fois la régénérescence axonale effectuée, les cellules de Schwann remyélinisent la fibre nouvellement synthétisée. La perte de ces cellules conduit bien souvent à une perte d'innervation par dégénérescence de l'axone entraînant la mort des MN. Ces altérations ont par exemple été décrites dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Scherer and Wrabetz 2008). Dans le cas de la SLA, bien que les cellules de Schwann semblent résistantes à l'accumulation de la SOD1m, des atteintes de myélinisation des nerfs ont été observées (Perrie et al. 1993). En 2010, une étude réalisée par Turner et ses collaborateurs a montré qu'une accumulation massive de SOD1m dans les cellules de Schwann de souris chimères n'exprimant la SOD1m que dans ces cellules, n'entraînait

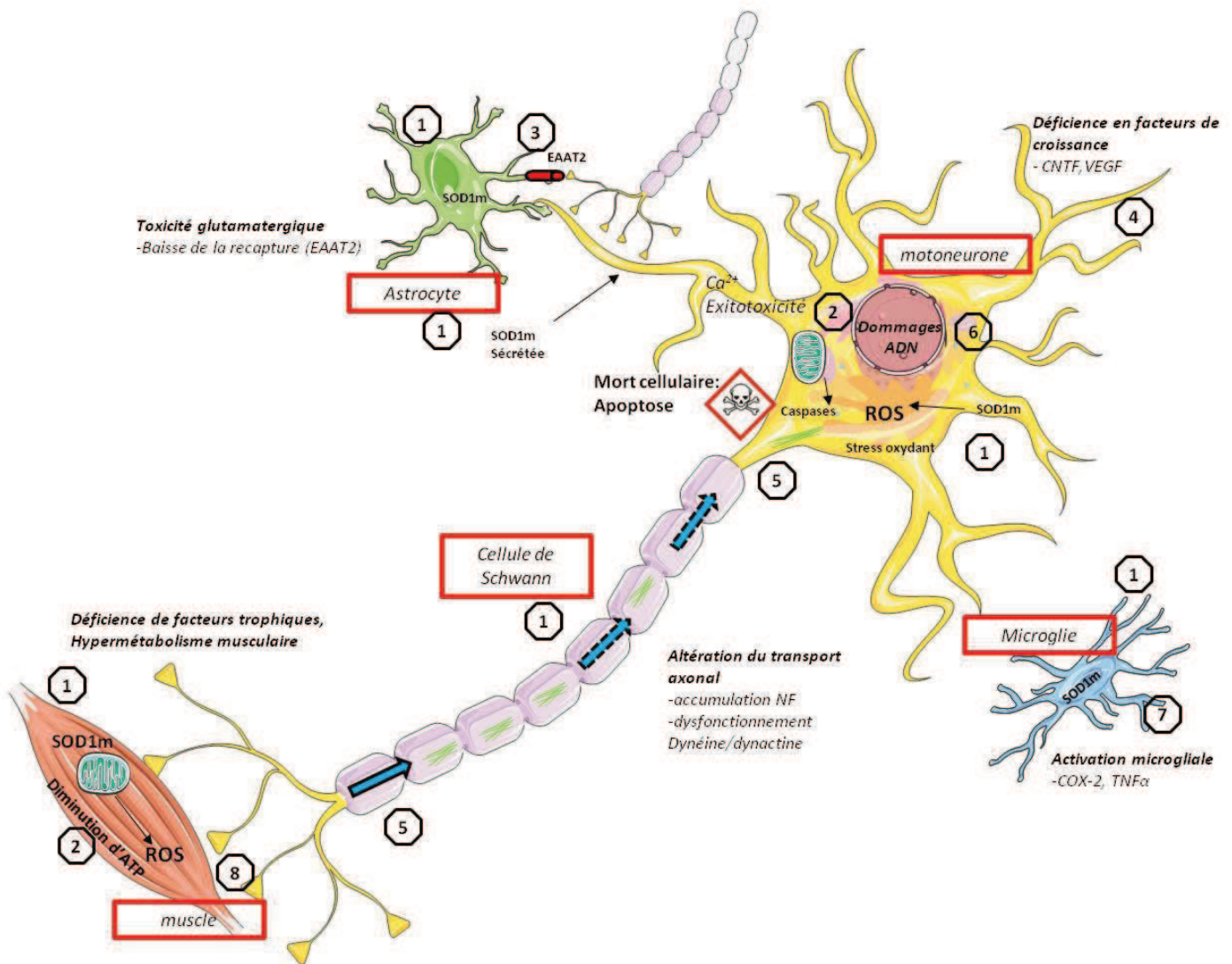


Figure 6 : Principaux mécanismes physiopathologiques de la SLA

1. Gains de fonctions de la SOD1m: agrégation- sécrétion- production de ROS
2. Dysfonctionnement mitochondrial
3. Toxicité glutamatergique
4. Déficiency en facteurs de croissance
5. Altération du transport axonal
6. Domage ADN/Protéine/Lipides
7. Activation microgliale
8. Hypermétabolisme musculaire / altération de la JNM / déficiency de facteurs trophiques

pas d'atteintes locomotrices et ne conduisait pas à la mort des animaux (Turner et al. 2010). En revanche il fut montré qu'une invalidation de la SOD1m dans les cellules de Schwann provoquait une accélération de la pathologie chez les souris SOD1m (Lobsiger et al. 2009). L'explication avancée était que les cellules de Schwann produisaient moins de facteurs trophiques, en particulier de l'IGF-1, réduisant alors la capacité d'attractivité des fibres nerveuses. Cependant une étude plus récente montre le contraire, en présentant la perte spécifique de la SOD1m dans les cellules de Schwann comme bénéfique pour la survie des animaux (Wang et al. 2012). La différence qui réside entre ces deux études porte sur le modèle utilisé. En effet la première étude mettant en évidence une aggravation de la pathologie était basée sur le modèle SOD1^{G37R} alors que la seconde s'appuie sur le modèle SOD1^{G85R}. Il s'agit de deux autres modèles de souris transgéniques portant une mutation sur le gène de la SOD1. L'explication avancée est fondée sur le maintien de l'activité dismutase dans le cas de l'utilisation du modèle SOD1^{G37R} et son absence dans le cas de l'utilisation du modèle SOD1^{G85R}. Les différences observées dans ces études témoignent de l'importance du choix du modèle utilisé pour l'analyse de la pathologie.

Les oligodendrocytes au niveau central influencent la différenciation des motoneurones durant le développement et permettent leur survie par la suite. Peu d'études ont porté sur le rôle des oligodendrocytes dans la SLA. Toutefois, en 1984, Delisle et Carpenter ont montré une atteinte de la myéline dans le faisceau pyramidal de patients SLA (Delisle and Carpenter 1984). La diminution du nombre d'oligodendrocytes observée dans la moelle épinière des souris SOD1m serait imputable au stress du RE induit par la mutation de la SOD1 (Ito et al. 2009). Plus récemment Kang et ses collaborateurs ont montré une atteinte précoce des oligodendrocytes de la moelle épinière de souris SOD1m pendant la phase asymptomatique de la maladie (Kang et al. 2013). Ils ont également mis en évidence qu'une délétion spécifique de la SOD1m dans les oligodendrocytes de souris SOD1m retardait l'apparition de la maladie et induisait une augmentation de la survie des animaux. La perte oligodendrocytaire observée dans la SLA est peu compensée par une augmentation de la prolifération et la différenciation des précurseurs des oligodendrocytes, car cette différenciation ne semble pas aboutir à des oligodendrocytes fonctionnels (Philips et al. 2013). En effet il a été vu une baisse d'expression de la protéine basique de la myéline (MBP) ainsi qu'une baisse

d'expression du transporteur monocarboxylate dont le rôle est associé au métabolisme énergétique (Halestrap and Wilson 2012).

Dans l'ensemble, ces études laissent à penser que les cellules myélinisantes ne sont pas directement impliquées dans les premières atteintes retrouvées dans la SLA, mais qu'elles seraient une cible secondaire d'une atteinte neuronale plus générale.

II.2.3 Les microglies

Différentes études ont montré que les cellules immunitaires du SNC sont affectées dans la maladie. C'est ainsi qu'ont été retrouvées des microglies activées dans le cerveau et la moelle épinière de patients SLA et de souris SOD1m modèles pour la pathologie (Corcia et al. 2012; Henkel et al. 2006; Henkel et al. 2004; Kriz et al. 2002; Turner et al. 2004). Tout comme pour les études impliquant les MN, les travaux traitant de l'implication d'autres types cellulaires sont essentiellement basés sur la surexpression ou sous-expression de formes mutées de la SOD1. C'est ainsi que l'étude des microglies a révélé un rôle prédominant de ce type cellulaire. En effet, l'inactivation ciblée de la forme mutée de la SOD1 dans les microglies et macrophages, entraîne une augmentation de la survie des souris SOD1m de l'ordre de 30% (Boillee et al. 2006). Toutefois, l'apparition des symptômes ne semble pas modifiée suite à la diminution d'expression de la SOD1 mutée. De ce fait, survenant apparemment à un stade plus avancé de la pathologie, la microglie ne peut être considérée comme un acteur inducteur de la maladie. Une autre étude parue la même année a confirmé ces propriétés des microglies. Pour ce faire, Beers et ses collaborateurs ont invalidé un gène (PU.1) nécessaire au développement de la lignée de cellules myéloïdes. Les souris modèles générées (SOD1^{G93A} chimères) présentaient des microglies saines issues de la greffe de moelle osseuse de souris sauvages. Une augmentation de l'espérance de vie, sans modifier l'apparition des symptômes, a donc été observée (Beers et al. 2006). De même, des souris sauvages porteuses d'une greffe de moelle osseuse issue de souris transgéniques (SOD1^{G93A}) ne développent pas d'altérations motrices caractéristiques de la SLA ce qui apporte une confirmation supplémentaire au rôle "secondaire" des microglies dans la SLA. Très récemment, Roberts et ses collaborateurs ont montré que des agrégats de SOD1m entraînaient l'activation microgliale à travers la voie de CD14 (Roberts et al. 2013)

Les aspects inflammatoires ont par la suite été étudiés. Ainsi, il fut montré en 2001 que la cyclooxygénase-2 (COX-2) est fortement exprimée dans la moelle épinière de patients SLA (Yasojima et al. 2001). COX-2 est une enzyme retrouvée dans de nombreux foyers inflammatoires. Elle est notamment connue pour son implication dans la libération de médiateurs inflammatoires tels que les prostaglandines. L'utilisation d'un inhibiteur de COX-2 a permis de retarder l'apparition de la maladie et d'augmenter la survie des souris SOD1m (Drachman et al. 2002). En revanche l'essai chez le patient d'un inhibiteur de COX2 (Celecoxib) n'a apporté aucun effet bénéfique (Cudkowicz et al. 2006). Par ailleurs, l'inhibition de l'activation microgliale, à l'aide de minocycline, a permis un retard d'apparition de la SLA et une augmentation de la survie chez les animaux (Kriz et al. 2002; Van Den Bosch et al. 2002; Yrjanheikki et al. 1999). Cet effet est associé à une baisse d'activation de la voie pro-inflammatoire (M1) et à une baisse de la surexpression de NF- κ B (Kobayashi et al. 2013).

Enfin, des études portant sur les aspects de la neuro-inflammation ont identifié la présence de cytokines pro-inflammatoires dans la moelle épinière de souris SOD1m; c'est le cas notamment de TNF-alpha (tumor necrosis factor α) (Hensley et al. 2003; Yoshihara et al. 2002). Là encore, une inhibition de ce facteur retarde légèrement l'apparition de la pathologie. Au contraire, en 2006 l'étude de Gowing et ses collaborateurs a montré qu'une absence de TNF- α n'avait pas d'effet sur la survie des motoneurones et des souris SOD1m (Gowing et al. 2006).

II.2.4 Les astrocytes

Des lésions astrocytaires et une astrocytose ont été détectées dans la SLA (Bruijn et al. 1997; Kushner et al. 1991; Nagy et al. 1994; O'Reilly et al. 1995). Les astrocytes, dont les fonctions principales sont le dialogue intercellulaire, la modulation du signal et le maintien des besoins métaboliques du système nerveux, sont donc également touchés dans la SLA. Des approches similaires aux études sur les microglies ont été mises en place pour élucider le rôle astrocytaire dans la SLA. C'est ainsi qu'en 2000, la surexpression, exclusivement astrocytaire, de la SOD1m a conduit à une astroglie réactionnelle. Cependant cette surexpression spécifique de la SOD1 mutée dans les astrocytes n'a pas entraîné d'atteintes motrices chez les souris (Gong et al.

2000). Cette étude contraste avec celle publiée en 2003 par une autre équipe, qui met en évidence, grâce à l'utilisation de souris chimères, que les astrocytes peuvent influencer le cours de la pathologie. Il semblerait que contrairement aux microglies, les astrocytes porteurs de la SOD1^m soient capables d'induire une dégénérescence de motoneurones sauvages. Cette étude révèle également que des astrocytes sauvages semblent à même de préserver l'intégrité des motoneurones mutés (Clement et al. 2003). Différents travaux ont, par la suite, permis de mieux comprendre le rôle ambigu des astrocytes dans la pathologie à travers l'étude de facteurs solubles.

Ainsi, en culture, la surexpression de la SOD1^m dans les astrocytes induit une dégénérescence des motoneurones par libération de facteurs solubles (Di Giorgio et al. 2007; Nagai et al. 2007; Pehar et al. 2004). En effet dans la pathologie, les astrocytes sont activés par le FGF-1 (fibroblaste growth factor 1) relargué par les neurones en souffrance (Cassina et al. 2005). Cette activation induit une surproduction de NGF (nerve growth factor) par les astrocytes, qui va induire la mort des motoneurones par apoptose à travers la voie p75^{NTR} (Lowry et al. 2001; Pehar et al. 2004; Yoshida and Gage 1991). De plus, il fut décrit très récemment que la libération de ces facteurs par les astrocytes influencerait l'hyperexcitabilité des neurones par augmentation de leurs concentrations ioniques intracellulaires, et que l'effet bénéfique du riluzole passerait par une diminution de cette hyperexcitabilité (Fritz et al. 2013).

De façon intéressante, les astrocytes apportent aussi une neuroprotection aux motoneurones suite à l'activation de la voie NRF2. En effet, l'activation de la voie de réponse au stress, modulée par NRF2 retarde l'apparition de la maladie et accroît la survie des animaux (Vargas et al. 2008).

L'opposition apparente entre les résultats de ces différentes études semble en réalité traduire un mécanisme et un équilibre subtils, reflétant les nombreuses interactions cellulaires existant dans la SLA. Ces nombreux acteurs cellulaires intervenant dans les mécanismes physiopathologiques sont d'origines variées et s'étendent au-delà du système nerveux. Nous nous intéresserons ultérieurement au muscle, un autre acteur cellulaire impliqué dans la pathologie.

II.3 La SLA, une pathologie multifactorielle : Mécanismes physiopathologiques

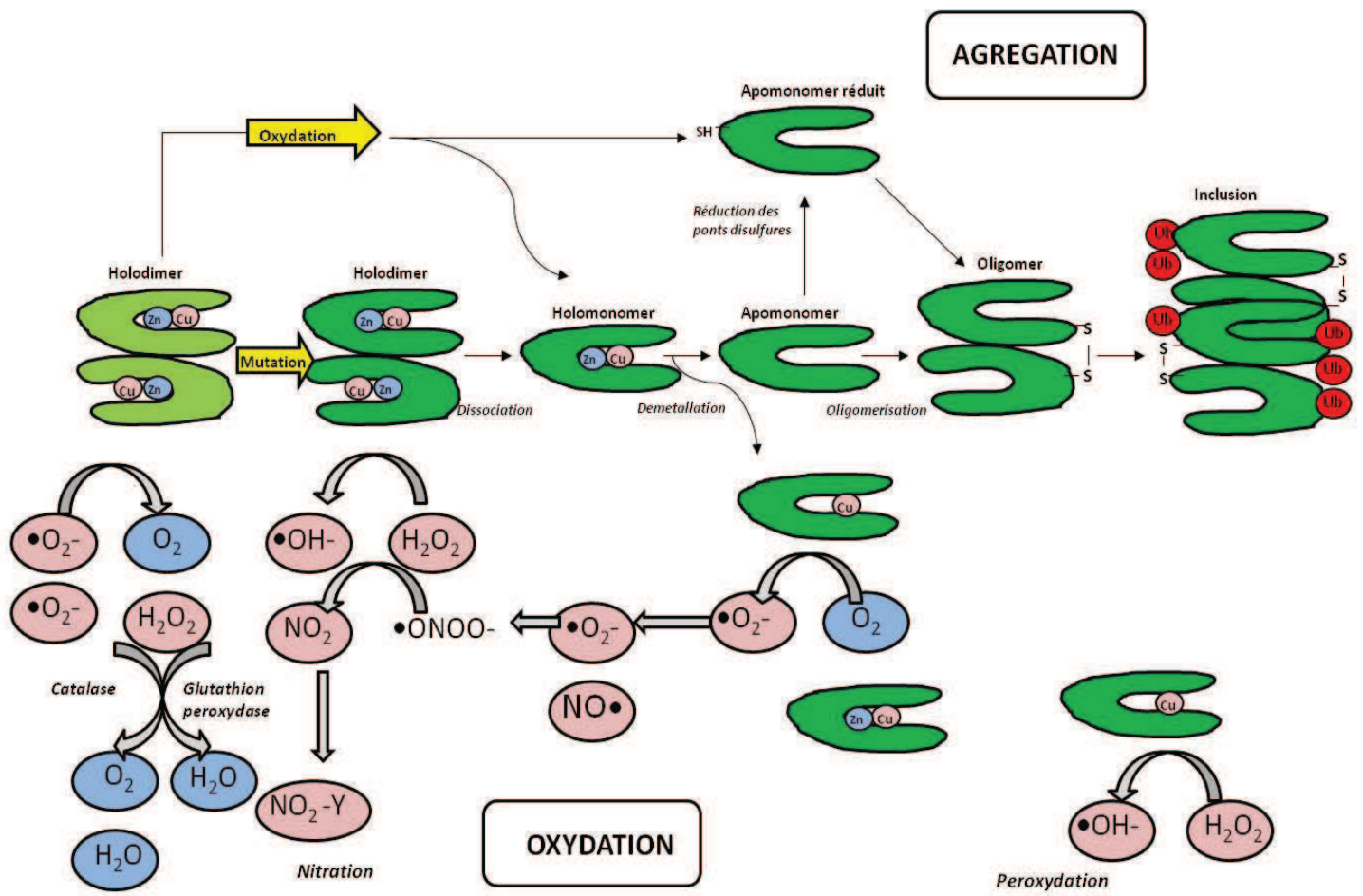
II.3.1 Stress oxydant : la SOD1 mutée

Tous les organismes vivant en aérobie produisent des espèces réactives oxygénées, (Reactive Oxygen Species ou ROS) comprenant des radicaux libres. La production de ces ROS ne constitue pas en soi un stress oxydant. En revanche un mauvais équilibre entre la production de ces ROS et leur élimination par la cellule, induit des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Ce stress oxydant risque de mettre en péril l'intégrité cellulaire.

Les radicaux libres mis en évidence sont les radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), le monoxyde d'azote ($\bullet NO$) et les radicaux hydroxyles ($\bullet OH$). On trouve également des molécules à fort potentiel oxydant telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO$). Pour lutter contre les effets délétères de ces molécules, les cellules disposent d'un système de détoxification complexe, basé sur l'utilisation de molécules antioxydantes telles que les vitamines E et C, ou encore le β -carotène. Les cellules disposent également d'un bagage enzymatique disposé à lutter contre l'accumulation de ces espèces réactives. Ainsi la superoxyde dismutase à cuivre et zinc (SOD1) constitue le premier défenseur cellulaire contre les radicaux libres.

La SOD1 est localisée dans le cytosol et dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Jaarsma et al. 2001; Mattiazzi et al. 2002; Okado-Matsumoto and Fridovich 2001). La SOD1 se présente en homodimère de 15,8 kDa et chaque sous-unité, et comporte un site de liaison au cuivre à fonction catalytique, et un site de liaison au zinc à fonction structurale. Cette enzyme de 153 acides aminés catalyse la conversion des ions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La catalase et les peroxydases interviennent ensuite sur ce peroxyde d'hydrogène et le transforme en dioxygène (O_2) et en molécules d'eau (H_2O) (Figure 7).

Lors de l'identification de mutations dans le gène de la SOD1, plusieurs hypothèses ont été émises quant aux mécanismes mis en jeu dans la SLA. Il a ainsi été envisagé des mutations conduisant à des pertes de la fonction enzymatique, expliquant l'augmentation du stress oxydant retrouvé dans la SLA. En effet, il fut montré une perte d'activité de la SOD1m dans les globules rouges des patients SLA (Deng et al. 1993). Cependant des études ultérieures ont conduit à reconsidérer cette perte de



(D'après Cleveland et Rothstein 2001)

Figure 7 : Fonctions toxiques de la SOD1 mutée conduisant aux mécanismes pathologiques retrouvés dans la SLA

Pour lutter contre le stress oxydant l'organisme dispose de la SOD1, agissant en holodimères. Des mutations ou l'oxydation de la SOD1 vont induire sa monomérisation et la perte de la fixation des ions métalliques ainsi que la réduction des ponts disulfures. Cette forme de la SOD1 entraîne une réaction inverse favorisant la production des radicaux hydroxyles à partir du peroxyde d'hydrogène. Elle conduit également à la production d'anions superoxydes à partir de l'oxygène, qui vont s'associer au monoxyde d'azote pour former des peroxynitrites. La mutation de la SOD1 entraîne la formation d'agrégats cytotoxiques ubiquinilés insolubles de SOD1 mutée qui déstabilisent l'organisation intracellulaire.

fonction. Il semblerait que certaines mutations de la SOD1 n'induisent pas de perte d'activité chez les patients et les souris modèles (Hayward et al. 2002). De même, l'inactivation génique de la forme sauvage de la SOD1 n'induit pas une pathologie de type SLA (Reaume et al. 1996). Il faut néanmoins citer la présence de troubles moteurs, d'une axonopathie ainsi que d'une dénervation très tardive (Fischer and Glass 2007; Flood et al. 1999; Muller et al. 2006). Les premiers signes cliniques retrouvés chez les souris SOD1^m ne semblent donc pas être directement liés à la fonction dismutase de l'enzyme.

Parallèlement à ce premier courant de pensées, des hypothèses portant sur un gain de fonction toxique suite à la mutation de la SOD1, ont vu le jour. Ces nouvelles hypothèses mettent en évidence, selon les cas, une altération de structure conduisant à des changements de conformation tridimensionnelle et/ou à une activité catalytique aberrante (Araki et al. 2012; Museth et al. 2009; Perry et al. 2010; Sahawneh et al. 2010).

II.3.1.a Formation d'agrégats toxiques de la SOD1 mutée

Chez la souris, des changements de conformation protéique ont été observés suite à l'étude des mutations du gène *sod1*. Il résulte de ces mutations des agrégats protéiques insolubles dans le cytoplasme (Figure 7). On trouve ces agrégats chez les patients humains et les souris modèles, dans différents types cellulaires tels que les motoneurones, les cellules musculaires et les astrocytes (Bruijn et al. 1997; Johnston et al. 2000; Kato et al. 1996; Wang et al. 2009). Chez les souris SLA, on trouve ces agrégats dès la phase asymptomatique de la maladie, ils augmentent jusqu'à la phase symptomatique (Wang et al. 2002). L'augmentation de la concentration est corrélée à l'évolution de la pathologie (Turner et al. 2003).

Ces agrégats pourraient provenir de l'altération des sites de liaisons au cuivre et au zinc, entraînant une déstabilisation du dimère (Hayward et al. 2002; Strange et al. 2003; Wang et al. 2007a). Les effets toxiques de ces agrégats sont en partie associés aux interactions de ces complexes avec d'autres protéines qui voient alors leur activité diminuer, perturbant de ce fait les fonctions cellulaires essentielles. On peut citer, par exemple, une diminution de la synthèse protéique dans les motoneurones ou un déficit dans la maturation et la dégradation des ARN et des protéines (Strong 2010; Ticozzi et

al. 2010). Le fort taux de protéines ubiquitinylées a conduit les études vers l'analyse du protéasome et des protéines chaperonnes (Watanabe et al. 2001).

Les protéines chaperonnes Hsp (heat shock proteins) ont été trouvées au sein des agrégats protéiques. Les augmentations de Hsp27, α B-crystalline ou de Hsp 40,60,70,90 furent alors associées à une tentative cellulaire de lutte contre ces agrégats (Vleminckx et al. 2002; Wang et al. 2003; Wang et al. 2005). Ainsi l'augmentation de l'expression de ces protéines chaperonnes est intimement liée à leur séquestration dans les agrégats de SOD1m (Wang et al. 2009). Parallèlement, il a été montré qu'une augmentation artificielle de l'expression des protéines chaperonnes, grâce à un traitement à l'arimoclomol, permettait une augmentation de la survie des animaux SOD1m (Kieran et al. 2004). Pour conclure, l'accumulation massive de SOD1m ubiquitinylée intoxiquerait le protéasome, ce dernier perdrait alors sa capacité à dégrader les autres protéines cellulaires, notamment en raison de la diminution de disponibilité des protéines chaperonnes (Cheroni et al. 2009; Cheroni et al. 2005). Cette dernière étape est représentée par le (1) de la (Figure 6).

II.3.1.b Stress du réticulum endoplasmique, dysfonctionnement mitochondrial et apoptose

Les inclusions cytoplasmiques de la SOD1m perturbent les organites cellulaires, notamment le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie, qui seront tous deux décrits dans cette section.

Différentes études *in vitro* ont montré la sécrétion de la SOD1 dans différents types cellulaires, tels les hématocytes ou une lignée cellulaire de motoneurones (NSC34) (Mondola et al. 1996; Turner and Atkin 2006). Cette sécrétion fait suite à un passage par le RE (Turner et al. 2005; Urushitani et al. 2006). Ainsi la présence de SOD1m dans le RE induirait un stress du RE, observé chez les patients SLA (Ito et al. 2009; Sasaki 2010) et les souris SOD1m (Atkin et al. 2006; Kikuchi et al. 2006; Saxena et al. 2009); hypothèse renforcée par la présence de protéines spécifiques du RE dans les agrégats intracellulaires (Bergemalm et al. 2010). Ce stress du RE semble imputable à une interaction entre la SOD1m et la Derlin-1, connue pour son rôle dans la rétro-translocation des protéines mal conformées du RE vers le cytoplasme (Nishitoh

et al. 2008). Afin de réduire l'accumulation de protéines aberrantes, la cellule met en place une réponse adaptée, la réponse UPR (*unfolded protein response*).

Cette réponse induit une augmentation de la synthèse de protéines chaperonnes, une diminution de l'entrée de nouvelles protéines dans la lumière du RE et oriente les protéines vers les voies de dégradation (Foufelle and Ferre 2007). Néanmoins si la réponse UPR s'avère insuffisante au vu des dommages cellulaires, le choix de l'apoptose est alors engagé (Saxena et al. 2009).

Par ailleurs, de nombreuses anomalies morphologiques de la mitochondrie ont été rapportées comme affectant divers tissus, tels le tissu nerveux, musculaire ou hépatique de patients SLA (Masui et al. 1985; Nakano et al. 1987; Sasaki and Iwata 1996; Siklos et al. 1996; Wiedemann et al. 2002; Wiedemann et al. 1998). Lors de la phase asymptomatique des souris SOD1m, des altérations mitochondriales sont déjà observées, en particulier des vacuolisations associées à des troubles de la perméabilité membranaire (Dal Canto and Gurney 1995; Higgins et al. 2003; Jaarsma et al. 2000).

Ces troubles de la perméabilité affectent le potentiel de membrane mitochondrial (De Vos et al. 2007) et entraînent une diminution de la synthèse d'ATP, par réduction d'activité des complexes de la chaîne respiratoire dans le muscle et la moelle épinière de patients SLA et de souris SOD1m (Echaniz-Laguna et al. 2006; Jung et al. 2002; Wiedemann et al. 2002). De même en 2003 notre équipe a montré une altération musculaire de la chaîne respiratoire mitochondriale chez les souris SOD1m, dans lesquelles une baisse de la concentration intracellulaire d'ATP a été observée (Dupuis et al. 2003). L'homéostasie du Ca^{2+} est, elle aussi, perturbée au niveau mitochondrial (Damiano et al. 2006; Jaiswal and Keller 2009; Palecek et al. 1999). En effet, l'excitotoxicité glutamatergique retrouvée dans la SLA (voir section II.3.2) entraîne une augmentation marquée de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , que la mitochondrie défaillante ne peut plus réguler; cette dernière participe alors directement à la mort cellulaire par apoptose (mécanisme décrit dans le paragraphe suivant) (Haase et al. 2008; Stout et al. 1998).

Tout comme pour le RE, les altérations mitochondriales trouvées dans la SLA semblent liées aux inclusions de la SOD1m. Ces inclusions empêchent une importation suffisante de protéines vers la mitochondrie (Liu et al. 2004; Vande Velde et al. 2011; Vande Velde et al. 2008) et induisent un stress oxydant (Martin et al. 2005; Radi et al.

2002). Les altérations mitochondriales semblent, tout comme pour le RE, résulter en une activation de la voie apoptotique (Pasinelli et al. 2004).

Aujourd'hui les différents mécanismes conduisant à la mort neuronale sont mieux connus. Ainsi de nombreux marqueurs apoptotiques ont été décrits dans la SLA. On peut de ce fait citer l'activation de la caspase 1, induite très précocement dans la maladie (Pasinelli et al. 2000; Vukosavic et al. 2000), ou encore des évènements plus tardifs comme le relargage du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol ainsi que l'activation de la caspase 9, 3, 7 et 12 (Guegan et al. 2001; Kikuchi et al. 2006; Wootz et al. 2004). De même, d'autres études ont montré la séquestration de protéines anti-apoptotiques telles Bcl-2 et Bcl-xL dans les agrégats de SOD1m (Pasinelli et al. 2004). Il a été décrit une diminution des taux de Bcl-2 et Bcl-xL ainsi qu'une augmentation des facteurs pro-apoptotiques tels que Bax, Bad, Bcl-xS dans les modèles animaux (Gonzalez de Aguilar et al. 2000; Vukosavic et al. 1999). Par ailleurs, une suppression de BIM (facteur pro-apoptotique) chez les souris SOD1m retarde l'apparition de la maladie (Hetz et al. 2007). De même une délétion de facteurs pro-apoptotiques, Bax ou une augmentation de Bcl-2 augmente la survie des motoneurones (Gould et al. 2006; Kostic et al. 1997). Au cours de la pathologie, d'autres gènes sont également touchés, notamment le gène codant pour Fas (APO-1, CD95), un récepteur de la famille du TNF (*tumor necrosis factor*), impliqué dans la réponse à la mort cellulaire. En 2002 Hensley et ses collaborateurs ont décrit une augmentation d'expression de Fas dans la moelle épinière de souris SOD1m (Hensley et al. 2002). Cette augmentation d'expression observée chez ces animaux a été associée à une plus grande sensibilité à l'oxyde nitrique (NO) des MN exposés à la SOD1m (Raoul et al. 2006; Raoul et al. 2002). L'activation de Fas conduirait à la mort cellulaire par l'intermédiaire de la FADD et la caspase-8.

Les voies de l'apoptose semblent fortement associées à la dégénérescence des MN dans la SLA. Bien que certains essais aient tenté d'agir sur cette voie pour préserver l'intégrité neuronale (Waldmeier and Tatton 2004), il paraît toutefois nécessaire d'intervenir en amont de ces processus de mort cellulaire. Cette étape est représentée en (2) de la (Figure 6).

II.3.2 Excitotoxicité glutamatergique

La communication cellulaire entre les NM du cortex et les MN de la moelle épinière est assurée par un neurotransmetteur bien connu, le glutamate (Hamilton and Attwell 2010). Son activité excitatrice est relayée par les récepteurs NMDA (*N-méthyl D-aspartate*) et AMPA (*α amino 3-hydroxy 5-méthyl 4-isoxazole propionic acide*). Afin de moduler l'action excitatrice du glutamate au niveau de la synapse, près de 80% du glutamate extracellulaire est recapturé par les astrocytes, via leurs récepteurs EEAT (récepteurs d'acides aminés excitateurs).

Les premières constatations d'altération homéostatique du glutamate dans la SLA datent des années 90. Dans leurs travaux, Rothstein et ses collaborateurs ont décrit une concentration de glutamate anormalement élevée, dans le LCR de patients SLA (Rothstein et al. 1990; Shaw et al. 1995; Spreux-Varoquaux et al. 2002). Ce taux de glutamate est imputable à une diminution de la recapture de ce neurotransmetteur par les astrocytes, due à une sous-expression de son transporteur EEAT2 (Rothstein et al. 1995). Ces observations ont été également confirmées chez les souris SOD1m (Bruijn et al. 1997; Howland et al. 2002; Warita et al. 2002). Par la suite il a été montré qu'une surexpression du transporteur EEAT2 dans les astrocytes permettait de réduire le déficit moteur et diminuer la mort des MN, sans toutefois améliorer la survie des animaux (Guo et al. 2003). De même il a été montré en 2009 que les MN eux-mêmes sont capables de réguler la présence de glutamate dans la fente synaptique (Yang et al. 2009). Ainsi une baisse de la recapture du glutamate par les MN pourrait favoriser l'excitotoxicité glutamatergique.

L'effet toxique du glutamate est dû à une suractivation des MN qui voient leur concentration intracellulaire de Ca^{2+} augmenter. Une hypothèse met en jeu la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA connue pour son activité de régulation de la perméabilité au Ca^{2+} . En effet, l'absence de cette sous-unité GluR2 accroît la sensibilité au glutamate, et donc la perméabilité au Ca^{2+} (Van Damme et al. 2002). Cet afflux massif de Ca^{2+} entraîne une activation majeure de nombreuses enzymes telles que la phospholipase C, les endonucléases et les protéases. Petit à petit, ces enzymes dégradent l'environnement intracellulaire par destruction progressive du cytosquelette, des membranes cellulaires et de l'ADN. Ce phénomène pourrait expliquer, en partie, la perte des MN dans la SLA (Choi et al. 2009). Ainsi un croisement entre des souris

SOD1m et des souris portant cette sous-unité GluR2 donne lieu à un retard d'apparition de la maladie et à une augmentation de la survie des animaux (Tateno et al. 2004).

Les différentes observations et analyses de cette excitotoxicité glutamatergique ont conduit à utiliser un anti-glutamatergique comme traitement contre la SLA. Ainsi, le Riluzole (Rilutek[®]), un inhibiteur des canaux sodiques et calciques dépendant du voltage est couramment utilisé dans le traitement de la SLA (Lacomblez et al. 1996a). Cependant, l'efficacité du riluzole reste modérée chez les patients SLA et ne prolonge la survie que de 2 à 7 mois (Miller et al. 2003). De plus, son action réelle semble depuis quelque temps remise en question, ou en tout cas discutable, puisque l'utilisation d'autres anti-glutamatergiques s'est révélée totalement inefficace face à la maladie. C'est le cas notamment du Topiramate (Maragakis et al. 2003), du Gabapentin (Kalra et al. 2003), ou encore du Dextromethorphan (Gredal et al. 1997) et du Ceftriaxone (Carelli et al. 1994)(NCT00718393). Cette excitotoxicité glutamatergique est représentée en (3) de la (Figure 6).

II.4 Altérations métaboliques : une histoire de lipides

II.4.1 L'hypermétabolisme dans la SLA

Au cours de ces dernières années, il a été montré que la SLA n'est pas seulement le reflet d'une défaillance du système nerveux, mais que bien d'autres systèmes sont perturbés dans la pathologie. En effet, des altérations du métabolisme énergétique ont été mises en évidence chez les patients et les souris. Ainsi, une origine périphérique en particulier musculaire ou du moins systémique, impliquant différents organes est aujourd'hui admise.

II.4.1.a Dysfonctionnements métaboliques

En 2001, Desport et ses collaborateurs ont mis en évidence que les patients SLA présentaient une augmentation de leur dépense énergétique au repos de l'ordre de 10 à 20% (Desport et al. 2001; Desport et al. 2005). C'est ce qu'on appelle

l'hypermétabolisme. Ces observations ont été confirmées et affinées par de nombreux travaux au cours de ces dernières années. Cet hypermétabolisme apparaît précocement et perdure tout au long de la maladie (Bouteloup et al. 2009; Funalot et al. 2009; Vaisman et al. 2009). Ce déficit énergétique chronique ainsi qu'un syndrome de malnutrition prononcée affectent pas moins de deux tiers des patients, dont la perte de poids progressive (>10%) ainsi que la baisse de l'indice de masse corporelle (<18.5) corrèle avec l'aggravation de la pathologie (Ikeda et al. 2012; Kasarskis et al. 1996; Marin et al. 2011). Par la suite il a été montré que ce déficit est retrouvé dans 100% des cas de SLAf (Desport et al. 2005; Funalot et al. 2009).

II.4.1.b Un muscle énergivore

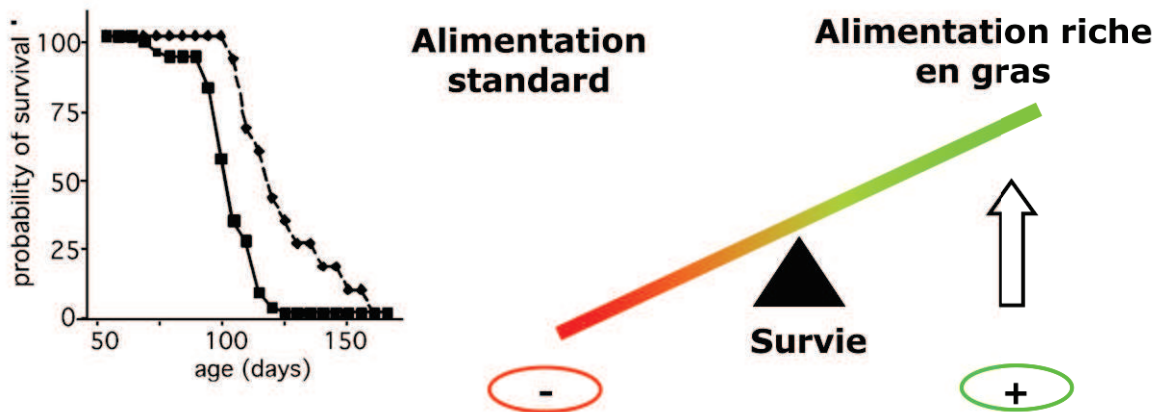
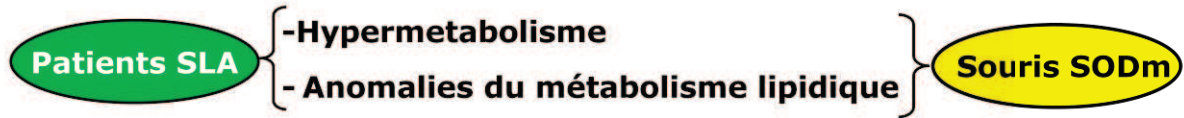
Un hypermétabolisme musculaire marqué chez les souris SOD1m a également été décrit au sein du laboratoire (Dupuis et al. 2004). Ces souris (SOD1^{G86R} et SOD1^{G93A}) présentent une diminution de leurs réserves lipidiques, ainsi qu'un déficit pondéral prononcé. Ces altérations sont observées avant l'apparition des premiers symptômes moteurs et ne relèvent pas de troubles de la prise alimentaire, d'augmentation des hormones thyroïdiennes ou de la thermogenèse chez ces animaux, car en tout point identiques à celles de leurs homologues sauvages.

Chez les souris SOD1m il apparaît que le métabolisme énergétique le plus touché est celui faisant appel à l'utilisation des lipides. A la suite d'une forte clairance lipidique musculaire le taux de lipides circulants est fortement réduit chez les animaux mutés (Dupuis et al. 2004; Fergani et al. 2007). De même il a été montré que l'effet d'un gavage riche en lipides était plus rapidement atténué chez les souris SOD1m que chez les souris sauvages, traduisant ainsi une plus forte capacité des souris mutées à réduire le taux de lipides plasmatiques circulants. Cette capacité provient du fait que les souris SOD1m expriment, au niveau musculaire, plus d'enzymes favorisant la capture lipidique que leurs consœurs sauvages (Fergani et al. 2007). Ce dernier point accentue l'hypothèse d'une origine musculaire de l'hypermétabolisme (Fergani et al. 2007). Cependant on trouve au niveau central durant la phase symptomatique, notamment dans la moelle épinière, une augmentation de l'expression de transporteurs lipidiques (Apoc1, FABP4) (Malaspina et al. 2010).

Par ailleurs l'augmentation du métabolisme basal des carbohydrates a également été montrée expérimentalement. En effet des études ont mis en évidence que les carbohydrates sont davantage consommés par les muscles de souris SOD1m. L'utilisation de glucose radiomarqué, non métabolisable, a permis de montrer que le muscle de souris SOD1m absorbait plus de glucose que celui des souris sauvages, étayant ainsi l'implication du muscle dans l'hypermétabolisme retrouvé dans la SLA (Dupuis et al. 2004).

L'hypermétabolisme décrit ici, semble influencer la dégénérescence de l'axe moteur. La surconsommation lipidique et la diminution des réserves lipidiques ont ainsi conduit le laboratoire à entreprendre une étude consistant à compenser ce déficit énergétique. En apportant un surcroît d'énergie aux animaux, à l'aide d'une alimentation enrichie en gras, nous avons ainsi pu constater une diminution des marqueurs de dénervation au niveau musculaire et une augmentation de la survie des animaux (Figure 8). Des effets similaires ont été observés sur des souris SOD1^{G93A} au cours d'une étude menée par Mattson et ses collaborateurs (Mattson et al. 2007). En revanche, une restriction calorique chez ces animaux entraîne une aggravation de la pathologie (Hamadeh et al. 2005; Patel et al. 2010).

Paradoxalement, chez les patients SLA, malgré un hypermétabolisme prononcé, on observe une lipidémie augmentée. En effet, les patients présentent une augmentation du rapport LDL/HDL (*low density lipoprotein, high density of lipoprotein*) (Dupuis et al. 2008). Une hypothèse envisagée serait que cette augmentation soit imputable à un dysfonctionnement hépatique, associé au métabolisme du cholestérol. Il proviendrait d'un excès de synthèse des VLDL (*very low density lipoprotein*) et d'une baisse de leur catabolisme, induisant une augmentation des LDL et une baisse des HDL. Il a été montré que l'utilisation du rapport LDL/HDL est un pronostic de l'état de survie des patients. En effet les patients ayant un rapport LDL/HDL élevé présentent une espérance de vie plus longue (+15 mois) que les patients possédant un rapport plus faible (Dupuis et al. 2008). A l'inverse, les patients ayant un niveau de lipides circulant plus faible voient s'accélérer la vitesse d'apparition de la détresse respiratoire (Yoshii et al. 2010). Une hypothèse pouvant expliquer cette hyperlipidémie repose sur le fait que les patients SLA sont insulino-résistants. Ainsi l'augmentation de la circulation des acides gras libres et la perturbation de la tolérance au glucose favoriseraient la lipogenèse et réduiraient la lipolyse. De ce fait l'hyperlipidémie et



D'après Dupuis et al., 2004

Figure 8 : Hypermétabolisme musculaire et effets bénéfiques d'une alimentation riche en gras

Les patients SLA et les souris SOD1m présentent un hypermétabolisme marqué ainsi qu'une anomalie du métabolisme lipidique. L'apport d'une alimentation enrichie en gras permet une augmentation de la survie des souris SOD1m.

l'hypermétabolisme lipidique pourraient s'expliquer par cette insulino-résistance (Pradat et al. 2010).

Ces différentes observations permettent petit à petit d'accentuer le rôle d'un trouble métabolique systémique dans le développement de la pathologie, en l'associant aux conséquences sur le système moteur (Martin et al. 2007).

II.4.1.c Le muscle un acteur suicidaire ?

Nous avons vu dans la section précédente que le muscle est fortement impliqué dans les anomalies métaboliques trouvées dans la SLA. A présent nous pouvons nous intéresser à son action et son implication dans la pathologie.

Les cellules musculaires sont affectées très précocement dans la maladie, et la détection de l'atrophie musculaire est un symptôme détecté très tôt au cours du développement de la SLA (Brooks et al. 2004). De même la déstabilisation de la jonction neuro-musculaire (JNM) apparaît comme la première atteinte structurale observée dans la maladie (Fischer et al. 2004): en effet chez un patient SLA le soma des MN peut être intact avec toutefois une dénervation de la JNM. De même, l'analyse effectuée chez les animaux a montré l'existence d'une perte de JNM ainsi qu'une diminution du nombre d'axones bien avant la perte des motoneurones spinaux. Il a été également montré dans des études de neuroprotection qu'une préservation du soma des motoneurones ne suffisait pas à empêcher le décès des animaux dont la perte de JNM conduit irrémédiablement à la faiblesse musculaire et à la mort (Rouaux et al. 2007; Suzuki et al. 2007). De plus, les anomalies du métabolisme musculaire, décrites précédemment, semblent être antérieures à l'atrophie et l'atteinte des JNM (Holl et al. 2008). Au sein du laboratoire nous avons montré que l'hypermétabolisme pourrait être responsable de l'altération des JNM. En effet, en 2003, l'équipe du laboratoire a montré que les souris SOD1m présentaient une augmentation de l'expression musculaire de gènes impliqués dans le découplage mitochondrial (Dupuis et al. 2003). Il fut constaté une diminution de la synthèse d'ATP au profit d'une dissipation énergétique sous forme de chaleur. En 2009, nous avons montré que des souris surexprimant une protéine découplante (la protéine UCP-1), exclusivement au niveau musculaire, sous le contrôle du promoteur MCK (*muscle creatine kinase*), présentaient un hypermétabolisme prononcé (Dupuis et al. 2009b).

Ces souris développent une dégénérescence modérée de la JNM ainsi qu'une atteinte des MN lombaires associée à une astroglie. Ces observations nous confortent dans l'idée que le muscle joue un rôle prépondérant dans la pathologie, à travers des altérations métaboliques entraînant une déstabilisation de l'axe neuro-musculaire. Ces différentes études suggèrent un rôle clé du muscle dans la déstabilisation de la JNM, et mettent en évidence la JNM comme cible privilégiée pour le traitement thérapeutique du déclenchement de la SLA. Dans ce contexte, l'étude de la surexpression musculaire de *l'insuline growth factor 1* (IGF-1) a montré une stabilisation de la JNM ainsi qu'une réduction de l'inflammation spinale associées à un retard d'apparition des symptômes et une augmentation de la longévité des animaux (Dobrowolny et al. 2005; Riddoch-Contreras et al. 2009). Par ailleurs une expression spécifiquement musculaire de la SOD1m est capable d'induire différentes atteintes caractéristiques de la SLA, notamment l'atrophie musculaire, l'astrocytose et la perte de MN (Dobrowolny et al. 2008b; Wong and Martin 2010). Ces résultats suggèrent une forte influence de la SOD1m musculaire dans la pathologie.

D'autres équipes ont montré qu'une diminution du taux protéique de SOD1m musculaire n'influait pas le phénotype des souris SOD1m. Ces résultats reposent sur l'utilisation de lentivirus et *d'adeno associated virus* (AAV) contenant un siRNA dirigé contre la SOD1m (Miller et al. 2006). Dans leurs travaux, Miller et ses collaborateurs ont dans un premier temps injecté le lentivirus, à fort tropisme musculaire, qui ne peut pas être capté par le transport rétrograde. Aucune amélioration phénotypique n'a été observée chez ces animaux en comparaison à leurs homologues non traités. L'injection intramusculaire de l'AAV pouvant utiliser le transport rétrograde et ainsi transfecter les motoneurones a mis en évidence une amélioration de la force musculaire et de la survie des animaux. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la SOD1m exclusivement musculaire ne permet pas d'améliorer le phénotype moteur des animaux et tend à montrer un rôle plus secondaire du muscle dans le déclenchement de la pathologie. Cependant, la diminution de l'expression de la SOD1m réalisée dans cette étude n'est que de l'ordre de 50% ce qui ne permet pas d'exclure une relative toxicité de la SOD1m encore présente. En 2008 une étude basée sur l'utilisation de shRNA dirigé contre la SOD1m a également été entreprise. Ces travaux ont montré qu'une transfection cellulaire étendue avec une bonne efficacité musculaire était envisageable par injection intraveineuse d'AAV. Néanmoins ces résultats présentent une absence d'amélioration

phénotypique des animaux. La encore la diminution partielle du taux de SOD1m peut être incriminée (Towne et al. 2008).

Nous avons vu dans la section II.2.1 que les premiers MN touchés dans la pathologie étaient ceux possédant un large soma avec une forte demande énergétique et innervant les fibres musculaires glycolytiques (Frey et al. 2000; Hegedus et al. 2007; Pun et al. 2006; Saxena et al. 2009). Cette perte précoce des unités motrices rapides et fatigables accentue la possibilité d'une implication du métabolisme musculaire dans la pathologie. En effet une défaillance énergétique chronique pourrait affecter prioritairement les MN et les fibres musculaires à forte demande énergétique. Nous savons qu'au cours de la pathologie s'établit un réarrangement des fibres musculaires avec une "conversion" ou "switch" des fibres glycolytiques en fibres oxydatives (Sharp et al. 2005). Il se peut que les MN au large soma dégèrent et qu'un réajustement s'opère pour maintenir une innervation musculaire suffisante, entraînant ce "switch" de fibres glycolytiques vers oxydatives, pouvant alors être innervées par les petits motoneurones. Il est également possible que suite aux altérations métaboliques, le muscle se restructure et passe spontanément vers un système à métabolisme oxydatif, entraînant alors perte de fonction des motoneurones au large soma conduisant à leur dégénérescence. Cependant, quelle que soit l'origine de ces altérations métaboliques, il semble clair que l'organisme oriente sa préférence énergétique vers la consommation de lipides, ceci expliquant la dyslipidémie retrouvée dans la SLA.

Au delà de son implication dans les troubles métaboliques, le muscle semble également jouer un rôle perturbateur dans les interactions trophiques au niveau de l'axe neuro-musculaire. En effet, nous avons montré que la protéine NOGO-A, qui joue un rôle majeur d'inhibiteur de la croissance neuritique, est fortement exprimée dans le muscle des souris SOD1m et des patients SLA (Dupuis et al. 2002). Il fut montré en 2005 que le niveau d'expression de NOGO-A est corrélé à l'état clinique du patient (Jokic et al. 2005). La suppression de cette protéine chez les souris SOD1m augmente la survie des animaux, alors que sa surexpression chez des souris sauvages entraîne une dénervation musculaire (Jokic et al. 2006). Des analyses cliniques de l'inhibition de NOGO-A et des réticulons ont été réalisées plus récemment et sont actuellement en cours d'analyse (*clinical trials* NCT00213824)

De nombreux autres facteurs trophiques sont impliqués dans les interactions nerfs muscles, tels que le GDNF, ou l'IGF-1 déjà mentionné précédemment. La perturbation de l'expression de ces facteurs par l'agrégation de la SOD1m pourrait accentuer les mécanismes pathologiques de la SLA (Taylor et al. 2007). Des études ont montré que la surexpression muscle spécifique de GDNF ou d'IGF-1 chez les souris SOD1m permettait de retarder l'apparition des premiers symptômes et de prolonger la survie des animaux (Dobrowolny et al. 2005; Li et al. 2007). L'action de certains de ces facteurs pourrait être associée à une diminution de l'inflammation spinale, à une meilleure stabilité de la JNM, ainsi qu'à un renforcement de l'activité des cellules musculaires satellites (Dobrowolny et al. 2008a).

Dans l'ensemble ces résultats montrent que le muscle, avant d'être la cible finale dans la SLA, peut aussi être un acteur majeur influençant le devenir de la pathologie.

II.4.2 Influence lipidique sur la balance pathologique

Nous avons vu dans la section précédente que le métabolisme énergétique est fortement perturbé dans la SLA. Dans ce dernier point nous verrons l'influence que peuvent avoir les lipides dans la pathologie, en reprenant certains points de la revue que nous avons publiée (voir ci-après). Cette revue retrace les différents rôles des lipides dans certaines pathologies des motoneurones. Nous nous intéresserons ici principalement à la SLA.

Les lipides jouent de nombreux rôles dans l'organisme. Ils sont évidemment impliqués dans le métabolisme énergétique, mais ils ont également des rôles de structures au niveau des membranes cellulaires ou encore de messagers et de signalisations.

- **Rôle énergétique**

Concernant les aspects énergétiques, nous ne reparlerons pas ici du "switch" de fibres déjà évoqué dans la section II.4.1.c. Néanmoins il est intéressant de rappeler que patients et souris SLA présentent une diminution drastique d'ATP musculaire (Derave et al. 2003; Dupuis et al. 2003). Les lipides constituent une plus grande

source de production d'ATP que les glucides. Il se peut qu'une baisse de concentration d'ATP induise une plus forte consommation lipidique afin de compenser ce déficit. De plus l'ATP influence la sensibilité à l'acétyl choline, le neurotransmetteur excitateur de la JNM (Lu and Smith 1991). En effet *via* des récepteurs purinergiques post-synaptiques (P2X et P2Y), l'ATP influence le réarrangement et le maintien des récepteurs cholinergiques, nécessaires à la transmission du signal entre nerfs et muscle (Ling et al. 2004; Tsim et al. 2003). Ainsi, il se peut qu'une altération énergétique majeure, influence la production d'ATP, entraînant par voie de conséquence une déstabilisation de la JNM. Au niveau du SNC et du SNP les lipides ont un rôle structural et fonctionnel crucial.

- **Rôle structural**

La fluidité membranaire, la stabilité de la synapse et l'optimisation de la transmission des signaux sont modulées par les lipides. Plus particulièrement, la présence d'acides gras polyinsaturés influence la fluidité membranaire et permet les mouvements de protéines des membranes. Elle favorise de ce fait les interactions cellulaires et la disposition des récepteurs membranaires. Des études intéressantes ont montré une augmentation des sphingolipides et du cholestérol ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique dans la moelle épinière des souris SOD1m et des patients SLA (Cutler et al. 2002). Récemment, une diminution de la proportion d'acides gras polyinsaturés dans la moelle épinière des souris SOD1m et des patients SLA a été décrite (Ilieva et al. 2007). Cette baisse conduit à une diminution de la fluidité membranaire dans la moelle épinière des souris SOD1m. Cette atteinte de la fluidité membranaire observée à l'apparition de la maladie chez les souris SOD1m est vraisemblablement liée au stress oxydant et à la peroxydation lipidique (Miana-Mena et al. 2011). Ces perturbations sont encore mal connues, mais de toute évidence les lipides sont également impliqués dans ces aspects plus structuraux et mécaniques de la pathologie.

- **Rôle signalétique**

Un autre rôle majeur joué par les lipides porte sur les échanges *via* la modulation vésiculaire ainsi que sur la signalisation, à travers leur rôle de second messenger. Ainsi certains acides gras poly-insaturés (PUFA), notamment l'acide eicosapentaénoïque (EPA), l'acide docosahexaénoïque (DHA), qui appartiennent à la classe des Oméga-3, et l'acide arachidonique (ARA) qui appartient aux Oméga-6, ont la

capacité d'agir comme facteurs de transcription par la voie des RXR (retinoid X receptor) (Duda 2012; Gillies et al. 2012; Inamori et al. 2013; Schmidt et al. 2012). Ils peuvent également être convertis en d'autres molécules de signalisation (Bazan 2013; Bazan et al. 2011; Kruger et al. 2010; Trappe et al. 2001; Zhao et al. 2011). Le DHA fut montré il y a quelques années comme acteur majeur dans les pathologies neurodégénératives. Il fut rapporté en 2005 qu'un déficit de DHA entraînait des troubles cognitifs et une mort neuronale (Lukiw et al. 2005). De même, l'augmentation du stress oxydant observée dans le cortex frontal et la moelle épinière de patients SLA, a été associée à des changements de concentration d'acides gras, tel que le DHA (Ilieva et al. 2007). En effet, les patients SLA présentent une forte diminution de la concentration spinale de DHA, qui contraste avec l'augmentation de concentration retrouvée au niveau cortical. Pour comprendre l'importance des espèces lipidiques, il faut garder à l'esprit que le DHA représente pas moins de 40% des PUFA du cerveau, et que plus de la moitié du poids des membranes des neurones est due aux PUFA (Singh 2005). Dans leurs études, Veldink et ses collaborateurs ont ainsi montré que l'augmentation de la consommation de PUFA permettait de réduire le risque de développer une SLA, mettant en évidence le rôle protecteur des Oméga-3 (Veldink et al. 2007). En effet, les Oméga-3 exercent une activité anti-inflammatoire, alors que les Oméga-6 induisent une réponse inflammatoire. Le DHA est connu pour induire une neurogenèse et avoir des effets protecteurs dans le cerveau des animaux-modèles pour les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Arsenault et al. 2011; Ozsoy et al. 2011). Ainsi l'augmentation de DHA chez les souris SOD1m peut être envisagée comme un mécanisme protecteur, développé par l'organisme pour lutter contre les atteintes des NM. Ces effets du DHA passeraient par la diminution de la cyclooxygénase (COX-2) et la lipoxigénase (LOX) connues pour leurs actions pro-inflammatoires. Ces enzymes étant responsables de la formation des prostaglandines, leukotriènes et eicosanoides.

Revue 1

**A plural role for lipids in motor neuron diseases :
energy, signaling and structure**

Florent SCHMITT, Ghulam HUSSAIN, Luc Dupuis, Jean-Philippe Loeffler and
Alexandre Henriques

Soumis à *Frontiers in Cellular Neuroscience*



A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure.

Florent SCHMITT, Ghulam HUSSAIN, Luc Dupuis, Jean-Philippe Loeffler and Alexandre Henriques

Journal Name:	Frontiers in Cellular Neuroscience
ISSN:	1662-5102
Article type:	Review Article
First received on:	30 Jul 2013
Frontiers website link:	www.frontiersin.org

Abstract

Motor neuron diseases (MNDs) are characterized by selective death of motor neurons and include mainly adult-onset amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and spinal muscular atrophy (SMA). Neurodegeneration is not the single pathogenic event occurring during disease progression. There are multiple lines of evidence for the existence of defects in lipid metabolism at peripheral level. For instance, hypermetabolism is well characterized in ALS, and dyslipidemia correlates with better prognosis in patients. Lipid metabolism plays also a role in other MNDs. In SMA, misuse of lipids as energetic nutrients is described in patients and in related animal models. The composition of structural lipids in the central nervous system is modified, with repercussion on membrane fluidity and on cell signaling mediated by bioactive lipids. Here, we review the main epidemiologic and mechanistic findings that link alterations of lipid metabolism and motor neuron degeneration, and we discuss the rationale of targeting these modifications for therapeutic management of MNDs.

Introduction

Motor neuron diseases (MNDs) are a group of incurable neurological disorders caused by the selective degeneration of motor neurons. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most representative motor neuron disease among adults with a incidence rate of 2-3 per 100000 (Brooks, Juhasz-Poscine et al. 2000). It is characterized by progressive muscle weakness and atrophy, loss of upper and lower motor neurons and death ensuing 3-5 years after diagnosis. Majority of ALS patients are of sporadic origin with unclear etiopathology. Several mutations are associated with ALS, in particular in genes encoding superoxide dismutase 1 (*SOD-1*), TAR DNA binding protein of 43-kDa (*TDP-43*), fused in sarcoma (*FUS*) and chromosome 9 open reading frame 72 (*C9ORF72*) (Rosen, Siddique et al. 1993; Mackenzie, Bigio et al. 2007; Deng, Zhai et al. 2010; Laaksovirta, Peuralinna et al. 2010; Shatunov, Mok et al. 2010). Thus, several transgenic mouse models overexpressing various mutant genes have been developed, and the SOD1 model, overexpressing a mutated form of SOD1 gene, is the most studied in ALS (Ripps, Huntley et al. 1995). Spinal muscular atrophy (SMA) is a genetic autosomal and recessive neuromuscular disease, caused by loss of functional survival motor neuron (SMN) gene 1. Patients suffer from degeneration of spinal motor neurons, muscle weakness leading to atrophy. Disease severity ranges from severe, with death of patients before the age of 10, to mild with moderate symptoms with no alteration of life expectancy. Spinal bulbar muscular atrophy (SBMA), also known as Kennedy's disease, is an X-linked recessive disease caused by a CAG-repeat expansion in the gene coding for the androgen receptor, leading to a poly-Q repeat expansion in the protein (Brooks and Fischbeck 1995; Fischbeck, Lieberman et al. 1999). The disease affects mainly males, even though it has been described also in female patients. SBMA is characterized by progressive muscle atrophy and degeneration of lower motor neurons in the brain stem and spinal cord. Similarly to ALS, mouse models have been developed to study SMA and SBMA (Katsuno, Adachi et al. 2003; Bebee, Dominguez et al. 2012).

Along with neuronal degeneration, several alterations of lipid metabolism are found in MNDs. Here, we review the role of lipids in MNDs, with a special attention on energy homeostasis, cell signaling and structure (Figure 1). We further discuss the rationale of targeting lipid metabolism for therapeutic management of MNDs.

Energetic alterations in amyotrophic lateral sclerosis

Multiple previously unrecognized phenotypes occur in ALS patients, in particular, the unbalance between food intake and energy (Braun, Osecheck et al. 2012; Muscaritoli, Kushta et al. 2012). ALS patients often present with dyslipidemia, reduced body mass and increased resting energy expenditure (Table 1, (Desport, Preux et al. 2001; Funalot, Desport et al. 2009; Dupuis, Pradat et al. 2011)). Energetic alterations are similarly found in transgenic animal models of ALS, the SOD1 mice. These mice are leaner than controls, hypermetabolic, hypolipidemic and present increased fatty acid uptake in muscles (Table 2, (Dupuis, Oudart et al. 2004; Fergani, Oudart et al. 2007; Kim, Kim et al. 2011)). Several lines of evidence point to lipid metabolism alterations being crucial for ALS progression. A first incidental event shed some light on the subject. During 2 years, a group of scientists remained isolated environment, and were submitted to long terms caloric restriction (Walford, Mock et al. 2002). From eight members of the group, one died from ALS and another one developed progressive gait impairment and motor neuron degeneration. Epidemiological studies went beyond this case study and documented an association between nutrition and the risk of developing ALS. First, a case control survey made in Japan in 2007 was conducted with the aim to study pre-illness nutritional habits of ALS patients. The authors identified that high carbohydrate and low fat intakes are associated with higher ALS risk (Okamoto, Kihira et al. 2007). More recently, another epidemiologic study focused on anthropometric characteristics of the general population with a follow up over 10 years. The investigators reached the conclusion that high fat content reduces the risk of developing ALS (Gallo, Wark et al. 2013). These clinical data are consistent with the reduced overall survival of SOD1 mice under caloric restriction (Table 2) (Hamadeh, Rodriguez et al. 2005).

Conversely, increased energy intake is beneficial for SOD1 mice. The first evidence emerged in 2004 from our laboratory, when we fed SOD1 mice with a diet enriched in lipids. The treatment restored normal body mass and adiposity, delayed disease onset and motor neuron degeneration, and life expectancy was extended by 20 % (Dupuis, Oudart et al. 2004). The beneficial effects of high fat diet, or ketogenic diet, for SOD1 mice were confirmed by other groups (Table 2) (Zhao, Lange et al. 2006; Mattson, Cutler et al. 2007). In 2008, we aimed to study the link between lipids and disease progression, by quantifying circulating lipids in ALS patients. We found that dyslipidemia, defined by high LDL/HDL ratio, was a characteristic of the ALS group (Dupuis, Corcia et al. 2008), and this dyslipidemia positively correlated with longer survival, increased by 13 months in the group of ALS patients with higher LDL/HDL ratio. Since then, others reported that either hyperlipidemia or high body mass index is a strong prognostic factor for survival (Dorst, Kuhnlein et al. 2011; Paganoni, Deng et al. 2011; Shimizu, Nagaoka et al. 2012; Reich-Slotky, Andrews et al. 2013). For instance, the median life expectancy was higher than 14 months in patients with high serum triglyceride levels (Dorst, Kuhnlein et al. 2011). Last, it was recently observed that subcutaneous fat positively correlated with survival of ALS patients (Lindauer, Dupuis et al. 2013). Conversely, lower LDL/HDL ratio has been linked to respiratory impairments (Chio, Calvo et al. 2009), fast loss of BMI was associated with faster decline (Jawaid, Murthy et al. 2010) and poor nutritional status is a negative prognosis factor (Marin, Desport et al. 2011).

These reports claim for a positive correlation between high circulating lipid levels of lipids or high fat mass and prognosis of ALS patients. The mechanisms in place deserve further investigation, to understand how peripheral lipids interfere with disease progression and how lipids can preserve motor axis integrity.

Energetic substrates and motor units

The motor unit is an anatomical structure responsible for the control of muscle contraction and its destruction represents the first detectable event in ALS (Dupuis and Loeffler 2009).

The motor units are composed of different sorts of spinal motor neurons and muscles fibers, depending on their activity and energetic capacities. Fast fatigable motor units are composed of large alpha-motor neurons and glycolytic muscle fibers that burn preferentially glucose to exert heavy force on a short period. Conversely, slow motor units correspond to small alpha-motor neurons and oxidative muscle fibers, which store and use preferentially fatty acids to produce less intense but constant strength. Large alpha motor neurons are the first to degenerate in ALS models (Pun, Santos et al. 2006; Hegedus, Putman et al. 2007), and fast-twitch motor units are preferentially affected in both ALS patients and mouse models (Schmied, Pouget et al. 1999; Atkin, Scott et al. 2005; Gordon, Tyreman et al. 2010).
90 Stimulation of motor units via regular training was proposed to maintain and strengthen motor function in ALS (Table 3). Clinical investigations reported benefit for ALS patients whom followed moderate and mainly aerobic exercise program, which use lipids as energy source (de Almeida, Silvestre et al. 2012). In particular, specific training of the diaphragm preserved respiratory functions in ALS patients (Mahajan, Bach et al. 2012). It should be noted that these studies were not randomized and suffer from the small size of the cohorts. Moreover, higher release of reactive oxygen species during exercise was reported (Siciliano, D'Avino et al. 2002) and suggest that design for muscular training in ALS patients should be considered with caution.

100 In an animal model of ALS, effects of high frequency and high amplitude training were compared to moderate and endurance training. SOD1 mice were subjected either to swimming-based training, targeting glycolytic motor units, or to running-based training, targeting oxidative motor units (Deforges, Branchu et al. 2009). After training, the group of “swimmer” mice presented with benefits in terms of counts of motor neurons and survival, when compared to proper control. On the contrary, the “running”-trained mice presented a similar disease course compared to sedentary mice. Effect of training on SOD1 mice is not fully clarified. Others reported claimed that moderate exercise alone can improve outcomes in SOD1 mice (Carreras, Yuruker et al. 2010), and most importantly, Gerber and colleagues recently demonstrated that benefits of training in mice might come from the enrichment of the environment rather than mobilization of muscle fibers (Gerber, Sabourin et al. 2012).
110 Therefore, the benefit after different types of training for SOD1 mice targeting different pool of motor units remains to be clarified. Currently, the effects of aerobic versus anaerobic exercises on vital capacity and muscular strength are under clinical investigations (NCT01650818, NCT01521728). Additional work on this topic is required to understand the impact of different exercises, using different energetic sources, on motor units in ALS patients, and why glycolytic motor units are preferentially affected.

Taken separately, the two extremities of the motor units, the muscles and the motor neurons, show abnormal lipid metabolism. Indeed, early in the disease course, glycolytic muscles of SOD1 mice switch towards an oxidative phenotype, presumably due to the loss of their connection to large motor neurons and subsequent reinnervation by “slow” motor neurons
120 (Sharp, Dick et al. 2005). The selective vulnerability of large motor neurons is potentially due to higher energetic needs that could be not fulfilled or a source of oxidative stress. In case of higher needs, neurons can use ketone bodies as energetic substrate when glucose level becomes low (Guzman and Blazquez 2004; LaManna, Salem et al. 2009). In this situation, astrocytes will use lipid to provide ketone bodies to neurons, and potentially motoneurons in ALS (Yi, Habegger et al. 2011). Interestingly, two recent studies have shown abnormally enhanced levels of ketone bodies, released by the breakdown of fatty acids, in the cerebrospinal fluid of ALS patients (Blasco, Corcia et al. 2010; Kumar, Bala et al. 2010). It could suggest that lipid beta oxidation is altered in the CNS of ALS patients.

130 Higher energetic needs have been documented in muscle of SOD1 mice (Dupuis, Oudart et al. 2004). In the animal model, the metabolic shift in muscle fibers (glycolytic to oxidative)

could explain the pronounced appetite for fatty acids in SOD1 muscles, as well as the changes in the expression profile of genes involved in lipid metabolism (Fergani, Oudart et al. 2007; Gonzalez de Aguilar, Niederhauser-Wiederkehr et al. 2008; Thau, Knippenberg et al. 2012). Interestingly, the predominance of oxidative metabolism goes along with deficiency in oxidative mitochondrial chain function, in particular in the muscles of ALS patients (Echaniz-Laguna, Zoll et al. 2002; Dupuis, di Scala et al. 2003; Crugnola, Lamperti et al. 2010). Mitochondria bioenergetic functions are impaired, as shown by Zhou and colleagues, whom described the presence of defective mitochondrion in mass near the neuromuscular junctions that may contribute to the progression of muscle atrophy in ALS (Zhou, Yi et al. 2010). The origin of mitochondrial defect is under investigation. Several potential pathways are proposed to explain the shift in metabolism and the alterations of mitochondrial functions, and they concern the tuning of metabolic pathways. Mitochondrial biogenesis and activity are orchestrated in part by PGC-1 alpha (Lin, Wu et al. 2002; Lin, Handschin et al. 2005; Handschin 2010). In ALS, the implication of PGC-1 alpha has been recently highlighted, as its expression is diminished in the muscles of patients and SOD1 mice (Thau, Knippenberg et al. 2012). The downregulation of PGC-1 alpha will cause modifications of lipid metabolism, and more particularly on the use of fatty acids (Barroso, Rodriguez-Calvo et al. 2011). Interestingly, we have very recently shown that deficiency in PGC1-alpha leads to hasten disease progression in the males of a mouse model of ALS (Eschbach, Schwalenstocker et al. 2013), strengthening the relation between lipid metabolism alterations and disease progression, at least in SOD1 mice. In another study, Da Cruz and collaborators overexpressed PGC1-alpha selectively in muscle of SOD1 mice. They observed that increasing PGC1-alpha in muscle of SOD1 mice increases muscle endurance, reduces atrophy and improves locomotor activity at symptomatic stages of disease. Although, in their study, they did not observed increased survival of SOD1 mice (Da Cruz, Parone et al. 2012), their results suggest that improving muscle activity and reducing atrophy through increased PGC1-alpha could be used as a palliative treatment in ALS.

Stearoyl-Coa desaturase 1 (SCD1) is a key enzyme for the regulation of fatty acid metabolism, and it can impact fatty acid oxidation taking place in mitochondria. SCD1 introduce a double bond in the carbon chain of saturated, to generated mono-unsaturated fatty acids that are more prone to be stored in fat tissues. We have recently reported a downregulation of SCD1 in the muscle of SOD1 mice (Hussain, Schmitt et al. 2013), and in a subpopulation of ALS patients (Pradat, Dubourg et al. 2011). The function of SCD-1 is associated to regulation of energetic metabolism, and most particularly the management of lipid reserves. Downregulation of SCD1 is known to trigger increased expression of genes involved in the beta-oxidation of fatty acids, increased energy expenditure and reduced fat storage, a metabolic phenotype exhibited by SOD1 mice (Ntambi, Miyazaki et al. 2002; Dupuis, Oudart et al. 2004). We aimed to study the impact of a low SCD-1 activity for the motor function. We recently described that knock-out mice for SCD-1, and non-transgenic mice treated with a SCD-1 inhibitor, present improved nerve regeneration after peripheral nerve injury (Hussain, Schmitt et al. 2013). Moreover, the products of SCD-1, the mono-unsaturated fatty acids, favour cytotoxic SOD-1 aggregation (Kim, Nakatomi et al. 2005), and the accumulation of toxic lipid species such as ceramide (Dobrzyn, Dobrzyn et al. 2005), suggesting that loss of SCD-1 activity could lower cytotoxicity in ALS. Further work is needed to understand the link between loss of SCD-1 activity and benefits for the motor units, especially in ALS. Aside from its role in energetic metabolism, SCD-1 is additionally required in the synthesis of more complex lipids, including phospholipids. Alterations in lipid metabolism will have repercussion not only on the energy homeostasis, but also on a wide range of cellular functions, including membrane fluidity and signaling.

A role for lipids beside energetic metabolism

Lipids play a critical role in the structure of the central and peripheral nervous systems in particular at the cell membrane level. They control membrane fluidity, improve transmission of electrical signals and stabilize synapses. Back in 2002, the group of Pr. Mattson studied the lipid metabolites present in the spinal cord of both ALS patients and presymptomatic SOD1 mice, and reported higher amounts of sphingolipids, cholesterol associated with increased lipid peroxidation (Cutler, Pedersen et al. 2002). These findings are important as these lipid metabolites modulate vital cellular functions in the central nervous system that may be involved in ALS pathophysiology.

190

A direct role for lipids in motorneuron survival?

Aberrant accumulation of ceramides is commonly seen as being toxic. It mediates neuron death by oxidative stress and apoptosis in animal models and patients of neurodegenerative diseases (Brugg, Michel et al. 1996; France-Lanord, Brugg et al. 1997; Alessenko 2000; Bras, Singleton et al. 2008; Car, Zendzian-Piotrowska et al. 2012; Filippov, Song et al. 2012). Ceramides are precursor molecules at the crossroads of the sphingolipid metabolism and they can be converted into sphingomyelin, ceramide-1-phosphate and gangliosides. Abnormal repartition of gangliosides was described in the CNS of ALS patients and presence of antibodies anti-gangliosides has been described in their serum (Mizutani, Oka et al. 2003). Gangliosides are important for axonal function and regeneration, and neuronal survival (Akasako, Nara et al. 2011). In the 80's, clinicians initiated half-dozen trials in ALS with injection of gangliosides with the aim to protect the motor units, but lead to no benefit (Bradley 1984; Hallett, Harrington et al. 1984). These studies were however underpowered. Sphingomyelin is particularly abundant in the nervous systems and represents another lipid impacting motor neuron survival. Cutlers and colleagues proposed that the increase of sphingomyelin in the spinal cord of ALS patients mediates motor neurons cells death via oxidative stress (Cutler, Pedersen et al. 2002), and in 2007, another group reported that p75-mediated motor neuron death is stimulated upon sphingomyelin-associated ROS production in an animal model of ALS (Pehar, Vargas et al. 2007).

200

210

Membrane fluidity.

Basic cellular functions depend on the composition in lipids of plasmatic membranes. Enrichment of sphingolipids and cholesterol, as well as content in polyunsaturated fatty acids (PUFA), directly determines membrane fluidity and movement of membrane proteins in lipid rafts (Xu, Bittman et al. 2001; Lang 2007; Lingwood and Simons 2010). Although the level of these lipids is altered in ALS patients and SOD1 mice, membrane fluidity *per se* has not been extensively investigated. One recent study described loss of membrane fluidity in the SOD1 mice at disease onset (Miana-Mena, Piedrafita et al. 2011) presumably due to oxidative stress and lipid peroxidation. Membrane phospholipids in the central nervous system (CNS) are rich in PUFA and in particular of docosahexaenoic acid (DHA). Interestingly, the profile of fatty acids in the brain cortex and spinal cord of ALS patients revealed an increase of DHA level with potential consequences on membrane fluidity (Ilieva, Ayala et al. 2007). Changes in the membrane fluidity could affect wide range of cellular functions such as ligand-receptor signal transduction and membrane trafficking (Simons and Vaz 2004), with consequences on cell functions and survival.

220

Signaling molecules.

In addition to their role in the membrane structure, PUFA also have intrinsic functions on cell signaling, in particular on neuroinflammation and regulation of energetic metabolism. First, PUFA are known to bind to transcription factors, such as liver-X receptor (LXR) and retinoic-

230

X receptor (RXR) (Yoshikawa, Shimano et al. 2002), to stimulate the expression of genes involved in energy homeostasis and dysregulation of their levels could account for the altered metabolism in ALS.

240 PUFA can be also converted to active molecules. Depending on the location of the unsaturations, PUFA present either anti-inflammatory and neuroprotective effects, for the omega3 fatty acids, or pro-inflammatory for omega 6 fatty acids (Schmitz and Ecker 2008). For instance, eicosapentaenoic and arachidonic acids can be oxidized to give rise to prostaglandins or leukotrienes, and the oxidation of DHA produces the neuroprotectin D1, a signaling molecule that promotes beneficial effects on cell survival under stress (Bazan, Musto et al. 2011). Prostaglandin E2 (PGE2) is synthesized by cyclooxygenase-2 from the arachidonic acid, an omega 6 fatty acid, to promote inflammation after binding to its receptor. In ALS patients, level of PGE2 is increased in the serum and the cerebrospinal fluid (Ilzecka 2003). Evidence from animal models also suggests a role for PGE2 in ALS physiopathology. Indeed, the pharmacological inhibition of PGE2 receptor or the silencing of the gene coding for cyclooxygenase-2 can lower neuroinflammation in SOD1 mice, preserve motor functions and extend survival (Pompl, Ho et al. 2003; Klivenyi, Kiaei et al. 2004; Liang, Wang et al. 2008).

250 The omega 3 fatty acids can be converted into anti-inflammatory and neuroprotective molecules. Many reports have shown that treatments based on omega 3 fatty acids exert beneficial effects in various animal models of neurodegenerative disease, such as Parkinson's or Alzheimer's diseases (Arsenault, Julien et al. 2011; Ozsoy, Seval-Celik et al. 2011). In a recent study, Michael-Titus and colleagues investigated the neuroprotective effect of eicosapentaenoic acid, an omega 3 fatty acid precursor for DHA, in SOD1 mice. Unexpectedly, the treatment resulted in enhancement of neuroinflammation, faster disease progression and hastened death for SOD1 mice (Yip, Pizzasegola et al. 2013). One explanation proposed by the authors is the greater susceptibility for PUFA to be peroxidized and therefore toxic (Kanner, German et al. 1987). Therefore, the increase in DHA of spinal cord from ALS patients could favor lipid peroxidability, and be potentially a toxic factor in ALS (Ilieva, Ayala et al. 2007).

260 Taken together, all these results clearly argue for a strong relationship between lipid metabolism and motor neuron degeneration. Most of the findings originate from ALS, as it is the most studied MNDs. However, alterations of lipid metabolism are also present in other MNDs.

Lipid alterations in other motor neuron diseases

Motor neuron degeneration is present in several diseases that complete the spectrum of motor neuron disease with ALS. The role of lipids in those diseases is poorly understood, although some lines of evidence exists.

270 Progressive muscular atrophy (PMA) is rare subtype of ALS characterized by loss of lower motor neurons. To our knowledge, only one report described alterations of circulating lipids in two patients with a PMA syndrome (Yao, Cannon et al. 1983). However, these patients suffer from other neurological disorders making difficult to reach a conclusion.

280 Spinal bulbar muscular atrophy (SBMA) is characterized by progressive muscle atrophy and degeneration of lower motor neurons in the brain stem and spinal cord. Role and regulation of lipids have not been accessed in SBMA patients, although androgen receptors are known to modulate lipid metabolism (Singh, Artaza et al. 2006). Indeed, the analysis of the muscle transcriptome of SBMA mice revealed that several differentially regulated genes relate to lipid metabolism, from an energetic and a structural point of view (Mo, Razak et al. 2010). For instance, the phospholipase A2, group VII (PLA₂g7) is downregulated in the muscles of SBMA mice. PLA₂g7 degrades phospholipids to release poly-unsaturated fatty acid and, in muscle, it is involved in the differentiation of myoblasts (Xiao, Pepe et al. 2012) and reduction of adiposity (Rao, Asadi-Lari et al. 2006). Ddit4l is another example of genes deregulated in SBMA mice. Ddit4l, also known as REDD2, is involved in muscle growth via stimulation of the IGF1/mTOR pathway and muscle fiber switch from oxidative to glycolytic metabolism (Pisani, Leclerc et al. 2005; Miyazaki and Esser 2009; Mo, Razak et al. 2010).

290 SMA is a progressive, recessively inherited, neuromuscular disease. SMA is characterized by weakness and muscle atrophy due to loss of spinal cord motor neurons. Similarly to ALS, metabolic abnormality is part of pathophysiology of SMA. In SMA, an initial study reported normal body mass index in a mixed population of SMA patients with severe to moderate symptoms. However, in this cohort, the authors described a reduction in fat-free mass but and an increase in total fat mass (Sproule, Montes et al. 2009). A second study, focusing only on the most severe form of the disease, described a lower calorie intake than the recommended dietary allowance in SMA patients, associated to a diminished fat-free mass, but a increase in total fat mass (Poruk, Davis et al. 2012). These alterations potentially participate to failure to thrive described in SMA patients. The reason why SMA patients have high fat mass despite low caloric intake is unclear but strengthen the role of metabolism of lipids in the disease. Indeed, a misuse of lipids has been documented in SMA patients with various symptom severities, with an impaired mitochondrial fatty acid beta-oxidation and a loss of free circulating carnitine, arguing for impairment of fatty acid entry into mitochondria (Tein, Sloane et al. 1995). The same clinician teams further investigated the role of lipids in SMA. They described fatty acid abnormalities such as high dicarboxylic acid to ketone ratio when fasting, or low C12:C14 fatty acid ratio that even decreased with disease duration. These two parameters are strong markers for fatty acid beta oxidation defects (Crawford, Sladky et al. 1999). The authors concluded that fatty acid abnormality in severe SMA is primary and general defect, directly caused by the loss of the SMN function.

300 Additionally, in a transgenic animal model of SMA, deficient for the SMN gene, pups survive longer when mothers were fed with a diet enriched in lipid content (Table 2). The treatment also corrected motor dysfunction despite lack of effect on motor neuron survival (Butchbach, Rose et al. 2010). Recently, a clinical trial investigated the effect of a combined treatment of valproic acid and L-carnitine in SMA patients, however, no to limited positive effects have been reported in ambulatory and non-ambulatory SMA patients (Swoboda, Scott et al. 2010; Kissel, Scott et al. 2011). However, further work is required to assess the role of lipids in SMA and their therapeutic potential.

Paths to explore

Clinical studies and basic research undoubtedly demonstrate a particular connection between lipid metabolism and ALS (Table 4). Contrary to that observed in other neurological diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, or even ageing (Maswood, Young et al. 2004; Patel, Gordon et al. 2005), high level of lipids positively correlates to better prognosis in ALS. Preclinical data and clinical studies clearly show that dietary lipid supplementation is a promising strategy to treat ALS, although there is no extensive clinical research at this level .

320 We are aware of only two clinical trials based on nutritional intervention. The first is a phase II trial that aims to correct malnutrition with high fat dietary supplement in ALS patients (NCT00983983). The second trial is a phase III that use high ketogenic supplementation (high fat and low carbohydrate) in ALS patients fed through a gastrostomy tube (NCT01016522). Both are dedicated to the prevention of malnutrition in ALS patients, and are not designed to identify benefit on prognosis after high fat diet. In parallel, how patients on and off respiratory support use diverse nutritional substrates (e.g. lipids) is under investigation (NCT00714220), as well as the influence of lipid lowering therapy in ALS (NCT01592084).

330 There are two additional trials based on pharmacological modulation of energetic metabolism, using pioglitazone or olanzapine. Pioglitazone is an anti-diabetic drug known to manage energetic metabolism and to lower level of circulating lipids in patients suffering from metabolic disorders. This phase II clinical trial has been stopped after interim analysis that revealed no benefit after treatment on primary and secondary outcomes (Dupuis et al. 2012, NCT00690118). A phase II/III using olanzapine is currently ongoing. Olanzapine is a neuroleptic drug with metabolic side effects, and investigators treated ALS patients with olanzapine, based on the weight-increasing effect of the drug (NCT00876772). Study results have not been released yet. The results of these trials will certainly help to determine whether modulation of lipids, though supplementation or pharmacology, is a feasible and rational

340 treatment for ALS, and potentially for other MNDs.

As discussed in this review, the role of lipids in ALS and MND pathophysiology goes beyond energetic metabolism, to structure and signaling. For example, there is a large spectrum of drugs targeting sphingolipids that are well characterized in terms of safety and bioavailability. They could be suitable for ALS patients, once clear targets are identified. A clinical trial has been very recently registered with the aim to test in ALS patients, the safety and tolerability of fingolimod, an agonist for sphingosine-1-phosphate receptors (NCT01786174), already used in multiple sclerosis to lower neuroinflammation in the CNS. In addition to pharmacological agents, dietary supplementation with neuroprotective and anti-inflammatory fatty acids, or derivatives, is worthy of further characterization. Altogether, alterations of lipid

350 metabolism in MND deserve further work that will undoubtedly lead to new and interesting therapeutic options for patients.

Acknowledgement

This work was supported by funds from European Community's Health Seventh Framework Programme under grant agreement no. 259867 (FP7/2007-2013), the Thierry Latran Foundation, the Higher Education Commission of the Pakistani government and "Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives" (AREMANE) and the "Association Française contre les Myopathies". We thank Dr J.-L. Gonzalez de Aguilar for his critical reading of the manuscript and

360 insightful comments.

Table 1: Altered energetic metabolism in ALS patients

Items	Cohort size (ALS patients)	Outcomes	References
Basal metabolism in ALS			
	N=62	ALS patients are hypermetabolic.	(Desport, Preux et al. 2001)
	N=44	ALS patients are hypermetabolic.	(Funalot, Desport et al. 2009)
Epidemiologic and risks to ALS			
	N=153	High carbohydrates and low fat intakes increase ALS risk.	(Okamoto, Kihira et al. 2007)
	N=222	High prediagnostic body fat is associated with a decreased risk of ALS mortality.	(Gallo, Wark et al. 2013)
Lipids and prognosis in ALS			
	N=369	High LDL/HDL ratio correlates to longer survival.	(Dupuis, Corcia et al. 2008)
	N=658	Hyperlipidemia does not correlate to longer survival.	(Chio, Calvo et al. 2009)
	N=658	Low level LDL/HDL ratio correlates to respiratory dysfunction.	(Chio, Calvo et al. 2009)
	N=285	Low BMI correlates to faster decline.	(Jawaid, Murthy et al. 2010)
	N=92	Poor nutritional status is associated with higher mortality.	(Marin, Desport et al. 2011)
	N=488	High triglycerides or cholesterol correlates to longer survival.	(Dorst, Kuhnlein et al. 2011)
	N=427	High BMI correlates to longer survival.	(Paganoni, Deng et al. 2011)
	N=77	Fast reduction of BMI predicts faster decline.	(Shimizu, Nagaoka et al. 2012)
	N=150	High BMI correlate to slower ALSFRS score decline.	(Reich-Slotky, Andrews et al. 2013)
	N=62	High subcutaneous fat positively correlate to survival.	(Lindauer, Dupuis et al. 2013)

Table 2: Altered energetic metabolism in mouse models of MNDs.

Model	Cohort size	Conclusion	Reference
ALS			
SOD1 G93A mice	N=8	Altered composition of lipids in spinal cord.	(Cutler, Pedersen et al. 2002)
SOD1 G86R and G93A mice	N=7-8	Dramatic defect in energy homeostasis, hypermetabolism mainly of muscular origin.	(Dupuis, Oudart et al. 2004)
	N=13	High fat diet delays disease onset and extent survival.	(Dupuis, Oudart et al. 2004)
SOD G93A mice	N=27	The ketogenic diet protects against motor neuron death.	(Zhao, Lange et al. 2006)
SOD1 G86R and G93A mice	N= 10-15	Hypolipidemia is found in SOD1 mice.	(Fergani, Oudart et al. 2007)
SOD1 G93A mice	N= 49 females N= 31 males	Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis.	(Patel, Safdar et al. 2010)
SOD1 G93A mice	N=30 males	Hypolipidemia is present at the presymptomatic stage of disease.	(Kim, Kim et al. 2011)
SMA			
SMN1 deficient mice	N=30 males	Hypolipidemia is present at the presymptomatic stage of disease.	(Butchbach, Rose et al. 2010)

Table 3: Effect of exercise in ALS.

Cohort	Outcomes	References
SOD1 mice G93A		
	High frequency and amplitude training support in motor neuron survival.	(Deforges, Branchu et al. 2009)
	Moderate frequency and amplitude training support motor neurons survival.	(Carreras, Yuruker et al. 2010)
	Benefits of training might come from the enrichment of the environment.	(Gerber, Sabourin et al. 2012)
ALS patients		
	Regular moderate physical exercise should be recommended.	(Drory, Goltzman et al. 2001)
	Higher release of ROS during exercise suggests that design of training should be considered with caution.	(Siciliano, D'Avino et al. 2002)
	Benefits of moderate aerobic exercise.	(Bello-Haas, Florence et al. 2007)

Table 4: Ongoing clinical trials in ALS

Items	Clinical trials	Status	Study type	Intervention	Estimated Enrollment	Study
Exercise						
	NCT01650818	Recruiting	Interventional	Endurance training	40	Aerobic Exercise Training in ALS
	NCT01521728	Recruiting	Interventional	Resistance exercise	60	Trial of Resistance and Endurance Exercise in ALS
Dietary supplement						
	NCT00983983	Active	Interventional	Oxepa	30	High Fat/High Calorie Trial in ALS
	NCT01016522	Terminated	Interventional	KetoCal	NA	Safety and Tolerability of the Ketogenic Diet in ALS
Basal metabolism						
	NCT00714220	Recruiting	Observational	/	150	Quantitative Measurement of Nutritional Substrate Utilization in Patients with ALS
	NCT01592084	Completed	Observational	/	267	Hyperlipidemia and statin Therapy in ALS
Pharmacology						
	NCT00690118	Terminated	Interventional	Pioglitazone (45 mg/day)	219	Study of Pioglitazone in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis
	NCT00876772	Unknown	Interventional	Olanzapine (10 mg/day)	40	Olanzapine for the Treatment of Appetite Loss in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

Figure legends

Figure 1: Biological functions of lipids for the motor axis, in ALS. Lipids are involved at different level in the cells. They provide energy, promote cell signaling and participate to cellular structure. Below the main functions are described the lipid alterations found at different levels in ALS.

REFERENCES

- Akasako, Y., K. Nara, et al. (2011). "Inhibition of ganglioside synthesis reduces the neuronal survival activity of astrocytes." *Neurosci Lett* **488**(2): 199-203.
- Alessenko, A. V. (2000). "The role of sphingomyelin cycle metabolites in transduction of signals of cell proliferation, differentiation and death." *Membr Cell Biol* **13**(2): 303-20.
- Arsenault, D., C. Julien, et al. (2011). "DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice." *PLoS One* **6**(2): e17397.
- Atkin, J. D., R. L. Scott, et al. (2005). "Properties of slow- and fast-twitch muscle fibres in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Neuromuscul Disord* **15**(5): 377-88.
- Barroso, E., R. Rodriguez-Calvo, et al. (2011). "The PPARbeta/delta activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1alpha-Lipin 1-PPARalpha pathway leading to increased fatty acid oxidation." *Endocrinology* **152**(5): 1848-59.
- Bazan, N. G., A. E. Musto, et al. (2011). "Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity." *Mol Neurobiol* **44**(2): 216-22.
- Bebee, T. W., C. E. Dominguez, et al. (2012). "Mouse models of SMA: tools for disease characterization and therapeutic development." *Hum Genet* **131**(8): 1277-93.
- Bello-Haas, V. D., J. M. Florence, et al. (2007). "A randomized controlled trial of resistance exercise in individuals with ALS." *Neurology* **68**(23): 2003-7.
- Blasco, H., P. Corcia, et al. (2010). "1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis." *PLoS One* **5**(10): e13223.
- Bradley, W. G. (1984). "Double-blind controlled trial of purified brain gangliosides in amyotrophic lateral sclerosis and experience with peripheral neuropathies." *Adv Exp Med Biol* **174**: 565-73.
- Bras, J., A. Singleton, et al. (2008). "Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: Potential role of ceramide metabolism in Lewy body disease." *FEBS J* **275**(23): 5767-73.
- Braun, M. M., M. Osecheck, et al. (2012). "Nutrition assessment and management in amyotrophic lateral sclerosis." *Phys Med Rehabil Clin N Am* **23**(4): 751-71.
- Brooks, B. P. and K. H. Fischbeck (1995). "Spinal and bulbar muscular atrophy: a trinucleotide-repeat expansion neurodegenerative disease." *Trends Neurosci* **18**(10): 459-61.
- Brooks, B. R., K. Juhasz-Poscine, et al. (2000). "Mosaic chemotherapy strategies for developing ALS/MND therapeutic approaches: beta-2 adrenergic agonists." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **1 Suppl 4**: 45-53; discussion 53-4.
- Brugg, B., P. P. Michel, et al. (1996). "Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons." *J Neurochem* **66**(2): 733-9.
- Butchbach, M. E., F. F. Rose, Jr., et al. (2010). "Effect of diet on the survival and phenotype of a mouse model for spinal muscular atrophy." *Biochem Biophys Res Commun* **391**(1): 835-40.
- Car, H., M. Zendzian-Piotrowska, et al. (2012). "[The role of ceramides in selected brain pathologies: ischemia/hypoxia, Alzheimer disease]." *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **66**: 295-303.
- Carreras, I., S. Yurker, et al. (2010). "Moderate exercise delays the motor performance decline in a transgenic model of ALS." *Brain Res* **1313**: 192-201.
- Chio, A., A. Calvo, et al. (2009). "Lower serum lipid levels are related to respiratory impairment in patients with ALS." *Neurology* **73**(20): 1681-5.
- Crawford, T. O., J. T. Sladky, et al. (1999). "Abnormal fatty acid metabolism in childhood spinal muscular atrophy." *Ann Neurol* **45**(3): 337-43.
- Crugnola, V., C. Lamperti, et al. (2010). "Mitochondrial respiratory chain dysfunction in muscle from patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Arch Neurol* **67**(7): 849-54.
- Cutler, R. G., W. A. Pedersen, et al. (2002). "Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* **52**(4): 448-57.

- Da Cruz, S., P. A. Parone, et al. (2012). "Elevated PGC-1alpha activity sustains mitochondrial biogenesis and muscle function without extending survival in a mouse model of inherited ALS." *Cell Metab* **15**(5): 778-86.
- de Almeida, J. P., R. Silvestre, et al. (2012). "Exercise and amyotrophic lateral sclerosis." *Neurol Sci* **33**(1): 9-15.
- Deforges, S., J. Branchu, et al. (2009). "Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *J Physiol* **587**(Pt 14): 3561-72.
- Deng, H. X., H. Zhai, et al. (2010). "FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* **67**(6): 739-48.
- Desport, J. C., P. M. Preux, et al. (2001). "Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Am J Clin Nutr* **74**(3): 328-34.
- Dobrzyn, A., P. Dobrzyn, et al. (2005). "Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency reduces ceramide synthesis by downregulating serine palmitoyltransferase and increasing beta-oxidation in skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**(3): E599-607.
- Dorst, J., P. Kuhnlein, et al. (2011). "Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol* **258**(4): 613-7.
- Drory, V. E., E. Goltsman, et al. (2001). "The value of muscle exercise in patients with amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol Sci* **191**(1-2): 133-7.
- Dupuis, L., P. Corcia, et al. (2008). "Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology* **70**(13): 1004-9.
- Dupuis, L., F. di Scala, et al. (2003). "Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis." *FASEB J* **17**(14): 2091-3.
- Dupuis, L. and J. P. Loeffler (2009). "Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models." *Curr Opin Pharmacol* **9**(3): 341-6.
- Dupuis, L., H. Oudart, et al. (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**(30): 11159-64.
- Dupuis, L., P. F. Pradat, et al. (2011). "Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis." *Lancet Neurol* **10**(1): 75-82.
- Echaniz-Laguna, A., J. Zoll, et al. (2002). "Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients." *Ann Neurol* **52**(5): 623-7.
- Eschbach, J., B. Schwalenstocker, et al. (2013). "PGC-1alpha is a male-specific disease modifier of human and experimental amyotrophic lateral sclerosis." *Hum Mol Genet*.
- Fergani, A., H. Oudart, et al. (2007). "Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." *J Lipid Res* **48**(7): 1571-80.
- Filippov, V., M. A. Song, et al. (2012). "Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases." *J Alzheimers Dis* **29**(3): 537-47.
- Fischbeck, K. H., A. Lieberman, et al. (1999). "Androgen receptor mutation in Kennedy's disease." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1386): 1075-8.
- France-Lanord, V., B. Brugg, et al. (1997). "Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease." *J Neurochem* **69**(4): 1612-21.
- Funalot, B., J. C. Desport, et al. (2009). "High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis." *Amyotroph Lateral Scler* **10**(2): 113-7.
- Gallo, V., P. A. Wark, et al. (2013). "Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis: the EPIC cohort." *Neurology* **80**(9): 829-38.
- Gerber, Y. N., J. C. Sabourin, et al. (2012). "Unlike physical exercise, modified environment increases the lifespan of SOD1G93A mice however both conditions induce cellular changes." *PLoS One* **7**(9): e45503.
- Gonzalez de Aguilar, J. L., C. Niederhauser-Wiederkehr, et al. (2008). "Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model." *Physiol Genomics* **32**(2): 207-18.

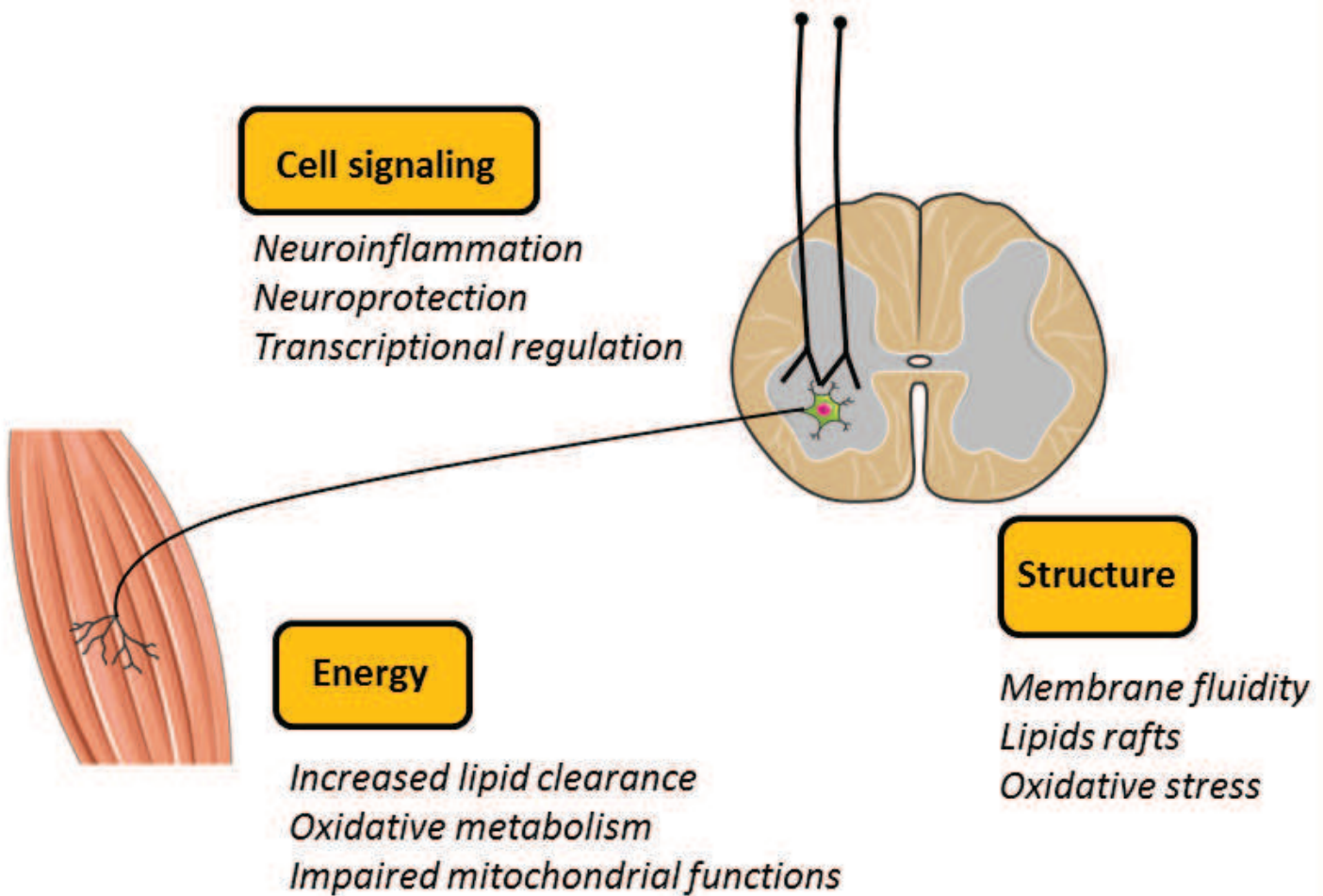
- Gordon, T., N. Tyreman, et al. (2010). "Functional over-load saves motor units in the SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Neurobiol Dis* **37**(2): 412-22.
- Guzman, M. and C. Blazquez (2004). "Ketone body synthesis in the brain: possible neuroprotective effects." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70**(3): 287-92.
- Hallett, M., H. Harrington, et al. (1984). "Trials of ganglioside therapy for amyotrophic lateral sclerosis and diabetic neuropathy." *Adv Exp Med Biol* **174**: 575-9.
- Hamadeh, M. J., M. C. Rodriguez, et al. (2005). "Caloric restriction transiently improves motor performance but hastens clinical onset of disease in the Cu/Zn-superoxide dismutase mutant G93A mouse." *Muscle Nerve* **31**(2): 214-20.
- Handschin, C. (2010). "Regulation of skeletal muscle cell plasticity by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha." *J Recept Signal Transduct Res* **30**(6): 376-84.
- Hegedus, J., C. T. Putman, et al. (2007). "Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Neurobiol Dis* **28**(2): 154-64.
- Hussain, G., F. Schmitt, et al. (2013). "Systemic Down-Regulation of Delta-9 Desaturase Promotes Muscle Oxidative Metabolism and Accelerates Muscle Function Recovery following Nerve Injury." *PLoS One* **8**(6): e64525.
- Ilieva, E. V., V. Ayala, et al. (2007). "Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Brain* **130**(Pt 12): 3111-23.
- Ilzecka, J. (2003). "Prostaglandin E2 is increased in amyotrophic lateral sclerosis patients." *Acta Neurol Scand* **108**(2): 125-9.
- Jawaid, A., S. B. Murthy, et al. (2010). "A decrease in body mass index is associated with faster progression of motor symptoms and shorter survival in ALS." *Amyotroph Lateral Scler* **11**(6): 542-8.
- Kanner, J., J. B. German, et al. (1987). "Initiation of lipid peroxidation in biological systems." *Crit Rev Food Sci Nutr* **25**(4): 317-64.
- Katsuno, M., H. Adachi, et al. (2003). "Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)." *Cytogenet Genome Res* **100**(1-4): 243-51.
- Kim, S. M., H. Kim, et al. (2011). "Amyotrophic lateral sclerosis is associated with hypolipidemia at the presymptomatic stage in mice." *PLoS One* **6**(3): e17985.
- Kim, Y. J., R. Nakatomi, et al. (2005). "Unsaturated fatty acids induce cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutants." *J Biol Chem* **280**(22): 21515-21.
- Kissel, J. T., C. B. Scott, et al. (2011). "SMA CARNIVAL TRIAL PART II: a prospective, single-armed trial of L-carnitine and valproic acid in ambulatory children with spinal muscular atrophy." *PLoS One* **6**(7): e21296.
- Klivenyi, P., M. Kiaei, et al. (2004). "Additive neuroprotective effects of creatine and cyclooxygenase 2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurochem* **88**(3): 576-82.
- Kumar, A., L. Bala, et al. (2010). "Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis." *Clin Chim Acta* **411**(7-8): 563-7.
- Laaksovirta, H., T. Peuralinna, et al. (2010). "Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genome-wide association study." *Lancet Neurol* **9**(10): 978-85.
- LaManna, J. C., N. Salem, et al. (2009). "Ketones suppress brain glucose consumption." *Adv Exp Med Biol* **645**: 301-6.
- Lang, T. (2007). "SNARE proteins and 'membrane rafts'." *J Physiol* **585**(Pt 3): 693-8.
- Liang, X., Q. Wang, et al. (2008). "The prostaglandin E2 EP2 receptor accelerates disease progression and inflammation in a model of amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* **64**(3): 304-14.
- Lin, J., C. Handschin, et al. (2005). "Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators." *Cell Metab* **1**(6): 361-70.
- Lin, J., H. Wu, et al. (2002). "Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres." *Nature* **418**(6899): 797-801.

- Lindauer, E., L. Dupuis, et al. (2013). "Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis." PLoS One **8**(6): e67783.
- Lingwood, D. and K. Simons (2010). "Lipid rafts as a membrane-organizing principle." Science **327**(5961): 46-50.
- Mackenzie, I. R., E. H. Bigio, et al. (2007). "Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations." Ann Neurol **61**(5): 427-34.
- Mahajan, K. R., J. R. Bach, et al. (2012). "Diaphragm pacing and noninvasive respiratory management of amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease." Muscle Nerve **46**(6): 851-5.
- Marin, B., J. C. Desport, et al. (2011). "Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients." J Neurol Neurosurg Psychiatry **82**(6): 628-34.
- Maswood, N., J. Young, et al. (2004). "Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(52): 18171-6.
- Mattson, M. P., R. G. Cutler, et al. (2007). "Energy intake and amyotrophic lateral sclerosis." Neuromolecular Med **9**(1): 17-20.
- Miana-Mena, F. J., E. Piedrafita, et al. (2011). "Levels of membrane fluidity in the spinal cord and the brain in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." J Bioenerg Biomembr **43**(2): 181-6.
- Miyazaki, M. and K. A. Esser (2009). "REDD2 is enriched in skeletal muscle and inhibits mTOR signaling in response to leucine and stretch." Am J Physiol Cell Physiol **296**(3): C583-92.
- Mizutani, K., N. Oka, et al. (2003). "Amyotrophic lateral sclerosis with IgM antibody against gangliosides GM2 and GD2." Intern Med **42**(3): 277-80.
- Mo, K., Z. Razak, et al. (2010). "Microarray analysis of gene expression by skeletal muscle of three mouse models of Kennedy disease/spinal bulbar muscular atrophy." PLoS One **5**(9): e12922.
- Muscaritoli, M., I. Kushta, et al. (2012). "Nutritional and metabolic support in patients with amyotrophic lateral sclerosis." Nutrition **28**(10): 959-66.
- Ntambi, J. M., M. Miyazaki, et al. (2002). "Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11482-6.
- Okamoto, K., T. Kihira, et al. (2007). "Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan." Amyotroph Lateral Scler **8**(5): 300-4.
- Ozsoy, O., Y. Seval-Celik, et al. (2011). "The influence and the mechanism of docosahexaenoic acid on a mouse model of Parkinson's disease." Neurochem Int **59**(5): 664-70.
- Paganoni, S., J. Deng, et al. (2011). "Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis." Muscle Nerve **44**(1): 20-4.
- Patel, B. P., A. Safdar, et al. (2010). "Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS." PLoS One **5**(2): e9386.
- Patel, N. V., M. N. Gordon, et al. (2005). "Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models." Neurobiol Aging **26**(7): 995-1000.
- Pehar, M., M. R. Vargas, et al. (2007). "Mitochondrial superoxide production and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in p75 neurotrophin receptor-induced motor neuron apoptosis." J Neurosci **27**(29): 7777-85.
- Pisani, D. F., L. Leclerc, et al. (2005). "SMHS1 is involved in oxidative/glycolytic-energy metabolism balance of muscle fibers." Biochem Biophys Res Commun **326**(4): 788-93.
- Pompl, P. N., L. Ho, et al. (2003). "A therapeutic role for cyclooxygenase-2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." FASEB J **17**(6): 725-7.
- Poruk, K. E., R. H. Davis, et al. (2012). "Observational study of caloric and nutrient intake, bone density, and body composition in infants and children with spinal muscular atrophy type I." Neuromuscul Disord **22**(11): 966-73.

- Pradat, P. F., O. Dubourg, et al. (2011). "Muscle gene expression is a marker of amyotrophic lateral sclerosis severity." Neurodegener Dis **9**(1): 38-52.
- Pun, S., A. F. Santos, et al. (2006). "Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF." Nat Neurosci **9**(3): 408-19.
- Rao, A., M. Asadi-Lari, et al. (2006). "Quality of life in patients with signs and symptoms of heart failure--does systolic function matter?" J Card Fail **12**(9): 677-83.
- Reich-Slotky, R., J. Andrews, et al. (2013). "Body mass index (BMI) as predictor of ALSFRS-R score decline in ALS patients." Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener **14**(3): 212-6.
- Ripps, M. E., G. W. Huntley, et al. (1995). "Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 689-93.
- Rosen, D. R., T. Siddique, et al. (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." Nature **362**(6415): 59-62.
- Schmied, A., J. Pouget, et al. (1999). "Electromechanical coupling and synchronous firing of single wrist extensor motor units in sporadic amyotrophic lateral sclerosis." Clin Neurophysiol **110**(5): 960-74.
- Schmitz, G. and J. Ecker (2008). "The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids." Prog Lipid Res **47**(2): 147-55.
- Sharp, P. S., J. R. Dick, et al. (2005). "The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." Neuroscience **130**(4): 897-910.
- Shatunov, A., K. Mok, et al. (2010). "Chromosome 9p21 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the UK and seven other countries: a genome-wide association study." Lancet Neurol **9**(10): 986-94.
- Shimizu, T., U. Nagaoka, et al. (2012). "Reduction rate of body mass index predicts prognosis for survival in amyotrophic lateral sclerosis: a multicenter study in Japan." Amyotroph Lateral Scler **13**(4): 363-6.
- Siciliano, G., C. D'Avino, et al. (2002). "Impaired oxidative metabolism and lipid peroxidation in exercising muscle from ALS patients." Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord **3**(2): 57-62.
- Simons, K. and W. L. Vaz (2004). "Model systems, lipid rafts, and cell membranes." Annu Rev Biophys Biomol Struct **33**: 269-95.
- Singh, R., J. N. Artaza, et al. (2006). "Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors." Endocrinology **147**(1): 141-54.
- Sproule, D. M., J. Montes, et al. (2009). "Increased fat mass and high incidence of overweight despite low body mass index in patients with spinal muscular atrophy." Neuromuscul Disord **19**(6): 391-6.
- Swoboda, K. J., C. B. Scott, et al. (2010). "SMA CARNI-VAL trial part I: double-blind, randomized, placebo-controlled trial of L-carnitine and valproic acid in spinal muscular atrophy." PLoS One **5**(8): e12140.
- Tein, I., A. E. Sloane, et al. (1995). "Fatty acid oxidation abnormalities in childhood-onset spinal muscular atrophy: primary or secondary defect(s)?" Pediatr Neurol **12**(1): 21-30.
- Thau, N., S. Knippenberg, et al. (2012). "Decreased mRNA expression of PGC-1alpha and PGC-1alpha-regulated factors in the SOD1G93A ALS mouse model and in human sporadic ALS." J Neuropathol Exp Neurol **71**(12): 1064-74.
- Walford, R. L., D. Mock, et al. (2002). "Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year period." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **57**(6): B211-24.
- Xiao, Q., A. E. Pepe, et al. (2012). "Nrf3-Pla2g7 interaction plays an essential role in smooth muscle differentiation from stem cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(3): 730-44.

- Xu, X., R. Bittman, et al. (2001). "Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide." *J Biol Chem* **276**(36): 33540-6.
- Yao, J. K., K. P. Cannon, et al. (1983). "Effects of polyunsaturated fatty acid diets on plasma lipids of patients with adrenomultineuronal degeneration, hepatosplenomegaly and fatty acid derangement." *J Neurol Sci* **62**(1-3): 67-75.
- Yi, C. X., K. M. Habegger, et al. (2011). "A role for astrocytes in the central control of metabolism." *Neuroendocrinology* **93**(3): 143-9.
- Yip, P. K., C. Pizzasegola, et al. (2013). "The omega-3 Fatty Acid eicosapentaenoic Acid accelerates disease progression in a model of amyotrophic lateral sclerosis." *PLoS One* **8**(4): e61626.
- Yoshikawa, T., H. Shimano, et al. (2002). "Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements." *J Biol Chem* **277**(3): 1705-11.
- Zhao, Z., D. J. Lange, et al. (2006). "A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis." *BMC Neurosci* **7**: 29.
- Zhou, J., J. Yi, et al. (2010). "Hyperactive intracellular calcium signaling associated with localized mitochondrial defects in skeletal muscle of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." *J Biol Chem* **285**(1): 705-12.

Figure 1.TIF



Problématique et objectif de Thèse

Nous avons exposé dans l'Introduction les nombreuses altérations patho-physiologiques atteignant différents types cellulaires chez les organismes affectés par la SLA. L'implication de l'hypermétabolisme dans la modulation des atteintes cellulaires est aujourd'hui une hypothèse fortement envisagée. La dyslipidémie avérée chez les patients et les souris suggère une forte influence du métabolisme lipidique dans l'évolution de la pathologie. Néanmoins les raisons de cet hypermétabolisme et cette dyslipidémie, ainsi que leurs répercussions exactes sur l'organisme, restent encore, à l'heure actuelle, sans réponses. Le rôle du muscle dans ces altérations énergétiques est fortement suspecté en raison de sa forte demande énergétique.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était de mieux comprendre les différents mécanismes physio-pathologiques mis en jeu au cours du développement de la SLA. Une analyse du transcriptome musculaire des patients SLA et souris SOD1m a permis d'identifier des modifications d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Cette analyse globale fut la première étape qui donna naissance à mon projet de thèse.

Mes travaux s'articulent autour de l'étude du gène codant pour la stéaroyl-coenzyme A désaturase 1 (SCD1), une enzyme du réticulum endoplasmique, dont l'expression est altérée au cours de la pathologie. Cette enzyme du métabolisme lipidique catalyse la transformation des acides gras saturés en acides gras mono-insaturés par l'ajout d'une double liaison. Comme nous l'avons vu précédemment (revue 1) l'état de saturation des acides gras ainsi que leur concentration dans l'organisme a de nombreuses répercussions sur le fonctionnement cellulaire.

- Le premier chapitre de cette thèse traitera de l'analyse des variations de concentrations en acide gras chez les souris SOD1m, au niveau circulant et hépatique. Cette analyse portera plus particulièrement sur les modifications témoignant du changement d'activité enzymatique de la SCD1.
- Le second chapitre sera destiné à l'étude de l'influence d'une modulation d'expression et d'activité de la SCD1 sur la fonction neuro-musculaire. Cette étude est basée sur l'analyse des fonctions motrices de souris transgéniques invalidées pour le gène *scd1*, mais également sur les effets d'une inhibition pharmacologique de cette enzyme.

- Le dernier chapitre sera consacré à l'analyse d'un traitement pharmacologique administré à des souris SOD1m, basé sur la modulation de l'activité de la SCD1. L'objectif de cette étude est de comprendre les répercussions d'une modification de l'activité de la SCD1, sur l'axe neuro-musculaire d'une souris SOD1m.

Résultats

Chapitre I :

Analyse du profil d'acides gras des souris SOD1m

(Article en préparation ci-après)

I.1 Profil d'acides gras

Nous avons vu en Introduction que les souris SOD1m et les patients SLA souffraient d'un hypermétabolisme et d'une dyslipidémie (Desport et al. 2001; Dupuis et al. 2008; Dupuis et al. 2004; Fergani et al. 2007). Dans le modèle SOD1m, ces modifications métaboliques peuvent être contrées par une alimentation enrichie en gras, permettant une diminution de la perte des motoneurones et une augmentation de la survie des animaux. Ces observations nous ont conduits à mener une analyse approfondie du profil des acides gras (AG) sériques et hépatiques chez les souris SOD1m. L'objectif de cette étude était de voir quelles étaient les altérations apparues chez les animaux, mais également de vérifier si ces modifications de concentrations en AG étaient détectables précocement, et si, dans ce cas, ces derniers pouvaient représenter de potentiels biomarqueurs utilisables pour le suivi de la pathologie.

1.1.1 Utilisation d'une chromatographie gazeuse

Les profils d'acides gras présents dans le sérum et les tissus reflètent un état métabolique général et un équilibre entre les voies de synthèses et de dégradations des différentes espèces lipidiques. Pour analyser ces profils, nous avons utilisé la technique de chromatographie en phase gazeuse, très fréquemment exploitée pour ce type d'analyses. Ce procédé permet une identification plus précise à celle envisageable par chromatographie sur plaque.

1.1.2 Chromatographie gazeuse

La chromatographie gazeuse (GC) apparue en 1952 (A.J.P MARTIN et R.L.M SYNGE) a connu son âge d'or dans les années soixante et n'a jamais cessé d'évoluer jusqu'à ce jour, notamment grâce aux progrès de l'instrumentation et de l'analyse. La GC permet de séparer différentes molécules d'une solution ou mélange pouvant être très complexe. Elle s'applique parfaitement à l'étude de composés pouvant être vaporisés, par chauffage, sans risque de dégradation. Dans notre cas, nous avons procédé à une extraction des AG du sérum et du foie de souris SOD1m, à l'aide de la méthode modifiée de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer 1959).

Cette méthode d'extraction est basée sur l'utilisation d'un mélange apolaire méthanol-chloroforme permettant la séparation des protéines et des lipides. Après centrifugation et transesterification, les AG sont collectés dans de l'heptane (Figure 9). Cette solution est ensuite injectée dans la colonne du chromatographe et diffusée à travers la colonne à l'aide de l'hélium, ici utilisé comme gaz vecteur (se référer à la partie Matériels et Méthodes du Manuscrit 1, ci-après). Les composés vont migrer au sein de la colonne et se séparer en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire, intrinsèque à la colonne. Le temps de rétention, qui sera par la suite analysé et comparé à celui d'un standard et qui dépend de cette affinité, traduit le temps entre l'injection de la solution dans la colonne et l'apparition du signal du soluté au niveau du détecteur (Figure 10).

I.2 Stratégie et plan expérimental

Les AG influencent les aspects énergétiques, structuraux et de communication cellulaire. Ils possèdent également un rôle clé dans le système nerveux central (SNC) et interviennent tant dans les fonctions cognitives que dans les aspects neuroinflammatoires ou neuroprotectifs (voir revue en Annexe de la thèse). De ce fait, il nous a paru important d'étudier les modulations de concentration des AG dans la SLA. La longueur et le nombre d'atomes de carbones insaturés trouvés dans la chaîne carbonée d'AG reflètent les grands aspects du métabolisme lipidique. Nous avons étudié, par GC, les concentrations sériques et hépatiques des différentes espèces d'AG chez les souris SOD1m à des âges asymptomatiques et symptomatiques.

I.2.1 Levée de rideau sur SCD1 : Historique et implication dans la pathologie

Une analyse détaillée du transcriptome musculaire de patients SLA et de souris SOD1m a été réalisée au sein du laboratoire, afin d'identifier les altérations de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Gonzalez de Aguilar et al. 2008; Pradat et al. 2012). De cette étude ont été identifiés un certain nombre de gènes, dérégulés dans la pathologie. L'un d'eux, le gène *scd1*, a conduit à l'élaboration de ce projet.

Ce gène code pour une enzyme du réticulum endoplasmique, la stéaroyl coenzyme A désaturase 1 (SCD1). Cette enzyme, aussi appelée Δ -9 désaturase, est impliquée dans

Extraction

Prélèvements sanguins (500µl) tubes lithium héparine
Centrifugation (2000 g, 10 minutes, 4° C)

200µl d'échantillon +2ml chloroforme /méthanol (1/2;v/v) vortex, sonicateur
Incuber 2h, +4°C, obscurité
Ajouter 500µl de chloroforme
Pour éliminer les contaminants ajouter 625µl de KCL (0,88%)
Centrifugation (15°C, 2500g, 5 minutes)

Elimination du surnageant (chloroforme/méthanol/eau; 3/48/47)
Conservation de la phase inférieure (chloroforme/méthanol/eau; 86/14/1)
Mélanger la phase inférieure avec 1mL de « phase supérieure de Folch »
(CHCl₃:Methanol:H₂O; 3:48:47)
Vortex, sonicateur
Centrifugation (2500g, 5 minutes)
Récupération de la phase inférieure, organique

Saponification / Méthylation = Transesterification

Evaporer sous flux d'azote la phase récupérée précédemment
Transesterifier par ajout de 100 µl de méthanol + 100 µl d'hydroxyde de potassium (2M)
Incuber 20 min, RT

Ajouter 200 µl d'heptane pour stopper la réaction
Centrifugation (2000g, 5 minutes, 15° C)

Récupérer 100 µl de la phase supérieure (possible de concentrer les échantillons)

Volume d'injection 1µl en mode splitless

Figure 9 : Protocole d'extraction d'acides gras selon la méthode modifiée de Bligh et Dyer

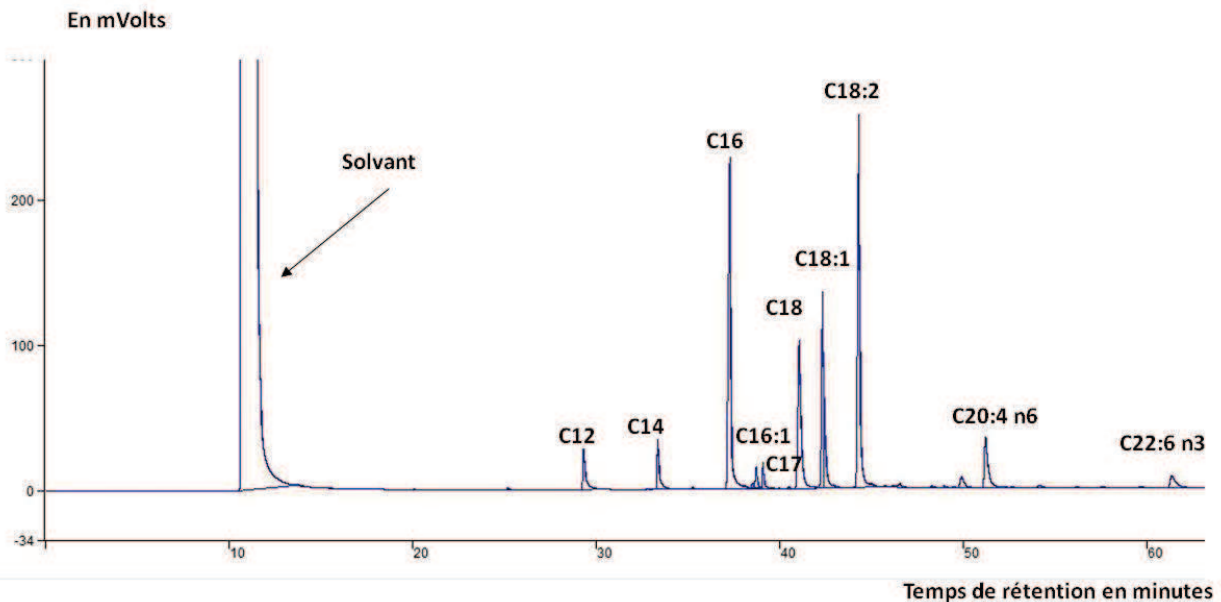
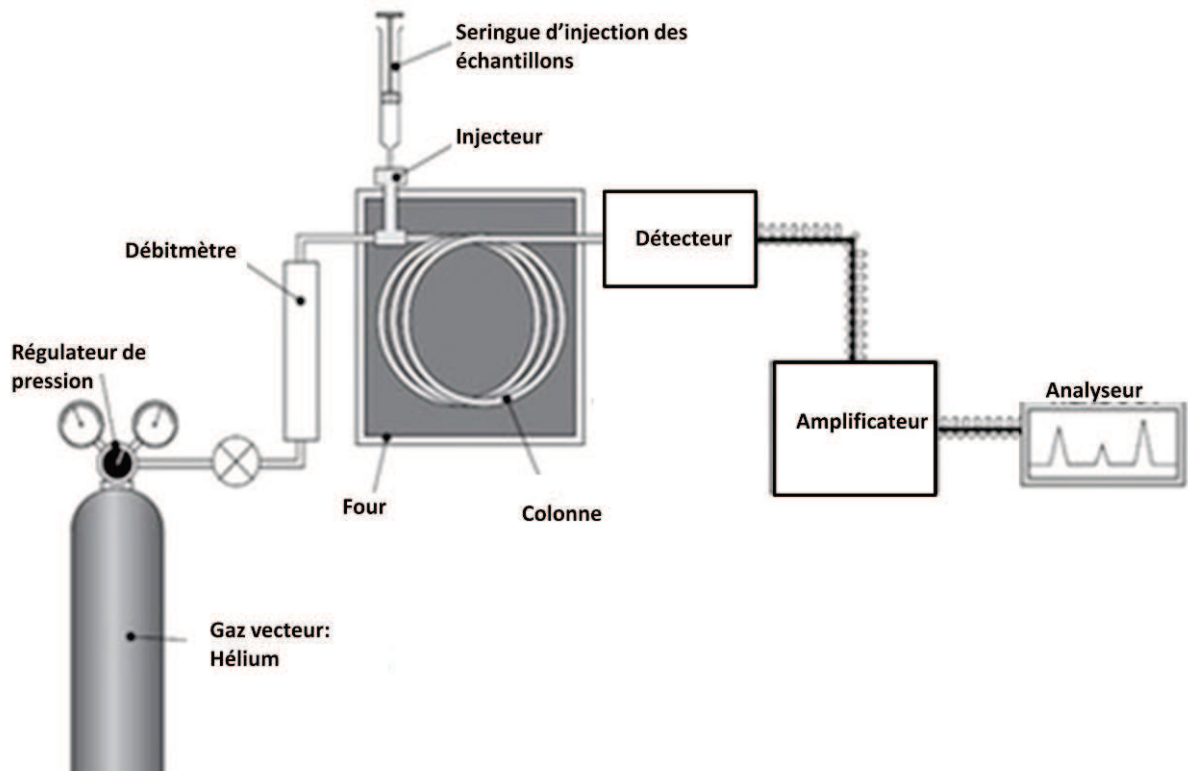


Figure 10 : Schéma d'une installation de chromatographie en phase gazeuse (GC) et chromatogramme.

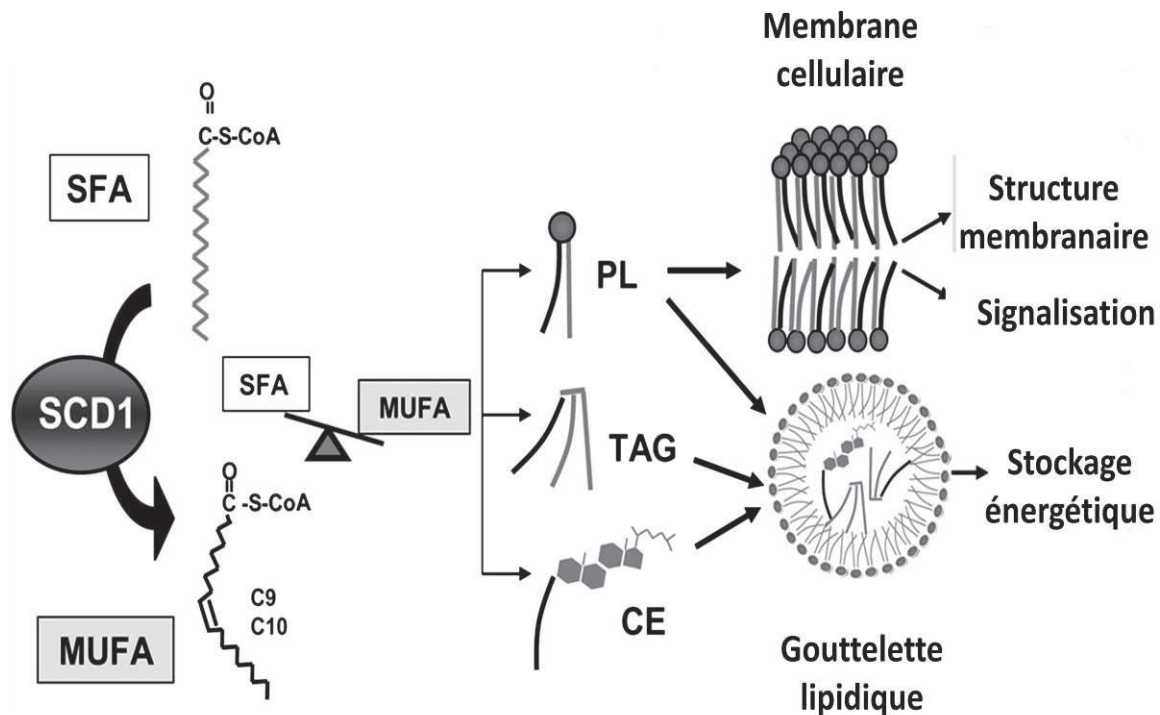
La GC est constituée d'une colonne dans laquelle est injecté le mélange à analyser. La colonne est chauffée dans un four permettant une bonne vaporisation du mélange. Le mélange progresse jusqu'au détecteur grâce à un gaz vecteur (ici l'hélium). Les résultats sont ensuite amplifiés puis analysés. Le chromatogramme obtenu lors d'une analyse de GC permet d'identifier les acides gras présents dans le mélange injecté dans la colonne en fonction du temps de rétention de ces derniers dans la colonne. Les acides courts sortiront les premiers, les acides gras longs dans un second temps.

le métabolisme lipidique et catalyse la désaturation des acides gras saturés (SFA: saturated fatty acids) provenant soit de l'alimentation, soit de la lipogenèse hépatique, en acides gras mono-insaturés (MUFA: monounsaturated fatty acids). On trouve parmi les substrats de cette réaction le palmitate (C16:0) et le stéarate (C18:0), tous deux sont des SFA, dont dérivent, respectivement, le palmitoléate (C16 :1 n=9) et l'oléate (C18 :1 n=9), des MUFA (Enoch et al. 1976). L'action de la SCD1 se traduit par l'introduction d'une double liaison dans le squelette carboné des AG, en position Δ -9, à partir de l'extrémité carboxy-terminale (Figure 11). En tant que désaturase, SCD1 contient un atome de fer non-héminique, relié au site actif par des résidus histidines (Shanklin et al. 1994). Ses extrémités C et N terminales sont cytoplasmiques, tout comme les acides aminés du site actif (Figure 12). Classiquement on trouve 2 isoformes de SCD chez l'humain (SCD1 et SCD5), et 4 isoformes chez la souris (SCD1, 2, 3 et 4). Une forte homologie de séquence existe entre la SCD1 humaine et les SCD murines (85% d'homologie), en revanche l'isoforme SCD5 semble nettement moins proche (pour revue voir (Flowers and Ntambi 2008)). Cette dernière enzyme n'a jusqu'à présent jamais été associée à des pathologies nerveuses, mais est couramment étudiée dans les atteintes métaboliques, notamment dans le développement de l'obésité (Ortinou et al. 2013).

1.2.2 Données du transcriptome et justification du choix de la SCD1

L'analyse du transcriptome musculaire a révélé une diminution de l'expression de SCD1 au niveau musculaire chez les souris SOD1m ainsi que dans un groupe de patients SLA (Gonzalez de Aguilar et al. 2008; Pradat et al. 2012). Le groupe précédemment cité était constitué de patients SLA chez lesquels l'état d'atrophie musculaire de la biopsie analysée n'était pas avancé et dont les signes cliniques et électromyographiques étaient absents. La diminution d'expression de la SCD1 observée nous a paru particulièrement intéressante car les souris invalidées pour le gène *scd1* présentent des aspects métaboliques proches des souris SOD1m. En effet, les souris *scd1*^{-/-} sont maigres et hypermétaboliques (Ntambi et al. 2002).

Ainsi l'hypermétabolisme détecté chez les souris SOD1m pourrait relever de cette baisse d'expression de la SCD1 et des modifications de ses voies de signalisation.



(Igal et al., 2010)

Figure 11 : Représentation de l'activité enzymatique de la SCD1 et destination des produits de la réaction.

L'activité enzymatique de la SCD1 permet la désaturation des acides gras saturés (saturated fatty acids, SFA) en acides gras mono-insaturés (monounsaturated fatty acids, MUFA). Les MUFA sont ensuite utilisés pour la synthèse de phospholipides (PL) de triacylglycérols (TAG) et d'esters de cholestérol (CE) intervenant dans les structures membranaires, la signalisation cellulaire et le stockage des lipides à des fins énergétiques.

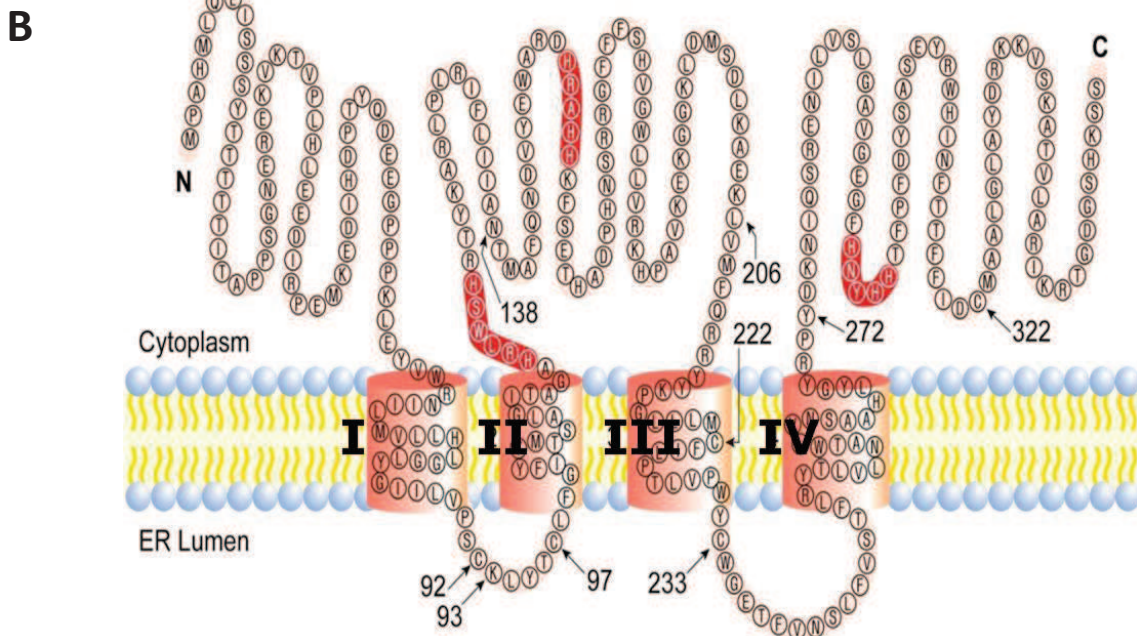
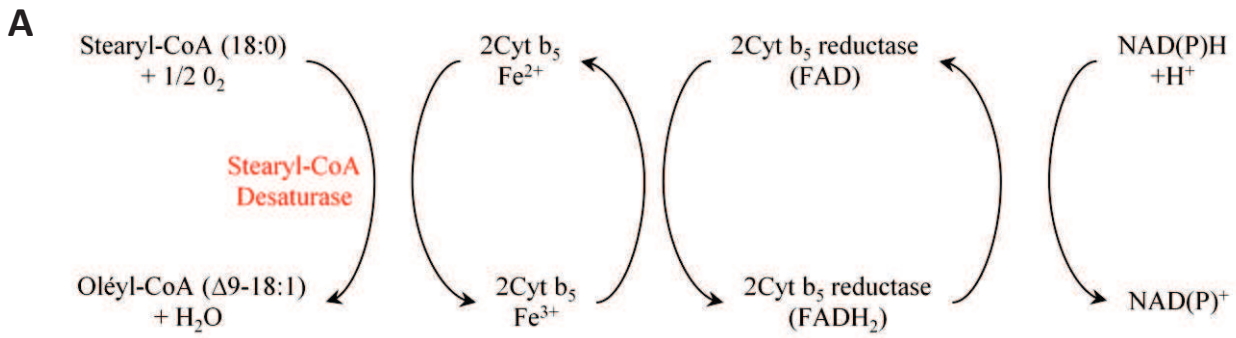


Figure 12 : Réaction enzymatique et représentation schématique de la SCD1.

A: Réaction enzymatique principale catalysée par la SCD1: représentation schématique du transfert d'électrons lors de la désaturation d'acides gras médiée par la SCD1.

B: Représentation schématique de l'association de la SCD1 avec la membrane du réticulum endoplasmique. Les chiffres de I à IV représentent les quatre domaines transmembranaires. Noter que, les extrémités NH₂- et COOH-terminales de SCD1 sont orientées vers le cytoplasme. Les deux boucles côté lumen sont petites comparées aux boucles cytoplasmiques qui contiennent les motifs histidinyl essentiels à l'activité catalytique de l'enzyme (positions 92, 97, 222, 233, 322).

(Man et al., 2006) [http://0-ajpendo.physiology.org.library.pcc.edu/content/297/1/E28/F2.large.jpg](http://ajpendo.physiology.org.library.pcc.edu/content/297/1/E28/F2.large.jpg)

I.3 Résumé des résultats

Le profil d'acides gras circulants a été obtenu après extraction et séparation des lipides neutres. Les acides gras liés au glycérol des triglycérides, diglycérides, monoglycérides, et aux esters de cholestérols, ont été analysés par GC. Nous avons obtenu un profil global, permettant d'identifier une quinzaine d'AG, allant de l'acide palmitique (C16) à l'acide docosahexaénoïque (C22 :6 oméga 3).

1.3.1 Altération du profil d'acides gras dans le sérum des souris SOD1m

A un stade précoce de la pathologie et en l'absence d'altération clinique détectable à l'EMG, le profil circulant des souris SOD1m apparaît normal en comparaison de celui des animaux sauvages. En revanche, dès les premiers signes électromyographiques, le profil des souris SOD1m présente des perturbations de concentrations pour différentes espèces d'AG. Ainsi on remarque une forte diminution des MUFA et une forte surreprésentation des PUFA. On observe par exemple une diminution d'acide palmitoléique (C16 :1) (Contrôle : 3,1%, SOD1m :2,1%, $p < 0,05$) d'acide oléique (C18 :1) (Contrôle :31,5%, SOD1m : 26,4%, $p < 0,05$), une augmentation d'acide docosahexaénoïque (C22 :6 oméga 3) (Contrôle :2,1%, SOD1m :3,9%, $p < 0,05$) (Tableau dans l'article 1, en préparation ci-après).

1.3.2 Altération du profil d'acides gras dans le foie des souris SOD1m

Au niveau hépatique, centre principal du métabolisme lipidique, un certain nombre d'altérations ont également été détectées. On trouve un niveau d'AG similaire entre les animaux SOD1m et leurs homologues sauvages à un stade asymptomatique. Toutefois, on notera la diminution précoce de l'acide alpha-linolénique (C18 :3), ainsi qu'une tendance à l'augmentation du niveau de SFA chez les souris SOD1m (Contrôle : 29,5%, SOD1m :32,5% $p < 0,09$). A un stade précoce de la pathologie on observe une diminution de (C16 :1)(Contrôle : 3,6% SOD1m 2,6%, $p < 0,05$) et de (C18 :1)(Contrôle : 40,2%, SOD1m 30,3%, $p < 0,05$) (Tableau dans l'article 1, en préparation ci-après).

1.3.3 Baisse de l'activité de la SCD1 et modulation pharmacologique

On remarque que le rapport produits/substrats de la réaction catalytique de la SCD1, décrit dans la littérature comme marqueur de l'activité enzymatique, est diminué lors des premiers signes de dénervation détectables à l'EMG (Attie et al. 2002). Cette baisse d'activité est conservée à un stade avancé de la pathologie. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCR quantitative et par western blot, qui montrent une baisse hépatique de l'expression de la SCD1, ainsi qu'une diminution protéique. Ainsi les changements observés dans les profils d'acides gras hépatiques et sériques semblent traduire une baisse d'activité de la SCD1.

Afin de vérifier l'implication de la SCD1 sur les profils d'AG observés, nous avons engagé un traitement pharmacologique visant à supprimer l'activité enzymatique de la SCD1 chez des souris sauvages (se référer à la partie Matériels et Méthodes de l'article en préparation ci-après). L'utilisation d'un inhibiteur de l'activité de la SCD1 reproduit les grandes lignes des profils d'AG retrouvés chez les souris SOD1m.

De plus, l'analyse des niveaux circulants des triglycérides (TG) a montré que la baisse des niveaux de TG apparaît à la phase symptomatique de la maladie chez les souris SOD1m. Le traitement avec l'inhibiteur de l'activité de la SCD1 administré à des souris sauvages reproduit cette baisse du niveau de TG circulants. De même l'analyse du niveau circulant de cholestérol a montré une baisse de ce niveau chez les souris SOD1m à l'apparition des symptômes. Baisse du niveau de cholestérol également observée chez les souris sauvages traitées avec l'inhibiteur de l'activité de la SCD1.

Suite à ces observations nous avons cherché à restaurer l'expression et l'activité de la SCD1 chez les souris SOD1m lors de l'apparition des premiers symptômes, afin de vérifier si une telle restauration avait un impact sur l'état métabolique et l'état d'innervation des souris SOD1m.

1.3.4 Restauration de l'activité de la SCD1 chez les souris SOD1m

L'utilisation d'un agoniste synthétique du récepteur *liver X receptor* (LXR), le TO901317 (Alexis Biochemicals, San Diego, Etats-Unis) permet une augmentation hépatique de l'expression de la SCD1, chez les souris sauvages et les souris SOD1m.

Les souris SOD1m traitées avec l'agoniste LXR présentent un niveau d'expression de la SCD1 hépatique supérieur à celui des souris sauvages contrôles et également supérieur à celui des souris SOD1m contrôles. L'activité relative de la SCD1 mesurée par GC est également restaurée après traitement avec l'agoniste LXR.

L'utilisation de l'agoniste LXR permet une restauration du niveau de TG circulants chez les souris SOD1m et permet une augmentation de la concentration de cholestérol circulant chez les souris SOD1m et les souris sauvages.

Voici à présent ces résultats sous forme d'article (en préparation)

Article 1

Systemic reduction of Stearoyl-CoA Desaturase 1 activity occurs at onset of muscular denervation and promotes profound metabolic changes in animal model of amyotrophic lateral sclerosis.

Florent SCHMITT, Alexandre HENRIQUES, Thiebault LEQUEU, Ghulam HUSSAIN, Sylvie DIRRIG-GROSH, Françoise BINDLER, Eric MARCHIONI, Jose-Luis GONZALEZ de AGUILAR, Jean-Philippe LOEFFLER.

En préparation

Systemic reduction of Stearoyl-CoA Desaturase 1 activity occurs at onset of muscular denervation and promotes profound metabolic changes in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis.

Florent SCHMITT (1, 2), Alexandre HENRIQUES (1, 2), Thiebault LEQUEU (1, 2), Ghulam HUSSAIN (1, 2), Sylvie DIRRIG-GROSH (1, 2), Françoise BINDLER (3), Eric MARCHIONI (3), Jose-Luis GONZALEZ de AGUILAR (1, 2), Jean-Philippe LOEFFLER (1, 2).

(1) INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Strasbourg, France,

(2) Université de Strasbourg, UMRS1118, Strasbourg, France,

(3) IPHC-DSA, UMR 7178, Illkirch-Graffenstaden, France,

Short title: Fatty acid profile in ALS **Keywords:** ALS, lipid, fatty acid

Corresponding authors: Jean-Philippe LOEFFLER
INSERM U1118,
Faculté de médecine,
11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France.
loeffler@unistra.fr
++33 3 68 85 30 81

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal condition caused by the selective degeneration of upper and lower motor neurons. Lower motor neurons connect the spinal cord and brainstem to skeletal musculature. Energetic metabolism suffers many alterations in ALS patients, including higher energy expenditure and dyslipidemia. We aimed to assess the regulation of energetic metabolism in an animal model of ALS, the SOD1 mice, by the study of the composition in fatty acids of energetic lipids in the serum and in the liver. We found that the major alterations start at onset of denervation and relate to SCD-1 activity, an enzyme that catalyzes the conversion of saturated (SFA) to mono-unsaturated fatty acids (MUFA). Indeed, fatty acid profile of SOD1 mice is characterized by lower proportion of MUFA at symptomatic disease stage and reduced relative activity of SCD-1 what coincides with onset of muscular denervation. Reduced activity of SCD1 is associated to lower de novo lipogenesis and reduced levels of circulating lipids. We showed that pharmacological inhibition of SCD1 activity in wild type animals reproduces the same traits of energetic disturbances, and that upregulation of SCD-1 reverse the metabolic phenotypes in SOD1 mice. Our fatty acid profile indicates a major shift in energetic metabolism at disease onset orchestrated, at least partially, by a reduced SCD1 activity.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is degenerative disease characterized by progressive loss of upper and lower motoneurons. As a result of neurodegeneration, patients present progressive muscular weakness evolving towards atrophy and paralysis. First symptoms develop at adulthood between 40 and 70 years of age and death occurs 2 to 5 years after diagnosis.

Lipid species are various molecules, ranging from pure energetic supplies to key structural player, and all are formed with at least one fatty acid. Several reports point the lipid metabolism to the pathophysiology of ALS. Patients often present higher resting energy expenditure and lower body mass index. We and others have recently shown that patients with dyslipidemia present with slower decline and extended life expectancy (Dupuis et al., 2008, 2011). An animal model of ALS, the SOD1 mice, reproduces the hypermetabolism trait of ALS, and high fat diets preserve their motor functions, protects their neuromuscular axis and extend their life expectancy (Dupuis et al., 2004).

The length and the number of saturations present in the carbon chain relate to the management of energetic metabolism (Vessby et al., 2002), and altered fatty acids repartition correlates with enhanced lipogenesis or, in the contrary to increased beta oxidation. Fatty acids have many effects on the central nervous system too. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) have a role in cognitive functions, neuroprotection and neuroinflammation (Bazan et al., 2011; Rao et al., 2012). Moreover, we have recently identified a novel role for Stearoyl-Coa Desaturase-1 (SCD-1), an enzyme converting saturated (SFA) to mono-unsaturated fatty acids (MUFA). In wild type animal, a low activity of SCD-1 support peripheral axonal regeneration (Hussain et al., 2013).

The aim of the study is to decipher the rearrangement taking place in lipids in ALS. We focused on the balance between different classes of fatty acids in SOD1 mice at different disease stages. We used gas chromatography to identify the repartition of fatty acids in the serum and the liver in an animal model of ALS, the SOD1 G86R mice. Alterations were further investigated at biomolecular and physiological levels.

By this mean, we sought to study the alterations in the energetic metabolism of an animal model of ALS and their impacts on the disease course.

METHODS

Animals

FVB/N mice overexpressing the murine G86R SOD1 mutation (SOD-1 mice) (Ripps et al., 1995), were maintained in our animal facility at 23°C with a 12 hours light/dark cycle. They had water and regular A04 rodent chow ad libitum. Age-matched non-transgenic female littermates served as controls. Stearoyl-CoA desaturase activity has been inhibited with the pharmacological agent MF-438, or (3-(5-methyl-[1,3,4]thiadiazol-2-yl)-6-[4-(2-trifluoromethyl-phenoxy)-piperidin-1-yl]-pyridazine (Prestwick Chemical, Illkirch, France). FVB/N mice were fed with A04 chow ad libitum containing 0.00625% (w/w) MF-438 (Safe, Augy, France), which provided a daily dose of 10 mg/kg body mass, as calculated on a basis of 4 g of food intake per day and 25 g of averaged body mass. Age-matched littermates fed on regular A04 chow pellet (Safe, Augy, France) served as controls. Stearoyl-CoA desaturase 1 has been upregulated with the pharmacological agent TO901317 (Alexis, San Diego, USA). Mice were daily treated with TO901317 (15mg/kg/day) diluted in vehicle solution for 7 days. Control mice were treated with the vehicle solution only (0.9% NaCl, 10% DMSO). Animal experiments followed European Union regulations (Directive 2010/63/EU), were approved by the ethical committee of the University of Strasbourg (No. AL/01/20/09/12) and performed by authorized experimenters (No. A67-402).

Samples collection

After deep anesthesia with sodium pentobarbital (120mg/kg, Ceva Santé Animale, France), electromyograms were obtained with a standard electromyography apparatus (Dantec, Les Ulis, France), in accordance with the guidelines of the American Association of Electrodiagnostic Medicine. A concentric needle electrode (no. 9013S0011, diameter 0.3 mm; Medtronic, Minneapolis, MN) was inserted in the gastrocnemius, and a monopolar needle electrode (no. 9013R0312, diameter 0.3 mm; Medtronic) was inserted into the tail of the mouse to ground the system. Only spontaneous activity with at least 50 μ V of amplitude was considered. Right after, whole blood was collected on plain tubes and mice were transcardially perfused with ice-cold PBS. Liver was rapidly dissected and snap frozen in liquid nitrogen. Whole blood was centrifuged at 4000 rpm, for 4 minutes, at 4°C, serum was collected and snap frozen. Samples were kept at -80°C until further steps.

Neutral lipid extraction

Lipids from serum were extracted following a modified version of the Bligh and Dyer method (Anon, 1959). Briefly, methanol/chloroform solution was added to serum. Centrifugations

were performed after addition of chloroform and KCl. Lower phases were collected and mixed with methanol. After a second centrifugation, the lower phase containing the lipids was collected on glass tubes. Liver samples were weighed, and disrupted with Tissue Lyser twice at 30 Hz for 3 min each using stainless steel beads and racks precooled at -80°C. After removing the beads, 1 mL ice-cold Ripa buffer was added per 100 mg of disrupted tissue, and samples were centrifuged at 2000 g for 10 min at 4°C. A volume of supernatant corresponding to two mg of proteins, according to the bicinchoninic acid assay, was mixed with 2.5 mL chloroform/methanol (1:1). After vortex and sonication, samples were incubated for at least 2-3 hours at 4°C, and centrifuged at 2000 g for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and non-polar lipid fraction was obtained by separation on Sephadex columns.

Neutral lipids were transmethylated with methanol and potassium hydroxide, and collected in heptane. The fatty acid methyl esters (FAMES) were stored at -20°C until further steps.

Gas chromatography

Gas chromatography was performed with 1µL of FAMES, using a Varian 3400 CX chromatograph fitted with a WCOT fused silica capillary column of 100 m x 0.25 mm x 0.20 µm (coated with polar highly substituted cyanopropyl CP-SIL 88 phase). The temperature gradient in the oven ranged from 80 to 220°C at a rate of 4°C/min. We used helium as gas carrier. The temperature of the flame ionization detector was set at 270°C. Peaks were identified by retention time and compared to a standard mix of fatty acid methyl esters (Supelco 37 and Supelco PUFA-2 Animal Source; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Data were expressed as relative percentages. SCD-1 activity index (18:1/18:0) was determined.

Direct quantifications of lipids

Levels of triglycerides, total cholesterol and free fatty acids were determined with Randox kits (TR210, CH200, FA115), according to manufacturer's recommendations. Briefly, the TR210 kit is based on the hydrolysis of triglycerides to release glycerol that will react with H₂O₂. Subsequent enzymatic reactions will produce a colored end-product. Absorbance is measured at 550nm. CH200 kit is based upon the oxidation of cholesterol to cholestene 3-one and H₂O₂ by the cholesterol oxidase. The H₂O₂ produced is then dosed upon the same principle as with the TR210 kit. FA115 kit use Acyl CoA Synthetase, Acyl Coa Oxidase and peroxidase to produce a purple adduct measured at 550nm.

Real-time quantitative PCR

Total RNA was prepared following standard protocols. Briefly, frozen liver was placed into a tube containing a 5-mm stainless steel bead. Working on ice, 1 mL Trizol reagent (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) was added, and homogenisation was performed in a TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) at 30 Hz for 3 min twice. RNA was extracted with chloroform/isopropyl alcohol/ethanol and stored at -80°C until use. One μg of total RNA was used to synthesize cDNA using Iscript reverse transcriptase (BioRad Laboratories, Marnes La Coquette, France) and oligo-dT primer as specified by the manufacturer. Gene expression was measured using the SYBR green reagent (2x SYBR Green Supermix; Bio-Rad Laboratories) following the manufacturer's instructions on a Bio-Rad iCycler. PCR was performed in optimized conditions: 95°C denatured for 3 min, followed by 40 cycles of 10 s at 95°C and 30 s at 60°C .

Primers (Eurogentec, Seraing, Belgium) were as follows. Ribosomal RNA 18S (18S): forward 5'-cgtctgccctatcaacttcg-3', reverse 5'-ttccttgatgtgtagccg-3'; RNA polymerase II (pol2): forward 5'-aatccgcatcatgaacagt-3', reverse 5'-tcattccatttaccacc-3'; TBP: forward 5'-ccaatgactcctatgacccta-3', reverse 5'-cagccaagattcaggttagat-3'; Stearoyl CoA Desaturase 1 (SCD-1): forward 5'-cctacgacaagaacattcaatcc-3', reverse 5'-cgtctcaagttcttctaatcct-3'; Sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1): forward 5'-atgctatctccatggcaacac-3', reverse 5'-ccaccaagaaacgggtgacct-3'; Fatty acid synthase (FAS): forward 5'-tctgcagagaagcgagcata-3', reverse 5'-cccagagggtggtttaga-3'. Adipose Triglyceride Lipase (ATGL): forward 5'-cac atc tct cgg agg acc at-3', reverse 5'-aca gtg tcc cca ttc tca gg-3'; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): forward 5'-aat cct tgg ccc tct gagat-3', reverse 5'-ttttcaagggtgccagtttc-3'. Relative quantification was achieved by calculating the ratio between the cycle number (Ct) at which the signal crossed a threshold set within the logarithmic phase of the gene of interest and that of the normalization factor determined by GeNorm with the three reference genes (18S, pol2, TBP). Ct values were the means of duplicates.

Statistics

Data are expressed as the mean \pm sem. Prism version 5.0a software (GraphPad, San Diego, CA) was used for statistical analysis. Statistics were performed using unpaired t-test or one way ANOVA. A p-value of less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Altered fatty acid profile in serum and liver of SOD1 mice

We have previously shown that both ALS patients and SOD1 mice, animal model for ALS, present with metabolic dysfunctions that impact disease severity. Here, we pictured the profile of circulating fatty acids of SOD1 mice and wild type littermates.

After lipid extraction and separation, neutral lipids underwent transmethylation. During this step, fatty acids bonded to the glycerol of triglycerides, diglycerides, monoglycerides and to cholesterol ester were released and identified by gas chromatography. A total of fifteen fatty acids, from palmitic (c16:0) to docosohexaenoic acids (c22:6 omega 3), were identified by gas chromatography. Table 1 presents the proportion of each detected fatty acid, at presymptomatic and symptomatic disease stage.

At a disease stage when SOD1 mice do not present with motor symptoms, profile of circulating fatty acid is normal and the balance between saturated (SFA), mono-unsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) remain stable. Discrepancies in the FA profile of SOD1 mice appear with muscular denervation. At this disease stage, we observed an abnormal repartition of fatty acids, with a significant shrinkage of MUFA, and a significant overrepresentation of PUFA (Table 1). Representative altered fatty acids are c18:1 oleic acid (control: 31.5%, SOD1: 26.4%, $p < 0.05$), c20:4n6 arachidonic acid (control: 6.6%, SOD1: 13.5%, $p < 0.05$) and c22:6n3 decosahexaenoic acid (control: 2.1%, SOD1: 3.9%, $p < 0.05$).

Liver is a major organ for the regulation of lipid metabolism, and has a direct impact on the composition of circulating lipids. In order to determine the role of liver in the alterations identified in the serum, we investigated the hepatic pool of fatty acids (Table 1).

The content of fatty acids in the liver is stable at a presymptomatic disease stage when compared to control, despite a significant down representation of the alpha-linoleic acid, an essential fatty acid. We also noted a trend for higher level of SFA in SOD1 mice, (control: 29.5%, SOD1: 32.5%, $p < 0.09$), a trend that become significant at symptomatic stage (control: 27.6%, SOD1: 33.0%, $p < 0.05$). After onset of muscular denervation, main deregulations concerned the balance between SFA and MUFA. The most representative fatty acids from SFA and MUFA families were respectively over- and downrepresented, suggesting a loss of activity in the conversion of SFA towards MUFA.

Disease progression and SCD-1 relative activity in SOD1 mice.

Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) is the enzyme responsible for the conversion of palmitic and stearic acids (SFA) to palmitoleic and oleic acids (MUFA). As levels of SFA and MUFA are altered in both the serum and liver of SOD1 mice, we sought to determine how the relative SCD-1 activity is modulated, at different disease stages. Disease evolution in SOD1 mice is well defined. A long asymptomatic phase precedes the onset of denervation. Later, the symptomatic phase is characterized by muscular denervation, and can be subdivided in early and late groups. Early symptomatic mice present with muscular denervation, as shown by electromyography, but no alterations of the motor phenotype. Late symptomatic mice had strong muscular denervation, impaired hind limbs extension and gait impairments (Fig. 1A). At presymptomatic disease stage, relative SCD-1 activity is similar between SOD1 mice and controls. However, we found a reduction in the relative activity of this enzyme, both in the serum and in liver of symptomatic SOD1. Interestingly, the reduction in SCD-1 activity starts at the early disease stage, when muscular denervation is noticeable by electrophysiology but is not associated to motor dysfunctions (Fig. 1B). Later, when motor impairment is well established, SCD-1 activity further decreased in the serum of SOD1 mice (control: 100%, early symptomatic SOD1 mice: 71.9%, late symptomatic SOD1 mice: 57.7%, both $p < 0.05$ to control). Relative SCD-1 activity is strongly impaired in liver too at symptomatic age (control: 100%, early symptomatic SOD1: 54.7%, late symptomatic SOD1: 60.3%, $p < 0.05$). The loss of function of SCD-1 is explained by transcriptional downregulation and reduced level of SCD-1 protein in early symptomatic (Fig. 1D). Taken together these results show a loss of SCD-1 activity in neutral lipids that correlates with onset of denervation in an animal model of ALS.

Pharmacological inhibition of SCD-1 reproduces metabolic phenotype of SOD-1 mice in non-transgenic animals

SCD-1 is a key enzyme for fatty acid anabolism and its activity impacts fatty acid beta-oxidation, insulin sensitivity and also in inflammation (Sampath and Ntambi, 2011). We first hypothesized that reduced relative activity of SCD-1 contribute to the overall deregulation of energetic metabolism in SOD1 mice. To assess our hypothesis, we treated non transgenic mice with an inhibitor of SCD-1 activity, the pharmacological agent MF-438, and compared their metabolic profile to symptomatic SOD1 mice. Upon treatment, relative SCD-1 activity was drastically reduced and the fatty acid profile recapitulates the main features of the profile of symptomatic SOD1 mice (Table 2), such as a loss of MUFA, the product of SCD-1.

SOD1 mice are leaner and present with lower triglycerides and cholesterol levels (Dupuis et al., 2004). The pharmacological inhibition of SCD-1 in non-transgenic mice induced a severe drop in body mass, as expected (Ntambi et al., 2002) despite normal food intake (Fig. 2.A) and a reduction of triglyceride and total cholesterol levels, similarly to SOD-1 mice (Fig. 2.B). To decipher the regulation taking place in SOD1 mice, we performed quantitative PCR to assess the transcriptional regulation of genes involved in lipid metabolism, in liver (Fig. 2C). At symptomatic disease stage, we found marked downregulations of SCD-1 and FAS, two enzymes directly responsible for the transformation of lipids for energy storage (Jensen-Urstad and Semenkovich, 2012), and SREBP-1c, the transcription factor that controls the expression of genes involved in the de novo synthesis of lipids, such as SCD-1 and FAS (Mauvoisin et al., 2007; Kumadaki et al., 2008). Interestingly, pharmacological inhibition of SCD-1 reproduces the same scheme in non-transgenic mice. Expressions of SCD-1, FAS and SREBP-1 are strongly impaired by more than a factor 2 in SOD-1 and MF438 treated mice, compared to control mice (Fig. 2C).

Taken together, these data suggest that loss of function of SCD-1 participate to the reduced anabolic metabolism and to hypolipidemia found in SOD1 mice.

Upregulation of SCD-1 corrects metabolic phenotype of SOD-1 mice.

To ascertain our observation, we next sought to restore SCD-1 activity and proper anabolism in SOD1 mice. We took advantage of TO-901317, an agonist of the nuclear receptor LXR that promotes, among other targets, SCD-1 expression, and we treated non-transgenic and SOD1 mice. As expected, TO-901317 increased SCD-1 activity in wild type, but also in symptomatic SOD1 mice (Fig. 3A). Upon treatment, body mass was not affected in wild type and SOD1 mice presented a similar weight loss when compared to untreated SOD1 mice (Fig. 3B). Alongside with increased relative SCD-1 activity in SOD-1 mice, TO-901317 was able to stimulate the expression of lipogenic genes in liver that are downregulated in SOD-1 mice, such as SCD-1, FAS and SREBP-1 (Fig. 3.C), and to enhanced triglyceride and cholesterol levels, that are usually drastically reduced in symptomatic SOD1 mice.

Altogether, these results show that alterations of lipid metabolism in SOD1 mice are associated to loss of SCD-1 function and that pharmacological stimulation of SCD-1 expression is sufficient to restore normal values for circulating lipids and hepatic metabolism.

DISCUSSION

Composition of lipids in fatty acids relates to regulations of energetic metabolism. In the present study, we analyzed the repartition of fatty acids of neutral lipids, at different disease stages in an animal model of ALS, the SOD1 G86R mice.

Based on our chromatograms, the profile of fatty acids is unaltered at presymptomatic disease stage, but profound alterations appear with muscular denervation detected by electromyography, when motor dysfunctions are not established in SOD1 mice. Serum and hepatic lipids of symptomatic SOD1 were characterized by a reduction of the conversion of SFA to MUFA, catalyzed by SCD-1, which goes along with a downregulation of the hepatic lipid anabolism. SCD-1 is a well-known enzyme responsible for the storage of lipid reserves in the body. High SCD-1 activity is associated to synthesis of fatty reserves and insulin resistance (García-Serrano et al., 2011)(Flowers and Ntambi, 2008), whereas a low SCD-1 activity is responsible for enhanced metabolism (Ntambi et al., 2002). SCD-1 expression is tightly regulated by food intake and level of circulating fatty acids. Its upregulation occurs with an excess of saturated fatty acids, carbohydrates and cholesterol (Mauvoisin and Mounier, 2011). An additional cause for SCD-1 upregulation is chronic food restriction/refeeding that promotes fat storage. Conversely, long term fasting is associated to a downregulation of hepatic SCD-1 (Mauvoisin and Mounier, 2011). In the present study, the loss of SCD-1 activity in liver is not caused by fasting of SOD1 mice, as mice present normal food intake at early symptomatic disease stage (Dupuis et al., 2004). Moreover, within the study, food pellets were placed directly into the cages and were accessible to mice, even weakened by the disease. Therefore, it is unlikely that SOD1 mice were fasting from disease onset to more severe disease stage. As an additional source of regulation, it is documented that SCD-1 is downregulated by increased level of PUFA. Of note, PUFA levels were enhanced in the profile of both serum and liver of SOD1 mice, and we cannot exclude that they contribute to the low expression of SCD-1 found in the liver of SOD-1 mice. However, we believe that the over-representation of PUFA is rather a consequence of the loss of SCD-1 activity. Indeed, an experimental loss of SCD-1 activity leads to a relative increase of PUFA, as show after MF-438 treatment.

The negative transcriptional regulation of SCD-1 and other anabolic genes shows that the de novo lipogenesis is reduced in symptomatic SOD1 mice, at the very onset of disease, before the occurrence of motor symptoms. Pharmacological modulations of SCD-1 suggest that its activity in ALS is responsible for the lipid alterations found in SOD-1 mice, including hypolipidemia. Indeed, inhibition of SCD-1 in wild type animals reproduces the fatty acid profiles of SOD-1 mice and their altered levels of circulating lipids. Moreover, a

pharmacological upregulation of SCD-1 expression is able to restore anabolism by stimulating the hepatic gene expression and by increasing the circulating lipid levels in symptomatic SOD-1 mice.

Interestingly, SCD-1 activity has repercussion on muscular physiology. Our transcriptomic studies have reported a downregulation of SCD-1 in the muscle of SOD1 mice and in the muscle of a subset of ALS patients (Gonzalez de Aguilar et al., 2008; Pradat et al., 2012). At the time of biopsy, the muscles from this subset of patients were spared from denervation and atrophy. Additionally, we have recently published a study where we characterized the consequences of a reduced SCD-1 activity for the neuromuscular axis in mice. We have reduced the conversion of SFA to MUFA by genetic and pharmacological means in non-transgenic mice. Those animals reproduced a hypermetabolic trait and most importantly, they recovered better after a sciatic nerve injury. Reduction of SCD-1 activity turns skeletal muscles to a more oxidative metabolism, promote the expression of neuromuscular junction genes and support peripheral nerve regeneration after sciatic nerve crush (Hussain et al., 2013). The downregulation of SCD1, and the reduction of hepatic lipid anabolism could be therefore a potential innate mechanism to counteract ALS pathologies. Further investigations are required now and should focus on the regulation of SCD-1 in ALS patients and on the effect of MF-438 or TO901317 on disease course in SOD-1 mice.

In conclusion, energetic lipids suffer changes in their composition of fatty acids, when muscular denervation occurs in an animal model of ALS. (i) These alterations reveal a silencing of de novo lipogenesis in liver, associated to a decrease in circulating triglycerides and cholesterol. (ii) A pharmacological inhibition of SCD1 reproduces these observations in a non-transgenic animal and (iii) a treatment with an agonist LXR stimulates SCD-1 expression and activity in SOD-1 mice, and reverse metabolic phenotype in symptomatic animals. Our study suggests a pivotal role for SCD1 in the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Annie Picchinenna and Marie José Ruivo for excellent technical assistance. This work was supported by the Thierry Latran Foundation, the European Community's Health Seventh Framework Programme under grant agreement n° 259867 (FP7/2007-2013), the "Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres Maladies du Motoneurone" and by the "Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives". JLGDA is recipient of a "Chaire d'Excellence

INSERM/Université de Strasbourg". A.H. is a research fellow receiving funding from FP7/2007-2013. F.S. is granted by "Association Française contre les Myopathies" and AREMANE. G.H. is supported by the Higher Education Commission of the Pakistani government and "Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives".

REFERENCES

- Anon (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917.
- Bazan NG, Musto AE, Knott EJ (2011) Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity. *Molecular neurobiology* 44:216–222 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3180614&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 27, 2013].
- Dupuis L, Corcia P, Fergani a, Gonzalez De Aguilar J-L, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Seilhean D, Hauw J-J, Lacomblez L, Loeffler J-P, Meininger V (2008) Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70:1004–1009 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18199832>.
- Dupuis L, Oudart H, Aguilar JG De, Loeffler J (2004) Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:11159–11164.
- Dupuis L, Pradat P, Ludolph AC, Loeffl J (2011) Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurology* 10:75–82.
- Flowers MT, Ntambi JM (2008) Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Current opinion in lipidology* 19:248–256 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460915>.
- García-Serrano S, Moreno-Santos I, Garrido-Sánchez L, Gutierrez-Repiso C, García-Almeida JM, García-Arnés J, Rivas-Marín J, Gallego-Perales JL, García-Escobar E, Rojo-Martinez G, Tinahones F, Soriguer F, Macias-Gonzalez M, García-Fuentes E (2011) Stearoyl-CoA desaturase-1 is associated with insulin resistance in morbidly obese subjects. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 17:273–280 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3060976&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 8, 2013].
- Gonzalez de Aguilar J-L, Niederhauser-Wiederkehr C, Halter B, De Tapia M, Di Scala F, Demougin P, Dupuis L, Primig M, Meininger V, Loeffler J-P (2008) Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiological genomics* 32:207–218 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000159> [Accessed March 3, 2013].
- Hussain G, Schmitt F, Henriques A, Lequeu T, Frederique R, Françoise B, Sylvie D-G, Hugues O, Lavinia P, Marie-Helene M-B, Luc D, Eric M, Gonzalez De Aguilar J-L, Loeffler J-P (2013) Systemic down-regulation of delta-9 desaturase promotes muscle oxidative metabolism and accelerates muscle function recovery following nerve injury. *PLoS one* In press.
- Jensen-Urstad APL, Semenkovich CF (2012) Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochimica et biophysica acta* 1821:747–753

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009142> [Accessed January 29, 2013].

Kumadaki S, Matsuzaka T, Kato T, Yahagi N, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H (2008) Mouse Elovl-6 promoter is an SREBP target. *368*:261–266.

Mauvoisin D, Mounier C (2011) Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie* 93:78–86 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713121> [Accessed February 8, 2013].

Mauvoisin D, Rocque G, Arfa O, Radenne A, Boissier P, Mounier C (2007) Role of the PI3-kinase/mTor pathway in the regulation of the stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver. *Journal of cell communication and signaling* 1:113–125 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2275876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 8, 2013].

Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD (2002) Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *PNAS* 99:11482–11486 Available at: <http://www.pnas.org/content/99/17/11482.short> [Accessed February 8, 2013].

Pradat P-F, Dubourg O, De Tapia M, Di Scala F, Dupuis L, Lenglet T, Bruneteau G, Salachas F, Lacomblez L, Corvol J-C, Demougin P, Primig M, Meininger V, Loeffler J-P, Gonzalez de Aguilar J-L (2012) Muscle gene expression is a marker of amyotrophic lateral sclerosis severity. *Neuro-degenerative diseases* 9:38–52 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21934272> [Accessed February 8, 2013].

Rao JS, Kellom M, Kim H-W, Rapoport SI, Reese E a (2012) Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochemical research* 37:903–910 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3478877&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 14, 2013].

Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:689–693 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Sampath H, Ntambi JM (2011) The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1243:47–53 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22211892> [Accessed February 27, 2013].

Vessby B, Gustafsson I, Tengblad S, Boberg M (2002) Desaturation and Elongation of Fatty Acids and Insulin Action. *Ann NY Acad Sci* 967:183–195.

LEGENDS

Table 1. Fatty acid composition of circulating and hepatic neutral lipids of SOD1 G86R mice.

Mean values and SEM of proportional repartition of each fatty acids, at two different ages (n=10-15/group). ⁰ p<0.1, ¹ p<0.05, ² p<0.005.

Table 2. Fatty acid composition of circulating neutral lipids after inhibition of SCD1.

Mean values and SEM of proportional repartition of each fatty acids, at two different ages (n=10-15/group). ⁰ p<0.1, ¹ p<0.05, ² p<0.005.

Figure 1. Energetic metabolism at various disease stages.

(A) Representative electromyogram of the different experimental groups included in the study. Note scarce fibrillations at early symptomatic phase and massive denervation at late symptomatic phase. **(B)** Relative SCD-1 activity. Decrease of the SCD-1 activity correlates with onset of denervation in SOD1 mice and remain reduced in late disease stage, in serum (n=10/group) and liver (n=15, * p<0.05). **(D)** SCD-1 expression. Relative mRNA of SCD-1 is downregulated in the liver of symptomatic SOD-1 mice (n=6/group, * p<0.05). Western blot analysis reveals finer bands for the SCD-1 protein in liver.

Figure 2. Pharmacological inhibition of SCD-1 activity.

(A) Relative SCD-1 activity. Upon MF-438 treatment, relative SCD-1 activity is strongly reduced, and induces a drop in body mass despite normal food intake (n= 8/group, *, p<0.05; **, p<0.005). **(B)** Real-time RT-qPCR of indicated genes in liver of SOD1 mice and upon MF-438 treatment (n= 8/group, * p<0.05). **(C)** Triglyceride and cholesterol levels. SOD1 mice present with lower levels of circulating lipids and MF-438 treatment reproduces this hypolipidemia in non-transgenic mice (n= 8/group; *, p<0.05 to CT).

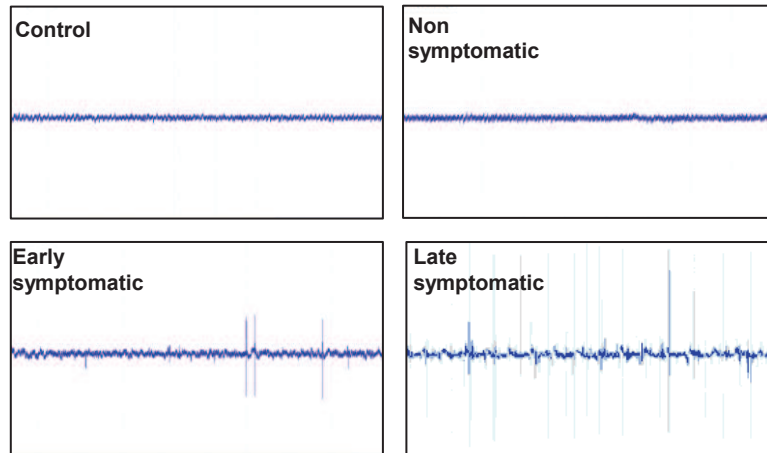
Figure 3. Restoration of SCD-1 activity in SOD1 mice.

(A) Relative SCD-1 activity. Upon TO-901317 treatment, relative SCD-1 activity is increased in both SOD1 and non-transgenic mice. **(B)** The treatment did not result in body mass increase. **(C)** Triglyceride and cholesterol levels. The loss of triglycerides and total cholesterol in SOD1 can be reversed upon TO-901317 treatment (n= 8/group; *, p<0.05 to CT). **(D)** Real-time RT-qPCR of indicated genes in liver of SOD1 mice and upon TO-901317 treatment (n= 8/group, * p<0.05).

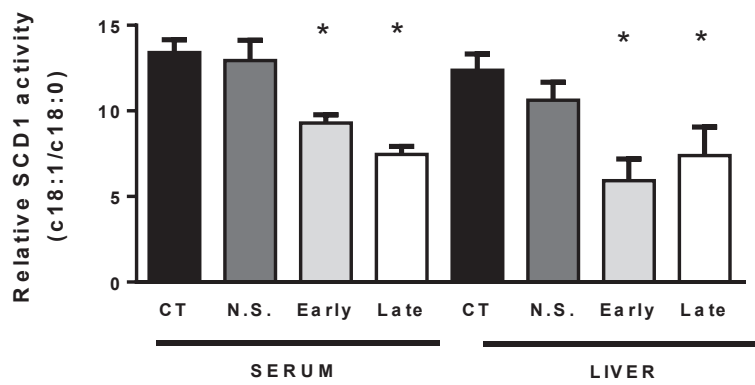
%	Serum				Liver			
	Control	Presympt	Control	Sympt	Control	Presympt	Control	Sympt
16:0	20.0 ± 0.3	20.5 ± 0.9	20.7 ± 0.7	17.4 ± 1.3 ⁰	24.2 ± 1.7	26.8 ± 1.5	22.4 ± 1.2	27.1 ± 1.6 ¹
18:0	2.7 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3.2 ± 0.3	4.5 ± 0.8	4.4 ± 0.6	3.5 ± 0.3	5.9 ± 0.8 ¹
20:0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1 ⁰
22:0	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.2	1.2 ± 0.8	2.6 ± 1.7	0.7 ± 0.3	1.2 ± 0.6	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2
16:1n9	3.4 ± 0.2	3.7 ± 0.4	3.1 ± 0.2	2.1 ± 0.4 ¹	3.5 ± 0.4	3.2 ± 0.3	3.6 ± 0.2	2.6 ± 0.3 ¹
18:1n9	35.8 ± 1.4	33.9 ± 1.6	31.9 ± 1.1	26.4 ± 1.4 ¹	38.6 ± 1.7	38.0 ± 1.4	40.2 ± 1.3	30.3 ± 2.5 ²
20:1n9	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.3
18:2n6	27.2 ± 1.0	25.5 ± 1.1	28.0 ± 0.9	27.6 ± 1.9	20.2 ± 2.2	20.2 ± 0.7	19.3 ± 0.8	22.8 ± 1.5 ⁰
18:3n6	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.0 ⁰	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1
20:2n6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1
20:3n6	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.1 ⁰	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.4
20:4n6	5.4 ± 0.4	7.9 ± 1.6	6.7 ± 0.5	13.5 ± 2.5 ¹	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.3	2.9 ± 0.6	3.5 ± 0.4
18:3n3	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1 ¹	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.3
20:5n3	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1 ¹	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1
22:6n3	2.3 ± 0.3	2.7 ± 0.4	2.4 ± 0.3	3.9 ± 0.5 ¹	0.9 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.3
SFA	22.9 ± 0.4	23.7 ± 0.9	24.7 ± 1.0	23.3 ± 2.1	29.5 ± 1.4	32.5 ± 0.9 ⁰	26.6 ± 1.1	33.8 ± 2.0 ¹
MUFA	39.8 ± 1.6	38.0 ± 1.9	35.4 ± 1.3	29.2 ± 1.5 ¹	43.5 ± 1.8	42.2 ± 1.3	45.1 ± 1.4	34.0 ± 2.5 ²
PUFA	37.3 ± 1.6	38.3 ± 2.6	39.4 ± 1.3	47.5 ± 3.4 ¹	26.4 ± 2.5	25.0 ± 1.0	26.9 ± 1.4	32.1 ± 1.8 ¹

Table 1. Neutral fatty acids profiles.

A.



B.



C.

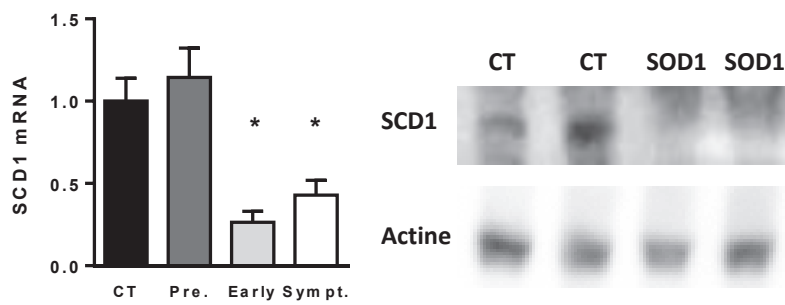
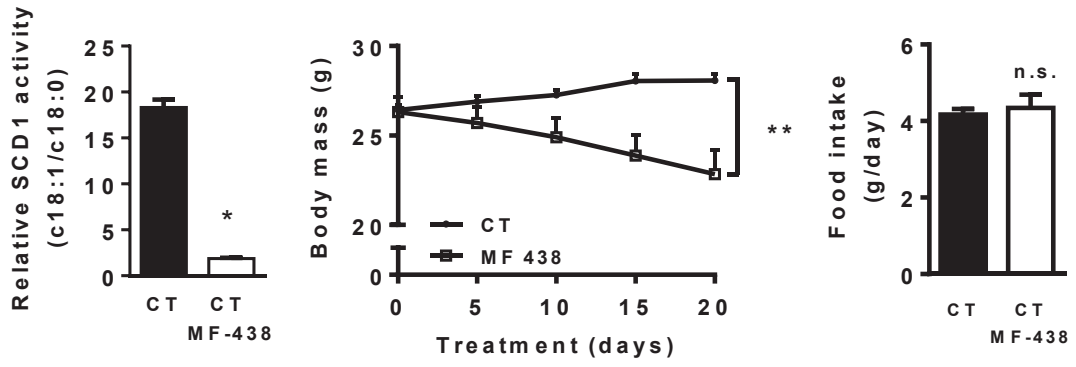


Fig 1. Lipid peroxidability and SCD-1 in SOD-1 mice.

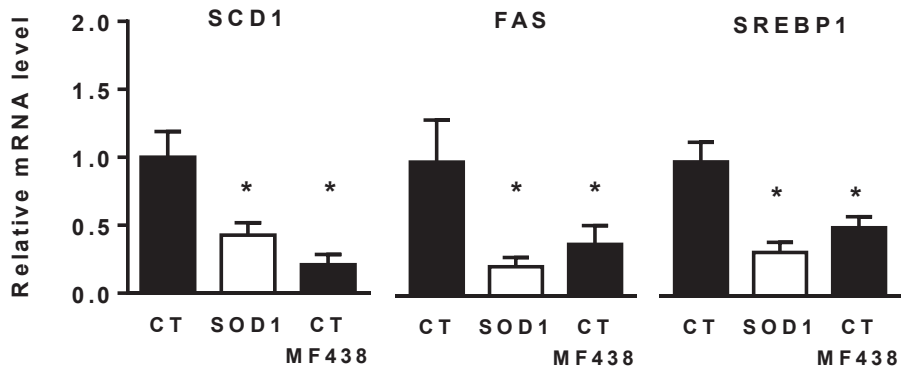
%	Serum - Neutral lipids	
	Control	MF
16:0	18.84 ± 0.84	17.58 ± 1.65
18:0	1.81 ± 0.07	6.74 ± 0.21 ²
20:0	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00 ⁰
22:0	0.33 ± 0.04	1.17 ± 0.38 ⁰
16:1n9	4.47 ± 0.33	0.45 ± 0.07 ²
18:1n9	29.42 ± 1.53	12.63 ± 0.73 ²
20:1n9	0.59 ± 0.06	0.14 ± 0.05 ²
18:2n6	29.13 ± 1.51	41.39 ± 0.53 ²
18:3n6	0.31 ± 0.04	0.36 ± 0.06
20:2n6	0.25 ± 0.01	0.45 ± 0.13
20:3n6	0.62 ± 0.11	0.39 ± 0.23
20:4n6	8.81 ± 1.12	11.82 ± 1.42
18:3n3	0.97 ± 0.07	1.48 ± 0.31
20:5n3	0.79 ± 0.07	1.68 ± 0.51
22:6n3	3.63 ± 0.32	3.71 ± 0.25
SFA	21.01 ± 0.82	25.49 ± 1.55 ¹
MUFA	34.48 ± 1.87	13.22 ± 0.69 ²
PUFA	44.51 ± 2.52	61.29 ± 2.16 ²

Table 2. Fatty acid after MF-438 treatment

A.



B.



C.

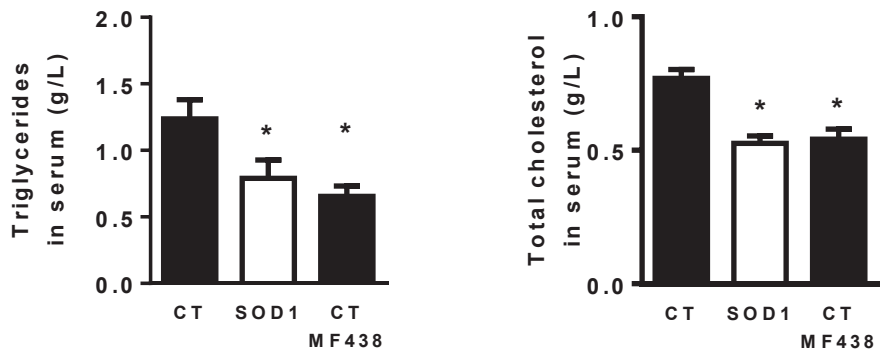


Fig 2. Pharmacological inhibition of SCD-1 activity.

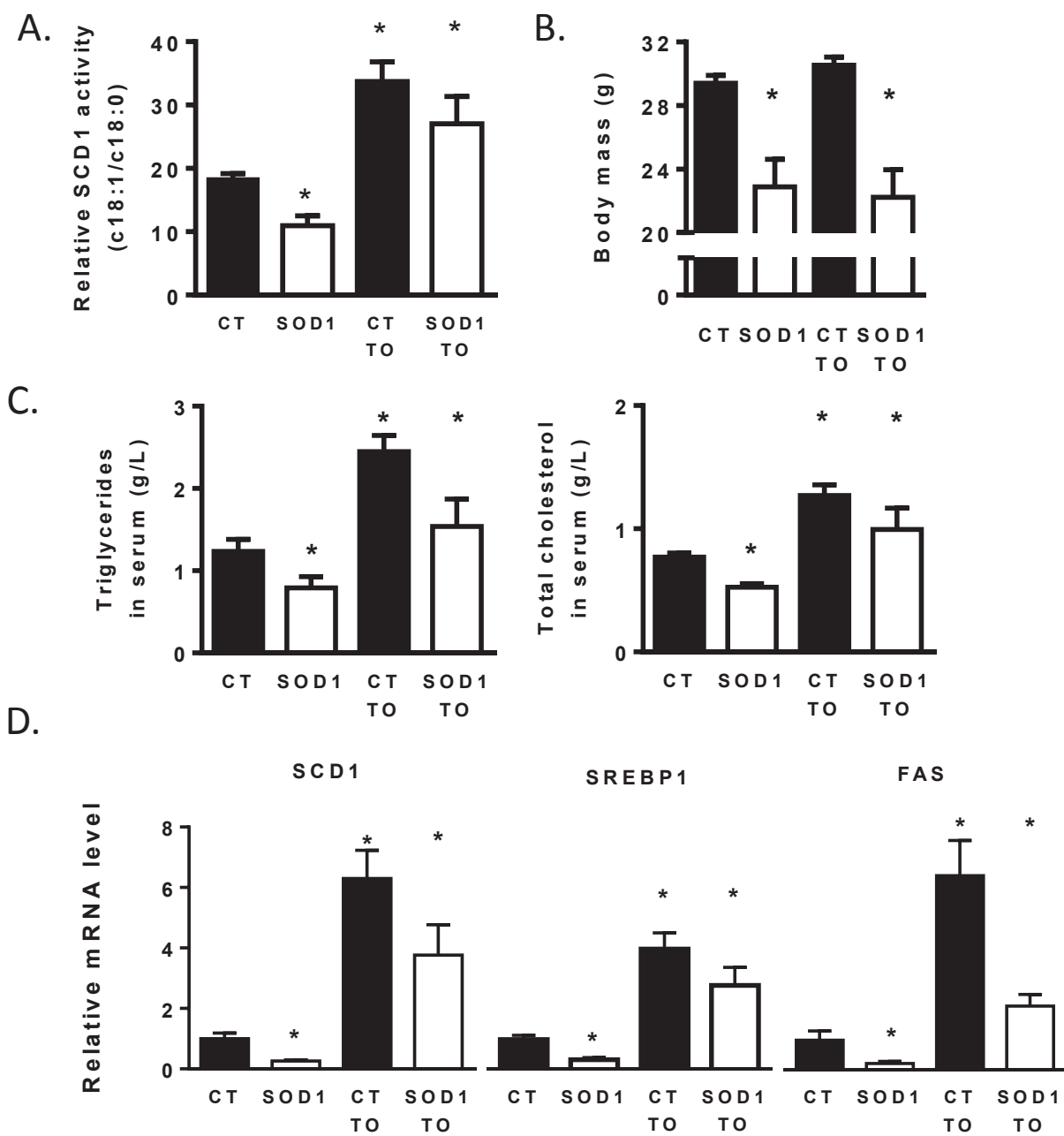


Fig 3. Restoration of SCD-1 activity in SOD1 mice.

1.3.5 Données complémentaires sur l'état d'innervation des souris SOD1m dont l'activité de la SCD1 a été restaurée.

Les effets bénéfiques sur le profil d'AG d'une restauration d'expression et d'activité de la SCD1 nous ont conduits à analyser les effets d'une telle restauration sur l'état d'innervation des souris SOD1m. Pour ce faire, nous avons traité des souris SOD1m avec l'agoniste LXR dès les premières atteintes d'extension des pattes postérieures et ce pendant 7 jours.

L'analyse de la force musculaire des souris SOD1m au cours du traitement n'a révélé aucune amélioration de la force des animaux après restauration de l'activité de la SCD1 (Figure 13 A).

Les souris SOD1m n'ont révélé aucun effet bénéfique du traitement sur l'état d'innervation. En effet le niveau d'expression musculaire d'un gène reflétant la dénervation (sous-unité alpha du récepteur nicotinique) n'a révélé aucune aggravation de l'état de dénervation chez des souris sauvages traitées avec l'agoniste LXR, ni aucune amélioration du niveau d'expression de ce gène chez les souris SOD1m, qui présentent naturellement un niveau plus élevé d'expression à ce stade de la pathologie. Il faut toutefois souligner que le niveau d'expression de ce gène de jonction présente une tendance à l'augmentation chez les souris SOD1m après traitement avec l'agoniste LXR (Figure 13 B).

La quantification du nombre de MN présents dans la corne ventrale de la moelle épinière a montré une absence d'effet bénéfique du traitement sur les souris SOD1m. En effet, on observe un nombre de MN plus faible chez les souris SOD1m contrôles en comparaison à leurs homologues sauvages et un nombre de MN similaire dans la moelle épinière des souris SOD1m traitées avec l'agoniste LXR (Figure 13 C et D).

Ces résultats suggèrent une absence d'effet bénéfique d'une restauration de l'activité de la SCD1 sur l'innervation musculaire et le maintien du nombre de MN chez les souris SOD1m, dans nos conditions expérimentales.

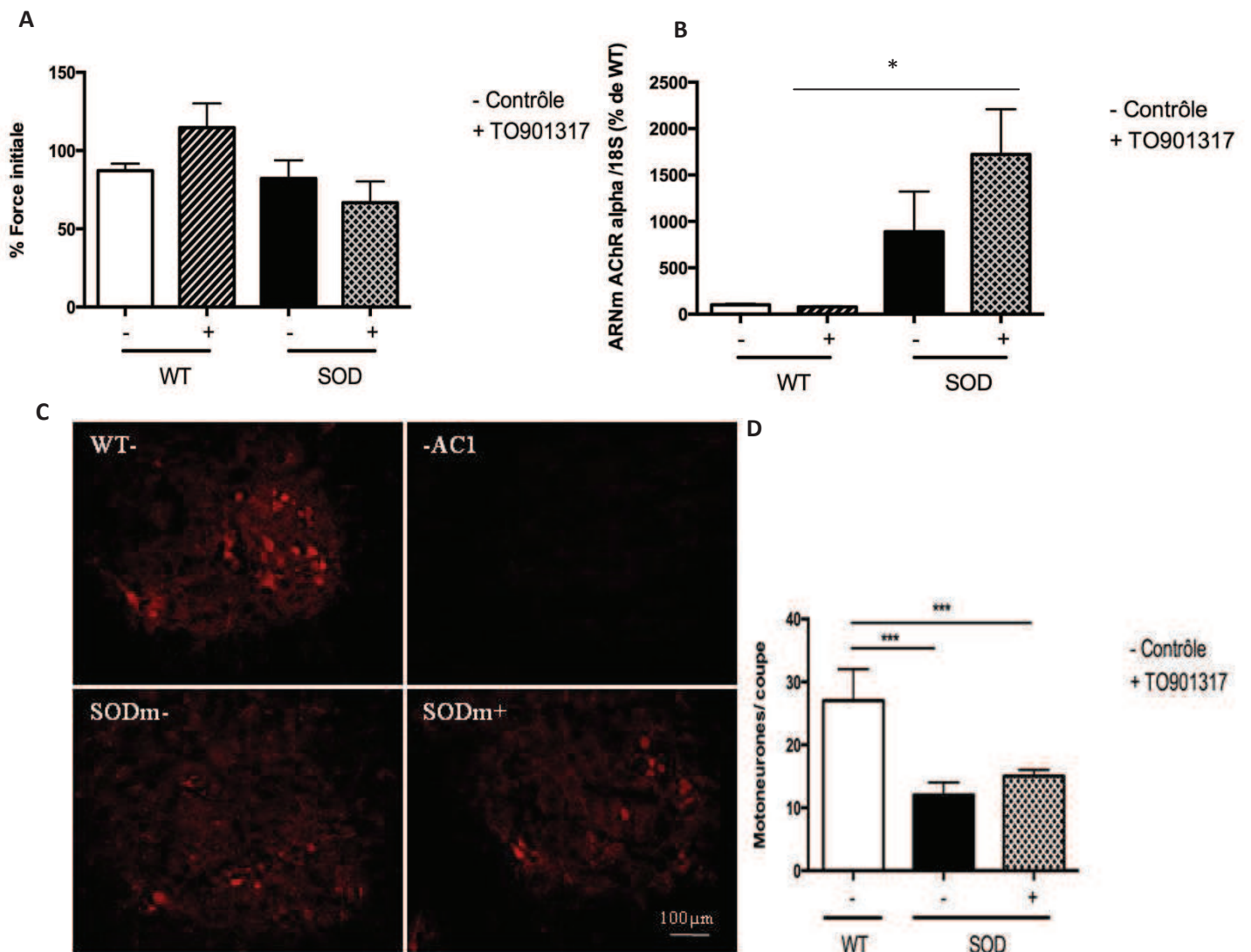


Figure 13: Effet du traitement au TO901317 sur la force musculaire, l'expression des sous-unités alpha du récepteur à l'acétylcholine (AChR) dans le muscle gastrocnémien, et sur le nombre de motoneurones dans la moelle épinière lombaire.

A) La force musculaire développée par les souris au 7^{ème} jour de traitement est exprimée en pourcentage de la force initiale développée le 1^{er} jour (en Newton). B) En l'absence de traitement, l'expression d'AChRa est très fortement augmentée chez les souris SODm- par rapport aux WT-. Le traitement au TO901317 entraîne une légère augmentation sur l'expression d'AChRa chez les souris SOD1m. C) A gauche, 3 micrographies représentatives de l'immunoréactivité cholineacétyltransférase (Chat) permettant de visualiser les motoneurones sur des coupes de moelle épinière lombaire de souris sauvage traitée au solvant (WT-) et de souris SOD1m traitée au solvant (SODm-) ou au TO901317 (SODm+). La spécificité du marquage est attestée par l'absence de signal obtenu par omission de l'anticorps anti-Chat (-AC1). D) Le nombre moyen de motoneurones par coupes en fonction des groupes expérimentaux est représenté à droite. En l'absence de traitement, on observe une diminution significative de 54% du nombre de motoneurones par coupe chez les souris SODm- par rapport aux WT-. Le traitement au TO901317 ne semble pas modifier la perte de motoneurones.***, $p < 0,001$ ANOVA à un facteur: l'effet est très significatif sur le nombre de motoneurones.

Conclusion de l'étude

Notre étude met en évidence les perturbations lipidiques trouvées dans la SLA, en identifiant les espèces d'AG dont les niveaux sont modifiés dans la pathologie, et ce tant au niveau circulant qu'hépatique. Ainsi nous avons vu que l'équilibre entre les différents AG est modifié dès les premiers symptômes de la pathologie. On voit également une forte perturbation du niveau de substrats et produits de la réaction enzymatique de la SCD1, mais on observe aussi des différences touchant les PUFA, aux niveaux hépatique et circulant.

Les différences de niveau des substrats et produits de la SCD1 traduisent la baisse d'activité de cette enzyme au cours du développement de la maladie. Nous avons vu à l'aide de traitements pharmacologiques, qu'il est possible d'influencer ces profils lipidiques, qu'il s'agisse du niveau d'AG, ou de formes plus complexes telles que les triglycérides ou le cholestérol. En effet, l'administration d'un agoniste synthétique du récepteur LXR permet une augmentation d'expression de SCD1, ainsi qu'une augmentation de son activité, se traduisant par une restauration des niveaux d'AG hépatique et circulant. L'utilisation d'un inhibiteur de l'activité enzymatique de la SCD1 a permis de renforcer le rôle de SCD1 dans la SLA, puisque l'administration de cet inhibiteur à des souris sauvages reproduit partiellement les caractéristiques lipidiques trouvées chez les souris SOD1m. Ce dernier point souligne ainsi l'importance de l'activité de la SCD1 sur le profil lipidique des animaux.

Notre étude a permis de mieux caractériser les altérations lipidiques présentes dans la SLA et de mieux en cerner les conséquences éventuelles. Cette étude a également montré qu'il est possible d'agir sur l'expression et l'activité de la SCD1, permettant de ce fait de compenser d'éventuels déficits. D'autres travaux seront nécessaires pour déterminer si une modulation des niveaux d'AG présents chez les souris SOD1m peut influencer le devenir de la pathologie. Néanmoins, à la vue de l'augmentation de la survie des animaux SOD1m suite à une alimentation enrichie en gras (Dupuis et al. 2004), il semble que l'influence de l'état lipidique soit déterminante sur l'évolution de la maladie. Une perturbation du niveau de certains types d'acides gras, peut avoir des répercussions dramatiques sur l'évolution de la pathologie. A l'inverse, une meilleure compréhension des effets bénéfiques d'une modulation lipidique permettra certainement d'envisager des traitements thérapeutiques améliorant la survie des patients, ou retardant l'évolution de la maladie.

Chapitre II :

Influence de l'expression de la SCD1 sur l'axe neuromusculaire

(Publié dans l'article 2, ci-après)

II.1 Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude était d'appréhender des mécanismes physiopathologiques trouvés dans la SLA et de comprendre l'influence du métabolisme des acides gras sur l'axe moteur. Suite à l'analyse du transcriptome musculaire entrepris au sein du laboratoire, *scd1* a été identifié comme gène d'intérêt. En effet, en résumant le chapitre précédent, le profil d'acides gras des souris SOD1m est altéré au cours de la pathologie et la baisse d'activité et d'expression de la SCD1 semble étroitement liée à ces altérations. En effet, une inhibition pharmacologique de l'activité enzymatique de la SCD1 reproduit les grands aspects des profils d'acides gras présents chez les souris SOD1m.

La baisse d'expression et/ou d'activité de la SCD1 ayant une répercussion sur le profil lipidique global des animaux, nous pensons que celle-ci peut également moduler les paramètres physiopathologiques caractéristiques de la SLA.

Il avait été montré que les souris invalidées pour le gène *scd1* présentaient un hypermétabolisme, mais aucune description ou analyse de l'axe moteur n'avait été entreprise sur ce modèle. Nous avons voulu savoir si cet hypermétabolisme, proche de celui retrouvé chez les souris SOD1m était capable d'induire un déficit des fonctions motrices et/ou une dégénérescence motoneuronale. Pour cette nouvelle étude, nous avons entrepris une analyse musculaire de l'expression de la SCD1 chez les souris SOD1m ainsi qu'une expertise de l'axe moteur suite à l'invalidation génétique ou pharmacologique de la SCD1 chez des souris sauvages.

II.2 Résumé et discussion des résultats

La première étape de notre étude a permis de montrer par PCR quantitative, la baisse précoce et progressive de l'expression de SCD1 au niveau musculaire chez les souris SOD1m. Une analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG) a également permis de montrer la baisse du rapport produits/substrats de l'activité enzymatique de la SCD1, traduisant une baisse d'activité de l'enzyme. Cette diminution affecte vraisemblablement d'une manière différente les muscles en fonction de leurs préférences énergétiques. En effet, le muscle gastrocnémien, qui a un métabolisme mixte (mi-oxydatif, mi-glycolytique), présente une diminution relativement précoce de l'expression de SCD1, alors que dans le muscle tibialis, à préférence glycolytique, cette diminution n'apparaît qu'à un stade plus avancé de la pathologie. Ce changement, au demeurant cohérent avec leurs préférences énergétiques initiales, est en réalité fort intéressant si on prend en compte la différence temporelle d'atteinte pathologique entre ces différents muscles. En effet, le muscle tibialis semble affecté plus précocement dans la pathologie que le muscle gastrocnémien (Hegedus et al. 2008). De plus, il est à noter que les muscles des souris SOD1m présentent un changement (switch) de type de fibres musculaires, avec une préférence passant majoritairement de fibres glycolytiques vers l'oxydatif (Sharp et al. 2005).

Il est intéressant de constater que la baisse de la SCD1 apparaît avant les premiers signes de dénervation. Suite à cette observation, après avoir provoqué une lésion du nerf sciatique, nous avons testé l'expression musculaire de la SCD1. Nous avons ainsi comparé les effets d'une perte d'innervation par axotomie du nerf sciatique, donc sans récupération fonctionnelle possible dans nos conditions expérimentales, aux conséquences au niveau musculaire d'un écrasement du nerf sciatique (crush), à la suite duquel une récupération est engagée. Nous avons constaté qu'une lésion irréversible du nerf sciatique (axotomie) entraîne une augmentation d'expression de la SCD1, au niveau musculaire, après la lésion. En revanche la réponse à l'écrasement entraîne une baisse d'expression de la SCD1 après la lésion. Afin de déterminer si une baisse d'expression de la SCD1 permettait une meilleure récupération fonctionnelle, nous avons analysé en parallèle l'axe moteur de souris *scd1*^{-/-} et de souris traitées avec un inhibiteur de l'activité SCD1, en condition basale après une lésion.

Pour la seconde étape de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'axe moteur des souris *scd1*^{-/-}. L'analyse globale n'a révélé aucune activité électrique spontanée anormale, caractéristique d'un défaut d'innervation musculaire. Au niveau musculaire, nous avons constaté une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif et dans le changement de préférence énergétique musculaire. Ce dernier résultat est cohérent avec l'observation histologique réalisée parallèlement, qui met en lumière la plus forte capacité des muscles des souris *scd1*^{-/-} à développer un métabolisme oxydatif. Enfin, dans le but de vérifier si une baisse d'activité de la SCD1 apportait un effet bénéfique sur la récupération fonctionnelle après lésion du nerf sciatique, nous avons engagé cette opération sur des souris *scd1*^{-/-} et des souris sauvages traitées avec un agent pharmacologique inhibant son activité enzymatique. Suite à cet écrasement du nerf sciatique, nous avons constaté que les souris *scd1*^{-/-} et les souris traitées avec l'inhibiteur présentaient une récupération fonctionnelle, mesurée par EMG et *grip test*, supérieure à celle que l'on trouve chez leurs homologues sauvages ou non traités.

Les détails expérimentaux et les résultats de cette étude ont été publiés dans l'article ci-après.

Article 2

Systemic down-regulation of delta-9 desaturase promotes muscle oxidative metabolism and accelerates muscle function recovery following nerve injury

Florent SCHMITT, Ghulam HUSSAIN, Alexandre HENRIQUES, Thiebault LEQUEU, Frederique RENE, Françoise BINDLER, Sylvie DIRRIG-GROSCH, Hugues OUDART, Lavinia PALAMIUC, Marie-Helene METZ-BOUTIGUE, Luc DUPUIS, Eric MARCHIONI, Jose-Luis GONZALEZ DE AGUILAR, Jean-Philippe LOEFFLER

PLoS One. 2013; 8(6): e64525

Online 2013 June 13.

Systemic Down-Regulation of Delta-9 Desaturase Promotes Muscle Oxidative Metabolism and Accelerates Muscle Function Recovery following Nerve Injury

Ghulam Hussain^{1,2,3}, Florent Schmitt^{1,2,3}, Alexandre Henriques^{1,2}, Thiebault Lequeu^{1,2}, Frederique Rene^{1,2}, Françoise Bindler³, Sylvie Dirrig-Grosch^{1,2}, Hugues Oudart⁴, Lavinia Palamiuc^{1,2}, Marie-Helene Metz-Boutigue⁵, Luc Dupuis^{1,2}, Eric Marchioni³, Jose-Luis Gonzalez De Aguilar^{1,2,*}†, Jean-Philippe Loeffler^{1,2,*}†

1 INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Strasbourg, France, **2** Université de Strasbourg, UMRS1118, Strasbourg, France, **3** CNRS, UMR7178, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives, Illkirch, France, **4** CNRS, UPR9010, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Département d'Ecologie, Physiologie et Ethologie, Strasbourg, France, **5** INSERM, U977, Laboratoire des Biomatériaux et Ingénierie Tissulaire, Strasbourg, France

Abstract

The progressive deterioration of the neuromuscular axis is typically observed in degenerative conditions of the lower motor neurons, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Neurodegeneration in this disease is associated with systemic metabolic perturbations, including hypermetabolism and dyslipidemia. Our previous gene profiling studies on ALS muscle revealed down-regulation of delta-9 desaturase, or SCD1, which is the rate-limiting enzyme in the synthesis of monounsaturated fatty acids. Interestingly, knocking out SCD1 gene is known to induce hypermetabolism and stimulate fatty acid beta-oxidation. Here we investigated whether SCD1 deficiency can affect muscle function and its restoration in response to injury. The genetic ablation of SCD1 was not detrimental *per se* to muscle function. On the contrary, muscles in SCD1 knockout mice shifted toward a more oxidative metabolism, and enhanced the expression of synaptic genes. Repressing SCD1 expression or reducing SCD-dependent enzymatic activity accelerated the recovery of muscle function after inducing sciatic nerve crush. Overall, these findings provide evidence for a new role of SCD1 in modulating the restorative potential of skeletal muscles.

Citation: Hussain G, Schmitt F, Henriques A, Lequeu T, Rene F, et al. (2013) Systemic Down-Regulation of Delta-9 Desaturase Promotes Muscle Oxidative Metabolism and Accelerates Muscle Function Recovery following Nerve Injury. *PLoS ONE* 8(6): e64525. doi:10.1371/journal.pone.0064525

Editor: Antonio Musaro, University of Rome La Sapienza, Italy

Received: January 28, 2013; **Accepted:** April 16, 2013; **Published:** June 13, 2013

Copyright: © 2013 Hussain et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by funds from European Community's Health Seventh Framework Programme under grant agreement no. 259867 (FP7/2007-2013) and Thierry Latran Foundation to JPL; "Appel à Projets 2009 du Conseil Scientifique" (University of Strasbourg) to JLGDA; and "Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres Maladies du Motoneurone" to JLGDA and FR. GH is supported by the Higher Education Commission of the Pakistani government and "Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives" (AREMANE). FS is granted by "Association Française contre les Myopathies" and AREMANE. AH is a research fellow receiving funds from FP7/2007-2013. JLGDA is recipient of a "Chaire d'Excellence INSERM/Université de Strasbourg". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: gonzalez@unistra.fr (JLGDA); loeffler@unistra.fr (JPL)

† These authors contributed equally to this work.

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

Introduction

In mammals, the contraction of voluntary skeletal muscles is under the control of motor neurons whose cell bodies are located in the spinal cord and the brainstem. These so-called lower motor neurons directly communicate with muscle fibers through the neurotransmitter acetylcholine at the neuromuscular junctions. The progressive functional deterioration of this neuromuscular axis is typically found in neurodegenerative conditions such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS). This disease, which is the most frequent adult-onset form of motor neuron disease, is characterised by motor neuron death, skeletal muscle atrophy and paralysis [1]. Studies conducted on genetic animal models of ALS showed that the process leading to motor neuron degeneration is

not cell-autonomous but involves defects in other cell types than neurons [2–5]. Consistent with this notion, ALS neurodegeneration is also associated with systemic defects, including hypermetabolism and dyslipidemia, which are observed in both patients and animal models [6–8]. Particularly, transgenic mice overexpressing a mutated form of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), linked to familial ALS, are in energy deficit and have decreased adipose tissue stores. These deficiencies appear to be elicited by increased energy expenditure (that is to say, hypermetabolism), and due to an increased consumption of nutrients by skeletal muscles [9,10].

To gain insight into the relationships between neurodegeneration and metabolic dysfunction, we recently analyzed the gene expression profiles of skeletal muscles from mutant SOD1 mice

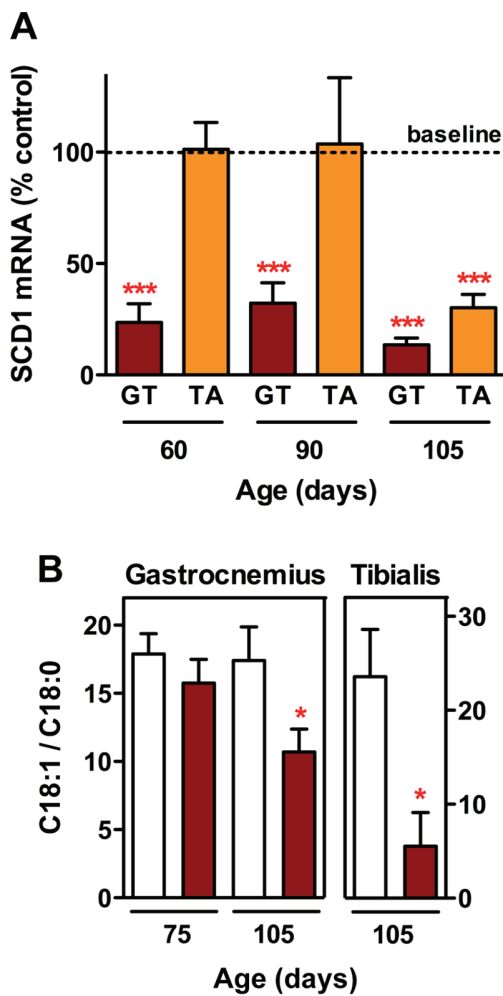


Figure 1. SCD1 expression and activity in ALS mouse muscle. (A) Time course of SCD1 expression in gastrocnemius (GT, brown columns) and tibialis anterior (TA, orange columns) from SOD1(G86R) mice at indicated ages. Wild-type expression is represented by 100% baseline. *** $P < 0.001$ (One sample t-test, $n = 5-11$). (B) C18:1/C18:0 fatty acid ratio in gastrocnemius and tibialis anterior from SOD1(G86R) mice (brown columns) and wild-type littermates (white columns) at indicated ages. * $P < 0.05$ (1-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test for gastrocnemius, and unpaired t-test for tibialis anterior, $n = 3-10$). doi:10.1371/journal.pone.0064525.g001

and patients with sporadic ALS [11,12]. We found a decrease in the expression of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1), an enzyme that introduces the first *cis* double bond in the delta-9 position of saturated fatty acyl-CoA substrates. The preferred substrates are palmitoyl-CoA (C16:0) and stearoyl-CoA (C18:0), which are converted to palmitoleoyl-CoA (C16:1) and oleoyl-CoA (C18:1), respectively [13]. These monounsaturated fatty acids are the major constituents of complex lipids such as diacylglycerols, phospholipids, triglycerides, wax esters and cholesterol esters. Interestingly, the targeted disruption of the mouse SCD1 gene triggers an increase in the expression of genes involved in the β -oxidation of fatty acids and a decrease in the expression of genes involved in lipogenesis [14]. Therefore, these SCD1 knockout mice exhibit augmented energy expenditure and reduced body adiposity [14], a situation that is reminiscent of the metabolic phenotype of mutant SOD1 mice [9]. Despite sharing common

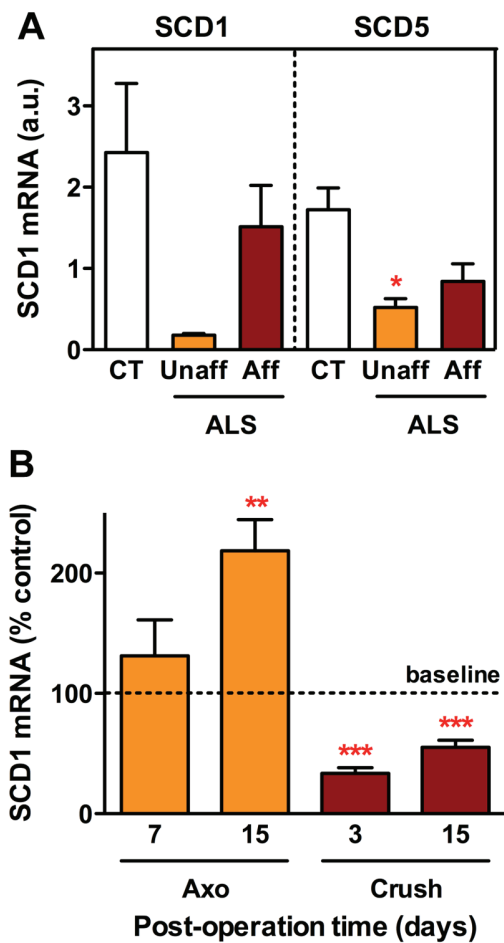


Figure 2. SCD1 expression in ALS patient muscle and after nerve injury. (A) Expression of SCD1 and SCD5 in deltoid muscle biopsies from ALS patients and healthy subjects (CT, white columns), as identified by microarray analysis of the database deposited at <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> (accession number E-MEXP-3260) [12]. ALS samples were obtained from muscle not clinically or electromyography affected (Unaff, orange columns) and from muscle with advanced pathology, characterized by reduced strength and neurogenic electromyography pattern (Aff, brown columns). * $P < 0.05$ (1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $n = 4-10$). (B) Expression of SCD1 in gastrocnemius following sciatic nerve axotomy (Axo) or crush at indicated post-operation days. Contralateral muscle expression is represented by 100% baseline. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (One sample t-test, $n = 4-10$). doi:10.1371/journal.pone.0064525.g002

features at the metabolic level, it is not known whether a decrease in SCD1 expression could be implicated by any means in the maintenance of muscle function and, perhaps, in motor neuron degeneration. In this work, first we characterized the expression of SCD1 in muscles from mutant SOD1 mice as well as in experimentally denervated muscles. Second, we studied the muscle phenotype of mice deficient in SCD1. Third, we analyzed the impact of the absence of SCD1, as obtained by both genetic and pharmacological means, on the recovery of muscle function in response to transient nerve lesion. We conclude that the systemic down-regulation of SCD1 promotes muscle oxidative metabolism and accelerates muscle function recovery after nerve injury, thus providing evidence for a new role of this enzyme in modulating the restorative potential of skeletal muscles. These findings therefore

may be relevant to pathological conditions affecting the lower motor neurons.

Materials and Methods

Animals

FVB/N males overexpressing the murine G86R SOD1 mutation [15], and C57BL/6 males knockout for the SCD1 gene (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were maintained in our animal facility at 23°C with a 12 hours light/dark cycle. They had water and regular A04 rodent chow *ad libitum*. SOD1(G86R) mice were 60-, 75-, 90- and 105 days of age. SCD1 knockout mice were 4–6 months old. The corresponding non-transgenic male littermates served as controls. To induce peripheral nerve injury, mice were anesthetized with 100 mg/kg body mass ketamine chlorhydrate and 5 mg/kg body mass xylazine. The sciatic nerve was exposed at the midthigh level, and crushed with a fine forceps for 30 s or sectioned 3 mm long with microscissors. Skin incision was sutured, and mice were allowed to recover. Hind limbs contralateral to the lesion served as controls [16]. To induce SCD deficiency pharmacologically, 4–6 months old mice were fed with A04 chow *ad libitum* containing 3-(5-methyl-[1,3,4]thiadiazol-2-yl)-6-[4-(2-trifluoromethyl-phenoxy)-piperidin-1-yl]-pyridazine, or MF-438 (Prestwick Chemical, Illkirch, France), which is an orally bioavailable inhibitor of SCD enzymatic activity [17]. The drug regimen was prepared to contain 0.00625% (w/w) MF-438 (Safe, Augy, France), which provided a daily dose of 10 mg/kg body mass, as calculated on a basis of 4 g of food intake per day and 25 g of averaged body mass.

Ethics statement

Experiments followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU), and were performed by authorized investigators (license from *Préfecture du Bas-Rhin* No. A67-402 to AH, and No. A67-118 to FR), after approval by the ethics committee of the University of Strasbourg (license from CRE-MEAS No. AL/01/20/09/12, and No. AL/15/44/12/12).

Quantitative RT-PCR

Total RNA was prepared following standard protocols. Briefly, each frozen sample was placed into a tube containing a 5-mm stainless steel bead. Working on ice, 1 mL Trizol reagent (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) was added, and homogenisation was performed in a TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) at 30 Hz for 3 min twice. RNA was extracted with chloroform/isopropyl alcohol/ethanol and stored at –80°C until use. One µg of total RNA was used to synthesize cDNA using Iscript reverse transcriptase (BioRad Laboratories, Marnes La Coquette, France) and oligo-dT primer as specified by the manufacturer. Gene expression was measured using the SYBR green reagent (2× SYBR Green Supermix; Bio-Rad Laboratories) following the manufacturer's instructions on a Bio-Rad iCycler. PCR was performed in optimized conditions: 95°C denatured for 3 min, followed by 40 cycles of 10 s at 95°C and 30 s at 60°C. Primers (Eurogentec, Seraing, Belgium) were as follows: acetylcholine receptor α -subunit (AChR- α), forward 5'-ccacagactcagg-gagaag-3', reverse 5'-aacggtgtgtgtgttgatg-3'; acetylcholine receptor γ -subunit (AChR- γ), forward 5'-gagagccactcgaagacac-3', reverse 5'-gaccacacatctcctcga-3'; acetylcholine receptor ϵ -subunit (AChR- ϵ), forward 5'-caatgccaatccagacactg-3', reverse 5'-ccctgttctctgactac-3'; muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK), forward 5'-tcagcgggactgagaaac-3', reverse 5'-tgttccacgctcagaatg-3'; peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), forward 5'-caccgatggaaggctgaa-3', reverse 5'-

gctccgatcacactgtcg-3'; peroxisome proliferator-activated receptor γ , coactivator 1- α (PGC1- α), forward 5'-tgctgtgtctgtttc-3', reverse 5'-ccctgcccattgtaagacc-3'; pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4 (PDK4), forward 5'-cgcttagtaacactcctcg-3', reverse 5'-cttctgggctcttctcatgg-3'; ribosomal RNA 18S (18S), forward 5'-cgtctgccctatcaacttgc-3', reverse 5'-ttccttgatgtgtagccg-3'; SCD1, forward 5'-cctacgacaagaacatcaatcc-3', reverse 5'-cgtctcaagttctct-taatct-3'. Relative quantification was achieved by calculating the ratio between the cycle number (Ct) at which the signal crossed a threshold set within the logarithmic phase of the gene of interest and that of the 18S reference gene. Ct values were the means of duplicates.

Gas chromatography

Muscle samples were weighed, and disrupted with TissueLyser twice at 30 Hz for 3 min each using stainless steel beads and racks precooled at –80°C. After removing the beads, 1 mL ice-cold Ripa buffer was added per 100 mg of disrupted tissue, and samples were centrifuged at 2000 g for 10 min at 4°C. Two mg of proteins, according to the bicinchoninic acid assay in the supernatants, was mixed with 2.5 mL chloroform/methanol (1:1). After vortex and sonication, samples were incubated for at least 2–3 hours at 4°C, and centrifuged at 2000 g for 10 min at 4°C. Supernatants were collected into glass tubes with a Pasteur pipette, and dried under nitrogen. Afterwards, the non-polar lipid fraction was obtained by separation on Sephadex columns. In the case of blood samples, they were collected on heparinized tubes by heart puncture from anesthetized mice, placed on ice, and centrifuged at 4000 rpm for 4 min at 4°C. Total lipids were extracted from plasma following a modified version of the Bligh and Dyer method [18]. Briefly, methanol/chloroform solution was added to plasma. Centrifugations were performed after addition of chloroform and KCl. Lower phases were collected and mixed with methanol. After a second centrifugation, the lower phase containing the lipids was collected on glass tubes. Extracted lipids from muscle and plasma were transmethylated by adding a mix of methanol and KOH. After collecting the samples in heptane, the so-generated fatty acid methyl esters were submitted to gas chromatography by using a Varian 3400 CX chromatograph fitted with a WCOT fused silica capillary column of 100 m×0.25 mm×0.20 µm (coated with polar highly substituted cyanopropyl CP-SIL 88 phase). The injection volume was 1 µL, and the split ratio was set at 1:1. The temperature gradient in the oven ranged from 80 to 220°C at a rate of 4°C/min, and helium was the gas carrier. The temperature of the flame ionization detector was set at 270°C. Peaks were identified by retention time and compared to a standard mix of fatty acid methyl esters (Supelco 37 and Supelco PUFA-2 Animal Source; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Data were expressed as relative percentages.

Muscle grip strength

Muscle strength was determined using the grip test (Bioseb, Chaville, France). Animals were placed over a metallic grid that they instinctively grab to try to stop the involuntary backward movement carried out by the manipulator until the pulling force overcomes their grip strength. After the animal loses its grip, the strength-meter scores the peak pull force. Strength was measured independently in hind limbs ipsi- and contralateral to the nerve lesion, and the mean of 3 assays was scored for each animal. Peak force was normalized to body mass.

Muscle histochemistry

The standard histochemical assay for succinate dehydrogenase (SDH) was used to distinguish between oxidative and non-

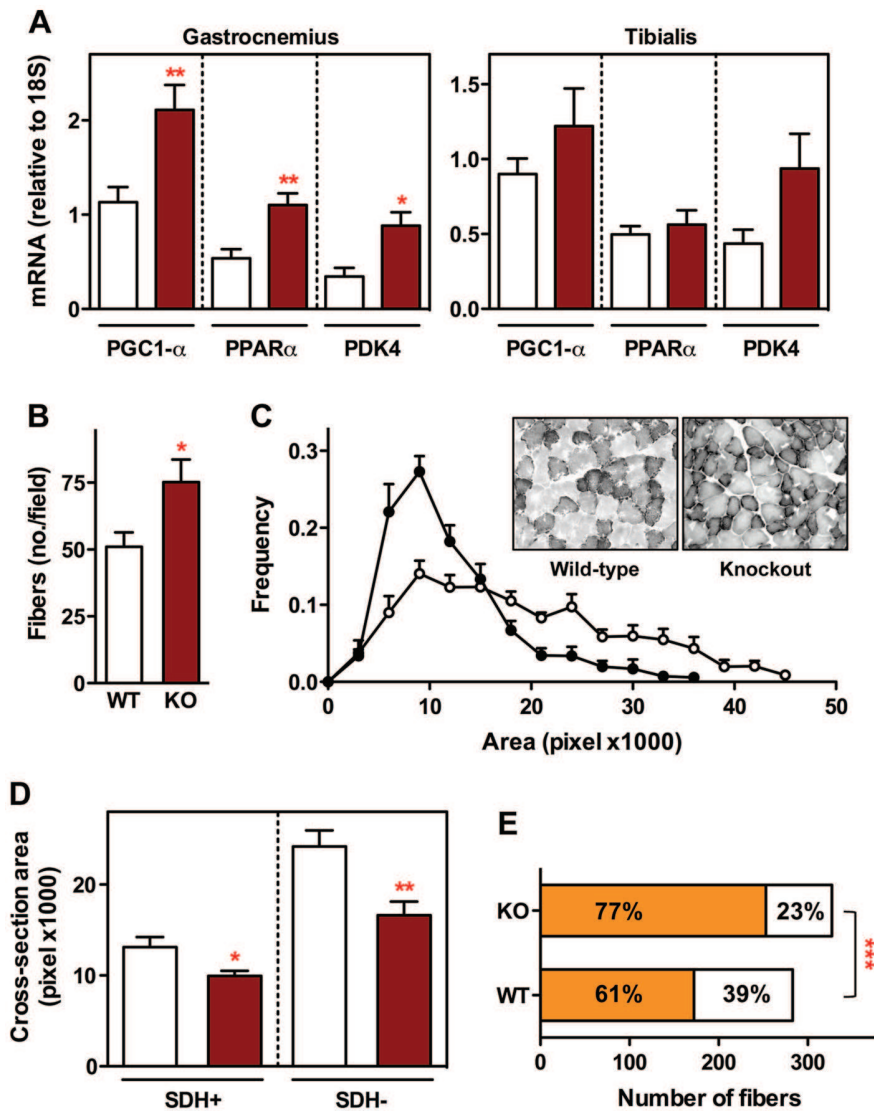


Figure 3. Metabolic phenotype of muscle from SCD1 knockout mice. (A) Expression of PGC1- α , PPAR α and PDK4 in gastrocnemius and tibialis anterior from SCD1 knockout mice (brown columns) and wild-type littermates (white columns). * P <0.05, ** P <0.01 (Unpaired t-test, n = 3–11). (B) Number of muscle fibers in tibialis anterior from SCD1 knockout mice (KO, brown column) and wild-type littermates (WT, white column). * P <0.05 (Unpaired t-test, n = 7–10). (C) Distribution of the calibers of muscle fibers in tibialis anterior from SCD1 knockout mice (327 fibers, black circles) and wild-type littermates (283 fibers, white circles). Representative microphotographs of wild-type and knockout tibialis anterior are shown. (D) Averaged cross-sectional area of SDH-positive and SDH-negative fibers in tibialis anterior from SCD1 knockout mice (brown columns) and wild-type littermates (white columns). * P <0.05, ** P <0.01 (Unpaired t-test, n = 7–10). (E) Number of SDH-positive (orange bars) and SDH-negative fibers (white bars) in tibialis anterior from SCD1 knockout mice (KO) and wild-type littermates (WT). *** P <0.001 (Chi-square test, n = 283–327). doi:10.1371/journal.pone.0064525.g003

oxidative muscle fibers. Fourteen- μ m serial sections were obtained by cutting isopentane fresh-frozen tibialis anterior muscles perpendicular to the muscle axis on a cryostat at -20°C (Leica, Nanterre, France). Sections were fixed with acetone for 15 min, air-dried and incubated for 30 min at 37°C in a solution containing 10 g/L sodium succinate, 2 g/L nitro blue tetrazolium and 0.025 g/L phenazine methosulfate. After washing, sections were mounted with aqueous mounting medium (Dako, Trappes, France). Microphotographs were obtained at a magnification of $\times 200$ (Nikon, Champigny sur Marne, France) on five non-adjacent sections per animal. Counts were performed using National Institutes of Health IMAGE version 1.62 software.

Indirect calorimetry

O_2 consumption and CO_2 production were measured using an open-circuit indirect calorimetry system (Klogor, Lannion, France), as previously described [9]. Concentrations of O_2 and CO_2 in the outgoing air were successively measured in five different cages. The system was rinsed for 90 s between each measurement. Final values of gas concentrations were the mean of 10 measures obtained during 40 s. Each cage was sampled every 11 min, and one cage was left vacant as reference of ambient gas concentrations. Measurements were performed continuously over 23 hours and a half, a 30-min period being required for calibration of the O_2 and CO_2 analyzers. In total, 127 measures

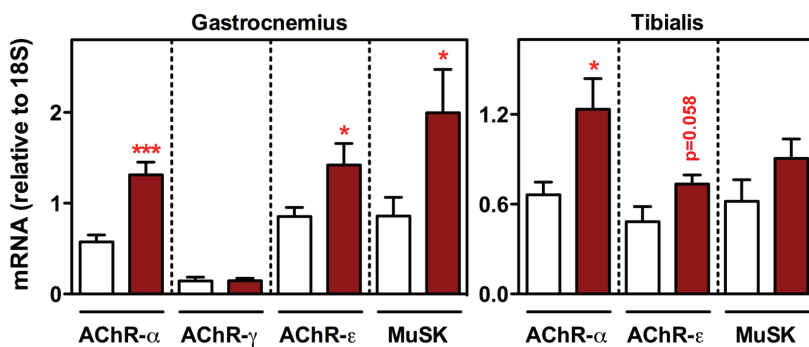


Figure 4. Gene expression specific to the motor end plate in SCD1 knockout mice. Expression of AChR- α , AChR- γ , AChR- ϵ and MuSK in gastrocnemius and tibialis anterior from SCD1 knockout mice (brown columns) and wild-type littermates (white columns). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Unpaired t-test, $n = 4-11$). doi:10.1371/journal.pone.0064525.g004

were collected per day and mouse. The respiratory quotient was the ratio of CO₂ production over O₂ consumption.

Electromyography

Recordings were obtained with a standard electromyography apparatus (Dantec, Les Ulis, France), in accordance with the guidelines of the American Association of Electrodiagnostic Medicine. Mice were anesthetized as indicated above and kept under a heating lamp to maintain a physiological muscle temperature (at about 31°C). A concentric needle electrode (no. 9013S0011, diameter 0.3 mm; Medtronic, Minneapolis, MN) was inserted in the gastrocnemius, and a monopolar needle electrode (no. 9013R0312, diameter 0.3 mm; Medtronic) was inserted into the tail of the mouse to ground the system. Each muscle was monitored in four different regions, and the degree of denervation was scored as the number of regions with spontaneous activity expressed in percentage. Spontaneous activity was differentiated from voluntary activity by visual and auditory inspection. Only spontaneous activity with a peak-to-peak amplitude of at least 50 μ V was considered to be significant.

Statistical analysis

Unless otherwise indicated, data are expressed as the mean \pm SEM. PRISM version 5.0a software (GraphPad, San Diego, CA) was used for statistical analysis. Tests are indicated in the legends under the figures. Differences with P -values of at least less than 0.05 were considered significant.

Results

SCD1 expression is altered in ALS muscle

On the basis of our previous microarray data, obtained from a transgenic mouse model of mutant SOD1-linked familial ALS [11], in this study we investigated the significance of the down-regulation of SCD1 for the metabolic capacity of muscles and their response to injury. The expression of SCD1 in the gastrocnemius of SOD1(G86R) mice, which are affected by a progressive denervation atrophy [19], was already diminished at 60 days of age. In this respect, it is noteworthy to mention that our previous electromyography studies on this mouse line revealed that the amplitudes of the compound muscle action potentials, a reduction of which typically reflects a decrease in the number of functional motor units, were normal at the age of 75 days. In addition, mice did not present at this age any abnormal spontaneous electrical activity, which would have reflected the common response of

muscle to loss of innervation [16]. According to these findings, we can conclude that SCD1 down-regulation occurred precociously in our SOD1(G86R) mouse model. We then showed here that the decrease in SCD1 expression also persisted during the course of the disease, at 90 days of age, when muscle denervation becomes detectable and motor deficits usually arise, and at about 105 days of age, when hind legs start to be paralysed. At that moment, the decrease in SCD1 expression was also noticeable in the tibialis anterior, which is another muscle in the mouse hind leg displaying less oxidative metabolism than the gastrocnemius (Figure 1A). As a consequence of the repression of muscle SCD1 expression, we observed that the C18:1/C18:0 fatty acid ratio, an index of the desaturation activity of the enzyme [20], was slightly reduced in presymptomatic muscle extracts but significantly diminished at the end stage in both gastrocnemius and tibialis anterior (Figure 1B). It is noteworthy to mention that our previous studies had shown that SOD1(G86R) mice typically exhibit decreased postprandial lipidemia and increased peripheral clearance of lipids, both of which can be ascribed to muscle hypermetabolism [10]. Therefore, an excess of uptake of exogenous lipids in this tissue could mask otherwise earlier and more robust differences in the index of SCD activity.

To obtain independent evidence that SCD1 down-regulation is a typical feature of ALS, we took advantage of our transcriptome database composed of deltoid biopsies from patients with the sporadic form of the disease [12]. The expression of not only SCD1 but also SCD5, a primate-specific enzyme variant with identical function [21], was lower in ALS patients, as compared to normal control subjects. Furthermore, the repression of SCD1 expression was much more remarkable in a muscle not clinically or electromyography affected than in a muscle at an advanced stage of pathology, characterized at the clinical level by reduced strength and neurogenic electromyography pattern (Figure 2A). That SCD1 down-regulation could be observed both in presymptomatic SOD1(G86R) mouse muscle and in relatively healthy human ALS muscle prompted us to speculate that such a pattern of expression might not be solely related to the loss of muscle innervation characteristic of the disease. To address this question, we compared SCD1 expression in gastrocnemius submitted to acute denervation, as obtained by cutting and removing several millimeters of the sciatic nerve, or transient denervation followed by re-innervation, as obtained by crushing the sciatic nerve for several seconds. Under these conditions, the expression of SCD1 was increased after axotomy but significantly reduced after crush (Figure 2B). Overall, these findings provide evidence for the implication of SCD1 in the pathological process triggering ALS,

and suggest that SCD1 down-regulation could be involved in the restoration of muscle function in response to injury.

SCD1 knockout mice do not manifest motor impairment but display exacerbated muscle metabolic oxidative capacity

To gain insight into the way in which the lack of SCD1 expression impacts on muscle function, we investigated several characteristics of muscles in these SCD1 knockout mice reflecting their metabolic status, and also evaluated their motor behavior. At the molecular level, we measured the expression of PGC1- α , PPAR α and PDK4, of which an increase is involved in stimulating mitochondrial biogenesis and in switching the energy source from glucose to fatty acids [22]. The expression of these genes was significantly higher in the gastrocnemius of SCD1 knockout mice, as compared to wild-type littermates; in the tibialis anterior, there was also a trend toward an increased expression (Figure 3A). Despite this latter attenuated response, the tibialis anterior represents, better than the gastrocnemius, a typical example of glycolytic muscle in which to evaluate changes in the relative density of the various fiber types. We therefore used this muscle to determine potential morphological and biochemical changes triggered by the absence of SCD1. The number of fibers per muscle section was higher in SCD1 knockout mice than in wild-type mice (Figure 3B). Accordingly, the distribution of fiber calibers showed an increase in the amount of fibers of small caliber in SCD1 knockout mice (Figure 3C). We extended these findings by performing SDH histochemistry, and found that the average cross-sectional area of both SDH-positive and SDH-negative fibers was smaller in SCD1 knockout mice than in wild-type mice (Figure 3D). These differences were associated in SCD1 knockout mice with a significant predominance of SDH-positive fibers, which are characterized by a higher metabolic oxidative capacity (Figure 3E).

Evaluation of muscle function using the grip strength test revealed no changes in the force developed by hind limbs between SCD1 knockout mice and their wild-type littermates (0.37 ± 0.024 N in SCD1 knockout mice *versus* 0.37 ± 0.021 N in wild-type mice, $n = 7$). Along with this, no abnormal spontaneous electrical activity, which would have reflected the typical response of muscle to loss of innervation, was found in the gastrocnemius of SCD1 knockout mice (data not shown). In contrast, we also measured the expression of a series of genes specific to the motor end plate, including the acetylcholine receptor subunits α , γ and ϵ (AChR- α , AChR- γ and AChR- ϵ , respectively), and muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK). Except for AChR- γ , of which an increase would have been considered a sign of muscle denervation [23], the expression of these genes was significantly increased in the gastrocnemius of SCD1 knockout mice as compared to their wild-type littermates, although the changes were less pronounced in the tibialis anterior (Figure 4). In all, these results indicate that the genetic ablation of SCD1 is not detrimental *per se* to muscle function but promotes a metabolic shift toward a more oxidative capacity, and stimulates the neuromuscular junction gene expression program.

SCD deficiency accelerates muscle function recovery after nerve injury

As shown above, the lack of SCD1 expression does not represent a handicap for muscle function. Therefore, its down-regulation, as observed in ALS or after nerve crush, prompts us to hypothesize that the enzyme may participate in the restorative efforts that muscles experience at the early stages of disease, when

neuromuscular deterioration is not generalized yet, or during the process of recovery following a brief disruption of the neuromuscular communication. To address this question, we took advantage of such a model of transient denervation and re-innervation as a means to evaluate, by performing relatively manageable short-term experiments [3], the importance of SCD1 for the restoration of muscle function in response to nerve damage. We performed these experiments using not only SCD1 knockout mice but also mice deficient in SCD enzymatic activity, as obtained by feeding them with MF-438, which is an orally bioavailable pharmacological agent inhibiting SCD-dependent desaturation of fatty acids [17]. To verify if our treatment was biologically active *in vivo*, we measured several parameters that should reflect the deficiency in SCD enzymatic activity. First, MF-438 significantly reduced both C16:1/C16:0 and C18:1/C18:0 fatty acid ratios in circulating lipids (Figure 5A). Second, MF-438 also induced a decrease in the respiratory quotient as determined by indirect calorimetry, which indicated a switch of the energy source from glucose to fatty acids (Figure 5B). Finally, the drug triggered concomitantly a small but significant decrease in body mass of mice treated for two weeks (Figure 5C). SCD deficiency did not alter hind limb grip strength during the 2-week treatment, as determined either by a percentage of peak force at day 0 (Figure 5D) or by normalizing peak force to body mass (Figure 5E). Also, there were no detectable electromyography abnormalities suggestive of denervation (data not shown). Furthermore, MF-438 stimulated the expression of several genes specific to the motor end plate (Figure 5F). Overall, these findings strongly support that the effects of the SCD inhibitor are very similar to those observed in SCD1 knockout mice.

To monitor the recovery of muscle function after crushing the sciatic nerve, we measured hind limb grip strength during a post-lesion period of two weeks, and found that the force in SCD1 knockout mice was restored to its initial level more rapidly than in their wild-type littermates. Accordingly, the proportion of abnormal electromyography episodes reflecting neurogenic muscle denervation was lower in SCD1 knockout mice at 14 days post-lesion (Figure 6A). We also measured at that time the relative density of muscle fiber types as a witness to the restorative process. In the denervated tibialis anterior of wild-type mice, the proportion of fibers intensely stained by SDH histochemistry (presumably, slow-twitch type I fibers) was very low, and there was a significant predominance of medium-stained fibers (presumed fast-twitch fatigue-resistant type IIA fibers). In contrast, the distribution of fiber types in the denervated tibialis anterior of SCD1 knockout mice was identical to that observed in the muscle contralateral to the lesion (Figure 6B), suggesting the establishment of a normal non-stressed situation. To corroborate these findings, we followed muscle function recovery after crush in MF-438 treated mice, and also found accelerated, though not complete, restoration of grip strength, as well as reduced extent of electromyography abnormalities (Figure 6C). Furthermore, quantification of the percentage of mice that, after initial total paralysis, started to exhibit a grip strength distinct from zero showed that on average the recovery in treated mice took place three days sooner than in untreated mice (Figure 6D). In all, these results strongly suggest that reducing SCD enzymatic activity stimulates the restorative potential of skeletal muscles.

Discussion

SCD1 is an essential lipogenic enzyme thought to be implicated in the development of obesity and associated metabolic disorders [24]. In this study, we have shown that its expression is down-regulated in skeletal muscles suffering from slowly progressing

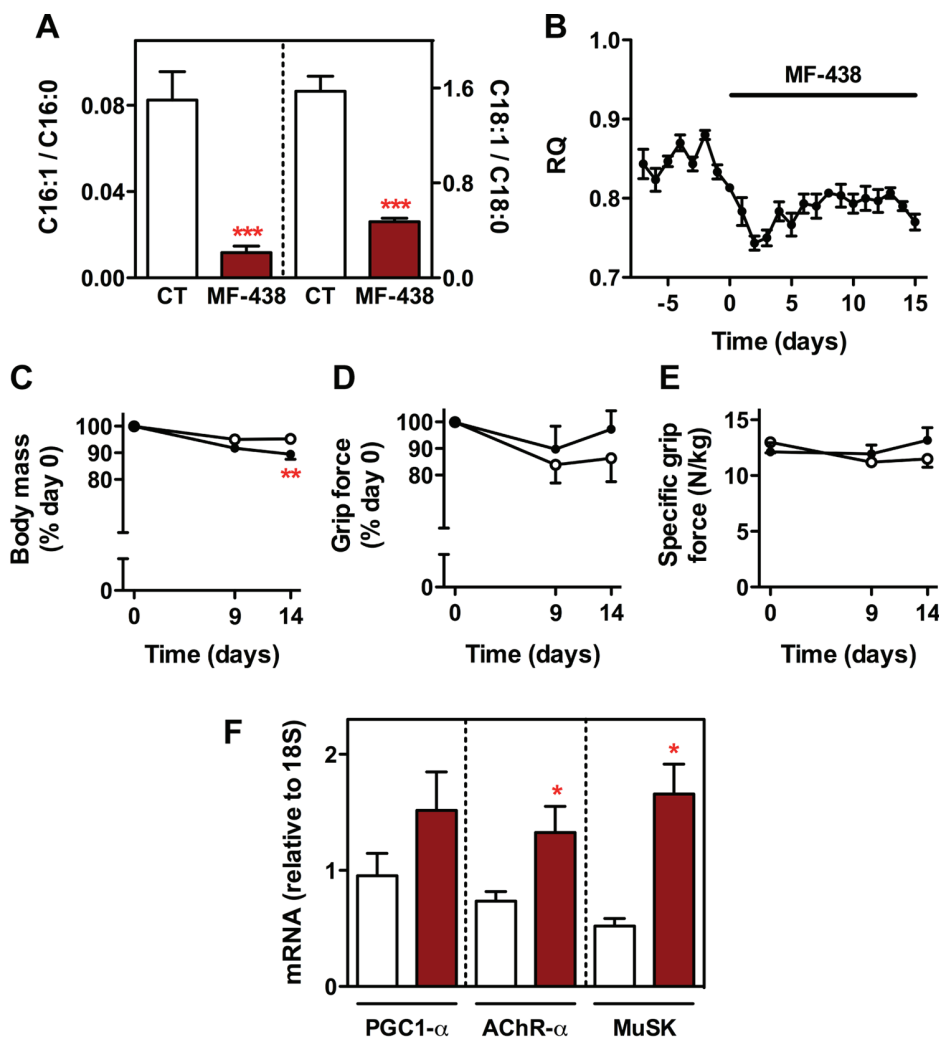


Figure 5. Effects of MF-438 on metabolism and muscle function. (A) C16:1/C16:0 and C18:1/C18:0 fatty acid ratio in plasma from MF-438 treated mice (brown columns) and control littermates (CT, white columns). *** $P < 0.001$ (Unpaired t-test, $n = 4-6$). (B) Time course of respiratory quotient (RQ) before and after treatment with MF-438 at a dose of 10 mg/kg body mass/day (indicated by the black bar) ($n = 4$). Time course of body mass (C), muscle grip strength expressed as a percentage of day 0 (D), and specific grip strength, as determined by normalizing peak force to body mass (E), in mice fed regular chow (white circles) and mice fed regular chow supplemented with MF-438 (black circles). ** $P < 0.01$ (2-way ANOVA followed by Bonferroni test, $n = 5-6$). (F) Expression of PGC1- α , AChR- α , and MuSK in gastrocnemius from MF-438 treated mice (brown columns) and control littermates (white columns). * $P < 0.05$ (Unpaired t-test, $n = 3-9$). doi:10.1371/journal.pone.0064525.g005

motor neuron degeneration, as seen in ALS, and from transitory denervation/re-innervation, as obtained experimentally by sciatic nerve crush. Based on these findings, we have also shown here that the systemic down-regulation of SCD1, as generated by both genetic and pharmacological means, enhances the oxidative metabolism of muscles, stimulates the expression of synaptic genes, and ameliorates the restoration of muscle function following transient denervation and subsequent re-innervation.

SCD1 knockout mice are mainly characterized by decreased adiposity and increased metabolic rate [14], two characteristics of the mutant SOD1 mouse model of ALS, even observed before the onset of any motor neuropathology [9]. The lack of SCD1 expression has been associated with inhibition of lipogenesis and stimulation of mitochondrial β -oxidation of fatty acids [25]. Notably, we had previously observed that the expression of genes involved in the uptake of fatty acids, such as FAT/CD36 and other related genes, was presymptomatically increased in skeletal

muscle of SOD1(G86R) mice [10]. In addition, it is known that the muscle-specific overexpression of FAT/CD36 is sufficient to trigger fatty acid oxidation [26]. It seems therefore not very surprising that, in accordance with an enhanced uptake of fatty acids, the muscles of SOD1(G86R) mice exhibit concomitantly a decrease in the expression of SCD1. The situation appears to be less straight-forward in the case of ALS patients. Although most of them are markedly hypermetabolic [6], as in the animal model, they usually present with increased levels of circulating lipids [7], which would not intuitively substantiate the hypothesis of the muscle down-regulation of SCD1. It is noteworthy, however, that the expression of SCD1 in patients was much more repressed in muscles not clinically or electromyography affected, which lets envisage that SCD1 down-regulation might occur as a result of whatever mechanism preceding overt disease. The fact that SCD1 down-regulation was observed early in presymptomatic SOD1(G86R) mouse gastrocnemius and in relatively healthy

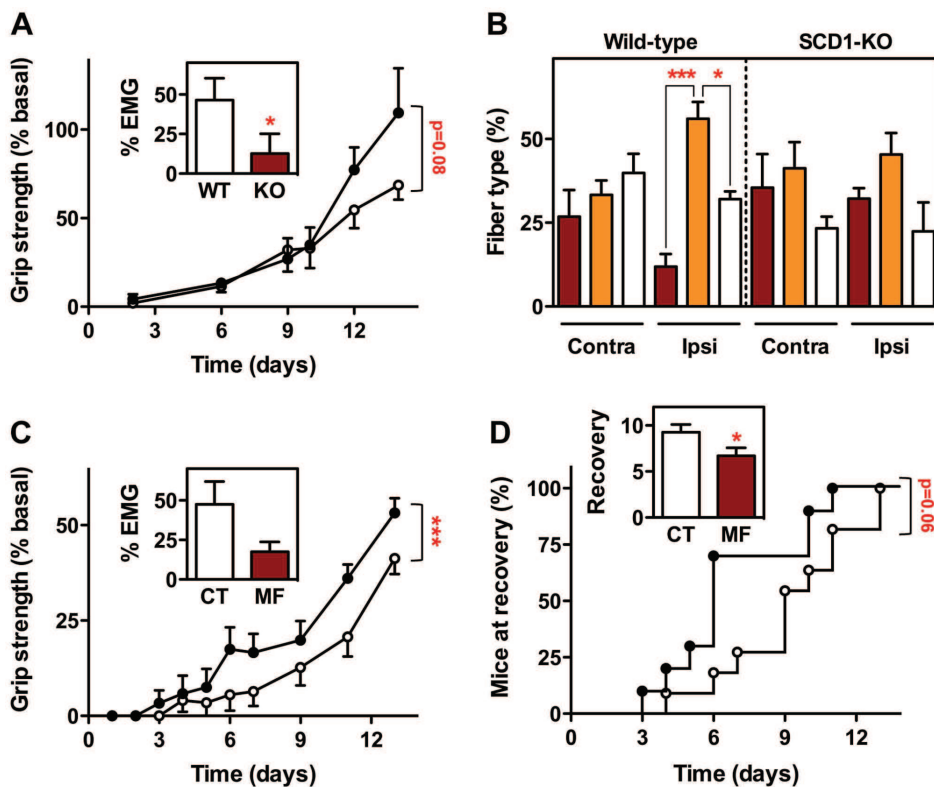


Figure 6. Muscle function recovery in SCD-deficient mice submitted to nerve crush. Restoration of muscle grip strength in SCD1 knockout mice (A) or MF-438 treated mice (C) (black circles) and corresponding control littermates (white circles) at the indicated post-operation times. $***P < 0.001$ (2-way ANOVA, $n = 4-12$). Percentage of electromyography episodes of spontaneous activity in SCD1 knockout mice (Inset A) or MF-438 treated mice (Inset C) (KO or MF, brown columns) and corresponding control littermates (WT or CT, white columns) two weeks after sciatic nerve crush. $*P < 0.05$ (Unpaired t-test, $n = 4-7$). (B) Relative density of muscle fiber types in ipsilateral and contralateral tibialis anterior from SCD1 knockout mice and wild-type littermates two weeks after sciatic nerve crush. According to SDH histochemistry, fibers were classified as dark brown colored fibers with high metabolic oxidative capacity (brown columns), pale brown colored fibers with medium oxidative capacity (orange columns) and non-stained fibers (white columns). $*P < 0.05$ and $***P < 0.001$ (1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $n = 4-6$). (D) Kaplan-Meier curves showing the percentage of MF-438 treated mice (black circles) and control littermates (white circles) that started to exhibit a grip strength distinct from zero after initial total paralysis. Logrank test ($n = 10-11$). Inset D, averaged time at start of recovery in MF-438 treated mice (MF, brown column) and control littermates (CT, white column). $*P < 0.05$ (Unpaired t-test, $n = 10-11$). doi:10.1371/journal.pone.0064525.g006

human ALS deltoid suggests that the transcriptional regulation of SCD1 might not be (solely) related to the loss of innervation of muscles characteristic of these conditions. In support of this notion, such a down-regulation of SCD1 expression was not found after severe denervation, at least at a time when re-innervation was not present according to our protocol of axotomy. In contrast, a more subtle denervation, as that obtained by crushing the sciatic nerve for only several seconds, simulated the inhibitory effect of ALS on SCD1 expression. Because sciatic nerve crush allows the rapid recovery (in around two weeks) of muscle function, we speculate that SCD1 down-regulation may be somehow related to the restorative potential of skeletal muscles.

As a first step toward the understanding of the importance of SCD1 for muscle function, we found that the genetic ablation of SCD1 promoted a decrease in the cross-sectional area of muscle fibers, and an increase in the amount of those enriched in the mitochondrial enzyme SDH. In parallel, we also observed increased expression of PGC1- α , PPAR α and PDK4. Overall, these observations provide persuasive evidence for a higher metabolic oxidative capacity, in accordance with several previous studies. For instance, overexpressing PGC1- α has been reported to trigger a decrease in the size of muscle fibers and a concomitant

fast to slow fiber type shift [27]. In contrast, knocking out PGC1- α specifically in muscle has been shown to induce a shift from oxidative to glycolytic muscle fibers [28]. Moreover, PGC1- α not only triggers metabolic changes in muscle but also activates the expression of genes specific to the motor end plate [29]. Therefore, the increased expression of the signaling kinase MuSK and several acetylcholine receptor subunits that we observed in our SCD1 knockout mice could be the consequence of a higher transcriptional activity involving, at least in part, PGC1- α . Despite these modifications, the lack of SCD1 did not cause any alteration of muscle function as determined by behavioral and electrophysiological means. Furthermore, inhibiting global SCD enzymatic activity with a diet containing MF-438 induced very similar changes as those found in SCD1 knockout mice.

Subsequent efforts were concentrated in determining if SCD1 down-regulation might affect muscle function when challenged by sciatic nerve crush. Both SCD1 knockout mice and MF-438 treated mice recovered their force more rapidly than their corresponding control groups. Two weeks after lesion, the degree of denervation was more important in these control groups than in SCD-deficient mice. In support of these findings, very early studies had already reported that oxidative muscles can recuperate better

than glycolytic ones after nerve crush [30]. Also, PGC1- α has been shown to protect muscles from denervation atrophy [31]. It can be therefore postulated that the pro-restorative power of SCD deficiency is the result of an enhancement of oxidative metabolism, as that shown in this work. A fast to slow fiber type shift has been shown to occur progressively in ALS, and it has been proposed that this metabolic modification would render muscle fibers with higher oxidative capacity more resistant to disease [32]. Recent studies have further reported that a modest increase in the expression of MuSK, as that observed here, can maintain neuromuscular junctions in mutant SOD1 mice, hence retarding denervation and ameliorating muscle function [33]. Taking our present findings as a whole, we can put forward that SCD1 stands at a regulatory crossroad shaping muscle function in health and disease. In this respect, the beneficial effects of inhibitors of SCD

enzymatic activity could pave the way for developing novel therapeutic strategies to palliate motor neuron injury.

Acknowledgments

We thank Annie Picchinenna and Marie José Ruivo for excellent technical assistance. We are also indebted to Dr. Benoit Halter for his aid with part of the initial SOD1(G86R) mouse experiments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GH FS JLGDA JPL. Performed the experiments: GH FS AH TL FR SDG LP. Analyzed the data: GH FS AH TL FB SDG HO LD EM JLGDA JPL. Contributed reagents/materials/analysis tools: FB HO MHMB EM. Wrote the paper: JLGDA.

References

- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, et al. (2011) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377: 942–955.
- Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, et al. (2006) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312: 1389–1392.
- Dupuis L, Gonzalez De Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Eschbach J, Rene F, et al. (2009) Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One* 4: e5390. doi:10.1371/journal.pone.0005390.
- Wong M, Martin LJ (2010) Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 19: 2284–2302.
- Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martínez-Palma L, et al. (2011) Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 18126–18131.
- Bouteloup C, Desport JC, Clavelou P, Guy N, Derumeaux-Burel H, et al. (2009) Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J Neurol* 256: 1236–1242.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, et al. (2008) Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70: 1004–1009.
- Dupuis L, Pradat PF, Ludolph AC, Loeffler JP (2011) Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 10: 75–82.
- 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, et al. (2007) Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Lipid Res* 48: 1571–1580.
- Gonzalez De Aguilar JL, Niederhauser-Wiederkehr C, Halter B, De Tapia M, Di Scala F, et al. (2008) Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiol Genomics* 32: 207–218.
- Pradat PF, Dubourg O, de Tapia M, di Scala F, Dupuis L, et al. (2012) Muscle gene expression is a marker of amyotrophic lateral sclerosis severity. *Neurodegener Dis* 9: 38–52.
- Enoch HG, Catalá A, Strittmatter P (1976) Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem* 251: 5095–5103.
- Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzierski CM, et al. (2002) Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11482–11486.
- Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 689–693.
- Halter B, Gonzalez De Aguilar JL, Rene F, Petri S, Fricker B, et al. (2010) Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 48: 915–923.
- Léger S, Black WC, Deschenes D, Dolman S, Falgout JP, et al. (2010) Synthesis and biological activity of a potent and orally bioavailable SCD inhibitor (MF-438). *Bioorg Med Chem Lett* 20: 499–502.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911–917.
- Rouaux C, Panteleva I, René F, Gonzalez De Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, et al. (2007) Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neurosci* 27: 5535–5545.
- Attie AD, Krauss RM, Gray-Keller MP, Brownlie A, Miyazaki M, et al. (2002) Relationship between stearyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 43: 1899–1907.
- Wang J, Yu L, Schmidt RE, Su C, Huang X, et al. (2005) Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 735–742.
- Blanchet E, Annicotte JS, Lagarrigue S, Aguilar V, Clapé C, et al. (2011) E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat Cell Biol* 13: 1146–1152.
- Martinou JC, Merlie JP (1991) Nerve-dependent modulation of acetylcholine receptor epsilon-subunit gene expression. *J Neurosci* 11: 1291–1299.
- Sampath H, Ntambi JM (2011) The role of stearyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1243: 47–53.
- Dobrzyn A, Dobrzyn P, Lee SH, Miyazaki M, Cohen P, et al. (2005) Stearyl-CoA desaturase-1 deficiency reduces ceramide synthesis by downregulating serine palmitoyltransferase and increasing beta-oxidation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E599–607.
- Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, et al. (1999) Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem* 274: 26761–26766.
- Selsby JT, Morine KJ, Pendrak K, Barton ER, Sweeney HL (2012) Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1 α involves a fast to slow fiber type shift in the mdx mouse. *PLoS One* 7: e30063. doi: 10.1371/journal.pone.0030063.
- Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, et al. (2007) Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 α muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* 282: 30014–30021.
- Handschin C, Kobayashi YM, Chin S, Seale P, Campbell KP, et al. (2007) PGC-1 α regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. *Genes Dev* 21: 770–783.
- Lowrie MB, Krishnan S, Vrbová G (1982) Recovery of slow and fast muscles following nerve injury during early post-natal development in the rat. *J Physiol* 331: 51–66.
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, et al. (2006) PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16260–16265.
- Sharp PS, Dick JR, Greensmith L (2005) The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 130: 897–910.
- Pérez-García MJ, Burden SJ (2012) Increasing MuSK activity delays denervation and improves motor function in ALS mice. *Cell Rep* 2: 497–502.

II.3 Intérêt de cette étude dans la recherche sur la SLA

Notre étude a mis en évidence le rôle présumé de la SCD1 dans la SLA, à travers son influence sur le métabolisme lipidique et son action sur l'axe moteur. Nous avons pu montrer dans nos travaux que SCD1 est fortement dérégulée dans le muscle de souris SOD1m, et qu'une modulation de son activité influence l'état d'innervation musculaire après lésion. Ainsi la baisse d'expression et d'activité de la SCD1 observée dans le muscle des souris SOD1m pourrait être un mécanisme mis en place par l'organisme pour lutter contre les effets délétères qui apparaissent au cours de la pathologie. En effet, l'hypermétabolisme, s'il peut être délétère au niveau de l'organisme, peut n'être qu'en réalité qu'un "dégât collatéral" dû au changement ou la conversion des fibres musculaires passant d'un métabolisme glycolytique ou mixte à un métabolisme plus oxydatif. Cet état plus oxydatif pourrait être dans un premier temps, la seule voie permettant à l'organisme de préserver une innervation musculaire suffisante, après l'atteinte des motoneurones de gros diamètres innervant les unités motrices à préférences glycolytiques. Ainsi la diminution expérimentale provoquée de l'expression de la SCD1, favorise l'état oxydatif et de ce fait préserve davantage l'axe moteur des animaux. Il se peut d'une diminution d'activité de la SCD1 associée à un apport énergétique lipidique augmenté permette un retard d'apparition de la maladie, voire une augmentation de la survie des animaux.

Chapitre III:

Etude d'une inhibition pharmacologique de la SCD1 sur les souris SOD1m

III.1 Une diminution systémique de la SCD1 a-t-elle un effet bénéfique sur les souris SOD1m ?

Nous avons vu dans le chapitre I que la SCD1 diminue au cours de la pathologie, et que le profil d'acides gras des souris SOD1m est modifié. Le second chapitre suggère qu'une perte d'expression et/ou d'activité de la SCD1 apporte des effets bénéfiques sur l'axe neuro-musculaire après lésion mécanique du nerf sciatique. Dans ce dernier chapitre nous nous intéresserons aux effets d'une inhibition pharmacologique de l'activité de la SCD1 chez des souris SOD1m.

III.2 Stratégie expérimentale

Pour mener à bien cette étude, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de l'activité de la SCD1, le (3-(5-méthyl-[1,3,4] thiadiazol-2-yl)-6-[4-(2-trifluorométhyl-phénoxy)-piperidin-1-yl]-pyridazine, que nous appellerons MF-438 (Prestwick Chemical, Illkirch, France). Nous avons ajouté cet agent pharmacologique à la nourriture des animaux (mâles SOD1m et homologues sauvages, n=8-10), à une dose de 10mg/kg/ jour (SAFE, Augy, France). Les animaux ont été traités de l'âge de 60 jours à 95 jours. Ils ont été suivis pendant toute la durée de l'expérience, par prises de poids régulières, et expertise visuelle. Un électromyogramme a été réalisé juste avant l'euthanasie. Le sérum ainsi que les muscles des pattes postérieures et la moelle épinière ont été prélevés pour les analyses histologiques et biochimiques. Deux autres groupes ont été ajoutés à cette étude. Le premier groupe comporte des souris (SOD1m et homologues sauvages n=8-10) traitées avec une alimentation enrichie en acides gras saturés (SFA, Végétaline 15%, Unilever, Londres, Angleterre), substrat de la réaction enzymatique de la SCD1, complétement avec l'inhibiteur de la SCD1, le MF-438 (groupe SFA-MF). La Végétaline a été combinée à une alimentation standard pour rongeur (A04, SAFE, Augy, France). Le second groupe est un groupe de souris contrôle (SOD1m et homologues sauvages n=8-10) traité avec une alimentation enrichie en acides gras saturés (groupe SFA).

Le traitement du premier groupe (groupe SFA-MF) a pour but de réduire massivement la présence d'acides gras mono-insaturés (MUFA), produits de la réaction de la SCD1. L'apport du MF-438 permet une inhibition de l'activité enzymatique, donc une baisse de la conversion des SFA en MUFA. L'apport de SFA dans l'alimentation permet de réduire la biodisponibilité des MUFA présents dans l'alimentation standard. Le second groupe (groupe SFA) est un groupe contrôle qui permet de mesurer les effets physiologiques d'une alimentation enrichie en SFA (Figure 14).

Voici à présent quelques résultats préliminaires.

III.3 Résultats et discussion

III.3.1 Contrôle de l'expression et de l'activité de la SCD1

Le traitement MF-438 entraîne une perte de poids chez les animaux traités, mais également une alopecie, déjà décrite dans la littérature, dès le cinquième jour de traitement (Leger et al. 2010). Par ailleurs l'analyse d'expression génique musculaire de la SCD1 a révélé une perte de l'expression de SCD1 chez les souris SOD1m contrôles en comparaison à leurs homologues sauvages (Figure 15 A). Le traitement MF-438 n'induit pas de baisse d'expression musculaire chez les souris sauvages. En revanche on observe une forte augmentation d'expression de la SCD1 musculaire chez les souris SOD1m traitées avec le MF-438. Cela peut s'expliquer par le fait que l'inhibiteur bloquant l'activité enzymatique de la SCD1, l'organisme cherche à compenser cette diminution d'activité en favorisant la transcription du gène. Les animaux traités avec les SFA ne présentent pas d'augmentation d'expression musculaire de la SCD1. En effet, il se peut que les quantités de SFA absorbées ne soient pas suffisantes à elles-seules pour induire une augmentation d'expression de la SCD1 au niveau musculaire. Le traitement SFA-MF induit une augmentation d'expression de la SCD1 chez les souris sauvages et chez les souris SOD1m. On peut considérer que l'augmentation observée chez les souris sauvages traduit une combinaison des effets du MF-438 et des SFA, non suffisants à eux-seuls pour induire une augmentation d'expression de la SCD1 chez ces souris.

L'analyse de l'activité enzymatique systémique de la SCD1 par GC a permis de confirmer les effets de l'inhibiteur pharmacologique (Figure 15 B et C). Les rapports

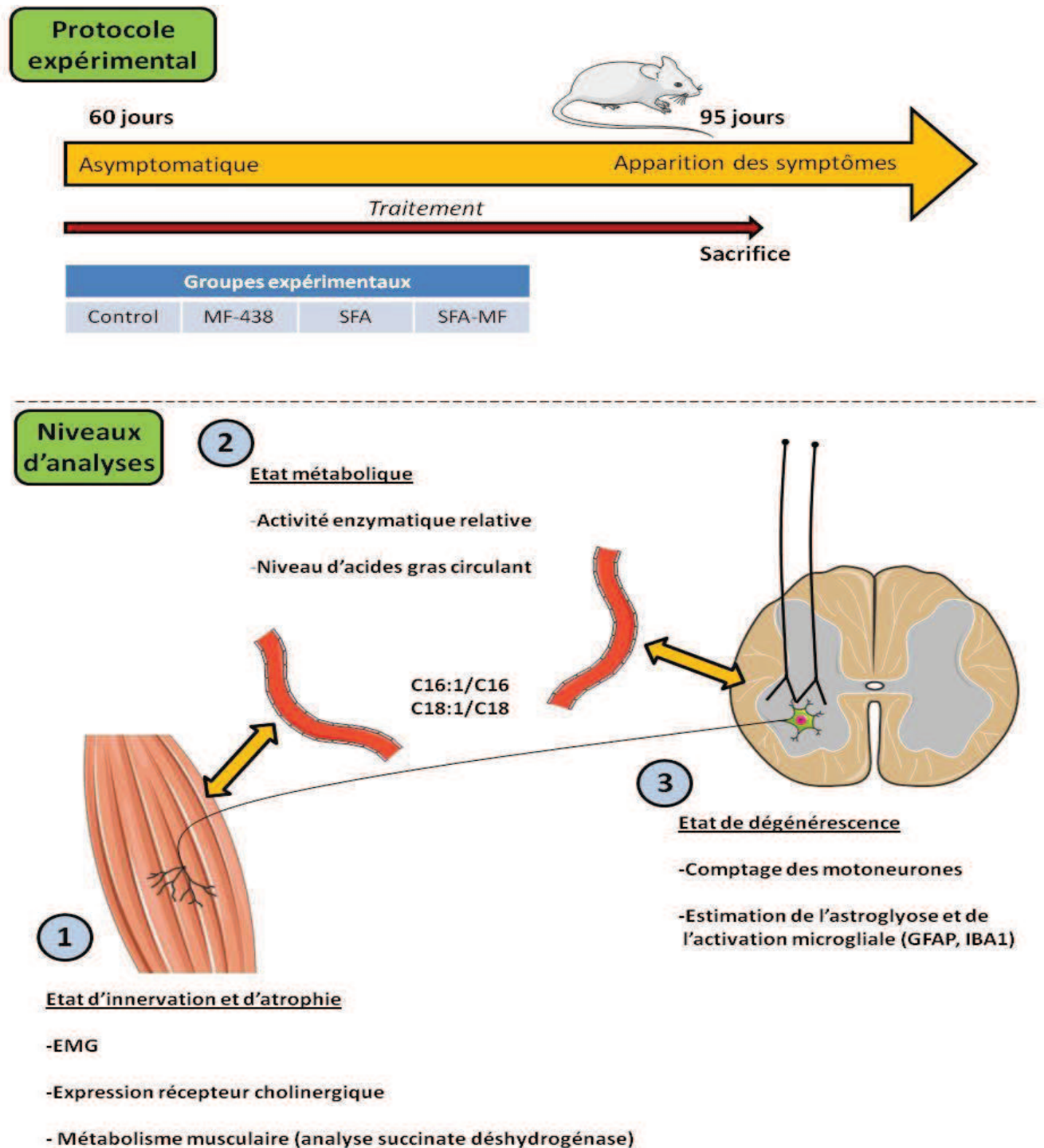


Figure 14: Représentation schématique du protocole expérimental et des niveaux d'analyses de l'étude

Le protocole expérimental de cette étude consiste à traiter des souris SOD1m et leurs homologues sauvages de l'âge de 60 jours (asymptomatique) à l'âge de 95 jours (apparition des symptômes) (n=8-10). Le traitement incorporé dans la nourriture est administré par prise alimentaire. Différents niveaux d'analyses sont ensuite étudiés : 1) l'état d'innervation musculaire, 2) l'état métabolique, 3) l'état de dégénérescence.

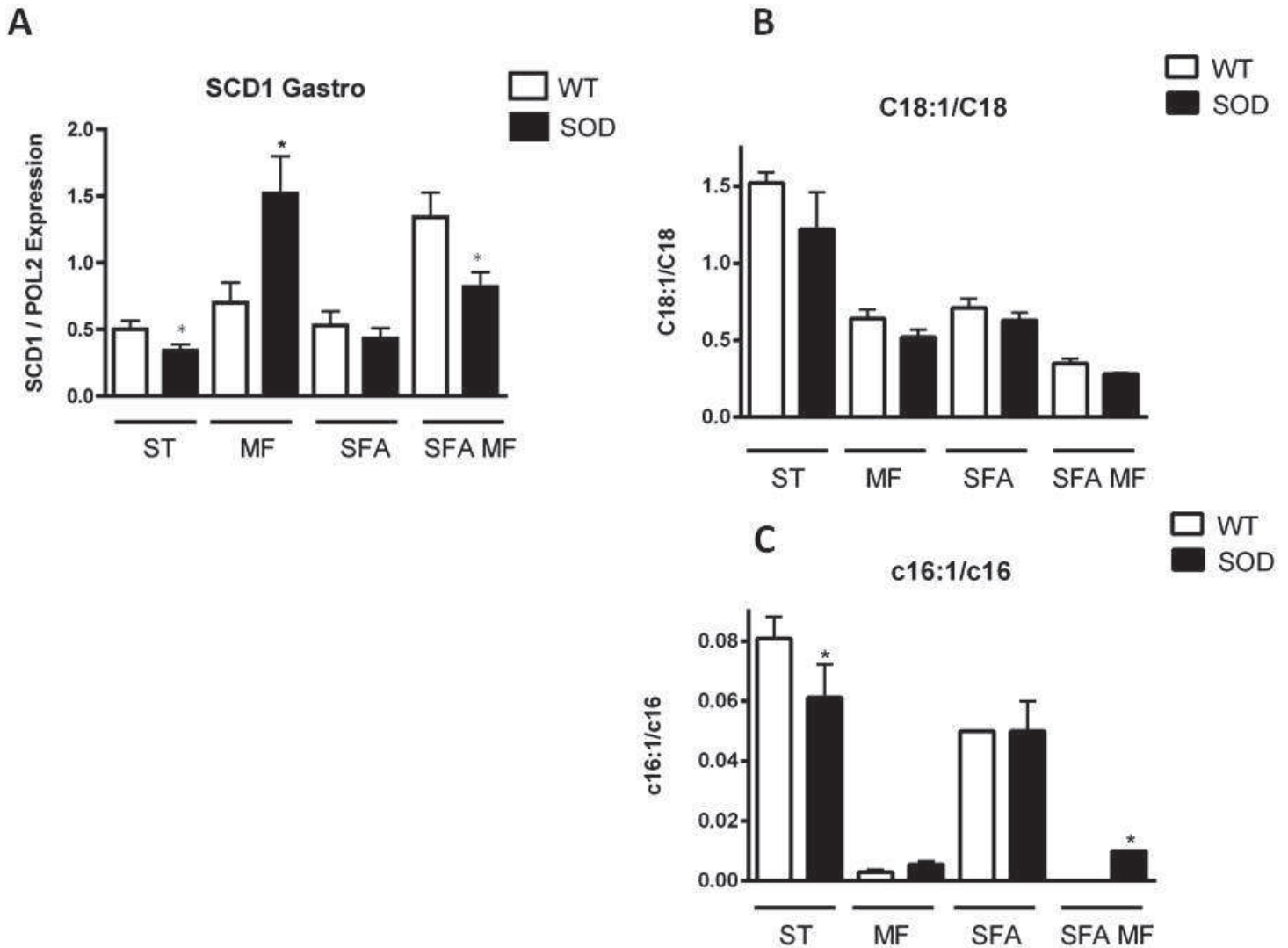


Figure 15 : Niveaux d'expression musculaire de la SCD1 et activités relatives de l'enzyme dans le système circulant

(A) Expression de l'ARNm de la SCD1 par RT-PCR quantitative dans le muscle gastrocnémien de souris sauvages (WT, barres blanches) et de souris SOD1m (SOD, barres noires), (valeurs moyennes d'expression de SCD1/ POL2, +/- SEM, n=8-10, *, p<0,05 ANOVA, post test Tukey). (B,C): Activité relative de la SCD1 par analyse du rapport circulant, produit/substrat. (B) Rapport de l'acide oléique/stéarique (C18:1/C18) . (C) Rapport de l'acide palmitoléique/palmitique (C16:1/C16). (valeurs moyennes du rapport, +/- SEM; *, p<0,05 ANOVA, post test Tukey).

produits/substrats de l'activité enzymatique de la SCD1 (C18:1/C18 et C16:1/C16) montrent une baisse d'activité de l'enzyme chez les souris SOD1m contrôles en comparaison à leurs homologues sauvages. On observe également une forte diminution de ces rapports chez les souris sauvages et SOD1m après traitement avec le MF-438. Cette baisse d'activité est également constatée dans les deux autres groupes expérimentaux. En effet, on observe une diminution d'activité dans le groupe SFA, en comparaison avec le groupe contrôle. On remarque également une réduction d'activité plus forte dans le groupe SFA-MF, mettant en évidence l'effet combiné de l'inhibiteur et des SFA.

III.3.2 Examen électromyographique et analyse de l'innervation

L'examen électromyographique (EMG) réalisé sur les animaux juste avant l'euthanasie a permis de montrer que le traitement MF-438 n'entraînait pas de perte d'innervation chez les souris sauvages. Nous avons également pu constater qu'à 95 jours, âge du prélèvement, 60% des souris SOD1m présentaient un EMG positif, alors qu'il n'y en avait que 10% dans le groupe traité avec le MF-438. Le groupe traité avec les SFA présente un niveau de dénervation quasi similaire à celui des souris SOD1m contrôles avec 50% d'animaux présentant un EMG positif. Le groupe SFA-MF présente un taux d'EMG positif plus faible que le groupe contrôle, mais supérieur à celui du groupe traité avec le MF-438. On observe 30% d'EMG positif dans ce groupe SFA-MF (Figure 16 A, C et D).

Les résultats de RT-PCR quantitative ont confirmé cet effet au niveau de l'expression d'un gène de jonction neuro-musculaire (JNM) dans le muscle gastrocnémien (sous-unité alpha du récepteur cholinergique). En effet, chez les souris SOD1m contrôles on trouve une forte augmentation du niveau d'expression de ce gène de jonction, connu pour être surexprimé lors d'une perte d'innervation (Witzemann et al. 1991). Nous avons remarqué que les souris SOD1m traitées avec le MF-438 expriment moins de sous-unités alpha de ce récepteur que leurs homologues non traités. Les souris SOD1m traitées avec les SFA ou SFA-MF présentent également une baisse d'expression de ce récepteur, cependant les effets semblent moindres que dans le groupe exclusivement traité avec le MF-438. Les effets délétères connus des SFA, notamment impliqués dans des processus de lipotoxicité, pourraient expliquer ces résultats (Figure 16 B). En effet, une concentration trop importante de SFA peut entraîner une insulino-résistance, mais aussi une réaction inflammatoire pouvant

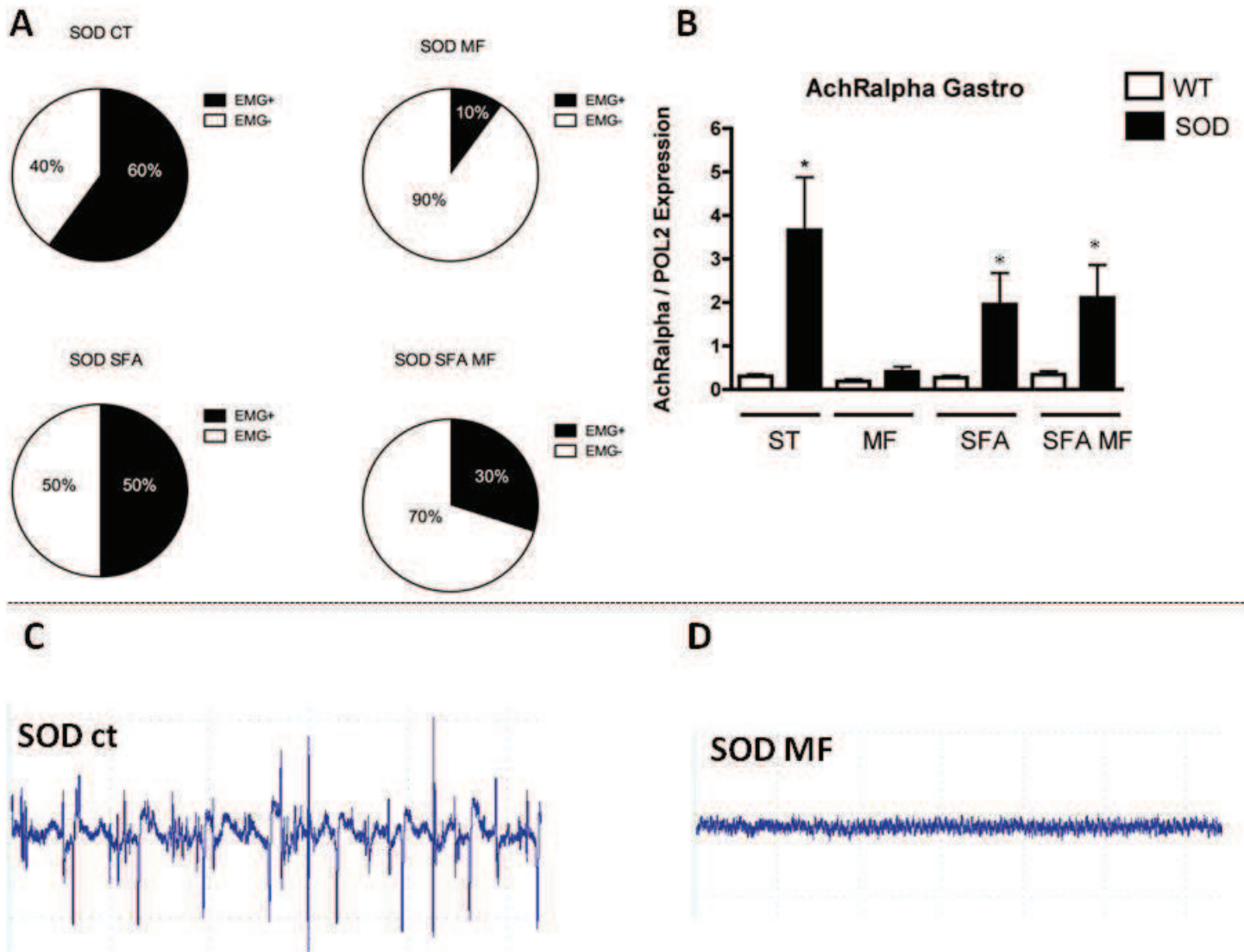


Figure 16 : Pourcentage d'EMG positif à la dénervation et niveau d'expression musculaire de récepteur cholinergique

(A) Représentation de l'état de dénervation musculaire des animaux en fonction de leurs traitements (contrôle (SOD-CT), MF-438 (SOD-MF), SFA (SOD-SFA), SFA+MF-438 (SFA-MF)). EMG positif en noir et EMG négatif en blanc (n=8-10). (B) Expression musculaire, de l'ARNm de la sous-unité alpha du récepteur cholinergique, détectée par RT-PCR quantitative, après ces mêmes traitements. Les barres blanches représentent les souris sauvages (WT) et les noires les souris SOD1m (SOD), (n=8-10; *p<0,05 ANOVA, post test Tukey). (C) Tracé EMG+ d'une souris SOD1m contrôle (SOD-CT). (D) Tracé EMG- d'une souris SOD1m traité avec le MF-438 (SOD-MF).

conduire à l'activation de la voie pro-apoptotique (Bonnard et al. 2008; Coll et al. 2008; Miller et al. 2005). On peut alors envisager que l'effet bénéfique d'une baisse d'activité de la SCD1 dans les groupes SFA et SFA-MF est réduit par la trop forte concentration en SFA.

III.3.3 Analyse de l'état métabolique musculaire

L'analyse histologique du muscle tibialis a montré que le traitement MF-438 entraîne une augmentation du métabolisme oxydatif chez les souris sauvages (Figure 17 C, D, E, F et G). En effet les souris sauvages traitées présentent une plus forte proportion de fibres oxydatives (positives au marquage succinate déshydrogénase SDH), que leurs homologues non traitées. De même une tendance similaire est observée chez les souris SOD1m. Toutefois il faut noter que les souris SOD1m contrôles présentent naturellement un taux de fibres SDH positives supérieur à celui des souris sauvages.

L'analyse de l'état d'atrophie musculaire met en évidence que le niveau d'expression de l'atrogine est augmenté dans le muscle des souris SOD1m contrôles en comparaison à leurs semblables sauvages (Figure 17 A). Le traitement MF-438 n'induit pas d'augmentation d'expression de l'atrogine chez les souris SOD1m. En revanche on constate une forte augmentation de cette expression chez les souris sauvages. Cela peut s'expliquer par le fait que les muscles de ces animaux opèrent un changement métabolique majeur, confirmé lors de l'analyse SDH. Ce changement métabolique, conduisant au « switch » (conversion ou changement) de fibres à préférence glycolytique vers une préférence oxydative; celui-ci entraîne une restructuration morpho-fonctionnelle pouvant expliquer cette expression génique (Yang et al. 2006). Cette expression n'est pas ou peu altérée chez les souris SOD1m dont le changement métabolique est déjà effectué. De plus, une autre étude montre que l'AMP-activated protein kinase (AMPK) est un activateur de l'expression de l'atrogine (Nakashima and Yakabe 2007). De même il a été montré qu'une baisse d'activité de la SCD1 induisait une activation de la voie AMPK (Dobryzn et al. 2004; Kim et al. 2011). Ainsi une baisse de la SCD1 pourrait induire l'AMPK et permettre ce changement d'expression de l'atrogine. Une diminution de l'expression de l'atrogine est également observée dans les groupes SFA et SFA-MF.

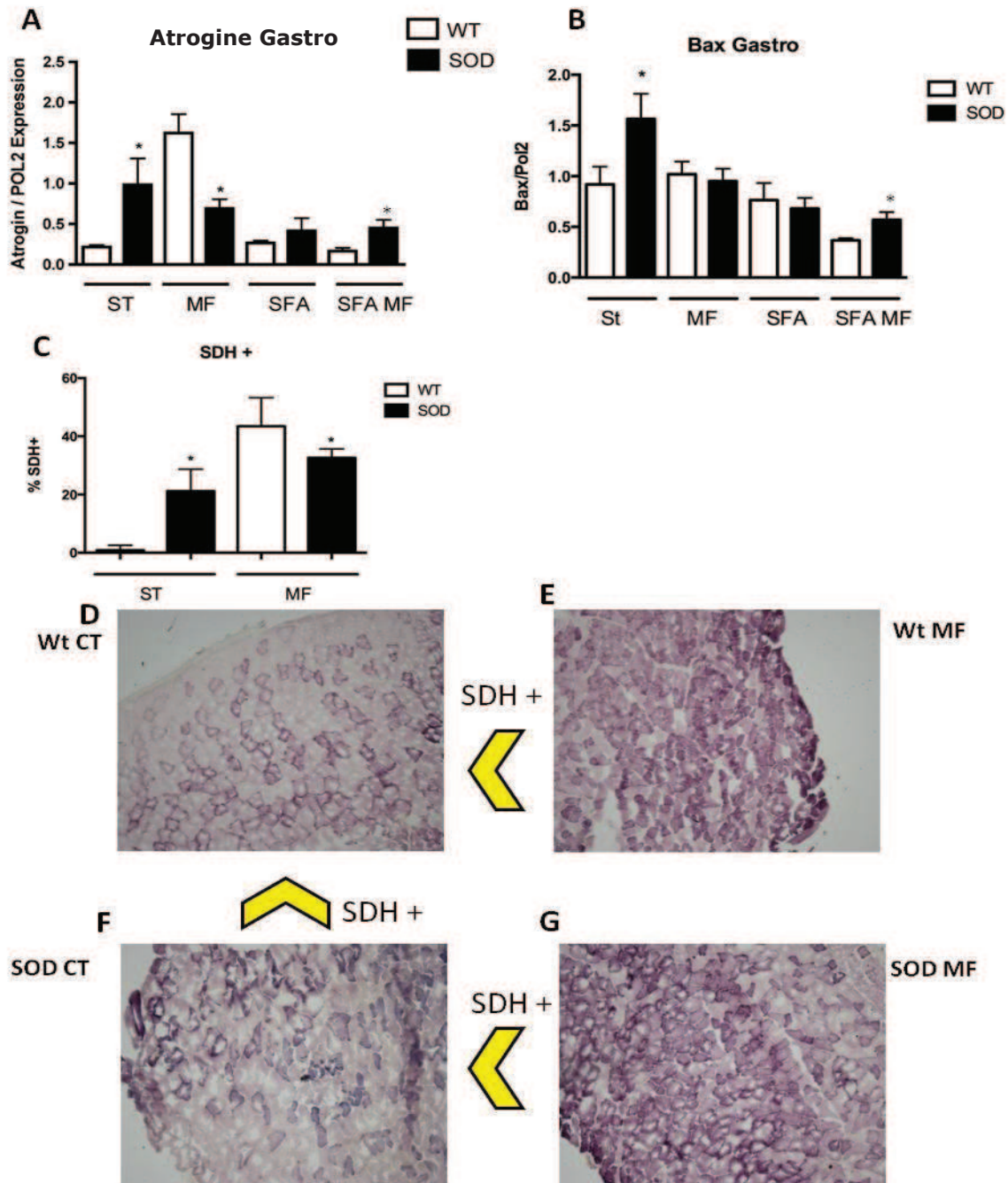


Figure 17: Niveau d'expression musculaire de l'atrogine et Bax, et analyse histologique du métabolisme oxydatif musculaire.

(A) Expression de l'atrogine par RT-PCR quantitative dans le muscle de souris sauvages (barres blanches) et de souris SOD1m (barres noires) en fonction de leurs traitements (n=8-10, *, p<0,05 ANOVA, post test Tukey). (B) Expression de Bax par RT-PCR dans le muscle des mêmes souris. (C) Pourcentage de fibres musculaires positive au test SDH dans le muscle tibialis des souris sauvages et SOD1m en condition contrôle ou MF. (D) Images représentatives de l'état oxydatif du muscle suite à un marquage succinate déshydrogénase (SDH), chez les souris sauvages contrôles (WT CT), (E) sauvages traitées MF-438 (WT-MF), (F) les souris SOD1m contrôles (SOD CT), (G) les souris SOD1m traitées MF-438 (SOD-MF). Le sens des flèches indique la gradation de l'intensité du marquage.

L'expression de Bax, facteur pro-apoptotique, est augmentée chez les souris SOD1m contrôles (Figure 17 B). En revanche on remarque une diminution de son expression chez les souris SOD1m après traitement. Le MF-438 permet une restauration de l'expression à un niveau similaire à celui des souris sauvages contrôles. Cet aspect est également cohérent avec la description faite dans la littérature, qui montre que les souris SOD1m présentent un niveau de marqueurs apoptotiques supérieur à celui de leurs homologues sauvages (Dobrowolny et al. 2011; Miller and Girgenrath 2006; Patel et al. 2010; Tews et al. 1997). Les deux autres groupes (groupe SFA et groupe SFA-MF) présentent également un niveau d'expression de Bax diminué chez les souris SOD1m en comparaison aux souris SOD1m contrôles.

III.3.4 Evaluation de la neuroprotection motoneuronale

L'observation de la corne ventrale de la moelle épinière lombaire a permis de constater que les souris SOD1m traitées avec le MF-438 ont un nombre de motoneurones supérieur à celui des SOD1m non traités (Figure 18 A, B et C). En effet, le nombre de MN des souris SOD1m contrôles est diminué par rapport à celui présent chez les animaux sauvages, traités ou non. Les souris SOD1m traitées avec les SFA ou SFA-MF présentent également un nombre de MN supérieur à celui des souris SOD1m contrôles.

L'analyse de l'astroglyose, par mesure du niveau d'expression de la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) dans la moelle épinière, a montré que les souris SOD1m contrôles avaient une astroglyose plus importante que leurs homologues sauvages (Figure 18 D). Les traitements MF, SFA et SFA-MF permettent une réduction de cette astroglyose dans des proportions similaires, en comparaison au groupe de souris SOD1m contrôle. Les différents traitements réduisent également l'expression de la GFAP dans la moelle épinière des souris sauvages.

Par ailleurs, l'étude de l'activation microgliale suite à l'analyse de l'expression de *allograft inflammatory factor 1* (AIF-1) également connu sous le nom de *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (IBA1) a montré une augmentation de cette activation dans la moelle épinière des souris SOD1m contrôles en comparaison à leurs homologues sauvages (Figure 18 E). Le traitement MF permet une réduction de l'expression de IBA1, restaurant son niveau à un état proche de celui des souris contrôles. Les souris sauvages traitées avec le MF ont un niveau d'expression de IBA1

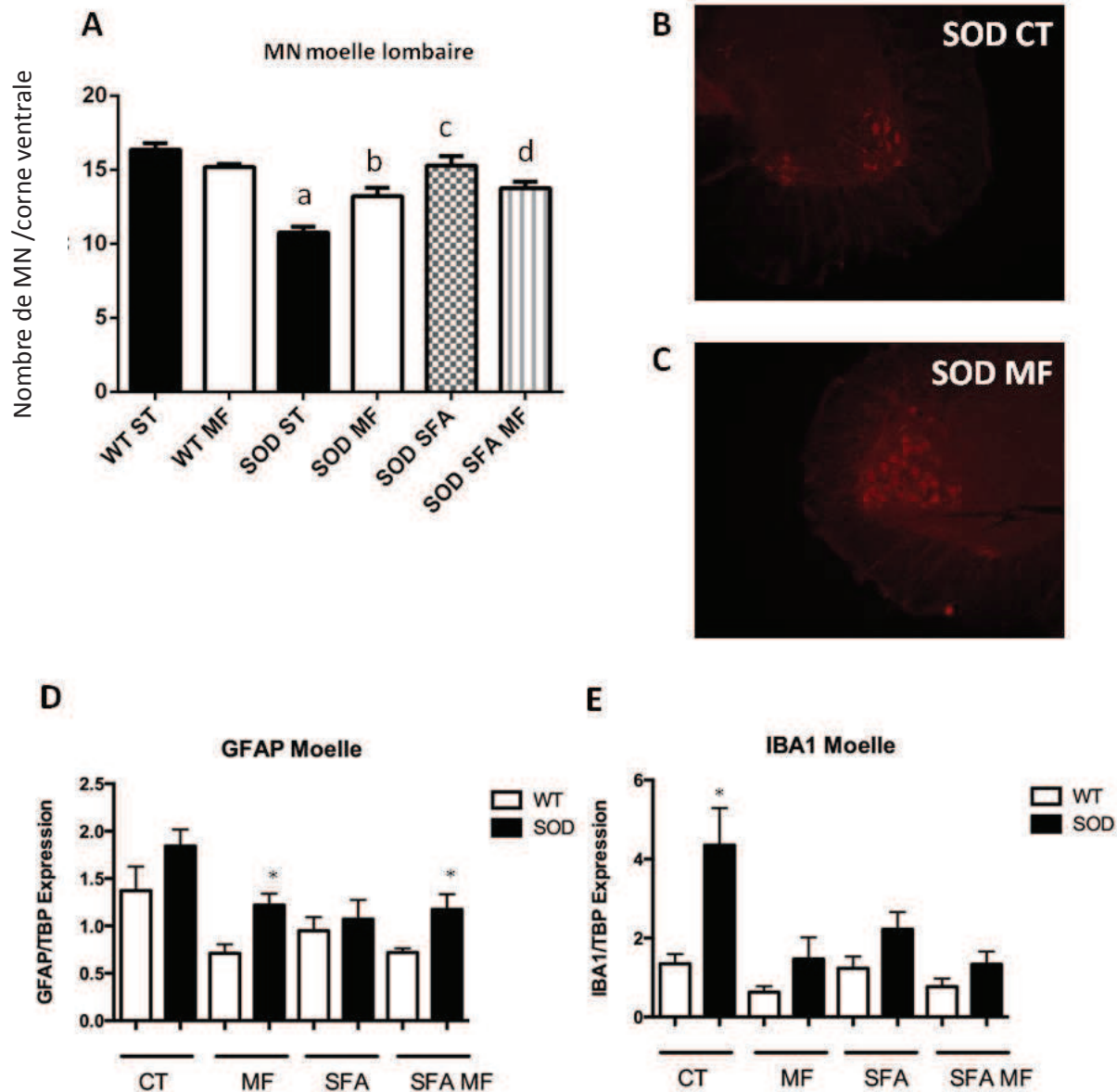


Figure 18: Quantification du nombre de motoneurones dans la corne ventrale de la moelle épinière lombaire et niveau d'expression de gènes de l'astroglyose et de l'activation microgliale dans la moelle épinière

(A) Nombre de motoneurones dans la corne ventrale de la moelle épinière lombaire dans les différents groupes de souris, en fonction de leurs traitements (n=8, +/- SEM, a-d, p<0,05 ANOVA, post test Tukey) (a) WT-CT vs SOD CT, (b) SOD-MF vs SOD-CT, (c) SOD-SFA vs SOD-CT, (d) SOD-SFA-MF vs SOD CT. (B) Image mettant en évidence les motoneurones par un marquage dirigé contre la Choline acétyltransférase (ChAT) chez une souris SOD1m contrôle. (C) Même illustration chez une souris SOD1m traitée avec le MF-438. (D) Expression de l'ARNm de la GFAP dans la moelle épinière thoracique des souris sauvages (WT, barres blanches) et SOD1m (SOD, barres noires) en fonction de leurs traitements (n=8-10, +/- SEM, *, p<0,05 ANOVA, post test Tukey). (E) Expression de l'ARNm de IBA1 dans les mêmes animaux et dans les mêmes conditions.

légèrement diminué par rapport à leurs contrôles non traités. Les traitements SFA et SFA-MF entraînent aussi une diminution de l'expression de IBA1 chez les souris SOD1m. Le traitement SFA ne semble pas aussi efficace que le traitement MF ou que le traitement combiné SFA-MF. Les souris sauvages ne semblent pas influencées par ces traitements.

III.4 Apports de cette étude dans la recherche sur la SLA

Cette étude préliminaire renforce notre idée qu'une baisse d'activité de la SCD1 apporte des effets bénéfiques sur l'axe moteur, notamment sur les animaux modèles de la SLA. Il faudra néanmoins compléter cette analyse par le suivi de la survie des souris SOD1m après un traitement plus long avec le MF. Pour l'heure, une telle étude n'a pu être réalisée, en raison d'effets secondaires importants sur nos animaux. Nous n'avons pas encore identifié l'origine de ces effets secondaires. Nous excluons toute possibilité de surdosage, car le même traitement fut déjà administré sur une période de 90 jours à des souris sauvages. Cette dernière étude portait sur les effets d'une inhibition prolongée de l'activité de la SCD1. Une alopecie marquée est apparue dès le cinquième jour de traitement et ce pendant toute sa durée. L'analyse EMG n'avait révélé aucun signe de dénervation et la vitesse de conduction nerveuse était normale après traitement. Il est possible que l'alopecie et l'altération de la barrière cutanée reflètent une fragilité des animaux, et les rendent plus susceptibles à des parasites opportunistes. Une mise en quarantaine des animaux, ou un élevage dans des conditions axéniques permettra peut être d'empêcher ce type d'atteintes.

Discussion

Les recherches menées dans le cadre de ma thèse se fondent sur les découvertes d'une étude antérieure à mon arrivée au laboratoire, dans laquelle une analyse du transcriptôme musculaire de souris SOD1m et de patients SLA fut réalisée (Gonzalez de Aguilar et al. 2008; Pradat et al. 2012). Mon travail a consisté à étudier les effets de modifications d'expression et d'activité de la SCD1 dans un contexte neurodégénératif. Dans la discussion qui suit je reviendrai sur l'origine du projet et le contexte de l'étude, puis sur l'analyse des profils lipidiques observés chez les souris SOD1m et enfin nous verrons l'apport de l'étude pharmacologique dans le contexte physiopathologique de la SLA.

I) Contexte originel : le phénotype métabolique de la SLA

En 2004, des travaux menés au sein du laboratoire ont révélé que les souris SOD1m présentaient un déficit énergétique caractéristique, l'hypermétabolisme (Dupuis et al. 2004). Cette atteinte se traduit par une augmentation de la dépense énergétique, probablement d'origine musculaire. En effet, il a été montré qu'une augmentation de la clairance périphérique des lipides est retrouvée chez les souris SOD1m (Fergani et al. 2007). Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une augmentation d'expression musculaire de FAT/CD36, dont le rôle est de faciliter l'utilisation des acides gras, chez les souris SOD1m (Coburn et al. 2000; Fergani et al. 2007). La diminution des ressources énergétiques contribuant au développement de la maladie, un apport alimentaire hyperlipidique permet de retarder l'apparition de la pathologie et de prolonger la vie des animaux (Dupuis et al. 2004). Une restriction calorique quant à elle accélère le déclenchement de la maladie (Hamadeh et al. 2005). Une explication envisagée, repose sur le fait que le métabolisme lipidique est intimement lié à de nombreuses voies de transduction, impliquant de multiples facteurs de transcription et seconds messagers. Ainsi on peut envisager l'implication de l'AMPK, connue pour sa sensibilité aux variations énergétiques, notamment par son activation *via* la diminution de l'ATP et l'augmentation de l'AMP. Variations toutes deux décrites dans la littérature comme présentes dans le muscle des souris SOD1m (Derave et al. 2003; Dupuis et al. 2003). De même le métabolisme semble influencer la différenciation musculaire par la voie de *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1-alpha), récemment décrit comme associé à la

formation de la JNM (Handschin et al. 2007). Son implication dans la pathologie paraît aujourd'hui évidente, car récemment rapportée comme diminuée dans le muscle de patients SLA et de souris SOD1m (Thau et al. 2012). Cette interaction entre le métabolisme lipidique et l'état d'avancement de la maladie a également été confirmée par une étude montrant qu'une perte d'expression de PGC1-alpha entraînait une accélération de la progression de la SLA (Eschbach et al. 2013) .

Les constatations d'atteinte du métabolisme lipidique ont conduit à l'analyse du transcriptôme musculaire des souris SOD1m et des patients (Gonzalez de Aguilar et al. 2008; Pradat et al. 2012). Cette analyse a révélé une altération de l'expression de la SCD1, un gène impliqué dans le métabolisme lipidique. Dans ce contexte est né le projet SCD1, visant à étudier l'impact d'une modulation d'expression et d'activité de la SCD1 sur l'axe neuromusculaire, et plus largement dans la SLA. L'intérêt porté aux lipides s'explique par leur rôle dans le métabolisme énergétique mais également dans les nombreuses voies de signalisation, en tant que messagers, et également pour leurs rôles structuraux. Par ailleurs, dans un contexte neurodégénératif global, il a été montré que les lipides sont impliqués dans d'autres pathologies neurodégénératives. En effet, quelques études ont rapporté les effets bénéfiques d'une restriction calorique dans le cas de la maladie d'Alzheimer, d'Huntington et de Parkinson (Duan et al. 2003; Maswood et al. 2004; Patel et al. 2005). A l'inverse, une hypercholestérolémie est un facteur de risque pour le développement de la maladie d'Alzheimer (Pappolla et al. 2003). Au contraire, dans la SLA, les patients présentant un rapport plasmatique LDL/HDL élevé ont une espérance de vie plus longue que les patients SLA avec un rapport identique aux sujets contrôles (Dupuis et al. 2008).

La comparaison des phénotypes métaboliques entre les souris SOD1m et les souris invalidées pour *scd1* (*scd1*^{-/-}) a renforcé notre choix de *scd1* comme gène d'intérêt pour l'étude des mécanismes physio-pathologiques dans la SLA. La forte ressemblance du phénotype métabolique entre les deux modèles suggère SCD1 comme acteur de l'hypermétabolisme chez les souris SOD1m. Cet hypermétabolisme est considéré comme un mécanisme potentiellement néfaste pour l'axe moteur depuis l'étude menée au sein du laboratoire, montrant qu'un découplage mitochondrial exclusivement musculaire, conduisant à un hypermétabolisme, est capable d'induire un état de dénervation chez les animaux modèles (MCK-UCP) (Dupuis et al. 2009b). On peut ainsi imaginer que la diminution d'expression musculaire de la SCD1 chez les souris SOD1m est imputable à l'expression musculaire de la SOD1 mutée. La

confirmation de cette baisse de la SCD1 chez les patients SLAs et SLAf, qui présentent également un hypermétabolisme, renforce l'idée d'une pathologie systémique avec influence périphérique dont le muscle serait un acteur métabolique majeur.

II) Les acides gras dans la SLA : implications multiples

Ayant considéré que les lipides pouvaient avoir une influence sur la pathologie du fait de leurs multiples fonctions, tant énergétiques que structurales ou informatives, nous avons analysé plus en détail le profil AG des souris SOD1m. Nous avons vu dans le chapitre I que le profil d'AG est altéré au cours de la pathologie dans les souris SOD1m.

La forte diminution du rapport MUFA/SFA, tant hépatique que plasmatique, confirme les altérations métaboliques imputables aux modulations d'expression et d'activité de la SCD1. Les modifications de ce rapport renseignent non seulement sur l'état d'activité de l'enzyme mais renforcent aussi l'hypothèse de son implication dans la pathologie. Elles permettent également de mieux envisager les mécanismes pathologiques trouvés dans la SLA. En effet il a été montré que le rapport MUFA/SFA influence la fluidité membranaire et permet une plus grande souplesse cellulaire, tant en terme de communications, que d'échanges ou de réajustement et survie (Ntambi and Miyazaki 2004). De même une étude récente a mis en évidence une baisse de fluidité membranaire dans la moelle épinière des souris SOD1m (Miana-Mena et al. 2011). Ainsi une baisse du rapport MUFA/SFA suite à une diminution d'expression et d'activité de la SCD1 pourrait entraîner des atteintes membranaires et empêcher un réajustement cellulaire tant au niveau spinal que musculaire. La diminution de fluidité membranaire entraîne aussi une baisse de la communication intra- et inter-cellulaire due à la réduction des mouvements des récepteurs cellulaires.

Notre analyse a également permis de montrer une série d'altérations d'autres espèces d'acides gras, notamment des PUFA, fortement impliqués dans la signalisation cellulaire.

Un PUFA souvent étudié, l'acide docosahexaénoïque (DHA), dont l'action est anti-inflammatoire et qui appartient à la classe des oméga-3, est connu pour être fortement peroxydé dans la moelle épinière des souris et patients SLA (Ilieva et al. 2007).

Dans notre étude, nous avons pu observer une forte augmentation du niveau circulant de DHA et ce dès les premiers signes électromyographiques. Cela pourrait traduire une augmentation de la lipolyse, hypothèse accrue par notre observation d'augmentation du niveau circulant de glucagon à un stade symptomatique de la maladie (données non présentées). De même nous avons observé dans le foie des souris SOD1m une baisse de la lipogénèse (article 1) et dans le tissu adipeux une augmentation de l'expression de PPAR gamma, dont l'action est connue pour influencer l'expression de gènes pro-lipolytiques (données non présentées). Cela peut également conduire à une plus forte peroxydation lipidique, les PUFA étant plus sensibles que les MUFA ou SFA en raison de leur plus grand nombre de doubles liaisons sur leur chaîne carbonée. Peroxydabilité que nous avons aussi détectée dans nos travaux (données non présentées) et qui pourrait concorder avec les travaux de Yip et ses collaborateurs. En effet, dans leurs études, les auteurs ont cherché à vérifier l'effet protecteur sur des souris SOD1m de l'EPA, le précurseur des DHA. Ils ont observé une aggravation et une accélération de la pathologie ainsi qu'une mort prématurée des souris SOD1m (Yip et al. 2013). Une explication proposée par les auteurs est basée sur la plus grande susceptibilité des PUFA à être peroxydés et à induire des effets toxiques (Kanner et al. 1987).

Notre étude a montré qu'il est possible d'influencer le profil d'AG chez les souris SOD1m, ce qui met en évidence un maintien de la capacité de régulation des voies de signalisations métaboliques. Ceci suggère l'absence d'une perte irréversible des capacités de modulations d'expression génique et d'activité protéique impliquées dans le métabolisme lipidique. En effet l'agoniste synthétique du récepteur LXR, couramment utilisé pour augmenter l'expression génique de la SCD1 permet une restauration de l'activité enzymatique. Par ailleurs, nous avons pu montrer en utilisant un autre agent pharmacologique, qu'il est possible de réduire l'activité enzymatique de la SCD1. Le MF-438 induit une baisse d'activité de la SCD1 chez les souris sauvages et conduit à un profil AG similaire à celui trouvé chez les souris SOD1m. Ce dernier point renforce l'idée que la baisse de la SCD1 observée chez les souris SOD1m est responsable du profil d'acides gras détecté chez ces animaux. Plus encore, notre analyse a montré que le taux de cholestérol circulant ainsi que le niveau de TG est fortement diminué chez les souris SOD1m dès les premiers symptômes, et que ce

niveau est compensé par un traitement avec l'agoniste LXR. De même l'inhibition d'activité de la SCD1 à l'aide du MF-438, chez des souris sauvages, entraîne une baisse du taux de cholestérol et de TG circulants, ce qui est cohérent avec les études de Miyazaki et ses collaborateurs (Miyazaki et al. 2000; Miyazaki et al. 2001). Cela démontre que la seule modulation d'activité de la SCD1 peut entraîner des modifications du métabolisme lipidique, bien au-delà du rôle initial de l'enzyme. Notre première étude suggère un rôle néfaste de la perte de la SCD1, du fait de son implication sur le profil lipidique. En effet la perte de la SCD1 entraîne la diminution du niveau de cholestérol et de TG circulants, dont un niveau élevé concorde avec une survie accrue des patients SLA (Dorst et al. 2011).

Dans l'ensemble, l'article 1, présenté dans le chapitre I, met en évidence une forte interaction entre le profil métabolique des souris SOD1m et l'altération d'expression et d'activité de la SCD1. Nos résultats suggèrent que la baisse de la SCD1 chez les souris SOD1m influence le métabolisme lipidique et entraîne l'hypermétabolisme conduisant à la perte des réserves lipidiques.

III) SCD1 dans un contexte neurodégénératif

Au début de ce projet, nous avons émis l'hypothèse que la SCD1 influençait négativement l'axe moteur dans la pathologie. Nos connaissances des effets délétères d'un hypermétabolisme musculaire, ainsi que l'implication de la SCD1 dans l'hypermétabolisme nous ont orientés vers cette hypothèse. Notre analyse ayant révélé une diminution précoce d'expression musculaire de la SCD1, nous avons naturellement envisagé qu'il pouvait s'agir d'un mécanisme intervenant dans la mise en place de la pathologie. Par la suite, l'étude phénotypique des souris *scd1*^{-/-} a permis d'exclure que l'unique perte de la SCD1 était capable d'induire une altération de l'innervation (article 2, Plos One). De plus, nous avons constaté qu'une perte totale et irréversible d'innervation musculaire est associée à une augmentation de l'expression musculaire de la SCD1. En revanche, une lésion mécanique du nerf sciatique, permettant une récupération fonctionnelle, induit une diminution d'expression musculaire de la SCD1. Afin de vérifier si, en réalité, une diminution d'expression et d'activité pouvait être bénéfique sur l'axe moteur, nous avons réalisé une lésion mécanique du nerf sciatique, et nous avons administré un inhibiteur de l'activité de la SCD1 à des souris sauvages.

Il s'est avéré que la diminution d'activité de la SCD1 permettait une meilleure récupération fonctionnelle après lésion du nerf. Nous avons donc reconsidéré notre hypothèse de départ d'un effet délétère de la perte de la SCD1 dans la SLA. Il se peut en effet que la diminution précoce de la SCD1 soit en réalité un processus mis en place par l'organisme pour compenser l'avancée de la pathologie.

Les résultats du chapitre III reprennent cette hypothèse et suggèrent qu'une baisse de l'activité de la SCD1 pourrait apporter des effets bénéfiques sur l'axe moteur des souris SOD1m.

La difficulté de cette analyse générale du rôle de la SCD1 dans la pathologie repose sur la distinction entre des mécanismes locaux et systémiques. En effet, il se peut qu'un effet local bénéfique entraîne des effets systémiques néfastes pour l'organisme. Là encore, il faut envisager la possibilité qu'un effet puisse être bénéfique à court terme, et entraîner des atteintes plus sévères sur le long terme.

A présent, à partir de nos observations et nos connaissances, voici quelques hypothèses de mécanismes permettant d'envisager le rôle de la SCD1 dans la SLA. Dans un premier temps, il sera question des effets bénéfiques, puis dans un second temps nous verrons les effets néfastes.

Effets bénéfiques :

- La diminution de la SCD1 entraîne une modification métabolique, associée à un changement du type de fibre musculaire (Schmitt Hussain et al. 2013), similaire à celui retrouvé chez des souris SOD1m (Sharp et al. 2005). Les fibres deviennent plus oxydatives, donc avec une préférence énergétique orientée vers l'utilisation des AG. Cette préférence pourrait influencer la consommation lipidique et expliquer partiellement la diminution des réserves lipidiques (Dupuis et al. 2004; Fergani et al. 2007; Thau et al. 2012).
- Le changement de préférence énergétique et de type de fibre musculaire pourrait être associé à un mécanisme visant à conserver l'innervation musculaire, en proie à une perte des MN des unités motrices FF (rapide et fatigable, innervant les fibres musculaires glycolytiques) (Frey et al. 2000; Hegedus et al. 2008; Pun et al. 2006).

- La diminution d'expression de la SCD1 est bénéfique pour une récupération fonctionnelle après lésion réversible du nerf sciatique (Schmitt Hussain et al. 2013). Cet effet bénéfique pourrait s'expliquer par une augmentation de la beta-oxydation (Dobrzyn et al. 2005; Dobrzyn et al. 2004; Ntambi et al. 2002), permettant une plus grande synthèse d'ATP et ainsi entretenir et restaurer la JNM *via* les récepteurs purinergiques post-synaptiques, P2Y et P2X. En effet, l'ATP module la sensibilité à l'acétyl-choline au niveau de la JNM et permet un réarrangement et un maintien des récepteurs cholinergiques dans cette région musculaire (Ling et al. 2004; Lu and Smith 1991; Tsim et al. 2003).
- Il faut également souligner que la beta-oxydation produit davantage d'ATP lorsqu'il s'agit de SFA plutôt que de MUFA, ce qui, là encore, pourrait concorder avec un effet bénéfique d'une baisse de la SCD1 (Biochemistry. 5th edition Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, 2002 ID: NBK22387). L'ATP pré- et post-synaptique influençant le maintien de la JNM et l'agrégation des récepteurs (Santos et al. 2003; Tsim et al. 2003), il se peut que les effets bénéfiques d'un maintien ou d'une récupération fonctionnelle de l'innervation passent par cette voie purinergique. De même, la baisse d'ATP musculaire chez les souris SOD1m (Dupuis et al. 2003) pourrait expliquer en partie la déstabilisation progressive de la JNM trouvée dans la maladie (Dupuis and Loeffler 2009; Fischer et al. 2004; Marcuzzo et al. 2011). Des études portant sur l'invalidation des récepteurs purinergiques P2X2 ont rapporté une déstabilisation de la JNM (Ryten et al. 2007), ce qui accroît le rôle potentiel de l'ATP et de ses récepteurs dans l'altération de la JNM retrouvé dans la SLA.
- La baisse de la SCD1 conduisant à une diminution du taux de cholestérol (Miyazaki et al. 2000), on peut également imaginer que la fluidité membranaire pourrait être en partie augmentée (Cooper 1978; Gleason et al. 1991; Pucadyil and Chattopadhyay 2006), ce qui favoriserait le réarrangement de la JNM.
- La baisse de la SCD1 permet de réduire le taux de MUFA présents, ce qui pourrait atténuer l'agrégation cytotoxique de la SOD1m décrite comme augmentée en présence de MUFA (Kim et al. 2005).

- De même une baisse de la SCD1 favoriserait la réponse UPR (Ariyama et al. 2010). Réponse UPR qui est augmentée au niveau des MN des souris SOD1m (Prell et al. 2012). Des études suggèrent qu'une baisse de la réponse UPR favoriserait l'accumulation de protéine SOD1m chez les souris SOD1m et qu'une stratégie thérapeutique passerait par une activation de cette réponse UPR (Wang et al. 2011).
- La baisse de la SCD1 permet une réduction de la concentration de céramide (Dobrzyn et al. 2005), dont la concentration dans la moelle épinière des souris SOD1m et des patients SLA est associée à la dégénérescence des MN (Cutler et al. 2002).

Effets secondaires indésirables ou néfastes d'une baisse de la SCD1

- La baisse de la SCD1 pourrait induire une inflammation par augmentation du niveau de SFA (Kadotani et al. 2009) ainsi qu'un stress du réticulum endoplasmique (Peter et al. 2009; Wei et al. 2006).
- Une lipotoxicité pourrait être induite suite à une baisse de la SCD1. La baisse d'activité enzymatique induirait une surconcentration de SFA, couramment impliquée dans la lipotoxicité cellulaire (Estadella et al. 2013).

IV) Apport de l'inhibition pharmacologique de la SCD1 dans la SLA

A l'heure actuelle, aucun traitement pharmacologique ne permet de soigner la SLA. Seul le riluzole permet de prolonger la vie des patients de quelques mois. Ainsi il est crucial de tester de nouveaux agents pharmacologiques pouvant améliorer la vie des patients voire prolonger la vie de ces derniers, ou encore guérir la SLA. Bien des molécules ont été testées, sur les bases des études scientifiques constatant des altérations génétiques, moléculaires ou physiologiques dans la pathologie. Dans ce

contexte, et au vu de nos travaux, nous avons engagé un traitement pharmacologique sur nos souris SOD1m, visant à réduire massivement l'activité de la SCD1. De même nous avons traité des souris SOD1m avec une alimentation enrichie en SFA, modifiant ainsi la biodisponibilité des MUFA.

La diminution systémique de l'activité de la SCD1 chez les souris SOD1m apporte des effets bénéfiques au niveau de l'axe neuro-musculaire. En effet, nos observations de l'état d'innervation ainsi que l'analyse du nombre de motoneurones présents dans la moelle épinière, montrent un effet bénéfique du traitement chez nos souris SOD1m. De même un apport de SFA permet une réduction de la perte des MN dans la corne ventrale de la moelle épinière. Les effets observés seraient associés à des modifications du profil lipidique des animaux, leurs permettant une meilleure utilisation de ces ressources tant d'un point de vue énergétique que structural ou de signalisation. Cependant ces résultats sont encore très préliminaires et demandent à être confirmés par des expériences complémentaires.

Conclusions et perspectives

Les résultats de ces travaux ont permis de mieux caractériser les altérations métaboliques constatées chez les souris SOD1m. Nous avons montré par nos études que les AG jouent un rôle prépondérant dans la pathologie, et ce grâce à leurs multiples actions, structurales, énergétiques, et signalétiques.

Rappelons ces différents points :

- Le profil d'AG est altéré dans les souris SOD1m.
- L'activité de la SCD1 influence le profil d'AG mais aussi les concentrations de TG et de cholestérol.
- La baisse d'expression musculaire de la SCD1 apparaît avant les premiers symptômes moteurs.
- Une diminution d'activité de la SCD1 est bénéfique pour une récupération fonctionnelle après lésion nerveuse.
- L'inhibition pharmacologique de l'activité de la SCD1 conduit à des effets bénéfiques sur l'axe moteur des souris SOD1m.

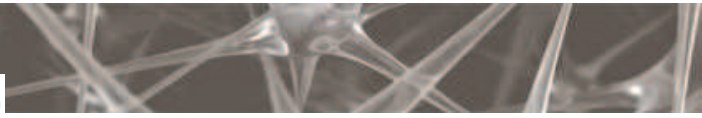
Les prochaines étapes envisagées pour la suite de ce projet reposent sur une amélioration du traitement pharmacologique, mais également sur la mise en place d'une invalidation ciblée de la SCD1 au niveau spécifique d'un tissu, notamment le muscle ou le foie. L'utilisation de vecteurs viraux pourrait permettre une invalidation locale, et cibler ainsi davantage les effets que l'on considère comme bénéfiques pour le traitement de la maladie. Il pourra également être envisagé une stratégie combinée d'invalidation locale de l'activité de la SCD1 associée à un apport énergétique complémentaire au niveau systémique, que l'on sait par ailleurs bénéfique pour l'allongement de la durée de vie des animaux. Il serait également intéressant d'étudier les effets trophiques musculaires engagés suite à une baisse d'activité de la SCD1. Par ailleurs la compréhension des mécanismes locaux, liés au métabolisme lipidique, pourrait permettre de concevoir un traitement thérapeutique visant à préserver l'innervation musculaire et ainsi prolonger la vie des animaux, et, à terme, celle des patients SLA.

ANNEXES :

Fatting the brain: a brief of recent research

Ghulam Hussain, Florent Schmitt, Jean-Philippe Loeffler and Jose Luis
Gonzalez_De_Aguilar

Soumis à Frontiers in Cellular Neuroscience



Fatting the brain: a brief of recent research

Ghulam Hussain, Florent Schmitt, Jean-Philippe Loeffler and Jose Luis Gonzalez_De_Aguilar

Journal Name:	Frontiers in Cellular Neuroscience
ISSN:	1662-5102
Article type:	Review Article
First received on:	27 May 2013
Revised on:	01 Aug 2013
Frontiers website link:	www.frontiersin.org

Abstract

Fatty acids are of paramount importance to all cells, since they provide energy, function as signaling molecules, and sustain structural integrity of cellular membranes. In the nervous system, where fatty acids are found in huge amounts, they participate in its development and maintenance throughout life. Growing evidence strongly indicates that fatty acids in their own right are also implicated in pathological conditions, including neurodegenerative diseases, mental disorders, stroke and trauma. In this review, we focus on recent studies that demonstrate the relationships between fatty acids and function and dysfunction of the nervous system. Fatty acids stimulate gene expression and neuronal activity, boost synaptogenesis and neurogenesis, and prevent neuroinflammation and apoptosis. By doing so, they promote brain development, ameliorate cognitive functions, serve as anti-depressants and anti-convulsants, bestow protection against traumatic insults and enhance repairing processes. On the other hand, unbalance between different fatty acid families or excess of some of them generate deleterious side effects, which limit the translatability of successful results in experimental settings into effective therapeutic strategies for humans. Despite these constraints, there exists realistic evidence to consider that nutritional therapies based on fatty acids can be of benefit to several currently incurable nervous system diseases.

Keywords

monounsaturated fatty acid, neurodegenerative disease, neurological disease, peripheral nerve, saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid

1. Introduction

Fatty acids represent a class of lipids that are crucial components of all mammalian cells. They display a variety of biological functions to maintain vital cellular processes at various levels. Thus, fatty acids provide energy, function as signaling molecules, and sustain structural integrity of cellular membranes. They are of particular importance for the nervous system for two major reasons. First, the nervous system possesses a very high concentration of fatty acids, second only to adipose tissue (Etschmaier et al., 2011). Second, these fatty acids participate actively both in the development of the nervous system during embryonic and early postnatal life, and in its maintenance throughout adulthood and natural aging (Uauy and Dangour, 2006; Rombaldi Bernardi et al., 2012). Along with these actions, currently incurable pathological conditions of the nervous system, including neurodegenerative diseases, mental disorders, stroke and trauma, involve deregulated contents of fatty acids. It is therefore believed that these changes contribute in their own right by as yet incompletely understood mechanisms to those pathological processes. In consequence, the roles of fatty acids in health and disease of the nervous system have been intensively investigated in the last few decades. In this piece of work, we focus mainly on studies published during the last five years to show the diversity in the fatty acids implicated in function and dysfunction of the nervous system. The detailed mechanisms of action of fatty acids at the molecular level are not treated in this article, since they are the subject of other recently published reviews (Georgiadi and Kersten, 2012; Yamashima, 2012).

2. Some aspects of the biochemistry of fatty acids

According to the IUPAC definition, fatty acids are "aliphatic monocarboxylic acids derived from or contained in esterified form in an animal or vegetable fat, oil or wax" (IUPAC, 1997). Naturally occurring fatty acids mostly consist of an unbranched 4-28 carbon chain that is usually composed of an even number of carbon atoms. On the basis of the carbon chain length, fatty acids are classified into short- (less than 6 carbon atoms), medium- (6-12 carbon atoms), long- (14-22 carbon atoms) and very long chain fatty acids (more than 22 carbon atoms). Fatty acids in which the aliphatic chain is fully composed of single bonds between carbon atoms are named as saturated fatty acids (SFAs), whereas fatty acids with one or more than one carbon-carbon double bond are called unsaturated fatty acids. Based on the number of double bonds, unsaturated fatty acids are further divided into mono- (MUFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (**Table 1**). Long chain SFAs have relatively high melting points that make them to appear solid at room temperature. Therefore, the body possesses a mechanism to introduce double bonds in the carbon chain, which lowers the melting point and permits functioning in a physiological environment. There are four fatty acid desaturases documented in humans that selectively catalyze the introduction of a double bond in different positions of the carbon chain. Δ -9 desaturase, also known as stearoyl-CoA desaturase (SCD), is charged with synthesizing MUFAs, mainly palmitoleic acid (16:1) and oleic acid (18:1), by introducing a double bond between carbon atoms 9 and 10 from the carboxylic acid end (**Figure 1**) (Enoch et al., 1976). Δ -4, Δ -5 and Δ -6 desaturases introduce a double bond at carbon positions 4, 5 and 6, respectively, and work cooperatively with elongases, which are responsible for the extension of the aliphatic chain. The combined actions of desaturases and elongases are implicated in the synthesis of PUFAs (Nakamura and Nara, 2004).

According to the position of the first double bond from the methyl end of the fatty acid chain, the most important PUFAs for humans can be divided into two families: n-6 and n-3 PUFAs. Linoleic acid (LA, 18:2 n-6) is the parent fatty acid of n-6 PUFAs, which produces principally arachidonic acid (AA, 20:4 n-6), whereas α -linolenic acid (ALA, 18:3 n-3) is the parent fatty

acid of n-3 PUFAs, which gives rise mainly to eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and subsequently docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3) (**Figure 1**). Both LA (18:2 n-6) and ALA (18:3 n-3) cannot be synthesized indigenously by the human body, so that they must be supplied with food, and such fatty acids are termed as essential fatty acids (Ruzickova et al., 2004; Lands, 2012). In spite of the fact that the body is able to metabolize these essential fatty acids, the efficiency of conversion is low. Hence, the availability not only of essential precursors but also of some of their metabolites, such as EPA (20:5 n-3) and DHA (22:6 n-3), greatly depends on dietary support (Brenna et al., 2009). Alternatively, PUFAs can also be made available by enzymatic processing of membrane phospholipids by phospholipases (Lee et al., 2011). Whatever pathway is involved, several PUFAs can be metabolized by cyclo-oxygenases, lipo-oxygenases or cytochrome P450 mono-oxygenases to produce other compounds with important biological functions. AA (20:4 n-6) and, to a lesser extent, EPA (20:5 n-3) are transformed into potent pro-inflammatory eicosanoids. Additionally, EPA (20:5 n-3) and DHA (22:6 n-3) generate opposing anti-inflammatory docosanoids, including resolvins and protectins such as neuroprotectin-D1 (NPD1) (Bazan, 2009) (**Figure 1**).

3. Evidence of the importance of fatty acids for health and disease of the nervous system

3.1. Fatty acids and brain development

Mother's own resources, via placenta and milk, provide most of the n-3 PUFAs necessary for brain development during fetal and early postnatal life. Due to this high demand of the developing nervous system in the progeny, maternal brain levels of DHA (22:6 n-3) exhaust during pregnancy and lactation period (Chen and Su, 2012). Thus, enhanced provision or adequate supply of n-3 PUFAs at these stages can yield positive effects on offspring brain development. For instance, increased expression of neuron specific enolase, glial fibrillary acidic protein and myelin basic protein was observed in pups from mice fed on n-3 PUFA enriched diet, administered from two months prior to mouse conception to end of lactation period (Tian et al., 2011). Similarly, postnatal supplementation of ALA (18:3 n-3), the parent precursor of n-3 PUFAs, enhanced cell proliferation and early neuronal differentiation, whilst its deprivation resulted in increased proportion of apoptosis in the dentate gyrus of unweaned pups. This ameliorating effect was offset by maternal ALA (18:3 n-3) deficiency during gestation period, suggesting that ALA (18:3 n-3) is not only required at postnatal stages but is also essential for fetal brain development (Niculescu et al., 2011). Importantly, such diets given at perinatal stages may have long lasting consequences in the adulthood. Thus, the abundance of n-3 PUFAs in the diet of pregnant females revealed essential for the development of the glutamatergic system and normal behavior performance in the adult offspring (Moreira et al., 2010a). Also, motor coordination was ameliorated in adulthood when rats were fed on DHA (22:6 n-3) and EPA (20:5 n-3) supplementation starting from gestation stage to postnatal age of 90 days (Coluccia et al., 2009). Finally, n-3 PUFA enriched diets also improved reference and working memory in offspring rats when supplied to mother at gestation stage (Chung et al., 2008).

Frequently, the impact of dietary fatty acids depends on a balance between different types. In a study to assess the effects of quality and quantity of several high fat diets, mice were nourished with various concentrations and types of fats mingled with normal chow. It was noticed that these diets not only modified the lipid profile in brain but also altered spatial memory and learning ability of the pups in a different manner (Yu et al., 2010). In another study, when mice were fed on diets supplemented with either SFAs or MUFAs, MUFAs promoted insulin sensitivity and cortical activity while SFAs did not (Sartorius et al., 2012). Lastly, it is

noteworthy that the intake of sufficient quantity of MUFAs prevented the age related deletion of mitochondrial DNA in the brain of aged animals (Ochoa et al., 2011).

3.2. Fatty acids and neurodegenerative disorders

The altered amounts of different classes of fatty acids in the nervous system may contribute positively or negatively to any given neuropathological process (**Table 2**). Using APP-C99-transfected COS-7 cells, a cellular model of Alzheimer's disease-like degeneration, a study was carried out to investigate the class of fatty acids that was thought to influence the production of A β peptide, which is a major neuropathological hallmark of disease. It was shown that palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), upstream n-3 PUFAs and AA (20:4 n-6) triggered higher secretion of A β peptide compared to long chain downstream n-3 PUFAs and MUFAs (Amtul et al., 2011a). These findings were corroborated *in vivo* by using a transgenic mouse model of early-onset Alzheimer's disease that expresses the double-mutant form of human APP, which is the precursor protein responsible for the synthesis of A β peptide. Decreased levels of A β peptide and less accumulation in the form of amyloid plaques were observed in the brain of mice nourished with a diet enriched in n-3 PUFAs, mainly DHA (22:6 n-3) (Amtul et al., 2011a). Not only extraneously supplied but endogenously synthesized n-3 PUFAs can suppress the synthesis of A β peptide and the formation of amyloid plaques. Lebbadi and co-workers (Lebbadi et al., 2011) crossed 3xTg-AD mice, a model of Alzheimer's disease, with transgenic mice expressing Δ -3 desaturase (Fat-1) from *Caenorhabditis elegans*, which endogenously converts n-6 PUFAs into n-3 PUFAs. It was observed that the double transgenic 3xTg-AD/Fat-1 mice had increased brain levels of DHA (22:6 n-3) and lower levels of A β peptide. Similarly, MUFAs, mainly oleic acid (18:1 n-9), were also shown to inhibit the production of A β peptide and amyloid plaques both *in vitro* and *in vivo* (Amtul et al., 2011b). In contrast, n-6 PUFAs, such as AA (20:4 n-6), aggravated Alzheimer's disease neuropathology, by increasing the synthesis of A β peptide (Amtul et al., 2012).

The results obtained in experimental models of Alzheimer's disease have been confirmed, at a certain extent, by studies performed on human brain. Thus, decreased levels of PUFAs and MUFAs, particularly DHA (22:6 n-3) and oleic acid (18:1 n-9), respectively, were observed in the brain of Alzheimer's disease patients (Martín et al., 2010). However, other studies reported that, although the abundance of DHA (22:6 n-3) varied highly among patients, the mean quantity of this PUFA did not differ significantly when compared to healthy brains (Fraser et al., 2010). This study also showed that levels of stearic acid (18:0) were reduced remarkably in frontal and temporal cortex, while those of oleic acid (18:1 n-9) were increased in both parts; also, levels of palmitic acid (16:0) appeared increased in the parietal cortex (Fraser et al., 2010). These *a priori* puzzling abnormalities in MUFAs could be a result of alterations in the expression of MUFA synthesizing genes. Thus, levels of MUFAs in hippocampus, frontal cortex and temporal cortex were elevated in Alzheimer's disease patients, as was the expression of the SCD isomers SCD1, SCD5a and SCD5b. In addition, the ratio of MUFAs to SFAs, an index of desaturase activity, was reported to be negatively correlated with the degree of cognitive performance (Astarita et al., 2011).

Less is known about the changes of fatty acids in other neurodegenerative conditions. Fabelo and co-workers (Fabelo et al., 2011) reported that lipid rafts from brain cortices of patients with Parkinson disease displayed significantly decreased levels of n-3 and n-6 PUFAs, particularly DHA (22:6 n-3) and AA (20:4 n-6), respectively, while SFAs, mainly palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0), were noted augmented, as compared to control subjects. In another study, the effects of diets rich in n-3 or n-6 PUFAs were assessed on cuprizone-induced experimental demyelination, an animal model for multiple sclerosis. It was observed

that n-3 PUFAs from various sources affected the pathological phenotype differently; for example, a diet containing n-3 PUFAs from salmon ameliorated the behavioral deficits induced by cuprizone, whereas a diet containing n-3 PUFAs from cod affected similarly as n-6 PUFA enriched or control diet did, suggesting that not only the type of PUFA but its origin is also to consider when prescribing a diet based remedy (Torkildsen et al., 2009). Contrasting these findings, other studies did not corroborate the protective effects of n-3 PUFAs against multiple sclerosis and concluded that neither n-3 nor n-6 PUFAs had any effect on disease progression or remedial influence (Wergeland et al., 2012). Moreover, dietary administration of EPA (20:5 n-3) even accelerated disease progression in mice expressing a mutated form of Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1), which is a model of neuromuscular degeneration as caused by amyotrophic lateral sclerosis (Yip et al., 2013).

3.3. Fatty acids and traumatic injury to the nervous system

Several recent studies have provided evidence that n-3 PUFAs can exert protection against neuronal injury triggered by hypoxia or ischemia. In neonates, these fatty acids protected neurons following hypoxia/ischemia by modulating the microglial inflammatory response through inhibition of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) dependent pathway (Zhang et al., 2010). However, it is important to mention that consistent increased intake of n-3 PUFAs can also affect adversely in some cases. In this respect, a diet rich in EPA (20:5 n-3) and DHA (22:6 n-3) enhanced the risk for intracerebral hemorrhagic stroke in rats, and caused oxidative damage to the brain, probably due to the fact that a high PUFA content increased the danger of lipid peroxidation. Alternatively, n-3 PUFA intake was reported to affect blood viscosity, vasoconstriction, platelet aggregation and blood clotting ultimately leading to hemorrhaging (Park et al., 2009).

There is also evidence that certain fatty acids have the potential to improve the recovery of the injured spinal cord. Hirakawa and co-workers (Hirakawa et al., 2010) reported that trans-2-decenoic acid ethyl ester, a medium-chain fatty acid derivative, increased the expression of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK1/2) in cultured cortical neurons and at the site of injury in a rat spinal cord injury model. Indeed, the administration of trans-2-decenoic acid ethyl ester ameliorated functional recovery and reduced lesion size in response to injury, by increasing the expression of ERK1/2, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and anti-apoptotic Bcl-2. Similarly, DHA (22:6 n-3) pre-treatment in an acute spinal cord injury model diminished the extent of functional deficits as compared to that observed in the control group, and this protective effect was associated with increased survival of precursor cells, sparing of white matter and axonal preservation (Figuerola et al., 2012; Lim et al., 2013b). In the same way, mice carrying the Fat-1 transgene for boosting endogenous synthesis of n-3 PUFAs showed better outcome after spinal cord injury (Lim et al., 2013a). Finally, in relation to diabetes, it was shown that the augmentation of epoxy-fatty acid resources, as obtained by inhibiting soluble epoxide hydrolase, resulted in a dose dependent anti-allodynic effect on neuropathic pain due to glucose toxicity (Inceoglu et al., 2012).

3.4. Fatty acids and neurological disorders

Particular changes in brain fatty acid composition appear to be intimately connected to a series of neurological diseases, as recently reported in several studies. Thus, Conklin and co-workers (Conklin et al., 2010) observed a reduction in the quantity of both saturated and unsaturated fatty acids of various types, including n-3 and n-6 PUFAs, in the cingulate cortex of depressive patients. Similar alternations in n-3 PUFAs, including EPA (20:5 n-3) and DHA (22:6 n-3), were also shown by others (Lin et al., 2010). In another study, it was noticed that the altered

concentrations of MUFAs and PUFAs were region-specific. In fact, no changes in n-3 and n-6 PUFAs were found in hippocampus and orbitofrontal cortex of patients with depression but concentrations of MUFAs, such as oleic acid (18:1 n-9), and SFAs, such as palmitic acid (16:0), appeared augmented (Hamazaki et al., 2012). A partial confirmation of these findings emerged from another study showing lowered expression of genes involved in PUFA and MUFA synthesis in the frontal cortex of depressed patients (McNamara and Liu, 2011). It is also noteworthy that lifelong n-3 PUFA deficiency perturbed normal endocannabinoid function in prelimbic prefrontal cortex and accumbens, and this effect was related to impaired emotional behavior (Lafourcade et al., 2011). Although less investigated, several studies also detected changes in fatty acids in patients with schizophrenia. A decrease in docosatetraenoic acid (22:4 n-6) was observed in the nuclei of the amygdala of these patients but other PUFAs, including DHA (22:6 n-3) and AA (20:4 n-6), remained unchanged (Hamazaki et al., 2010; 2012). Interestingly, the decrease in total membrane PUFAs found in erythrocytes of young patients with schizophrenia correlated with the degree of demyelination in brain white matter (Peters et al., 2009).

Lastly, several lines of evidence support the anticonvulsant effects of certain fatty acids in animal models of epileptogenesis, and the administration of PUFA enriched diets has been envisaged to treat epileptogenic convulsions. Using the pentylenetetrazol-induced epilepsy rat model, Porta and co-workers (Porta et al., 2009) showed that a PUFA containing diet increased the threshold level for pentylenetetrazol to induce convulsions. A contemporary study confirmed that rats nourished with n-3 PUFAs exhibited greater resistance to pentylenetetrazol-induced seizures (Taha et al., 2009). In the kindling model of epilepsy, intracerebroventricular injection of DHA (22:6 n-3), or its derivative NPD1, limited the progression in the hippocampus of the electrically induced neuronal hyperexcitability characteristic of seizures (Musto et al., 2011). In contrast, other studies did not corroborate these findings, since DHA (22:6 n-3) or EPA (20:5 n-3) showed neither anticonvulsant activity nor protection against pentylenetetrazol-induced seizures (Willis et al., 2009).

4. Cellular roles of fatty acids in the nervous system

4.1. Actions of fatty acids in the hippocampus

Many recent studies have investigated the implication of fatty acids in learning and memory processes occurring in the hippocampus (**Figure 2**). In general, n-3 PUFAs were shown to foster neuronal activity and hence counteract memory deficits. It is well known that increased c-Fos expression is an indicator of neuronal activity in response to extracellular signals like growth factors, and it is initiated when neurons fire action potentials. Commonly, the activity of c-Fos decreases as age extends and spatial memory goes off. Provision of n-3 PUFAs restored c-Fos expression in the hippocampus, and enhanced neuronal activity ultimately leading to the amelioration of memory deficits in aged mice (Labrousse et al., 2012). Dietary DHA (22:6 n-3) also enhanced the expression of F-ATPase involved in mitochondrial ATP synthesis in the CA1 region of the hippocampus, whereas its deficiency led to decreased glucose transporter expression and defective glucose transport in the cerebral cortex (Harbeby et al., 2012). The stimulatory action of n-3 PUFAs on gene expression also appears to affect neurotransmission. In fact, recent proteomics studies performed on mouse brain deficient in DHA (22:6 n-3) revealed a loss of synaptic proteins associated with altered synaptic transmission (Sidhu et al., 2011). In contrast, expression of vesicular glutamate transporters 1 and 2, which are implicated in glutamatergic neurotransmission, was increased in response to ALA (18:3 n-3) exposure (Blondeau et al., 2009). Similarly, DHA (22:6 n-3) provision to rats with traumatic brain injury enhanced learning ability, by modulating the expression levels of

synapsin-1, cAMP response element-binding protein-1 and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-2 in the hippocampus of treated animals (Wu et al., 2008; 2011). DHA (22:6 n-3) also ameliorated spatial memory in rats by increasing the expression of subtypes of endocannabinoid/endovanilloid receptors (Pan et al., 2011). Last, n-3 PUFAs augmented the expression of a series of transcription factors involved in learning and memory, including retinoic acid receptor, retinoic X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor (Dyall et al., 2010).

Many positive actions of DHA (22:6 n-3), and likely other n-3 PUFAs, may therefore converge to enhance synaptic transmission, and ameliorate spatial learning and memory (Connor et al., 2012). In a mouse model of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome, which is characterized by behavioral abnormalities, reduced aged hippocampal neurogenesis and loss of long-term potentiation (LTP), the dietary supplementation with n-3 PUFAs corrected LTP at synapses in the medial perforant pathway/dentate gyrus and enhanced the amount of adult-born neurons in the hippocampus (Crupi et al., 2012). Similarly, docosapentaenoic acid (DPA, 22:5 n-3) also ameliorated hippocampal function by attenuating the reduction in LTP in aged brain (Kelly et al., 2011). Finally, *in vitro* studies showed that treatment of differentiated PC12 cells with EPA (20:5 n-3) resulted in activation of the neuroprotective PI3-kinase/Akt signaling pathway, a mechanism that might account for the increase in LTP observed *in vivo* following EPA (20:5 n-3) treatment (Wu et al., 2008; Kawashima et al., 2010).

In Alzheimer's disease, A β peptide induces neuronal apoptosis through degradation of the adaptor protein insulin receptor substrate-1 in a c-Jun N-terminal kinase (JNK) dependent manner. An n-3 PUFA enriched diet prevented the phosphorylation of JNK, and ultimately protected neurons from death *in vitro* and improved cognitive deficit *in vivo* (Ma et al., 2009). Also, lower levels of phosphorylated tau protein and improved brain function were observed by crossing 3xTg-AD mice with Fat-1 expressing mice to enhance the endogenous production of n-3 PUFAs (Lebbadi et al., 2011). Nevertheless, it is noteworthy that 12/15-lipo-oxygenase adversely affected Alzheimer's disease pathology by synthesizing pro-inflammatory and pro-oxidant hydroperoxyacids resulting from the oxidation of PUFAs, so that genetic ablation of this enzyme ameliorated cognitive function (Yang et al., 2010).

Neuroinflammation is one of the distinctive features of aged or diseased brain, as demonstrated by the activation of glial cells and the increase in the expression of a variety of pro-inflammatory factors. In this respect, it was reported that n-3 PUFA provision restored spatial memory loss in aged animals by suppressing pro-inflammatory interleukin-1 β and reverting to normal the morphology of microglia and astrocytes in the hippocampus (Labrousse et al., 2012; Park et al., 2012). n-3 PUFAs also yielded protecting effects to neurons by blocking microglia activation in a transgenic mouse model of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome (Crupi et al., 2012). In the same way, DPA (22:5 n-3) inactivated microglia attenuating neuroinflammation and counteracting spatial learning deficit in aged brain (Kelly et al., 2011). Contrary to the protective effects of PUFAs, SFAs stimulated the secretion of pro-inflammatory cytokines and induced apoptosis in astrocytes. Particularly, palmitic acid (16:0), lauric acid (12:0) and stearic acid (18:0) triggered the secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 by engaging toll-like receptor-4 (TLR-4). Moreover, palmitic acid (16:0) also activated caspase-3 and modified the Bax/Bcl-2 ratio in these glial cells for apoptotic demise. Interestingly, these pro-inflammatory actions of SFAs could be reverted by n-3 PUFAs like DHA (22:6 n-3) (Gupta et al., 2012; Wang et al., 2012).

Another way by which n-3 PUFAs can afford neuroprotection is by preventing apoptosis. The mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, a neurodegenerative disease caused by

palmitoyl-protein thioesterase-1 (PPT1) deficiency, manifests enhanced endoplasmic reticulum- and oxidative stress that lead to apoptotic cell demise. In PPT1-deficient cells from such mice, intervention of n-3 PUFAs attenuated stress and repressed apoptotic death casting a protection to neuronal cells (Kim et al., 2010; Wu et al., 2011). Similarly, differentiated PC12 cells treated with EPA (20:5 n-3) showed lower rates of apoptosis and suppressed activity of the apoptotic effector caspase-3 (Boudrault et al., 2009; Kawashima et al., 2010). Conjugated linoleic acid (18:2 n-6) also protected neurons from mitochondrial dysfunction and demise. Treatment of cortical neurons with this fatty acid following excitotoxic glutamate exposure resulted in decreased glutamate-induced loss of mitochondrial function, increased Bcl-2 expression and prolonged neuronal survival (Hunt et al., 2010). In the same manner, administration of fish oil, that is a rich source of n-3 PUFAs, protected hippocampal neurons from diabetic insult by precluding the expression of apoptosis inducing genes in both CA1 region and cultured cells, and by increasing the expression of anti-apoptotic genes, such as Bcl-2 and Bcl-xL (Zhang and Bazan, 2010; Zhao et al., 2012). Together with caspase-3, ceramides, resulting from the hydrolysis of sphingomyelin by sphingomyelinase, are well-known apoptosis inducing factors. Treatment with DPA (22:5 n-3) inactivated sphingomyelinase and caspase-3 in the hippocampus of elderly rats (Kelly et al., 2011). On the other hand, n-3 PUFA withdrawal modulated the phosphorylation of glycogen-synthase kinase-3 β and ERK1/2, predisposing more hippocampal neurons to damage in an *in vitro* oxygen and glucose deprivation model of ischemia (Moreira et al., 2010b). Along with this, a decrease in the release of PUFAs from cell membranes in the rat hippocampus, as a result of reduced phospholipase-A2 activity, caused alterations in membrane fluidity that could account for loss of spatial memory and cognitive impairment in Alzheimer's disease (Schaeffer et al., 2011). However, the protective effects of n-3 PUFAs under certain conditions seemed to be limited to some of the members of this class of fatty acids. Thus, only DHA (22:6 n-3) offset the expression of AMPA receptors in the membrane of hippocampal neurons and attenuated neurotoxicity leading to improved cognitive function. Other members of the n-3 PUFA family, especially EPA (20:5 n-3), lacked such a protective effect against AMPA-mediated toxicity (Ménard et al., 2009).

Synaptogenesis is one of the mechanisms by which memory process takes place. Hence, the loss of synapses is characteristic of neurodegenerative conditions and aging. For instance, cortical or hippocampal neurons incubated with the neurotoxic prion-derived peptide PrP82-146, and pre-treated with DHA (22:6 n-3) or EPA (20:5 n-3), showed less loss of synaptophysin-1 and reduced accumulation of prion peptide (Bate et al., 2010). ALA (18:3 n-3) also stimulated the expression of genes involved in synaptic function, like VAMP-2, SNAP-25 and synaptophysin-1, that led to improved stability and physiology of synapses (Blondeau et al., 2009). Similarly, the chronic supplementation of n-3 PUFAs yielded anti-depressant effects by increasing the expression of synaptophysin-1 in the hippocampus (Venna et al., 2009). However, another study performed on SH-SY5Y cells reported that DHA (22:6 n-3) did not affect the neurotransmission machinery, as evaluated by the expression of synaptotagmin-1, syntaxin-1A, and synaptobrevin-1, although the release of noradrenaline by these cells was enhanced (Mathieu et al., 2010).

Hippocampal neurogenesis also contributes to learning and memory processes. The mouse model of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome typically exhibits age-dependent reduced hippocampal neurogenesis. Supplementation of diet with n-3 PUFAs to these mice enhanced the density of BrdU- and doublecortin positive cells in the hippocampus, suggesting an ongoing neurogenesis (Crupi et al., 2012). Similar neurogenesis enhancement was also reported in response to ALA (18:3 n-3) treatment (Blondeau et al., 2009). In addition, AA (20:4 n-6) even increased neurogenesis at postnatal stages when administered at gestation

period (Maekawa et al., 2009). Several *in vitro* studies revealed that not only n-3 PUFA precursors, such as EPA (20:5 n-3), but also naturally derived metabolites, including the neurotrophic N-docosahexaenylethanolamine, stimulated neurogenic differentiation of neural stem cells (Katakura et al., 2013; Rashid et al., 2013). The importance of the stimulatory role of PUFAs for neurogenesis is also illustrated by experiments reporting increased expression of fatty acid binding proteins (FABPs) in the ischemic hippocampus. FABPs are carriers of PUFAs in the cytoplasm, and their expression declines with age in association with reduced synaptic activity and other cellular functions. CA1 and dentate gyrus regions in the hippocampus showed augmented levels of FABP-5 and FABP-7 after ischemia, suggesting elevated transportation of PUFAs in these regions to restore cellular neurophysiology (Liu et al., 2010; Ma et al., 2010). More importantly, at post-ischemic stages, the subgranular zone in the dentate gyrus of the hippocampus, a niche of adult neurogenesis, displayed a concomitant increase in the neuronal expression of FABPs and the fatty acid receptor GPR40, representing compensatory processes of newborn cells (Boneva et al., 2011a; Boneva et al., 2011b; Yamashima, 2012). Finally, it is noteworthy that many of the beneficial actions of PUFAs on hippocampal function were associated with an increase in the production of BDNF, which is a member of the neurotrophin family of growth factors involved in supporting growth, differentiation and survival of neurons (Wu et al., 2008; 2011; Blondeau et al., 2009; Venna et al., 2009; Avraham et al., 2011; Vines et al., 2012).

4.2. Actions of fatty acids in the hypothalamus

The central regulation of energy balance involves a number of neuronal circuits in the hypothalamus that either exert anorexic actions or stimulate food intake. In this respect, it was recently shown that certain fatty acids could influence the control of energy homeostasis by the hypothalamus. In general, dietary supplementation with fish oil, rich in n-3 PUFAs, normalized several hypothalamic neurochemical systems in food restricted animals (Avraham et al., 2011). However, supplementation of diet with SFAs induced endoplasmic reticulum stress and expression of cytokines via TLR-4 signaling in the hypothalamus, and this effect resulted in resistance to anorexigenic signals (Milanski et al., 2009). At the cellular level, treating hypothalamic mHy-poE-44 cells with palmitic acid (16:0) increased the expression of the orexigenic neuropeptide-Y, suggesting that this fatty acid could enhance food intake (Fick et al., 2011). Moreover, palmitic acid (16:0) faded insulin signaling and enhanced endoplasmic reticulum stress and caspase-3 cleavage in the same cell line, which resulted in apoptosis in a JNK-dependent manner (Mayer and Belsham, 2010). In another study, exposure to palmitic acid (16:0) displayed no effects on insulin resistance and inflammatory process activation but corroborated the stimulation of endoplasmic reticulum stress and apoptosis, along with the activation of mitogen-activated protein kinase (Choi et al., 2010).

4.3. Actions of fatty acids in the nigrostriatal pathway

Growing evidence supports a link between the dietary intake of n-3 PUFAs and the function (or dysfunction) of the nigrostriatal pathway involved in the control of movement (**Figure 3**). This relationship was particularly investigated in a number of animal models of Parkinson disease, which is a neurodegenerative condition primarily characterized by the loss of dopaminergic neurons connecting the substantia nigra to the striatum. In several recent studies, n-3 PUFAs were shown to be beneficial by reverting disease phenotype. In the MPTP model of Parkinson disease, pre-treatment of mice with n-3 PUFAs bestowed protection by increasing the expression of BDNF and involving its TrkB receptor (Bousquet et al., 2009; Balanzá-Martínez et al., 2011). In other studies, it was found that exposure to the n-3 PUFA ethyl-eicosapentaenoate derivative lowered the expression of Bax and caspase-3, and enhanced

cortical dopamine levels (Bousquet et al., 2008; Meng et al., 2010). Furthermore, n-3 PUFAs also yielded protective influence indirectly, by attenuating inflammation-causing factors. These fatty acids targeted the NF κ B signaling pathway in microglia to suppress their over-activated response and hence protect dopaminergic neurons (Boudrault et al., 2009; Zhang et al., 2010; Ji et al., 2012; Zhou et al., 2012).

Other findings, however, did not support the beneficial effects of n-3 PUFAs on Parkinson disease. It was reported that treatment with ethyl-eicosapentaenoate, although minimized pro-inflammatory cytokines and yielded positive effects on procedural memory deficit, it was unable to preclude the loss of nigrostriatal dopamine in MPTP mice (Shchepinov et al., 2011; Luchtman et al., 2012). Similarly, the parkinsonian neurotoxin 6-hydroxydopamine caused lesions in the medial forebrain bundle of rats and motor deficits that remained unaffected by fish oil derived n-3 PUFAs (Delattre et al., 2010). A chronic intervention of a DHA (22:6 n-3) containing diet modified neither the number of cortical glial cells nor the expression of α -synuclein, which is typically involved in disease pathogenesis (Muntané et al., 2010). The use of different animal models of Parkinson disease and the different ways of treating these mice to counteract the pathological process may explain the observed discrepancies. In this respect, it is important to mention that some studies indicated even adverse effects of n-3 PUFAs on Parkinson disease pathogenesis. Indeed, the presence of DHA (22:6 n-3) augmented neuritic injury and astrogliosis in mice transgenic for a Parkinson disease causing mutation in human α -synuclein. In addition, DHA (22:6 n-3) triggered oligomerisation of α -synuclein, through the activation of retinoic X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2. Interestingly, its withdrawal from diet was found to be beneficial against the deleterious effects caused by its provision (Yakunin et al., 2012). Finally, structural and conformational modifications in α -synuclein leading to pathological aggregation were brought by DHA (22:6 n-3) (De Franceschi et al., 2009; 2011; Bousquet et al., 2011).

4.4. Actions of fatty acids in the peripheral nerves

A subset of peripheral sensory neurons expresses transient receptor potential cation channel-A1 (TRPA1), which is involved in pain and neurogenic inflammation. TRPA1 is a target for a variety of noxious and inflammatory irritant substances. In addition, it was found that n-3 PUFAs could act as a ligand for TRPA1 to excite sensory neurons and hence regulate their responses *in vivo* (Motter and Ahern, 2012). Transient receptor potential vanilloid cation channel-1 (TRPV1), which is another member of the family, is also found mainly in nociceptive neurons of the peripheral nervous system, where they are involved in transmission and modulation of pain. In this respect, it was shown that NPD1, which has anti-inflammatory properties, inhibited TRPV1 currents induced by capsaicin in dorsal root ganglion neurons, and modulated TRPV1/TNF- α -mediated synaptic plasticity in the spinal cord, suggesting a novel analgesic role (Park et al., 2011). The effects of fatty acids on sensory neurons go beyond receptor signaling. Both n-6 and n-3 PUFAs promoted neurite outgrowth in sensory neurons from dorsal root ganglia of embryos but also adult and aged animals (Robson et al., 2010). Enhanced levels of endogenously synthesized n-3 PUFAs also bestowed beneficial effects in various aspects. Thus, dorsal root ganglion neurons from Fat-1 expressing mice exhibited more resistance to hypoxia and mechanical injury as compared to neurons from wild-type littermates. Furthermore, Fat-1 expressing mice showed better functional recovery after sciatic nerve crush. The increased endogenous levels of n-3 PUFAs reduced the expression of the stress sensor activating transcription factor-3 in dorsal root ganglion neurons, and diminished muscle atrophy (Gladman et al., 2012). Similarly, our own studies also reported that the down-regulation of SCD1, which is in charge of the production of MUFAs such as oleic acid (18:1), triggered accelerated motor function recovery after sciatic nerve crush, providing evidence for

a new role of this fatty acid desaturase in modulating the restorative potential of the neuromuscular axis (Hussain et al., 2013).

The retina possesses a high concentration of n-3 PUFAs, particularly DHA (22:6 n-3). Many studies have shown that this fatty acid not only has a structural function but also protects visual neurons from trauma and disease. Recently, it was noticed that the retinal dysfunction induced by diabetes could be recovered to some extent by supplementing DHA (22:6 n-3) extraneously. In fact, diabetes resulted in reduced levels of n-3 PUFAs, by affecting n-3 fatty acid desaturase enzymatic activity, so that the provision of a DHA (22:6 n-3) enriched diet prevented dysfunction of rods and ameliorated vision (Yee et al., 2010). Also, n-3 PUFA derived NPD1, together with pigment epithelial-derived growth factor, promoted corneal nerve regeneration in a rat model of surgical injury (Cortina et al., 2010; 2012; Kenchegowda et al., 2013). However, other studies rather obtained contradictory results. Therefore, augmented levels of DHA (22:6 n-3) bestowed no protection against retinal degeneration in mice carrying a disease-causing VPP rhodopsin mutation and expressing Fat-1 (Li et al., 2009; 2010). In the same way, it was also reported that high levels of DHA (22:6 n-3) in the retina could generate oxidative stress, instead of protection, and hence enhance the susceptibility to degeneration (Tanito et al., 2009).

5. Conclusion

The biological functions of fatty acids have been investigated intensively during these last years, due to their active involvement in the physiology of both central and peripheral nervous system. They promote brain development, ameliorate cognitive functions in normal and diseased conditions, serve as anti-depressants and anti-convulsants, bestow protection against traumatic insults, and elevate repairing processes. At the cellular level, fatty acids stimulate gene expression and neuronal activity, and boost synaptogenesis and neurogenesis while preventing from neuroinflammatory toxicity and apoptosis (**Figure 2**). Although the demand for fatty acids in a healthy body applies to any of them, it can be said that, in general, excess of SFAs and, to some extent, n-6 PUFAs brings about negative consequences, whereas MUFAs and n-3 PUFAs are endowed with rather beneficial properties. In this respect, the ratio of n-6 to n-3 PUFAs is of especial interest. It has been postulated that a relatively constant n-6:n-3 ratio of about 1:1 constituted a major breakthrough in the expansion of grey matter in the cerebral cortex of modern human beings (Bradbury, 2011). In the brain, the preservation of an optimal n-6:n-3 ratio is crucial to the maintenance of the variety of the cellular processes in which PUFAs participate (Luchtman and Song, 2013). During the last century, however, the n-6:n-3 ratio has dramatically increased up to 20-25:1, particularly in Western societies, because of a high consumption of n-6 PUFAs to the detriment of n-3 PUFA intake (Simopoulos, 2011). Once the equilibrium is broken, an excessively high n-6:n-3 ratio would impair normal brain function and, importantly, predispose to disease (Palacios-Pelaez et al., 2010). According to what we have exposed herein, a huge amount of studies have shown the good and the bad side of different fatty acids in many experimental models of trauma and disease. Nevertheless, the diversity in modeling any given physiopathological condition, together with differences in time, dose and type of fatty acid used to counteract the insult, certainly account for a number of conflicting results concerning the nature of the observed effects. In addition, it must be taken into consideration that particular fatty acids are assumed to foster neuroprotection but engender indeed a series of collateral deleterious actions, such as increasing oxidative stress susceptibility or favoring neurodegenerative protein aggregation, which may preclude the use of these fatty acids under certain (pathological) conditions (**Figure 3**). Finally, it is also noteworthy that, frequently, studies used nutritional approaches consisting in giving a specific fatty acid or its precursor mixed with others and forming part of foods relatively more complex

than desired, since they also contain other substances with potential, uncontrolled positive or negative effects. Taken together, these drawbacks limit the translatability of successful results in terms of neuroprotection obtained in animal experiments into effective therapeutic interventions in humans. Numerous epidemiological studies have put fatty acids forward as key factors contributing to neuropathology but, in some cases, discrepant concentrations of fatty acids were reported in the corresponding diseased brain regions (**Table 2**). Despite these constraints, on the basis of these epidemiological studies and supported by experimental research, there is quite realistic evidence to envisage that nutritional therapies based on fatty acids can be of benefit to several neurodegenerative and neurological diseases, such as age-related macular degeneration, cognitive decline, depression and some related behavioral disorders (Prior and Fernandes Galduroz, 2012; Schleicher et al., 2013). More research is needed now for arriving at the final and conclusive result concerning the type of fatty acid, number of double bonds, origin, particular stage and proper concentration to achieve beneficial therapeutic potential against otherwise incurable diseases.

Acknowledgements

This work was supported by funds from European Community's Health Seventh Framework Programme under grant agreement No. 259867, and Thierry Latran Foundation to J.P.L.; and "Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres Maladies du Motoneurone" to J.L.G.D.A. G.H. is supported by the Higher Education Commission of the Pakistani government and "Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de Lutte contre les Maladies Neurodégénératives" (AREMANE). F.S. is granted by "Association Française contre les Myopathies" and AREMANE. J.L.G.D.A. is recipient of a "Chaire d'Excellence INSERM/Université de Strasbourg".

References

- Amtul, Z., Uhrig, M., Rozmahel, R. F., and Beyreuther, K. (2011a). Structural insight into the differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on the production of Abeta peptides and amyloid plaques. *J. Biol. Chem.* 286, 6100–6107.
- Amtul, Z., Uhrig, M., Wang, L., Rozmahel, R. F., and Beyreuther, K. (2012). Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease: structural insight. *Neurobiol. Aging* 33, 831.e21–31.
- Amtul, Z., Westaway, D., Cechetto, D. F., and Rozmahel, R. F. (2011b). Oleic acid ameliorates amyloidosis in cellular and mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 21, 321–329.
- Astarita, G., Jung, K.-M., Vasilevko, V., Dipatrizio, N. V, Martin, S. K., Cribbs, D. H., Head, E., Cotman, C. W., and Piomelli, D. (2011). Elevated stearoyl-CoA desaturase in brains of patients with Alzheimer's disease. *PLoS One* 6, e24777.
- Avraham, Y., Saidian, M., Burston, J. J., Mevorach, R., Vorobiev, L., Magen, I., Kunkes, E., Borges, B., Lichtman, A. H., and Berry, E. M. (2011). Fish oil promotes survival and protects against cognitive decline in severely undernourished mice by normalizing satiety signals. *J. Nutr. Biochem.* 22, 766–776.

- Balanzá-Martínez, V., Fries, G. R., Colpo, G. D., Silveira, P. P., Portella, A. K., Tabarés-Seisdedos, R., and Kapczinski, F. (2011). Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder. *Expert Rev. Neurother.* 11, 1029–1047.
- Bate, C., Tayebi, M., Salmona, M., Diomedea, L., and Williams, A. (2010). Polyunsaturated fatty acids protect against prion-mediated synapse damage in vitro. *Neurotox. Res.* 17, 203–214.
- Bazan, N. G. (2009). Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 205–211.
- Blondeau, N., Nguemini, C., Debruyne, D. N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R. H., Plumier, J.-C., et al. (2009). Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. *Neuropsychopharmacology* 34, 2548–2559.
- Boneva, N. B., Kaplamadzhiev, D. B., Sahara, S., Kikuchi, H., Pyko, I. V., Kikuchi, M., Tonchev, A. B., and Yamashima, T. (2011a). Expression of fatty acid-binding proteins in adult hippocampal neurogenic niche of postischemic monkeys. *Hippocampus* 21, 162–171.
- Boneva, N. B., Kikuchi, M., Minabe, Y., and Yamashima, T. (2011b). Neuroprotective and ameliorative actions of polyunsaturated fatty acids against neuronal diseases: implication of fatty acid-binding proteins (FABP) and G protein-coupled receptor 40 (GPR40) in adult neurogenesis. *J. Pharmacol. Sci.* 116, 163–172.
- Boudrault, C., Bazinet, R. P., and Ma, D. W. L. (2009). Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* 20, 1–10.
- Bousquet, M., Calon, F., and Cicchetti, F. (2011). Impact of ω -3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing Res. Rev.* 10, 453–63.
- Bousquet, M., Gibrat, C., Saint-Pierre, M., Julien, C., Calon, F., and Cicchetti, F. (2009). Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 1401–1408.
- Bousquet, M., Saint-Pierre, M., Julien, C., Salem, N., Cicchetti, F., and Calon, F. (2008). Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 22, 1213–1225.
- Bradbury, J. (2011). Docosahexaenoic acid (DHA): an ancient nutrient for the modern human brain. *Nutrients* 3, 529–554.
- Brenna, J. T., Salem, N., Sinclair, A. J., and Cunnane, S. C. (2009). alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 80, 85–91.

- Chen, H.-F., and Su, H.-M. (2012). Fish oil supplementation of maternal rats on an n-3 fatty acid-deficient diet prevents depletion of maternal brain regional docosahexaenoic acid levels and has a postpartum anxiolytic effect. *J. Nutr. Biochem.* 23, 299–305.
- Choi, S. J., Kim, F., Schwartz, M. W., and Wisse, B. E. (2010). Cultured hypothalamic neurons are resistant to inflammation and insulin resistance induced by saturated fatty acids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E1122–E1130.
- Chung, W.-L., Chen, J.-J., and Su, H.-M. (2008). Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *J. Nutr.* 138, 1165–1171.
- Coluccia, A., Borracci, P., Renna, G., Giustino, A., Latronico, T., Riccio, P., and Carratù, M. R. (2009). Developmental omega-3 supplementation improves motor skills in juvenile-adult rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 599–605.
- Conklin, S. M., Runyan, C. A., Leonard, S., Reddy, R. D., Muldoon, M. F., and Yao, J. K. (2010). Age-related changes of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in the anterior cingulate cortex of individuals with major depressive disorder. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 82, 111–119.
- Connor, S., Tenorio, G., Clandinin, M. T., and Sauvé, Y. (2012). DHA supplementation enhances high-frequency, stimulation-induced synaptic transmission in mouse hippocampus. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 37, 880–887.
- Cortina, M. S., He, J., Li, N., Bazan, N. G., and Bazan, H. E. P. (2010). Neuroprotectin D1 synthesis and corneal nerve regeneration after experimental surgery and treatment with PEDF plus DHA. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 804–810.
- Cortina, M. S., He, J., Li, N., Bazan, N. G., and Bazan, H. E. P. (2012). Recovery of corneal sensitivity, calcitonin gene-related peptide-positive nerves, and increased wound healing induced by pigment epithelial-derived factor plus docosahexaenoic acid after experimental surgery. *Arch. Ophthalmol.* 130, 76–83.
- Crupi, R., Cambiaghi, M., Deckelbaum, R., Hansen, I., Mindes, J., Spina, E., and Battaglia, F. (2012). n-3 fatty acids prevent impairment of neurogenesis and synaptic plasticity in B-cell activating factor (BAFF) transgenic mice. *Prev. Med.* 54 Suppl, S103–S108.
- Delattre, A. M., Kiss, A., Szawka, R. E., Anselmo-Franci, J. a, Bagatini, P. B., Xavier, L. L., Rigon, P., Achaval, M., Iagher, F., De David, C., et al. (2010). Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Neurosci. Res.* 66, 256–264.
- Dyall, S. C., Michael, G. J., and Michael-Titus, A. T. (2010). Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J. Neurosci. Res.* 88, 2091–2102.
- Enoch, H. G., Catala, A., and Strittmatter, P. (1976). Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J. Biol. Chem.* 251, 5095–5103.

- Etschmaier, K., Becker, T., Eichmann, T. O., Schweinzer, C., Scholler, M., Tam-Amersdorfer, C., Poeckl, M., Schuligoi, R., Kober, A., Chirackal Manavalan, A. P., et al. (2011). Adipose triglyceride lipase affects triacylglycerol metabolism at brain barriers. *J. Neurochem.* 119, 1016–1028.
- Fabelo, N., Martín, V., Santpere, G., Marín, R., Torrent, L., Ferrer, I., and Díaz, M. (2011). Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol. Med.* 17, 1107–1118.
- Fick, L. J., Fick, G. H., and Belsham, D. D. (2011). Palmitate alters the rhythmic expression of molecular clock genes and orexigenic neuropeptide Y mRNA levels within immortalized, hypothalamic neurons. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 413, 414–419.
- Figuroa, J. D., Cordero, K., Baldeosingh, K., Torrado, A. I., Walker, R. L., Miranda, J. D., and Leon, M. De (2012). Docosahexaenoic acid pretreatment confers protection and functional improvements after acute spinal cord injury in adult rats. *J. Neurotrauma* 29, 551–566.
- De Franceschi, G., Frare, E., Bubacco, L., Mammi, S., Fontana, A., and De Laureto, P. P. (2009). Molecular insights into the interaction between alpha-synuclein and docosahexaenoic acid. *J. Mol. Biol.* 394, 94–107.
- De Franceschi, G., Frare, E., Pivato, M., Relini, A., Penco, A., Greggio, E., Bubacco, L., Fontana, A., and De Laureto, P. P. (2011). Structural and morphological characterization of aggregated species of α -synuclein induced by docosahexaenoic acid. *J. Biol. Chem.* 286, 22262–22274.
- Fraser, T., Tayler, H., and Love, S. (2010). Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 35, 503–513.
- Georgiadi, A., and Kersten, S. (2012). Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv. Nutr.* 3; 127–134.
- Gladman, S. J., Huang, W., Lim, S.-N., Dyall, S. C., Boddy, S., Kang, J. X., Knight, M. M., Priestley, J. V, and Michael-Titus, A. T. (2012). Improved outcome after peripheral nerve injury in mice with increased levels of endogenous ω -3 polyunsaturated fatty acids. *J. Neurosci.* 32, 563–571.
- Gupta, S., Knight, A. G., Gupta, S., Keller, J. N., and Bruce-Keller, A. J. (2012). Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J. Neurochem.* 120, 1060–1071.
- Hamazaki, K., Choi, K. H., and Kim, H.-Y. (2010). Phospholipid profile in the postmortem hippocampus of patients with schizophrenia and bipolar disorder: no changes in docosahexaenoic acid species. *J. Psychiatr. Res.* 44, 688–693.
- Hamazaki, K., Hamazaki, T., and Inadera, H. (2012). Fatty acid composition in the postmortem amygdala of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *J. Psychiatr. Res.* 46, 1024–1028.

- Harbeby, E., Jouin, M., Alessandri, J.-M., Lallemand, M.-S., Linard, A., Lavialle, M., Huertas, A., Cunnane, S. C., and Guesnet, P. (2012). n-3 PUFA status affects expression of genes involved in neuroenergetics differently in the fronto-parietal cortex compared to the CA1 area of the hippocampus: effect of rest and neuronal activation in the rat. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 86, 211–220.
- Hirakawa, A., Shimizu, K., Fukumitsu, H., Soumiya, H., Iinuma, M., and Furukawa, S. (2010). 2-Decenoic acid ethyl ester, a derivative of unsaturated medium-chain fatty acids, facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. *Neuroscience* 171, 1377–85.
- Hunt, W. T., Kamboj, A., Anderson, H. D., and Anderson, C. M. (2010). Protection of cortical neurons from excitotoxicity by conjugated linoleic acid. *J. Neurochem.* 115, 123–130.
- Hussain, G., Schmitt, F., Henriques, A., Lequeu, T., Rene, F., Bindler, F., Dirrig-Grosch, S., Oudart, H., Palamiuc, L., Metz-Boutigue, M. H., et al. (2013). Systemic down-regulation of delta-9 desaturase promotes muscle oxidative metabolism and accelerates muscle function recovery following nerve injury. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0064525.
- Inceoglu, B., Wagner, K. M., Yang, J., Bettaieb, A., Schebb, N. H., Hwang, S. H., Morisseau, C., Haj, F. G., and Hammock, B. D. (2012). Acute augmentation of epoxygenated fatty acid levels rapidly reduces pain-related behavior in a rat model of type I diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11390–11395.
- IUPAC. (1997). *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Ji, A., Diao, H., Wang, X., Yang, R., Zhang, J., Luo, W., Cao, R., Cao, Z., Wang, F., and Cai, T. (2012). N-3 Polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats. *Neurotoxicology* 33, 780–788.
- Katakura, M., Hashimoto, M., Okui, T., Shahdat, H. M., Matsuzaki, K., and Shido, O. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids enhance neuronal differentiation in cultured rat neural stem cells. *Stem Cells Int.* 2013, 490476.
- Kawashima, A., Harada, T., Kami, H., Yano, T., Imada, K., and Mizuguchi, K. (2010). Effects of eicosapentaenoic acid on synaptic plasticity, fatty acid profile and phosphoinositide 3-kinase signaling in rat hippocampus and differentiated PC12 cells. *J. Nutr. Biochem.* 21, 268–277.
- Kelly, L., Grehan, B., Chiesa, A. Della, O'Mara, S. M., Downer, E., Sahyoun, G., Massey, K. a, Nicolaou, A., and Lynch, M. A. (2011). The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. *Neurobiol. Aging* 32, 2318.e1–15.
- Kenchegowda, S., He, J., and Bazan, H. E. P. (2013). Involvement of pigment epithelium-derived factor, docosahexaenoic acid and neuroprotectin D1 in corneal inflammation and nerve integrity after refractive surgery. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 88, 27–31.

- Kim, S.-J., Zhang, Z., Saha, A., Sarkar, C., Zhao, Z., Xu, Y., and Mukherjee, A. B. (2010). Omega-3 and omega-6 fatty acids suppress ER- and oxidative stress in cultured neurons and neuronal progenitor cells from mice lacking PPT1. *Neurosci. Lett.* 479, 292–296.
- Labrousse, V. F., Nadjar, A., Joffre, C., Costes, L., Aubert, A., Grégoire, S., Bretillon, L., and Layé, S. (2012). Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* 7, e36861.
- Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., De Smedt-Peyrusse, V., Labrousse, V. F., Bretillon, L., Matute, C., et al. (2011). Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat. Neurosci.* 14, 345–350.
- Lands, B. (2012). Consequences of essential fatty acids. *Nutrients* 4, 1338–1357.
- Lebbadi, M., Julien, C., Phivilay, A., Tremblay, C., Emond, V., Kang, J. X., and Calon, F. (2011). Endogenous conversion of omega-6 into omega-3 fatty acids improves neuropathology in an animal model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 27, 853–869.
- Lee, J. C.-M., Simonyi, A., Sun, A. Y., and Sun, G. Y. (2011). Phospholipases A2 and neural membrane dynamics: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 116, 813–819.
- Li, F., Marchette, L. D., Brush, R. S., Elliott, M. H., Davis, K. R., Anderson, A. G., and Anderson, R. E. (2010). High levels of retinal docosahexaenoic acid do not protect photoreceptor degeneration in VPP transgenic mice. *Mol. Vis.* 16, 1669–1679.
- Li, F., Marchette, L. D., Brush, R. S., Elliott, M. H., Le, Y.-Z., Henry, K. a, Anderson, A. G., Zhao, C., Sun, X., Zhang, K., et al. (2009). DHA does not protect ELOVL4 transgenic mice from retinal degeneration. *Mol. Vis.* 15, 1185–1193.
- Lim, S.-N., Gladman, S. J., Dyall, S. C., Patel, U., Virani, N., Kang, J. X., Priestley, J. V., and Michael-Titus, A. T. (2013a). Transgenic mice with high endogenous omega-3 fatty acids are protected from spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 51, 104–112.
- Lim, S.-N., Huang, W., Hall, J. C. E., Michael-Titus, A. T., and Priestley, J. V. (2013b). Improved outcome after spinal cord compression injury in mice treated with docosahexaenoic acid. *Exp. Neurol.* 239, 13–27.
- Lin, P.-Y., Huang, S.-Y., and Su, K.-P. (2010). A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. *Biol. Psychiatry* 68, 140–147.
- Liu, R.-Z., Mita, R., Beaulieu, M., Gao, Z., and Godbout, R. (2010). Fatty acid binding proteins in brain development and disease. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1229–1239.
- Luchtman, D. W., Meng, Q., and Song, C. (2012). Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 226, 386–396.

- Luchtman, D. W., and Song, C. (2013). Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from childhood to old age: findings from animal and clinical studies. *Neuropharmacology* 64, 550–565.
- Ma, D., Zhang, M., Mori, Y., Yao, C., Larsen, C. P., Yamashima, T., and Zhou, L. (2010). Cellular localization of epidermal-type and brain-type fatty acid-binding proteins in adult hippocampus and their response to cerebral ischemia. *Hippocampus* 20, 811–819.
- Ma, Q.-L., Yang, F., Rosario, E. R., Ubeda, O. J., Beech, W., Gant, D. J., Chen, P. P., Hudspeth, B., Chen, C., Zhao, Y., et al. (2009). Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J. Neurosci.* 29, 9078–9089.
- Maekawa, M., Takashima, N., Matsumata, M., Ikegami, S., Kontani, M., Hara, Y., Kawashima, H., Owada, Y., Kiso, Y., Yoshikawa, T., et al. (2009). Arachidonic acid drives postnatal neurogenesis and elicits a beneficial effect on prepulse inhibition, a biological trait of psychiatric illnesses. *PLoS One* 4, e5085.
- Martín, V., Fabelo, N., Santpere, G., Puig, B., Marín, R., Ferrer, I., and Díaz, M. (2010). Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J. Alzheimers Dis.* 19, 489–502.
- Mathieu, G., Géraldine, M., Denis, S., Stéphanie, D., Langelier, B., Bénédicte, L., Denis, I., Isabelle, D., Lavialle, M., Monique, L., et al. (2010). DHA enhances the noradrenaline release by SH-SY5Y cells. *Neurochem. Int.* 56, 94–100.
- Mayer, C. M., and Belsham, D. D. (2010). Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 151, 576–85.
- McNamara, R. K., and Liu, Y. (2011). Reduced expression of fatty acid biosynthesis genes in the prefrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J. Affect. Disord.* 129, 359–363.
- Ménard, C., Patenaude, C., Gagné, A.-M., and Massicotte, G. (2009). AMPA receptor-mediated cell death is reduced by docosahexaenoic acid but not by eicosapentaenoic acid in area CA1 of hippocampal slice cultures. *J. Neurosci. Res.* 87, 876–886.
- Meng, Q., Luchtman, D. W., El Bahh, B., Zidichouski, J. a, Yang, J., and Song, C. (2010). Ethyl-eicosapentaenoate modulates changes in neurochemistry and brain lipids induced by parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium in mouse brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 649, 127–134.
- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D. E., Tsukumo, D. M. L., Anhe, G., Amaral, M. E., Takahashi, H. K., et al. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci.* 29, 359–370.

- Moreira, J. D., Knorr, L., Ganzella, M., Thomazi, A. P., De Souza, C. G., De Souza, D. G., Pitta, C. F., Mello e Souza, T., Wofchuk, S., Elisabetsky, E., et al. (2010a). Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: relevance for behavior alterations. *Neurochem. Int.* 56, 753–759.
- Moreira, J. D., Knorr, L., Thomazi, A. P., Simão, F., Battú, C., Osés, J. P., Gottfried, C., Wofchuk, S., Salbego, C., Souza, D. O., et al. (2010b). Dietary omega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats. *J. Nutr. Biochem.* 21, 351–356.
- Motter, A. L., and Ahern, G. P. (2012). TRPA1 is a polyunsaturated fatty acid sensor in mammals. *PLoS One* 7, e38439.
- Muntané, G., Janué, A., Fernandez, N., Odena, M. A., Oliveira, E., Boluda, S., Portero-Otin, M., Naudí, A., Boada, J., Pamplona, R., et al. (2010). Modification of brain lipids but not phenotype in alpha-synucleinopathy transgenic mice by long-term dietary n-3 fatty acids. *Neurochem. Int.* 56, 318–328.
- Musto, A. E., Gjørstrup, P., and Bazan, N. G. (2011). The omega-3 fatty acid-derived neuroprotectin D1 limits hippocampal hyperexcitability and seizure susceptibility in kindling epileptogenesis. *Epilepsia* 52, 1601–1608.
- Nakamura, M. T., and Nara, T. Y. (2004). Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 345–376.
- Niculescu, M. D., Lupu, D. S., and Craciunescu, C. N. (2011). Maternal α -linolenic acid availability during gestation and lactation alters the postnatal hippocampal development in the mouse offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 795–802.
- Ochoa, J. J., Pamplona, R., Ramirez-Tortosa, M. C., Granados-Principal, S., Perez-Lopez, P., Naudí, A., Portero-Otin, M., López-Frías, M., Battino, M., and Quiles, J. L. (2011). Age-related changes in brain mitochondrial DNA deletion and oxidative stress are differentially modulated by dietary fat type and coenzyme Q₁₀. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1053–1064.
- Palacios-Pelaez, R., Lukiw, W. J., Bazan, N. G. (2010). Omega-3 essential fatty acids modulate initiation and progression of neurodegenerative disease. *Mol. Neurobiol.* 41, 367–374.
- Pan, J.-P., Zhang, H.-Q., Wei-Wang, Guo, Y.-F., Na-Xiao, Cao, X.-H., and Liu, L.-J. (2011). Some subtypes of endocannabinoid/endovanilloid receptors mediate docosahexaenoic acid-induced enhanced spatial memory in rats. *Brain Res.* 1412, 18–27.
- Park, C.-K., Lü, N., Xu, Z.-Z., Liu, T., Serhan, C. N., and Ji, R.-R. (2011). Resolving TRPV1- and TNF- α -mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *J. Neurosci.* 31, 15072–15085.
- Park, Y., Moon, H.-J., and Kim, S.-H. (2012). N-3 polyunsaturated fatty acid consumption produces neurobiological effects associated with prevention of depression in rats after the forced swimming test. *J. Nutr. Biochem.* 23, 924–928.

- Park, Y., Nam, S., Yi, H.-J., Hong, H.-J., and Lee, M. (2009). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase oxidative stress in rats with intracerebral hemorrhagic stroke. *Nutr. Res.* 29, 812–818.
- Peters, B. D., Duran, M., Vlieger, E. J., Majoie, C. B., Den Heeten, G. J., Linszen, D. H., and De Haan, L. (2009). Polyunsaturated fatty acids and brain white matter anisotropy in recent-onset schizophrenia: a preliminary study. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 61–63.
- Porta, N., Bourgois, B., Galabert, C., Lecointe, C., Cappy, P., Bordet, R., Vallée, L., and Auvin, S. (2009). Anticonvulsant effects of linolenic acid are unrelated to brain phospholipid cell membrane compositions. *Epilepsia* 50, 65–71.
- Prior, P. L., and Galduróz, J. C. (2012). (N-3) Fatty acids: molecular role and clinical uses in psychiatric disorders. *Adv. Nutr.* 3, 257–265.
- Rashid, M. A., Katakura, M., Kharebava, G., Kevala, K., Kim, H. Y. (2013). N-Docosahexaenoyl ethanolamine is a potent neurogenic factor for neural stem cell differentiation. *J. Neurochem.* 125, 869–884.
- Robson, L. G., Dyall, S., Sidloff, D., and Michael-Titus, A. T. (2010). Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase the neurite outgrowth of rat sensory neurones throughout development and in aged animals. *Neurobiol. Aging* 31, 678–687.
- Rombaldi Bernardi, J., De Souza Escobar, R., Ferreira, C. F., and Pelufo Silveira, P. (2012). Fetal and neonatal levels of omega-3: effects on neurodevelopment, nutrition, and growth. *ScientificWorldJournal* 2012, 202473. doi: 10.1100/2012/202473.
- Ruzickova, J., Rossmeisl, M., Prazak, T., Flachs, P., Sponarova, J., Veck, M., Tvrzicka, E., Bryhn, M., and Kopecky, J. (2004). Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* 39, 1177–1185.
- Sartorius, T., Ketterer, C., Kullmann, S., Balzer, M., Rotermund, C., Binder, S., Hallschmid, M., Machann, J., Schick, F., Somoza, V., et al. (2012). Monounsaturated fatty acids prevent the aversive effects of obesity on locomotion, brain activity, and sleep behavior. *Diabetes* 61, 1669–1679.
- Schaeffer, E. L., Skaf, H. D., Novaes, B. de A., Da Silva, E. R., Martins, B. A., Joaquim, H. D., and Gattaz, W. F. (2011). Inhibition of phospholipase A2 in rat brain modifies different membrane fluidity parameters in opposite ways. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 1612–1617.
- Schleicher, M., Weikel, K., Garber, C., and Taylor, A. (2013). Diminishing risk for age-related macular degeneration with nutrition: a current view. *Nutrients* 5, 2405–2456.
- Shchepinov, M. S., Chou, V. P., Pollock, E., Langston, J. W., Cantor, C. R., Molinari, R. J., and Manning-Boğ, A. B. (2011). Isotopic reinforcement of essential polyunsaturated fatty acids diminishes nigrostriatal degeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Toxicol. Lett.* 207, 97–103.

- Sidhu, V. K., Huang, B. X., and Kim, H. Y. (2011). Effects of docosahexaenoic acid on mouse brain synaptic plasma membrane proteome analyzed by mass spectrometry and (16)O/(18)O labeling. *J. Proteome Res.* 10, 5472–5480.
- Simopoulos, A. P. (2011). Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol. Neurobiol.* 44, 203–215.
- Taha, A. Y., Filo, E., Ma, D. W. L., and McIntyre Burnham, W. (2009). Dose-dependent anticonvulsant effects of linoleic and alpha-linolenic polyunsaturated fatty acids on pentylenetetrazol induced seizures in rats. *Epilepsia* 50, 72–82.
- Tanito, M., Brush, R. S., Elliott, M. H., Wicker, L. D., Henry, K. R., and Anderson, R. E. (2009). High levels of retinal membrane docosahexaenoic acid increase susceptibility to stress-induced degeneration. *J. Lipid Res.* 50, 807–819.
- Tian, C., Fan, C., Liu, X., Xu, F., and Qi, K. (2011). Brain histological changes in young mice submitted to diets with different ratios of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids during maternal pregnancy and lactation. *Clin. Nutr.* 30, 659–667.
- Torkildsen, Ø., Brunborg, L. A., Milde, A. M., Mørk, S. J., Myhr, K.-M., and Bø, L. (2009). A salmon based diet protects mice from behavioural changes in the cuprizone model for demyelination. *Clin. Nutr.* 28, 83–87.
- Uauy, R., and Dangour, A. D. (2006). Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutr. Rev.* 64, S24–S33.
- Venna, V. R., Deplanque, D., Allet, C., Belarbi, K., Hamdane, M., and Bordet, R. (2009). PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 34, 199–211.
- Vines, A., Delattre, A. M., Lima, M. M. S., Rodrigues, L. S., Suchecki, D., Machado, R. B., Tufik, S., Pereira, S. I. R., Zanata, S. M., and Ferraz, A. C. (2012). The role of 5-HT_{1A} receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism. *Neuropharmacology* 62, 184–191.
- Wang, Z., Liu, D., Wang, J., Liu, S., Gao, M., Ling, E.-A., and Hao, A. (2012). Cytoprotective effects of melatonin on astroglial cells subjected to palmitic acid treatment in vitro. *J. Pineal Res.* 52, 253–264.
- Wergeland, S., Torkildsen, Ø., Bø, L., and Myhr, K.-M. (2012). Polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis therapy. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 126, 70–75.
- Willis, S., Samala, R., Rosenberger, T. a, and Borges, K. (2009). Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids are not anticonvulsant or neuroprotective in acute mouse seizure models. *Epilepsia* 50, 138–142.
- Wu, a, Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2008). Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Neuroscience* 155, 751–759.

- Wu, A., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2011). The salutary effects of DHA dietary supplementation on cognition, neuroplasticity, and membrane homeostasis after brain trauma. *J. Neurotrauma* 28, 2113–2122.
- Yakunin, E., Loeb, V., Kisos, H., Biala, Y., Yehuda, S., Yaari, Y., Selkoe, D. J., and Sharon, R. (2012). A-synuclein neuropathology is controlled by nuclear hormone receptors and enhanced by docosahexaenoic acid in a mouse model for Parkinson's disease. *Brain Pathol.* 22, 280–294.
- Yamashima, T. (2012). “PUFA-GPR40-CREB signaling” hypothesis for the adult primate neurogenesis. *Prog. Lipid Res.* 51, 221–231.
- Yang, H., Zhuo, J.-M., Chu, J., Chinnici, C., and Praticò, D. (2010). Amelioration of the Alzheimer's disease phenotype by absence of 12/15-lipoxygenase. *Biol. Psychiatry* 68, 922–929.
- Yee, P., Weymouth, A. E., Fletcher, E. L., and Vingrys, A. J. (2010). A role for omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements in diabetic neuropathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 1755–1764.
- Yip, P. K., Pizzasegola, C., Gladman, S., Biggio, M. L., Marino, M., Jayasinghe, M., Ullah, F., Dyll, S. C., Malaspina, A., Bendotti, C., et al. (2013). The omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid accelerates disease progression in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 8, e61626.
- Yu, H., Bi, Y., Ma, W., He, L., Yuan, L., Feng, J., and Xiao, R. (2010). Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28, 271–276.
- Zhang, C., and Bazan, N. G. (2010). Lipid-mediated cell signaling protects against injury and neurodegeneration. *J. Nutr.* 140, 858–863.
- Zhang, W., Hu, X., Yang, W., Gao, Y., and Chen, J. (2010). Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation confers long-term neuroprotection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury through anti-inflammatory actions. *Stroke* 41, 2341–2347.
- Zhao, C.-H., Liu, H.-Q., Cao, R., Ji, A.-L., Zhang, L., Wang, F., and Yang, R.-H. (2012). Effects of dietary fish oil on learning function and apoptosis of hippocampal pyramidal neurons in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res.* 1457, 33–43.
- Zhou, Y., Zhang, Y., Li, J., Lv, F., Zhao, Y., Duan, D., and Xu, Q. (2012). A comprehensive study on long-term injury to nigral dopaminergic neurons following intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide in rats. *J. Neurochem.* 123, 771–780.

Conflict of interest statement

The authors declare that the work was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Table 1. Most typical fatty acids

Systematic Name	Common name	Abbreviation	C:D n-X (1)
Saturated fatty acids (SFAs)			
Butanoic	Butyric		4:0
Hexanoic	Caproic		6:0
Octanoic	Caprylic		8:0
Decanoic	Capric		10:0
Dodecanoic	Lauric		12:0
Tetradecanoic	Myristic		14:0
Hexadecanoic	Palmitic		16:0
Octadecanoic	Stearic		18:0
Eicosanoic	Arachidic		20:0
Docosanoic	Behenic		22:0
Tetracosanoic	Lignoceric		24:0
Monounsaturated fatty acids (MUFAs)			
cis-9-Hexadecenoic	Palmitoleic		16:1
cis-9-Octadecenoic	Oleic		18:1
cis-13-Docosenoic	Erucic		22:1
cis-15-Tetracosenoic	Nervonic		24:1
Polyunsaturated fatty acids (PUFAs)			
cis-9,cis-12-cis-15-Octadecatrienoic	α -Linolenic	ALA	18:3 n-3
cis-6,cis-9,cis-12,cis-15- Octadecatetraenoic	Stearidonic	SDA	18:4 n-3
cis-8,cis-11,cis-14,cis-17- Eicosatetraenoic	Eicosatetraenoic	ETE	20:4 n-3
cis-5, cis-8,cis-11,cis-14,cis-17- Eicosapentaenoic	Eicosapentaenoic	EPA	20:5 n-3
cis-7,cis-10,cis-13,cis-16, cis-19- Docosapentaenoic	Docosapentaenoic	DPA	22:5 n-3
cis-4,cis-7,cis-10,cis-13,cis-16,cis-19- Docosahexaenoic	Docosahexaenoic	DHA	22:6 n-3
cis-9,cis-12-Octadecadienoic	Linoleic	LA	18:2 n-6
cis-6, cis-9,cis-12-Octadecatrienoic	γ -Linolenic	GLA	18:3 n-6
cis-8,cis-11,cis-14-Eicosatrienoic	Dihomo- γ -linolenic	DHGLA	20:3 n-6
cis-5,cis-8,cis-11,cis-14-Eicosatetraenoic	Arachidonic	AA	20:4 n-6
cis-7,cis-10,cis-13,cis-16- Docosatetraenoic	Docosatetraenoic		22:4 n-6
cis-4,cis-7,cis-10,cis-13,cis-16- Docosapentaenoic	Docosapentaenoic		22:5 n-6

(1) This nomenclature designates the number of carbon atoms in the fatty acid (C), the number of double bonds (D), and the position of the first double bond counting from the terminal methyl carbon (n-X).

Table 2. Changes in brain fatty acid composition in pathological conditions

Fatty acid	Disease	Tendency	Reference (1)
Saturated fatty acids (SFAs)			
Myristic (14:0)	Depression	Down	Conklin et al., 2010
Palmitic (16:0)	Alzheimer	Up	Fraser et al., 2010
Palmitic (16:0)	Parkinson	Up	Fabelo et al., 2011
Palmitic (16:0)	Depression	Down	Conklin et al., 2010
Palmitic (16:0)	Depression	Up	Hamazaki et al., 2012
Stearic (18:0)	Alzheimer	Down	Fraser et al., 2010
Stearic (18:0)	Parkinson	Up	Fabelo et al., 2011
Stearic (18:0)	Depression	Down	Conklin et al., 2010
Monounsaturated fatty acids (MUFAs)			
Palmitoleic (16:1)	Alzheimer	Up	Astarita et al., 2011
Palmitoleic (16:1)	Depression	Down	Conklin et al., 2010
Oleic (18:1)	Alzheimer	Down	Martín et al., 2010
Oleic (18:1)	Alzheimer	Up	Fraser et al., 2010
Oleic (18:1)	Alzheimer	Up	Astarita et al., 2011
Oleic (18:1)	Depression	Up	Hamazaki et al., 2012
Erucic (22:1)	Alzheimer	Up	Astarita et al., 2011
Nervonic (24:1)	Alzheimer	Up	Astarita et al., 2011
Polyunsaturated fatty acids (PUFAs)			
EPA (20:5 n-3)	Depression	Down	Lin et al., 2010
DPA (22:5 n-3)	Depression	Down	Conklin et al., 2010
DHA (22:6 n-3)	Alzheimer	Down	Martín et al., 2010
DHA (22:6 n-3)	Parkinson	Down	Fabelo et al., 2011
DHA (22:6 n-3)	Depression	Down	Conklin et al., 2010
DHA (22:6 n-3)	Depression	Down	Lin et al., 2010
LA (18:2 n-6)	Depression	Down	Conklin et al., 2010
AA (20:4 n-6)	Parkinson	Down	Fabelo et al., 2011
AA (20:4 n-6)	Depression	Down	Conklin et al., 2010
Docosatetraenoic (22:4 n-6)	Depression	Down	Conklin et al., 2010
Docosatetraenoic (22:4 n-6)	Schizophrenia	Down	Hamazaki et al., 2012

(1) This table summarizes recent studies cited in the text. It is concluded that, whatever disease condition is considered, PUFA levels were systematically decreased, whereas MUFA amounts often appeared increased. In contrast, there was no clear-cut tendency in the changes of the proportions of SFAs.

Figure legends

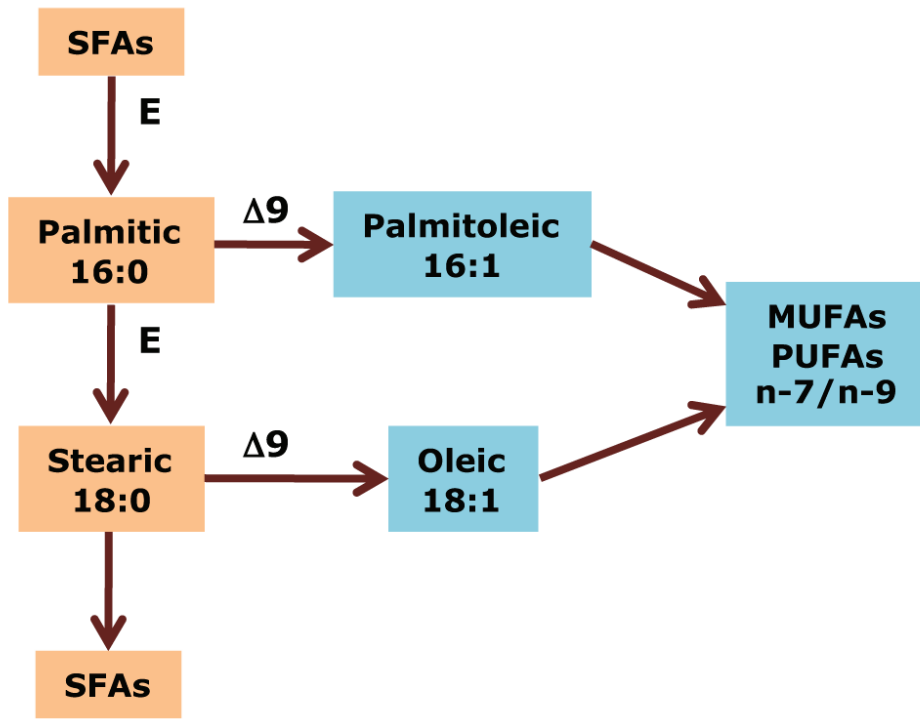
Figure 1. Biosynthesis of fatty acids. Medium- to long chain SFAs are successively transformed by the action of elongases (E) into palmitic acid (16:0), which is then either elongated to stearic acid (18:0), and other long chain SFAs, or desaturated, together with stearic acid (18:0), by $\Delta 9$ desaturase to produce *de novo* MUFAs of the n-7 and n-9 series, such as palmitoleic acid (16:1) and oleic acid (18:1). In the case of PUFAs, $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases work cooperatively with elongases to introduce double bonds and extend the aliphatic chain in a successive manner, from ALA (18:3 n-3) to EPA (20:5 n-3) in the n-3 series, and from LA (18:2 n-6) to AA (20:4 n-6) in the n-6 series. Afterwards, these end products are further elongated, desaturated and submitted to peroxisomal β -oxidation (all three steps indicated by OX) to yield DHA (22:6 n-3) and docosapentaenoic acid (22:5 n-6), respectively. Finally, AA (20:4 n-6) is the precursor of potent pro-inflammatory eicosanoids. EPA (20:5 n-3) produces less potent (dashed arrow) eicosanoids and, together with DHA (22:6 n-3), gives rise to docosanoids with anti-inflammatory properties (*i.e.*, resolvins and protectins). GLA, γ -linolenic acid; DHGLA, dihomo- γ -linolenic acid.

Figure 2. Multiple effects of fatty acids in the hippocampus. n-3 and n-6 PUFAs exert a variety of positive actions that promote formation, storage and processing of learning and memory in the hippocampus. In contrast, SFAs display rather negative actions. Green arrows indicate stimulatory effects while orange arrows represent inhibitory effects.

Figure 3. Conflicting effects of n-3 PUFAs in the nigrostriatal pathway. n-3 PUFAs are commonly endowed with a wide range of helpful effects, as illustrated by the protective benefit that these fatty acids offer to dopaminergic neurons in the nigrostriatal tract against apoptotic and pro-inflammatory cues. However, extreme caution should be exercised since these same PUFAs may not provide complete safety to halt degeneration induced by parkinsonian toxins or even trigger adverse effects, which eventually aggravates the extent of the pathological process.

Figure 1.TIF

Synthesis of MUFAs



Synthesis of n-3 PUFAs



Synthesis of n-6 PUFAs



Figure 2.TIF

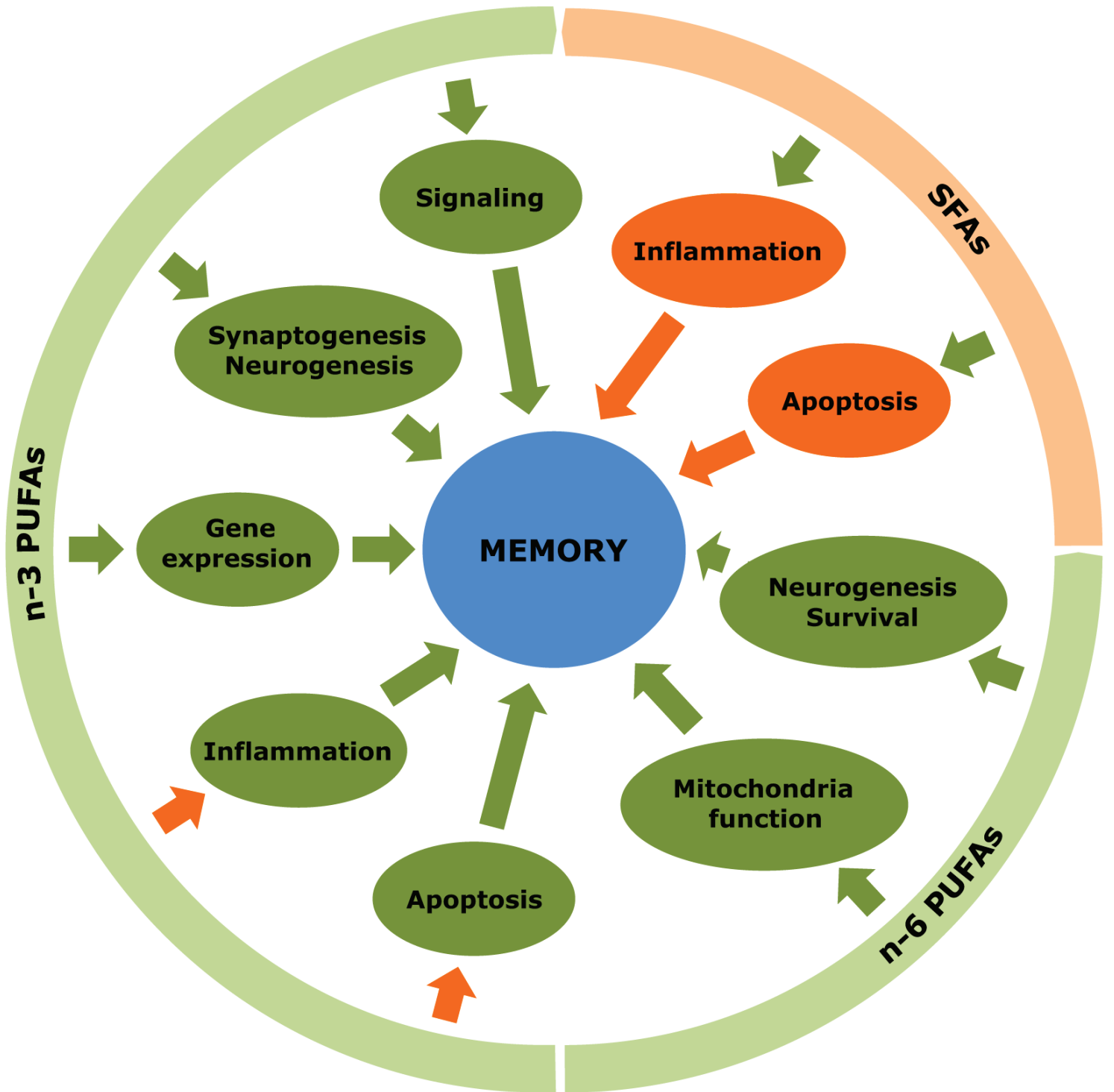
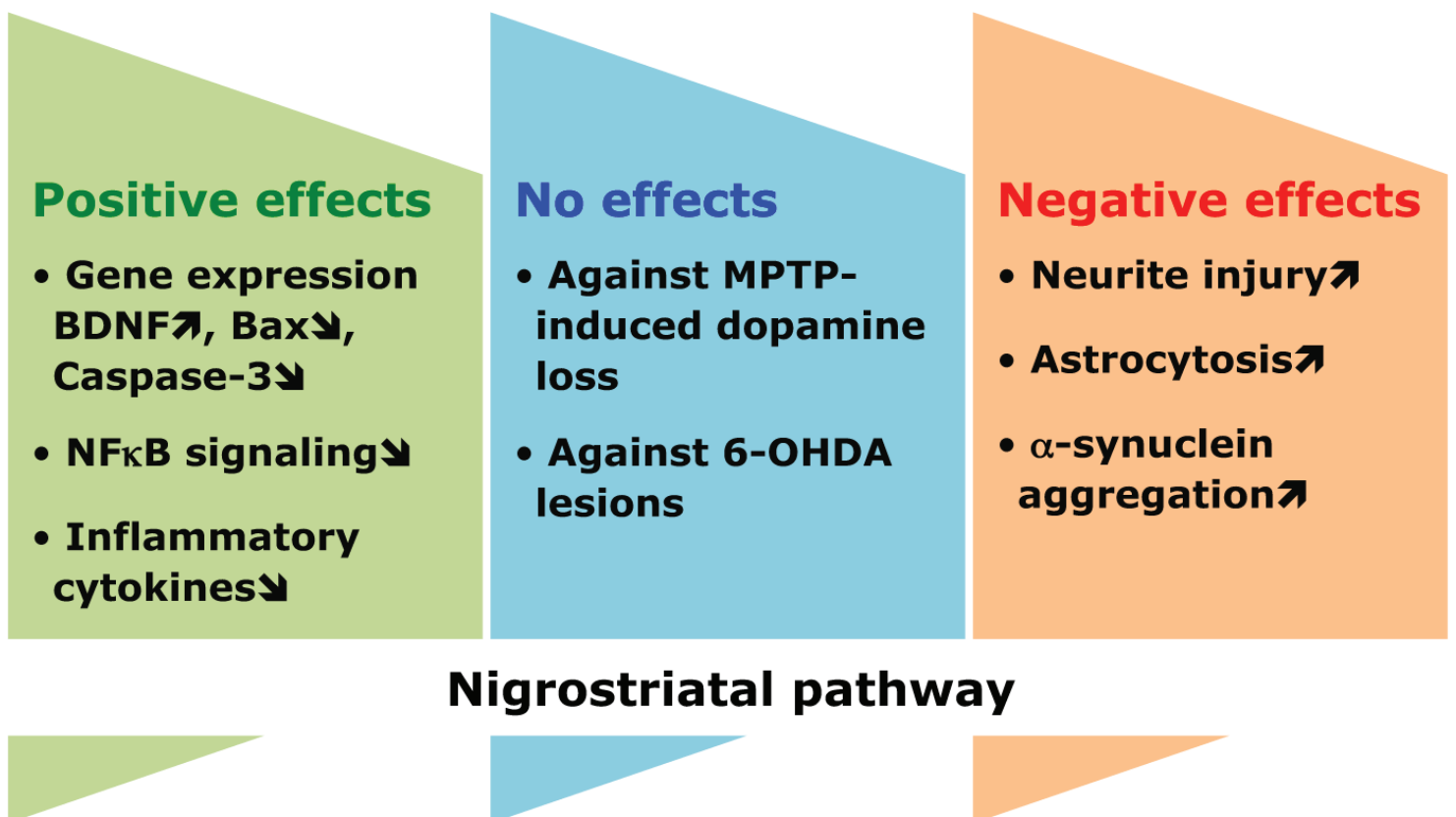


Figure 3.TIF



Bibliographie

- Abalkhail H, Mitchell J, Habgood J, Orrell R, de Bellerocche J. 2003. A new familial amyotrophic lateral sclerosis locus on chromosome 16q12.1-16q12.2. *Am J Hum Genet* 73(2):383-389.
- Abrahams S, Goldstein LH, Kew JJ, Brooks DJ, Lloyd CM, Frith CD, Leigh PN. 1996. Frontal lobe dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. A PET study. *Brain* 119 (Pt 6):2105-2120.
- Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, Russ C, Shaw CE, Powell JF, Leigh PN. 1999. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 8(2):157-164.
- Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. 2011. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 70(6):913-919.
- Amarilio R, Ramachandran S, Sabanay H, Lev S. 2005. Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction. *J Biol Chem* 280(7):5934-5944.
- Anagnostou G, Akbar MT, Paul P, Angelinetta C, Steiner TJ, de Bellerocche J. 2010. Vesicle associated membrane protein B (VAPB) is decreased in ALS spinal cord. *Neurobiol Aging* 31(6):969-985.
- Andersen PM. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep* 6(1):37-46.
- Andres PL, Hedlund W, Finison L, Conlon T, Felmus M, Munsat TL. 1986. Quantitative motor assessment in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 36(7):937-941.
- Appel V, Stewart SS, Smith G, Appel SH. 1987. A rating scale for amyotrophic lateral sclerosis: description and preliminary experience. *Ann Neurol* 22(3):328-333.
- Araki T, Nagano S, Tateno M, Kaido M, Ogata K, Arima K. 2012. Misfolded SOD1 forms high-density molecular complexes with synaptic molecules in mutant SOD1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis cases. *J Neurol Sci* 314(1-2):92-96.
- Argyriou AA, Polychronopoulos P, Papapetropoulos S, Ellul J, Andriopoulos I, Katsoulas G, Salakou S, Chroni E. 2005. Clinical and epidemiological features of motor neuron disease in south-western Greece. *Acta Neurol Scand* 111(2):108-113.
- Ariyama H, Kono N, Matsuda S, Inoue T, Arai H. 2010. Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem* 285(29):22027-22035.
- Armon C. 2009. Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology* 73(20):1693-1698.
- Armon C, Kurland LT, Daube JR, O'Brien PC. 1991. Epidemiologic correlates of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 41(7):1077-1084.
- Arning L, Epplen JT, Rahikkala E, Hendrich C, Ludolph AC, Sperfeld AD. 2013. The SETX missense variation spectrum as evaluated in patients with ALS4-like motor neuron diseases. *Neurogenetics* 14(1):53-61.
- Arsenault D, Julien C, Tremblay C, Calon F. 2011. DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice. *PLoS One* 6(2):e17397.
- Atkin JD, Farg MA, Turner BJ, Tomas D, Lysaght JA, Nunan J, Rembach A, Nagley P, Beart PM, Cheema SS, Horne MK. 2006. Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem* 281(40):30152-30165.

- Attie AD, Krauss RM, Gray-Keller MP, Brownlie A, Miyazaki M, Kastelein JJ, Lusis AJ, Stalenhoef AF, Stoehr JP, Hayden MR, Ntambi JM. 2002. Relationship between stearyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 43(11):1899-1907.
- Avemaria F, Lunetta C, Tarlarini C, Mosca L, Maestri E, Marocchi A, Melazzini M, Penco S, Corbo M. 2011. Mutation in the senataxin gene found in a patient affected by familial ALS with juvenile onset and slow progression. *Amyotroph Lateral Scler* 12(3):228-230.
- Banach M, Rakowicz M. 2010. [Electrophysiological diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis]. *Przegl Lek* 67(9):736-740.
- Bazan NG. 2013. The docosanoid neuroprotectin D1 induces homeostatic regulation of neuroinflammation and cell survival. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 88(1):127-129.
- Bazan NG, Musto AE, Knott EJ. 2011. Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity. *Mol Neurobiol* 44(2):216-222.
- Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH. 2006. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(43):16021-16026.
- Benajiba L, Le Ber I, Camuzat A, Lacoste M, Thomas-Anterion C, Couratier P, Legallic S, Salachas F, Hannequin D, Decousus M, Lacomblez L, Guedj E, Golfier V, Camu W, Dubois B, Champion D, Meininger V, Brice A. 2009. TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol* 65(4):470-473.
- Bergemalm D, Forsberg K, Srivastava V, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Wingsle G, Marklund SL. 2010. Superoxide dismutase-1 and other proteins in inclusions from transgenic amyotrophic lateral sclerosis model mice. *J Neurochem* 114(2):408-418.
- Bergemalm D, Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Rehnmark A, Marklund SL. 2006. Overloading of stable and exclusion of unstable human superoxide dismutase-1 variants in mitochondria of murine amyotrophic lateral sclerosis models. *J Neurosci* 26(16):4147-4154.
- Bigio EH. 2011. C9ORF72, the new gene on the block, causes C9FTD/ALS: new insights provided by neuropathology. *Acta Neuropathol* 122(6):653-655.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8):911-917.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312(5778):1389-1392.
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J. 2008. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 118(2):789-800.
- Bonvicini F, Marcello N, Mandrioli J, Pietrini V, Vinceti M. 2010. Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Ann Ist Super Sanita* 46(3):284-287.
- Borthwick GM, Taylor RW, Walls TJ, Tonska K, Taylor GA, Shaw PJ, Ince PG, Turnbull DM. 2006. Motor neuron disease in a patient with a mitochondrial tRNA^{Ile} mutation. *Ann Neurol* 59(3):570-574.
- Bouteloup C, Desport JC, Clavelou P, Guy N, Derumeaux-Burel H, Ferrier A, Couratier P. 2009. Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J Neurol* 256(8):1236-1242.

- Bowling AC, Schulz JB, Brown RH, Jr., Beal MF. 1993. Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 61(6):2322-2325.
- Brettschneider J, Van Deerlin VM, Robinson JL, Kwong L, Lee EB, Ali YO, Safren N, Monteiro MJ, Toledo JB, Elman L, McCluskey L, Irwin DJ, Grossman M, Molina-Porcel L, Lee VM, Trojanowski JQ. 2012. Pattern of ubiquilin pathology in ALS and FTLD indicates presence of C9ORF72 hexanucleotide expansion. *Acta Neuropathol* 123(6):825-839.
- Bromberg MB, Forshew DA, Nau KL, Bromberg J, Simmons Z, Fries TJ. 1993. Motor unit number estimation, isometric strength, and electromyographic measures in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 16(11):1213-1219.
- Brooks BR. 1994. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* 124 Suppl:96-107.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. 2000. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1(5):293-299.
- Brooks KJ, Hill MD, Hockings PD, Reid DG. 2004. MRI detects early hindlimb muscle atrophy in Gly93Ala superoxide dismutase-1 (G93A SOD1) transgenic mice, an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *NMR Biomed* 17(1):28-32.
- Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW. 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18(2):327-338.
- Byrne S, Heverin M, Elamin M, Bede P, Lynch C, Kenna K, Maclaughlin R, Walsh C, Al Chalabi A, Hardiman O. 2013. Aggregation of neurologic and neuropsychiatric disease in ALS kindreds: A population based case controlled cohort study of Familial and Sporadic ALS. *Ann Neurol*.
- Cai H, Lin X, Xie C, Laird FM, Lai C, Wen H, Chiang HC, Shim H, Farah MH, Hoke A, Price DL, Wong PC. 2005. Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knock-out mice but predisposes neurons to oxidative stress. *J Neurosci* 25(33):7567-7574.
- Cai H, Shim H, Lai C, Xie C, Lin X, Yang WJ, Chandran J. 2008. ALS2/alsin knockout mice and motor neuron diseases. *Neurodegener Dis* 5(6):359-366.
- Calvio C, Neubauer G, Mann M, Lamond AI. 1995. Identification of hnRNP P2 as TLS/FUS using electrospray mass spectrometry. *RNA* 1(7):724-733.
- Carelli V, Liguori R, Cordivari C, Bianchedi G, Montagna P. 1994. Ceftriaxone is ineffective in ALS. *Ital J Neurol Sci* 15(1):66.
- Cassina P, Pehar M, Vargas MR, Castellanos R, Barbeito AG, Estevez AG, Thompson JA, Beckman JS, Barbeito L. 2005. Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 93(1):38-46.
- Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, Nakanishi A. 1999. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci* 169(1-2):13-21.
- Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, Summers SA. 2003. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 278(12):10297-10303.

- Chen HJ, Anagnostou G, Chai A, Withers J, Morris A, Adhikaree J, Pennetta G, de Bellerocche JS. 2010. Characterization of the properties of a novel mutation in VAPB in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 285(51):40266-40281.
- Chen W, Saeed M, Mao H, Siddique N, Dellefave L, Hung WY, Deng HX, Sufit RL, Heller SL, Haines JL, Pericak-Vance M, Siddique T. 2006. Lack of association of VEGF promoter polymorphisms with sporadic ALS. *Neurology* 67(3):508-510.
- Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, Dierick I, Abel A, Kennerson ML, Rabin BA, Nicholson GA, Auer-Grumbach M, Wagner K, De Jonghe P, Griffin JW, Fischbeck KH, Timmerman V, Cornblath DR, Chance PF. 2004. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* 74(6):1128-1135.
- Cheroni C, Marino M, Tortarolo M, Veglianesi P, De Biasi S, Fontana E, Zuccarello LV, Maynard CJ, Dantuma NP, Bendotti C. 2009. Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 18(1):82-96.
- Cheroni C, Peviani M, Cascio P, De Biasi S, Monti C, Bendotti C. 2005. 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* 18(3):509-522.
- Cheung G, Gawel MJ, Cooper PW, Farb RI, Ang LC, Gawal MJ. 1995. Amyotrophic lateral sclerosis: correlation of clinical and MR imaging findings. *Radiology* 194(1):263-270.
- Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. 2005. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 128(Pt 3):472-476.
- Choi JK, Kustermann E, Dedeoglu A, Jenkins BG. 2009. Magnetic resonance spectroscopy of regional brain metabolite markers in FALS mice and the effects of dietary creatine supplementation. *Eur J Neurosci* 30(11):2143-2150.
- Chow CY, Landers JE, Bergren SK, Sapp PC, Grant AE, Jones JM, Everett L, Lenk GM, McKenna-Yasek DM, Weisman LS, Figlewicz D, Brown RH, Meisler MH. 2009. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet* 84(1):85-88.
- 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. 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302(5642):113-117.
- Cleveland DW, Rothstein JD. 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2(11):806-819.
- Coburn CT, Knapp FF, Jr., Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA. 2000. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* 275(42):32523-32529.
- Coll T, Eyre E, Rodriguez-Calvo R, Palomer X, Sanchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. 2008. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 283(17):11107-11116.
- Comi GP, Bordoni A, Salani S, Franceschina L, Sciacco M, Prella A, Fortunato F, Zeviani M, Napoli L, Bresolin N, Moggio M, Ausenda CD, Taanman JW, Scarlato G. 1998. Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol* 43(1):110-116.
- Cooper RA. 1978. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct* 8(4):413-430.

- Coppede F, Mancuso M, Lo Gerfo A, Carlesi C, Piazza S, Rocchi A, Petrozzi L, Nesti C, Micheli D, Bacci A, Migliore L, Murri L, Siciliano G. 2007. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 420(2):163-168.
- Corcia P, Khoris J, Couratier P, Mayeux-Portas V, Bieth E, De Toffol B, Autret A, Muh JP, Andres C, Camu W. 2002a. SMN1 gene study in three families in which ALS and spinal muscular atrophy co-exist. *Neurology* 59(9):1464-1466.
- Corcia P, Mayeux-Portas V, Khoris J, de Toffol B, Autret A, Muh JP, Camu W, Andres C. 2002b. Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 51(2):243-246.
- Corcia P, Tauber C, Vercoullie J, Arlicot N, Prunier C, Praline J, Nicolas G, Venel Y, Hommet C, Baulieu JL, Cottier JP, Roussel C, Kassiou M, Guilloteau D, Ribeiro MJ. 2012. Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7(12):e52941.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(14):5074-5078.
- Cox PA, Sacks OW. 2002. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 58(6):956-959.
- Cudkowicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE, Chin W, Geller B, Hayden DL, Schoenfeld DA, Hosler BA, Horvitz HR, Brown RH. 1997. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 41(2):210-221.
- Cudkowicz ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, Zhang H, Andreasson KI, Rothstein JD, Drachman DB. 2006. Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 60(1):22-31.
- Cutler RG, Pedersen WA, Camandola S, Rothstein JD, Mattson MP. 2002. Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 52(4):448-457.
- da Rocha AJ, Oliveira AS, Fonseca RB, Maia AC, Jr., Buainain RP, Lederman HM. 2004. Detection of corticospinal tract compromise in amyotrophic lateral sclerosis with brain MR imaging: relevance of the T1-weighted spin-echo magnetization transfer contrast sequence. *AJNR Am J Neuroradiol* 25(9):1509-1515.
- Dal Canto MC, Gurney ME. 1995. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* 676(1):25-40.
- Dal Canto MC, Gurney ME. 1997. A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 93(6):537-550.
- Damiano M, Starkov AA, Petri S, Kipiani K, Kiaei M, Mattiazzi M, Flint Beal M, Manfredi G. 2006. Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem* 96(5):1349-1361.
- 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. 2007. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet* 16(22):2720-2728.

- del Aguila MA, Longstreth WT, Jr., McGuire V, Koepsell TD, van Belle G. 2003. Prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Neurology* 60(5):813-819.
- Delisle MB, Carpenter S. 1984. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 63(2):241-250.
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, Jiang H, Hirano M, Rampersaud E, Jansen GH, Donkervoort S, Bigio EH, Brooks BR, Ajroud K, Sufit RL, Haines JL, Mugnaini E, Pericak-Vance MA, Siddique T. 2011. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477(7363):211-215.
- Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, et al. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261(5124):1047-1051.
- Derave W, Van Den Bosch L, Lemmens G, Eijnde BO, Robberecht W, Hespel P. 2003. Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. *Neurobiol Dis* 13(3):264-272.
- Desport JC, Preux PM, Magy L, Boirie Y, Vallat JM, Beaufriere B, Couratier P. 2001. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr* 74(3):328-334.
- Desport JC, Tornay F, Lacoste M, Preux PM, Couratier P. 2005. Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegener Dis* 2(3-4):202-207.
- Dezsi L, Danielsson O, Gati I, Varga ET, Vecsei L. 2013. [Inclusion body myositis--a rarely recognized disorder]. *Ideggyogy Sz* 66(3-4):89-101.
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. 2007. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10(5):608-614.
- Dixit R, Levy JR, Tokito M, Ligon LA, Holzbaur EL. 2008. Regulation of dynactin through the differential expression of p150Glued isoforms. *J Biol Chem* 283(48):33611-33619.
- Dobrowolny G, Aucello M, Molinaro M, Musaro A. 2008a. Local expression of mIgf-1 modulates ubiquitin, caspase and CDK5 expression in skeletal muscle of an ALS mouse model. *Neurol Res* 30(2):131-136.
- Dobrowolny G, Aucello M, Musaro A. 2011. Muscle atrophy induced by SOD1G93A expression does not involve the activation of caspase in the absence of denervation. *Skelet Muscle* 1(1):3.
- Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S, Belia S, Wannenes F, Nicoletti C, Del Prete Z, Rosenthal N, Molinaro M, Protasi F, Fano G, Sandri M, Musaro A. 2008b. Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab* 8(5):425-436.
- Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musaro A. 2005. Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol* 168(2):193-199.
- Dobrzyn A, Dobrzyn P, Lee SH, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, Friedman JM, Ntambi JM. 2005. Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency reduces ceramide synthesis by downregulating serine palmitoyltransferase and increasing beta-oxidation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(3):E599-607.
- Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, Friedman JM, Ntambi JM. 2004. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17):6409-6414.

- Dobrzyn P, Pyrkowska A, Jazurek M, Szymanski K, Langfort J, Dobrzyn A. 2010. Endurance training-induced accumulation of muscle triglycerides is coupled to upregulation of stearoyl-CoA desaturase 1. *J Appl Physiol* 109(6):1653-1661.
- Dorst J, Kuhnlein P, Hendrich C, Kassubek J, Sperfeld AD, Ludolph AC. 2011. Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 258(4):613-617.
- Drachman DB, Frank K, Dykes-Hoberg M, Teismann P, Almer G, Przedborski S, Rothstein JD. 2002. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* 52(6):771-778.
- Duan W, Guo Z, Jiang H, Ware M, Li XJ, Mattson MP. 2003. Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5):2911-2916.
- Dubowitz V. 2009. Ramblings in the history of spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 19(1):69-73.
- Duchen LW, Strich SJ. 1968. An hereditary motor neurone disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant 'wobbler'. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 31(6):535-542.
- Duda MK. 2012. [Polyunsaturated fatty acids omega-3 as modulators of intracellular signaling pathways]. *Postepy Biochem* 58(2):149-154.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Seilhean D, Hauw JJ, Lacomblez L, Loeffler JP, Meininger V. 2008. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70(13):1004-1009.
- Dupuis L, Dengler R, Heneka MT, Meyer T, Zierz S, Kassubek J, Fischer W, Steiner F, Lindauer E, Otto M, Dreyhaupt J, Grehl T, Hermann A, Winkler AS, Bogdahn U, Benecke R, Schrank B, Wessig C, Grosskreutz J, Ludolph AC. 2012. A randomized, double blind, placebo-controlled trial of pioglitazone in combination with riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7(6):e37885.
- Dupuis L, di Scala F, Rene F, de Tapia M, Oudart H, Pradat PF, Meininger V, Loeffler JP. 2003. Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J* 17(14):2091-2093.
- Dupuis L, Fergani A, Braunstein KE, Eschbach J, Holl N, Rene F, Gonzalez De Aguilar JL, Zoerner B, Schwalenstocker B, Ludolph AC, Loeffler JP. 2009a. Mice with a mutation in the dynein heavy chain 1 gene display sensory neuropathy but lack motor neuron disease. *Exp Neurol* 215(1):146-152.
- 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. 2002. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 10(3):358-365.
- 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. 2009b. Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One* 4(4):e5390.
- Dupuis L, Loeffler JP. 2009. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr Opin Pharmacol* 9(3):341-346.
- Dupuis L, Oudart H, Rene 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(30):11159-11164.
- Echaniz-Laguna A, Guiraud-Chaumeil C, Tranchant C, Reeber A, Melki J, Warter JM. 2002. Homozygous exon 7 deletion of the SMN centromeric gene (SMN2): a potential susceptibility factor for adult-onset lower motor neuron disease. *J Neurol* 249(3):290-293.
- Echaniz-Laguna A, Zoll J, Ponsot E, N'Guessan B, Tranchant C, Loeffler JP, Lampert E. 2006. Muscular mitochondrial function in amyotrophic lateral sclerosis is progressively altered as the disease develops: a temporal study in man. *Exp Neurol* 198(1):25-30.
- Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, Armarkola M, Geser F, Greene R, Lu MM, Padmanabhan A, Clay-Falcone D, McCluskey L, Elman L, Juhr D, Gruber PJ, Rub U, Auburger G, Trojanowski JQ, Lee VM, Van Deerlin VM, Bonini NM, Gitler AD. 2010. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466(7310):1069-1075.
- Elder GA, Friedrich VL, Jr., Kang C, Bosco P, Gourov A, Tu PH, Zhang B, Lee VM, Lazzarini RA. 1998. Requirement of heavy neurofilament subunit in the development of axons with large calibers. *J Cell Biol* 143(1):195-205.
- Enoch HG, Catala A, Strittmatter P. 1976. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem* 251(16):5095-5103.
- Eschbach J, Schwalenstocker B, Soyal S, Bayer H, Wiesner D, Akimoto C, Nilsson AC, Birve A, Meyer T, Dupuis L, Danzer K, Andersen PM, Witting A, Ludolph AC, Patsch W, Weydt P. 2013. PGC-1alpha is a male-specific disease modifier of human and experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*.
- Estadella D, da Penha Oller do Nascimento CM, Oyama LM, Ribeiro EB, Damaso AR, de Piano A. 2013. Lipotoxicity: effects of dietary saturated and transfatty acids. *Mediators Inflamm* 2013:137579.
- Fergani A, Oudart H, Gonzalez De Aguilar JL, Fricker B, Rene 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(7):1571-1580.
- Figlewicz DA, Garruto RM, Krizus A, Yanagihara R, Rouleau GA. 1994a. The Cu/Zn superoxide dismutase gene in ALS and parkinsonism-dementia of Guam. *Neuroreport* 5(5):557-560.
- Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA, Julien JP. 1994b. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 3(10):1757-1761.
- Figlewicz DA, Orrell RW. 2003. The genetics of motor neuron diseases. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4(4):225-231.
- 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(2):232-240.
- Fischer LR, Glass JD. 2007. Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neurodegener Dis* 4(6):431-442.
- Flood DG, Reaume AG, Gruner JA, Hoffman EK, Hirsch JD, Lin YG, Dorfman KS, Scott RW. 1999. Hindlimb motor neurons require Cu/Zn superoxide dismutase for maintenance of neuromuscular junctions. *Am J Pathol* 155(2):663-672.
- Flowers MT, Ntambi JM. 2008. Role of stearyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 19(3):248-256.
- Foufelle F, Ferre P. 2007. [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)* 23(3):291-296.

- Franchignoni F, Mora G, Giordano A, Volanti P, Chio A. 2013. Evidence of multidimensionality in the ALSFRS-R Scale: a critical appraisal on its measurement properties using Rasch analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- 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(7):2534-2542.
- Fritz E, Izaurieta P, Weiss A, Mir FR, Rojas P, Gonzalez D, Rojas F, Brown RH, Jr., Madrid R, van Zundert B. 2013. Mutant SOD1-expressing astrocytes release toxic factors that trigger motoneuron death by inducing hyperexcitability. *J Neurophysiol* 109(11):2803-2814.
- Funalot B, Desport JC, Sturtz F, Camu W, Couratier P. 2009. High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 10(2):113-117.
- Gajdusek DC, Salazar AM. 1982. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonian syndromes in high incidence among the Auyu and Jakai people of West New Guinea. *Neurology* 32(2):107-126.
- Gamez J, Barcelo MJ, Munoz X, Carmona F, Cusco I, Baiget M, Cervera C, Tizzano EF. 2002. Survival and respiratory decline are not related to homozygous SMN2 deletions in ALS patients. *Neurology* 59(9):1456-1460.
- Garruto RM, Yanagihara R, Gajdusek DC. 1985. Disappearance of high-incidence amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Neurology* 35(2):193-198.
- Gellera C, Colombrita C, Ticozzi N, Castellotti B, Bragato C, Ratti A, Taroni F, Silani V. 2008. Identification of new ANG gene mutations in a large cohort of Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* 9(1):33-40.
- Giagheddu M, Puggioni G, Masala C, Biancu F, Pirari G, Piras MR, Rachele MG. 1983. Epidemiologic study of amyotrophic lateral sclerosis in Sardinia, Italy. *Acta Neurol Scand* 68(6):394-404.
- Gillies PJ, Bhatia SK, Belcher LA, Hannon DB, Thompson JT, Vanden Heuvel JP. 2012. Regulation of inflammatory and lipid metabolism genes by eicosapentaenoic acid-rich oil. *J Lipid Res* 53(8):1679-1689.
- Gleason MM, Medow MS, Tulenko TN. 1991. Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 69(1):216-227.
- Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. 2000. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 20(2):660-665.
- Gonzalez de Aguilar JL, Gordon JW, Rene F, de Tapia M, Lutz-Bucher B, Gaiddon C, Loeffler JP. 2000. 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* 7(4):406-415.
- 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. 2008. Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiol Genomics* 32(2):207-218.
- Gordon T, Tyreman N, Li S, Putman CT, Hegedus J. 2010. Functional over-load saves motor units in the SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 37(2):412-422.
- Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW. 2006. Complete dissociation of motor neuron death from motor

- dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26(34):8774-8786.
- Gowing G, Dequen F, Soucy G, Julien JP. 2006. Absence of tumor necrosis factor- α does not affect motor neuron disease caused by superoxide dismutase 1 mutations. *J Neurosci* 26(44):11397-11402.
- Granieri E, Carreras M, Tola R, Paolino E, Tralli G, Eleopra R, Serra G. 1988. Motor neuron disease in the province of Ferrara, Italy, in 1964-1982. *Neurology* 38(10):1604-1608.
- Gredal O, Werdelin L, Bak S, Christensen PB, Boysen G, Kristensen MO, Jespersen JH, Regeur L, Hinge HH, Jensen TS. 1997. A clinical trial of dextromethorphan in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 96(1):8-13.
- Greenway MJ, Alexander MD, Ennis S, Traynor BJ, Corr B, Frost E, Green A, Hardiman O. 2004. A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology* 63(10):1936-1938.
- Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, Ennis S, Cashman S, Donaghy C, Patterson V, Swingler R, Kieran D, Prehn J, Morrison KE, Green A, Acharya KR, Brown RH, Jr., Hardiman O. 2006. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 38(4):411-413.
- Grohme K, Maravic MV, Gasser T, Borasio GD. 2001. A case of amyotrophic lateral sclerosis with a very slow progression over 44 years. *Neuromuscul Disord* 11(4):414-416.
- Grundstrom E, Lindholm D, Johansson A, Blennow K, Askmark H. 2000. GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 11(8):1781-1783.
- Grunseich C, Rinaldi C, Fischbeck K. 2013. Spinal and bulbar muscular atrophy: pathogenesis and clinical management. *Oral Dis*.
- Guegan C, Przedborski S. 2003. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest* 111(2):153-161.
- Guegan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S. 2001. Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 21(17):6569-6576.
- Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin CL. 2003. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet* 12(19):2519-2532.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264(5166):1772-1775.
- Haase G, Pettmann B, Raoul C, Henderson CE. 2008. Signaling by death receptors in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 18(3):284-291.
- Hadano S, Benn SC, Kakuta S, Otomo A, Sudo K, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Shefner JM, Cox GA, Iwakura Y, Brown RH, Jr., Ikeda JE. 2006. Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet* 15(2):233-250.
- Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH, Jr., Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, Ikeda JE. 2001. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29(2):166-173.

- Halestrap AP, Wilson MC. 2012. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life* 64(2):109-119.
- Hamadeh MJ, Rodriguez MC, Kaczor JJ, Tarnopolsky MA. 2005. Caloric restriction transiently improves motor performance but hastens clinical onset of disease in the Cu/Zn-superoxide dismutase mutant G93A mouse. *Muscle Nerve* 31(2):214-220.
- Hamilton NB, Attwell D. 2010. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* 11(4):227-238.
- Hand CK, Khoris J, Salachas F, Gros-Louis F, Lopes AA, Mayeux-Portas V, Brewer CG, Brown RH, Jr., Meininger V, Camu W, Rouleau GA. 2002. A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis, on chromosome 18q. *Am J Hum Genet* 70(1):251-256.
- Hand CK, Rouleau GA. 2002. Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 25(2):135-159.
- Handschin C, Kobayashi YM, Chin S, Seale P, Campbell KP, Spiegelman BM. 2007. PGC-1alpha regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. *Genes Dev* 21(7):770-783.
- Haverkamp LJ, Appel V, Appel SH. 1995. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 118 (Pt 3):707-719.
- Hayward C, Colville S, Swingler RJ, Brock DJ. 1999. Molecular genetic analysis of the APEX nuclease gene in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 52(9):1899-1901.
- Hayward LJ, Rodriguez JA, Kim JW, Tiwari A, Goto JJ, Cabelli DE, Valentine JS, Brown RH, Jr. 2002. Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 277(18):15923-15931.
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T. 2007. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 28(2):154-164.
- 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(14):3337-3351.
- Henkel JS, Beers DR, Siklos L, Appel SH. 2006. The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Mol Cell Neurosci* 31(3):427-437.
- Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH. 2004. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 55(2):221-235.
- Hensley K, Fedynyshyn J, Ferrell S, Floyd RA, Gordon B, Grammas P, Hamdheydari L, Mhatre M, Mou S, Pye QN, Stewart C, West M, West S, Williamson KS. 2003. Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 14(1):74-80.
- Hensley K, Floyd RA, Gordon B, Mou S, Pye QN, Stewart C, West M, Williamson K. 2002. Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 82(2):365-374.
- Hentati A, Bejaoui K, Pericak-Vance MA, Hentati F, Speer MC, Hung WY, Figlewicz DA, Haines J, Rimmler J, Ben Hamida C, et al. 1994. Linkage of recessive familial

- amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 2q33-q35. *Nat Genet* 7(3):425-428.
- Hentati A, Ouahchi K, Pericak-Vance MA, Nijhawan D, Ahmad A, Yang Y, Rimmler J, Hung W, Schlotter B, Ahmed A, Ben Hamida M, Hentati F, Siddique T. 1998. Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics* 2(1):55-60.
- Hetz C, Thielen P, Fisher J, Pasinelli P, Brown RH, Korsmeyer S, Glimcher L. 2007. The proapoptotic BCL-2 family member BIM mediates motoneuron loss in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ* 14(7):1386-1389.
- Higgins CM, Jung C, Xu Z. 2003. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* 4:16.
- Hillel AD, Miller RM, Yorkston K, McDonald E, Norris FH, Konikow N. 1989. Amyotrophic lateral sclerosis severity scale. *Neuroepidemiology* 8(3):142-150.
- Hirano A, Donnerfeld H, Sasaki S, Nakano I. 1984. Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43(5):461-470.
- Hirano M, Quinzii CM, Mitsumoto H, Hays AP, Roberts JK, Richard P, Rowland LP. 2011. Senataxin mutations and amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 12(3):223-227.
- Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. 2007. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* 68(5):326-337.
- Hofmann E, Ochs G, Pelzl A, Warmuth-Metz M. 1998. The corticospinal tract in amyotrophic lateral sclerosis: an MRI study. *Neuroradiology* 40(2):71-75.
- Holl N, Echaniz-Laguna A, Bierry G, Mohr M, Loeffler JP, Moser T, Dietemann JL, Kremer S. 2008. Diffusion-weighted MRI of denervated muscle: a clinical and experimental study. *Skeletal Radiol* 37(12):1111-1117.
- Hosler BA, Siddique T, Sapp PC, Sailor W, Huang MC, Hossain A, Daube JR, Nance M, Fan C, Kaplan J, Hung WY, McKenna-Yasek D, Haines JL, Pericak-Vance MA, Horvitz HR, Brown RH, Jr. 2000. Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *JAMA* 284(13):1664-1669.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. 2002. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3):1604-1609.
- Hwang CS, Liu GT, Chang MD, Liao IL, Chang HT. 2013. Elevated serum autoantibody against high mobility group box 1 as a potent surrogate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 58C:13-18.
- Ikeda K, Hirayama T, Takazawa T, Kawabe K, Iwasaki Y. 2012. Relationships between disease progression and serum levels of lipid, urate, creatinine and ferritin in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis: a cross-sectional study. *Intern Med* 51(12):1501-1508.
- Ilieva EV, Ayala V, Jove M, Dalfo E, Cacabelos D, Povedano M, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M. 2007. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 130(Pt 12):3111-3123.
- Ilieva HS, Yamanaka K, Malkmus S, Kakinohana O, Yaksh T, Marsala M, Cleveland DW. 2008. Mutant dynein (Loa) triggers proprioceptive axon loss that extends survival only in the SOD1 ALS model with highest motor neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(34):12599-12604.

- Ilzecka J, Stelmasiak Z, Solski J, Wawrzycki S, Szpetnar M. 2003. Plasma amino acids concentration in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amino Acids* 25(1):69-73.
- Inamori T, Goda T, Kasezawa N, Yamakawa-Kobayashi K. 2013. The combined effects of genetic variation in the SIRT1 gene and dietary intake of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on serum LDL-C and HDL-C levels: a population based study. *Lipids Health Dis* 12(1):4.
- Ito Y, Yamada M, Tanaka H, Aida K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hozumi I, Inuzuka T, Takahashi H, Hara H. 2009. Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol Dis* 36(3):470-476.
- Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, London J, Holstege JC. 2000. Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis* 7(6 Pt B):623-643.
- Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED, Holstege JC. 2001. CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol* 102(4):293-305.
- Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC. 2008. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J Neurosci* 28(9):2075-2088.
- Jacomy H, Zhu Q, Couillard-Despres S, Beaulieu JM, Julien JP. 1999. Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits. *J Neurochem* 73(3):972-984.
- Jacquier A, Buhler E, Schafer MK, Bohl D, Blanchard S, Beclin C, Haase G. 2006. Alsin/Rac1 signaling controls survival and growth of spinal motoneurons. *Ann Neurol* 60(1):105-117.
- Jaiswal MK, Keller BU. 2009. Cu/Zn superoxide dismutase typical for familial amyotrophic lateral sclerosis increases the vulnerability of mitochondria and perturbs Ca²⁺ homeostasis in SOD1G93A mice. *Mol Pharmacol* 75(3):478-489.
- Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Gibbs JR, Brunetti M, Gronka S, Wu J, Ding J, McCluskey L, Martinez-Lage M, Falcone D, Hernandez DG, Arepalli S, Chong S, Schymick JC, Rothstein J, Landi F, Wang YD, Calvo A, Mora G, Sabatelli M, Monsurro MR, Battistini S, Salvi F, Spataro R, Sola P, Borghero G, Galassi G, Scholz SW, Taylor JP, Restagno G, Chio A, Traynor BJ. 2010. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68(5):857-864.
- Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. 2000. 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* 97(23):12571-12576.
- Johnston M, Earll, A., Giles, M., McClenaham, R., Stevens, D. and Morrison, V. . 1999. Mood as a predictor of disability and survival in patients newly diagnosed with ALS/MND. *Br J Health Psychol* 4:127-136.
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Dimou L, Lin S, Fergani A, Ruegg MA, Schwab ME, Dupuis L, Loeffler JP. 2006. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* 7(11):1162-1167.

- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Pradat PF, Dupuis L, Echaniz-Laguna A, Muller A, Dubourg O, Seilhean D, Hauw JJ, Loeffler JP, Meininger V. 2005. Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* 57(4):553-556.
- Jung C, Higgins CM, Xu Z. 2002. Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 83(3):535-545.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40(5):572-574.
- Kadotani A, Tsuchiya Y, Hatakeyama H, Katagiri H, Kanzaki M. 2009. Different impacts of saturated and unsaturated free fatty acids on COX-2 expression in C(2)C(12) myotubes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(6):E1291-1303.
- Kalra S, Cashman NR, Caramanos Z, Genge A, Arnold DL. 2003. Gabapentin therapy for amyotrophic lateral sclerosis: lack of improvement in neuronal integrity shown by MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol* 24(3):476-480.
- Kanai K, Kuwabara S, Misawa S, Tamura N, Ogawara K, Nakata M, Sawai S, Hattori T, Bostock H. 2006. Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain* 129(Pt 4):953-962.
- Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothstein JD, Bergles DE. 2013. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 16(5):571-579.
- Kanner J, German JB, Kinsella JE. 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 25(4):317-364.
- Kasarskis EJ, Berryman S, Vanderleest JG, Schneider AR, McClain CJ. 1996. Nutritional status of patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to the proximity of death. *Am J Clin Nutr* 63(1):130-137.
- Kato S. 2008. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115(1):97-114.
- Kato S, Shimoda M, Watanabe Y, Nakashima K, Takahashi K, Ohama E. 1996. 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* 55(10):1089-1101.
- Kaupmann K, Simon-Chazottes D, Guenet JL, Jockusch H. 1992. Wobbler, a mutation affecting motoneuron survival and gonadal functions in the mouse, maps to proximal chromosome 11. *Genomics* 13(1):39-43.
- Kawano M, Kumagai K, Nishijima M, Hanada K. 2006. Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J Biol Chem* 281(40):30279-30288.
- Khan BK, Yokoyama JS, Takada LT, Sha SJ, Rutherford NJ, Fong JC, Karydas AM, Wu T, Ketelle RS, Baker MC, Hernandez MD, Coppola G, Geschwind DH, Rademakers R, Lee SE, Rosen HJ, Rabinovici GD, Seeley WW, Rankin KP, Boxer AL, Miller BL. 2012. Atypical, slowly progressive behavioural variant frontotemporal dementia associated with C9ORF72 hexanucleotide expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83(4):358-364.
- Khoris J, Moulard B, Briolotti V, Hayer M, Durieux A, Clavelou P, Malafosse A, Rouleau GA, Camu W. 2000. Coexistence of dominant and recessive familial amyotrophic lateral sclerosis with the D90A Cu,Zn superoxide dismutase mutation within the same country. *Eur J Neurol* 7(2):207-211.

- Kieran D, Kalmar B, Dick JR, Riddoch-Contreras J, Burnstock G, Greensmith L. 2004. Treatment with arimoclolmol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med* 10(4):402-405.
- Kieran D, Sebastia J, Greenway MJ, King MA, Connaughton D, Concannon CG, Fenner B, Hardiman O, Prehn JH. 2008. Control of motoneuron survival by angiogenin. *J Neurosci* 28(52):14056-14061.
- Kikuchi H, Almer G, Yamashita S, Guegan C, Nagai M, Xu Z, Sosunov AA, McKhann GM, 2nd, Przedborski S. 2006. 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* 103(15):6025-6030.
- Kikuchi H, Furuta A, Nishioka K, Suzuki SO, Nakabeppu Y, Iwaki T. 2002. Impairment of mitochondrial DNA repair enzymes against accumulation of 8-oxo-guanine in the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 103(4):408-414.
- Kim E, Lee JH, Ntambi JM, Hyun CK. 2011. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase1 activates AMPK and exhibits beneficial lipid metabolic effects in vitro. *Eur J Pharmacol* 672(1-3):38-44.
- Kim YJ, Nakatomi R, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R. 2005. Unsaturated fatty acids induce cytotoxic aggregate formation of amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutants. *J Biol Chem* 280(22):21515-21521.
- Kirby J, Menzies FM, Cookson MR, Bushby K, Shaw PJ. 2002. Differential gene expression in a cell culture model of SOD1-related familial motor neurone disease. *Hum Mol Genet* 11(17):2061-2075.
- Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, Hirakawa A, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N, Kadomatsu K. 2013. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis* 4:e525.
- Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. 1997. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 277(5325):559-562.
- Kriz J, Nguyen MD, Julien JP. 2002. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 10(3):268-278.
- Kruger MC, Coetzee M, Haag M, Weiler H. 2010. Long-chain polyunsaturated fatty acids: selected mechanisms of action on bone. *Prog Lipid Res* 49(4):438-449.
- Kurland LT. 1988. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin. *Trends Neurosci* 11(2):51-54.
- Kurland LT, Mulder DW. 1954. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution and special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations. *Neurology* 4(6):438-448.
- Kushner PD, Stephenson DT, Wright S. 1991. Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 50(3):263-277.
- Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH, Jr. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323(5918):1205-1208.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. 1996a. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 347(9013):1425-1431.

- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Powe L, Durrleman S, Delumeau JC, Meininger V. 1996b. A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology* 47(6 Suppl 4):S242-250.
- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Hutt KR, Vu AQ, Baughn M, Huelga SC, Clutario KM, Ling SC, Liang TY, Mazur C, Wancewicz E, Kim AS, Watt A, Freier S, Hicks GG, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Ravits J, Cleveland DW, Yeo GW. 2012. Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat Neurosci* 15(11):1488-1497.
- Lai C, Xie C, McCormack SG, Chiang HC, Michalak MK, Lin X, Chandran J, Shim H, Shimoji M, Cookson MR, Haganir RL, Rothstein JD, Price DL, Wong PC, Martin LJ, Zhu JJ, Cai H. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis 2-deficiency leads to neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis through altered AMPA receptor trafficking. *J Neurosci* 26(45):11798-11806.
- Laird FM, Farah MH, Ackerley S, Hoke A, Maragakis N, Rothstein JD, Griffin J, Price DL, Martin LJ, Wong PC. 2008. Motor neuron disease occurring in a mutant dynactin mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking. *J Neurosci* 28(9):1997-2005.
- Lambert EH, Mulder DW. 1957. Electromyographic studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 32(17):441-446.
- Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. 2003. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 34(4):383-394.
- LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, Tokito M, Van Winkle T, Howland DS, Holzbaur EL. 2002. Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 34(5):715-727.
- Leger S, Black WC, Deschenes D, Dolman S, Falguyret JP, Gagnon M, Guiral S, Huang Z, Guay J, Leblanc Y, Li CS, Masse F, Oballa R, Zhang L. 2010. Synthesis and biological activity of a potent and orally bioavailable SCD inhibitor (MF-438). *Bioorg Med Chem Lett* 20(2):499-502.
- Leigh PN, Mitsumoto H. 2003. MMT vs MVIC: low-tech scores high? *Neurology* 61(11):1472-1473.
- Li TM, Alberman E, Swash M. 1990. Clinical features and associations of 560 cases of motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53(12):1043-1045.
- Li W, Brakefield D, Pan Y, Hunter D, Myckatyn TM, Parsadanian A. 2007. Muscle-derived but not centrally derived transgene GDNF is neuroprotective in G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Exp Neurol* 203(2):457-471.
- Li X, Lu L, Bush DJ, Zhang X, Zheng L, Suswam EA, King PH. 2009. Mutant copper-zinc superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis binds to adenine/uridine-rich stability elements in the vascular endothelial growth factor 3'-untranslated region. *J Neurochem* 108(4):1032-1044.
- Ling KK, Siow NL, Choi RC, Ting AK, Kong LW, Tsim KW. 2004. ATP potentiates agrin-induced AChR aggregation in cultured myotubes: activation of RhoA in P2Y1 nucleotide receptor signaling at vertebrate neuromuscular junctions. *J Biol Chem* 279(30):31081-31088.

- Lino MM, Schneider C, Caroni P. 2002. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 22(12):4825-4832.
- Liscic RM, Grinberg LT, Zidar J, Gitcho MA, Cairns NJ. 2008. ALS and FTLN: two faces of TDP-43 proteinopathy. *Eur J Neurol* 15(8):772-780.
- Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, Brannstrom T, Gredal O, Wong PC, Williams DS, Cleveland DW. 2004. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* 43(1):5-17.
- Lloyd CM, Richardson MP, Brooks DJ, Al-Chalabi A, Leigh PN. 2000. Extramotor involvement in ALS: PET studies with the GABA(A) ligand [(11)C]flumazenil. *Brain* 123 (Pt 11):2289-2296.
- Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, Cleveland DW. 2009. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(11):4465-4470.
- Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E. 2010. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81(4):385-390.
- Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, Kramer JH, Olney RK, Miller B. 2003. Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology* 60(7):1094-1097.
- Lowry KS, Murray SS, McLean CA, Talman P, Mathers S, Lopes EC, Cheema SS. 2001. A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2(3):127-134.
- Lu Z, Smith DO. 1991. Adenosine 5'-triphosphate increases acetylcholine channel opening frequency in rat skeletal muscle. *J Physiol* 436:45-56.
- Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG. 2005. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115(10):2774-2783.
- Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 9(10):995-1007.
- Magnus T, Beck M, Giess R, Puls I, Naumann M, Toyka KV. 2002. Disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: predictors of survival. *Muscle Nerve* 25(5):709-714.
- Mai K, Andres J, Bobbert T, Assmann A, Biedasek K, Diederich S, Graham I, Larson TR, Pfeiffer AF, Spranger J. 2012. Rosiglitazone increases fatty acid Delta9-desaturation and decreases elongase activity index in human skeletal muscle in vivo. *Metabolism* 61(1):108-116.
- Malaspina A, Ngoh SF, Ward RE, Hall JC, Tai FW, Yip PK, Jones C, Jokic N, Averill SA, Michael-Titus AT, Priestley JV. 2010. Activation transcription factor-3 activation and the development of spinal cord degeneration in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 169(2):812-827.
- Malek AM, Barchowsky A, Bowser R, Youk A, Talbott EO. 2012. Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis of epidemiological studies: pesticide exposure as a risk factor for ALS. *Environ Res* 117:112-119.
- Maragakis NJ, Jackson M, Ganel R, Rothstein JD. 2003. Topiramate protects against motor neuron degeneration in organotypic spinal cord cultures but not in G93A SOD1 transgenic mice. *Neurosci Lett* 338(2):107-110.
- Marcuzzo S, Zucca I, Mastropietro A, de Rosbo NK, Cavalcante P, Tartari S, Bonanno S, Preite L, Mantegazza R, Bernasconi P. 2011. Hind limb muscle atrophy precedes

- cerebral neuronal degeneration in G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a longitudinal MRI study. *Exp Neurol* 231(1):30-37.
- Marin B, Desport JC, Kajeu P, Jesus P, Nicolaud B, Nicol M, Preux PM, Couratier P. 2011. Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82(6):628-634.
- Martin LJ, Chen K, Liu Z. 2005. Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation. *J Neurosci* 25(27):6449-6459.
- Martin LJ, Liu Z, Chen K, Price AC, Pan Y, Swaby JA, Golden WC. 2007. Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J Comp Neurol* 500(1):20-46.
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H. 2010. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465(7295):223-226.
- Masui Y, Mozai T, Kakehi K. 1985. Functional and morphometric study of the liver in motor neuron disease. *J Neurol* 232(1):15-19.
- Maswood N, Young J, Tilmont E, Zhang Z, Gash DM, Gerhardt GA, Grondin R, Roth GS, Mattison J, Lane MA, Carson RE, Cohen RM, Mouton PR, Quigley C, Mattson MP, Ingram DK. 2004. Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52):18171-18176.
- Matsuishi T, Nagamitsu S, Shoji H, Itoh M, Takashima S, Iwaki T, Shida N, Yamashita Y, Sakai T, Kato H. 1999. Increased cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Short communication. *J Neural Transm* 106(9-10):943-948.
- Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, Manfredi G. 2002. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277(33):29626-29633.
- Mattson MP, Cutler RG, Camandola S. 2007. Energy intake and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromolecular Med* 9(1):17-20.
- McClelland S, 3rd, Bethoux FA, Boulis NM, Sutliff MH, Stough DK, Schwetz KM, Gogol DM, Harrison M, Pioro EP. 2008. Intrathecal baclofen for spasticity-related pain in amyotrophic lateral sclerosis: efficacy and factors associated with pain relief. *Muscle Nerve* 37(3):396-398.
- Meyer T, Schwan A, Dullinger JS, Brocke J, Hoffmann KT, Nolte CH, Hopt A, Kopp U, Andersen P, Epplen JT, Linke P. 2005. Early-onset ALS with long-term survival associated with spastin gene mutation. *Neurology* 65(1):141-143.
- Miana-Mena FJ, Piedrafita E, Gonzalez-Mingot C, Larrode P, Munoz MJ, Martinez-Ballarín E, Reiter RJ, Osta R, Garcia JJ. 2011. Levels of membrane fluidity in the spinal cord and the brain in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Bioenerg Biomembr* 43(2):181-186.
- Miller JB, Girgenrath M. 2006. The role of apoptosis in neuromuscular diseases and prospects for anti-apoptosis therapy. *Trends Mol Med* 12(6):279-286.
- Miller RG, Jackson CE, Kasarskis EJ, England JD, Forshew D, Johnston W, Kalra S, Katz JS, Mitsumoto H, Rosenfeld J, Shoemaker C, Strong MJ, Woolley SC. 2009. Practice parameter update: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: multidisciplinary care, symptom management, and cognitive/behavioral impairment (an evidence-based review): report of the

- Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 73(15):1227-1233.
- Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH. 2003. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4(3):191-206.
- Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH. 2007. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*(1):CD001447.
- Miller RG, Rosenberg JA, Gelinas DF, Mitsumoto H, Newman D, Sufit R, Borasio GD, Bradley WG, Bromberg MB, Brooks BR, Kasarskis EJ, Munsat TL, Oppenheimer EA. 1999. Practice parameter: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology: ALS Practice Parameters Task Force. *Neurology* 52(7):1311-1323.
- Miller TA, LeBrasseur NK, Cote GM, Trucillo MP, Pimentel DR, Ido Y, Ruderman NB, Sawyer DB. 2005. Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 336(1):309-315.
- Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umaphathi P, Arnson H, Rizo L, Mendell JR, Gage FH, Cleveland DW, Kaspar BK. 2006. Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(51):19546-19551.
- Mitchell JD, Borasio GD. 2007. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 369(9578):2031-2041.
- Miyazaki M, Kim YC, Gray-Keller MP, Attie AD, Ntambi JM. 2000. The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem* 275(39):30132-30138.
- Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM. 2001. Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *J Nutr* 131(9):2260-2268.
- Mondola P, Annella T, Santillo M, Santangelo F. 1996. Evidence for secretion of cytosolic CuZn superoxide dismutase by Hep G2 cells and human fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 28(6):677-681.
- Mourelatos Z, Gonatas NK, Stieber A, Gurney ME, Dal Canto MC. 1996. 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* 93(11):5472-5477.
- Mulder DW, Kurland LT, Offord KP, Beard CM. 1986. Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 36(4):511-517.
- Muller FL, Song W, Liu Y, Chaudhuri A, Pieke-Dahl S, Strong R, Huang TT, Epstein CJ, Roberts LJ, 2nd, Csete M, Faulkner JA, Van Remmen H. 2006. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med* 40(11):1993-2004.
- Munch C, Rosenbohm A, Sperfeld AD, Uttner I, Reske S, Krause BJ, Sedlmeier R, Meyer T, Hanemann CO, Stumm G, Ludolph AC. 2005. Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD. *Ann Neurol* 58(5):777-780.
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA, Steele JC, Sacks OW. 2004. Occurrence of beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand* 110(4):267-269.
- Murray B. MH, Przedborski S. and Gordon P. . 2006. Natural history and prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. New York, Taylor et Francis:227-256.

- Museth AK, Brorsson AC, Lundqvist M, Tibell LA, Jonsson BH. 2009. The ALS-associated mutation G93A in human copper-zinc superoxide dismutase selectively destabilizes the remote metal binding region. *Biochemistry* 48(37):8817-8829.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. 2007. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10(5):615-622.
- Nagy D, Kato T, Kushner PD. 1994. Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 38(3):336-347.
- Nakano Y, Hirayama K, Terao K. 1987. Hepatic ultrastructural changes and liver dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 44(1):103-106.
- Nakashima K, Yakabe Y. 2007. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(7):1650-1656.
- Nelson LM, Matkin C, Longstreth WT, Jr., McGuire V. 2000. Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. II. Diet. *Am J Epidemiol* 151(2):164-173.
- Neumann M, Kwong LK, Lee EB, Kremmer E, Flatley A, Xu Y, Forman MS, Troost D, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. 2009. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathol* 117(2):137-149.
- Ngo M, Ridgway ND. 2009. Oxysterol binding protein-related Protein 9 (ORP9) is a cholesterol transfer protein that regulates Golgi structure and function. *Mol Biol Cell* 20(5):1388-1399.
- Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, Kok F, Oliveira JR, Gillingwater T, Webb J, Skehel P, Zatz M. 2004. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 75(5):822-831.
- Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. 2008. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* 22(11):1451-1464.
- Noonan CW, Reif JS, Yost M, Touchstone J. 2002. Occupational exposure to magnetic fields in case-referent studies of neurodegenerative diseases. *Scand J Work Environ Health* 28(1):42-48.
- Norris F, Shepherd R, Denys E, U K, Mukai E, Elias L, Holden D, Norris H. 1993. Onset, natural history and outcome in idiopathic adult motor neuron disease. *J Neurol Sci* 118(1):48-55.
- Norris FH, Jr., Calanchini PR, Fallat RJ, Panchari S, Jewett B. 1974. The administration of guanidine in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 24(8):721-728.
- Ntambi JM. 1999. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 40(9):1549-1558.
- Ntambi JM, Miyazaki M. 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 43(2):91-104.
- Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzioriski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD. 2002. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17):11482-11486.
- O'Reilly SA, Roedica J, Nagy D, Hallewell RA, Alderson K, Marklund SL, Kuby J, Kushner PD. 1995. Motor neuron-astrocyte interactions and levels of Cu,Zn superoxide dismutase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 131(2):203-210.

- Ogunshola OO, Antic A, Donoghue MJ, Fan SY, Kim H, Stewart WB, Madri JA, Ment LR. 2002. Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J Biol Chem* 277(13):11410-11415.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I. 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276(42):38388-38393.
- Ono S, Hu J, Shimizu N, Imai T, Nakagawa H. 2001. Increased interleukin-6 of skin and serum in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 187(1-2):27-34.
- 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, Laudénbach V, Vermylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx 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. 2001. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28(2):131-138.
- Ortinou LC, Nickelson KJ, Stromsdorfer KL, Naik CY, Pickering RT, Haynes RA, Fritsche KL, Perfield JW, 2nd. 2013. Sterculic oil, a natural inhibitor of SCD1, improves the metabolic state of obese OLETF rats. *Obesity (Silver Spring)* 21(2):344-352.
- Otomo A, Hadano S, Okada T, Mizumura H, Kunita R, Nishijima H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Kohiki E, Suga E, Yasuda M, Osuga H, Nishimoto T, Narumiya S, Ikeda JE. 2003. ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet* 12(14):1671-1687.
- Ozsoy O, Seval-Celik Y, Hacıoglu G, Yargıoğlu P, Demir R, Agar A, Aslan M. 2011. The influence and the mechanism of docosahexaenoic acid on a mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 59(5):664-670.
- Padhi AK, Jayaram B, Gomes J. 2013. Prediction of functional loss of human angiogenin mutants associated with ALS by molecular dynamics simulations. *Sci Rep* 3:1225.
- Palecek J, Lips MB, Keller BU. 1999. Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *J Physiol* 520 Pt 2:485-502.
- Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, Girones X, Henry TL, Matsubara E, Zambon D, Wolozin B, Sano M, Cruz-Sanchez FF, Thal LJ, Petanceska SS, Refolo LM. 2003. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61(2):199-205.
- Parboosingh JS, Meininger V, McKenna-Yasek D, Brown RH, Jr., Rouleau GA. 1999. Deletions causing spinal muscular atrophy do not predispose to amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 56(6):710-712.
- Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, Morrison KE, Pall HS, Hardiman O, Collinge J, Shaw PJ, Fisher EM. 2006. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 67(6):1074-1077.
- Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacsikai BJ, Hyman BT, Trotti D, Brown RH, Jr. 2004. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 43(1):19-30.
- Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Jr., Cleveland DW. 2000. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25):13901-13906.

- Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. 2010. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PLoS One* 5(2):e9386.
- Patel NV, Gordon MN, Connor KE, Good RA, Engelman RW, Mason J, Morgan DG, Morgan TE, Finch CE. 2005. Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models. *Neurobiol Aging* 26(7):995-1000.
- Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L. 2004. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89(2):464-473.
- Perrie WT, Lee GT, Curtis EM, Sparke J, Buller JR, Rossi ML. 1993. Changes in the myelinated axons of femoral nerve in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm Suppl* 39:223-233.
- Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 1804(2):245-262.
- Peter A, Weigert C, Staiger H, Machicao F, Schick F, Machann J, Stefan N, Thamer C, Haring HU, Schleicher E. 2009. Individual stearyl-coa desaturase 1 expression modulates endoplasmic reticulum stress and inflammation in human myotubes and is associated with skeletal muscle lipid storage and insulin sensitivity in vivo. *Diabetes* 58(8):1757-1765.
- Philips T, Bento-Abreu A, Nonneman A, Haeck W, Staats K, Geelen V, Hersmus N, Kusters B, Van Den Bosch L, Van Damme P, Richardson WD, Robberecht W. 2013. Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 136(Pt 2):471-482.
- Pradat PF, Bruneteau G. 2006. [Differential diagnosis and atypical subsets of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 162 Spec No 2:4S81-84S90.
- Pradat PF, Bruneteau G, Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, Jokic N, Salachas F, Le Forestier N, Echaniz-Laguna A, Dubourg O, Hauw JJ, Tranchant C, Loeffler JP, Meininger V. 2007. Muscle Nogo-A expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. *Ann Neurol* 62(1):15-20.
- 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. 2010. Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 11(1-2):166-171.
- Pradat PF, Dubourg O, de Tapia M, di Scala F, Dupuis L, Lenglet T, Bruneteau G, Salachas F, Lacomblez L, Corvol JC, Demougin P, Primig M, Meininger V, Loeffler JP, Gonzalez de Aguilar JL. 2012. Muscle gene expression is a marker of amyotrophic lateral sclerosis severity. *Neurodegener Dis* 9(1):38-52.
- Pramatarova A, Laganier J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. 2001. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21(10):3369-3374.
- Prell T, Lautenschlager J, Witte OW, Carri MT, Grosskreutz J. 2012. The unfolded protein response in models of human mutant G93A amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 35(5):652-660.
- Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. 2006. Effect of cholesterol on lateral diffusion of fluorescent lipid probes in native hippocampal membranes. *Chem Phys Lipids* 143(1-2):11-21.
- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SJ, Brown RH, Jr., Ludlow CL, Fischbeck KH. 2003. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 33(4):455-456.

- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. 2006. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9(3):408-419.
- Radi R, Cassina A, Hodara R. 2002. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 383(3-4):401-409.
- Rao MV, Houseweart MK, Williamson TL, Crawford TO, Folmer J, Cleveland DW. 1998. Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation. *J Cell Biol* 143(1):171-181.
- Raoul C, Buhler E, Sadeghi C, Jacquier A, Aebischer P, Pettmann B, Henderson CE, Haase G. 2006. Chronic activation in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice of a feedback loop involving Fas, Daxx, and FasL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(15):6007-6012.
- Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. 2002. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35(6):1067-1083.
- Rathke-Hartlieb S, Schmidt VC, Jockusch H, Schmitt-John T, Bartsch JW. 1999. Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse. *Neuroreport* 10(16):3411-3416.
- Ravits J, Laurie P, Fan Y, Moore DH. 2007a. Implications of ALS focality: rostral-caudal distribution of lower motor neuron loss postmortem. *Neurology* 68(19):1576-1582.
- Ravits J, Paul P, Jorg C. 2007b. Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology* 68(19):1571-1575.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD. 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13(1):43-47.
- Riddoch-Contreras J, Yang SY, Dick JR, Goldspink G, Orrell RW, Greensmith L. 2009. Mechano-growth factor, an IGF-I splice variant, rescues motoneurons and improves muscle function in SOD1(G93A) mice. *Exp Neurol* 215(2):281-289.
- Ringholz GM, Greene SR. 2006. The relationship between amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 6(5):387-392.
- Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW. 1995. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(3):689-693.
- Roberts K, Zeineddine R, Corcoran L, Li W, Campbell IL, Yerbury JJ. 2013. Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype. *Glia* 61(3):409-419.
- Roche JC, Rojas-Garcia R, Scott KM, Scotton W, Ellis CE, Burman R, Wijesekera L, Turner MR, Leigh PN, Shaw CE, Al-Chalabi A. 2012. A proposed staging system for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 135(Pt 3):847-852.
- Rosati G, Pinna L, Granieri E, Aiello I, Tola R, Agnetti V, Pirisi A, de Bastiani P. 1977. Studies on epidemiological, clinical, and etiological aspects of ALS disease in Sardinia, Southern Italy. *Acta Neurol Scand* 55(3):231-244.
- Rosen DR. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364(6435):362.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. 1990. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28(1):18-25.

- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38(1):73-84.
- Rouaux C, Panteleeva I, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Dupuis L, Menger Y, Boutillier AL, Loeffler JP. 2007. Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neurosci* 27(21):5535-5545.
- Rouleau GA, Clark AW, Rooke K, Pramatarova A, Krizus A, Suchowersky O, Julien JP, Figlewicz D. 1996. SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39(1):128-131.
- Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YF, Stewart H, Kelley BJ, Kuntz K, Crook RJ, Sreedharan J, Vance C, Sorenson E, Lippa C, Bigio EH, Geschwind DH, Knopman DS, Mitsumoto H, Petersen RC, Cashman NR, Hutton M, Shaw CE, Boylan KB, Boeve B, Graff-Radford NR, Wszolek ZK, Caselli RJ, Dickson DW, Mackenzie IR, Petrucelli L, Rademakers R. 2008. Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 4(9):e1000193.
- Ryten M, Koshi R, Knight GE, Turmaine M, Dunn P, Cockayne DA, Ford AP, Burnstock G. 2007. Abnormalities in neuromuscular junction structure and skeletal muscle function in mice lacking the P2X2 nucleotide receptor. *Neuroscience* 148(3):700-711.
- Sahawneh MA, Ricart KC, Roberts BR, Bomben VC, Basso M, Ye Y, Sahawneh J, Franco MC, Beckman JS, Estevez AG. 2010. Cu,Zn-superoxide dismutase increases toxicity of mutant and zinc-deficient superoxide dismutase by enhancing protein stability. *J Biol Chem* 285(44):33885-33897.
- Santos DA, Salgado AI, Cunha RA. 2003. ATP is released from nerve terminals and from activated muscle fibres on stimulation of the rat phrenic nerve. *Neurosci Lett* 338(3):225-228.
- Sasaki S. 2010. Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69(4):346-355.
- Sasaki S, Iwata M. 1996. Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 204(1-2):53-56.
- Savitz DA, Loomis DP, Tse CK. 1998. Electrical occupations and neurodegenerative disease: analysis of U.S. mortality data. *Arch Environ Health* 53(1):71-74.
- Saxena S, Cabuy E, Caroni P. 2009. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 12(5):627-636.
- Schenk S, Horowitz JF. 2007. Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117(6):1690-1698.
- Scherer SS, Wrabetz L. 2008. Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies. *Glia* 56(14):1578-1589.
- Schmidt S, Willers J, Stahl F, Mutz KO, Scheper T, Hahn A, Schuchardt JP. 2012. Regulation of lipid metabolism-related gene expression in whole blood cells of normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation. *Lipids Health Dis* 11:172.
- Schmitt-John T, Drepper C, Mussmann A, Hahn P, Kuhlmann M, Thiel C, Hafner M, Lengeling A, Heimann P, Jones JM, Meisler MH, Jockusch H. 2005. Mutation of Vps54 causes motor neuron disease and defective spermiogenesis in the wobbler mouse. *Nat Genet* 37(11):1213-1215.
- Schmitt Hussain G, Schmitt F, Henriques A, Lequeu T, Rene F, Bindler F, Dirrig-Grosch S, Oudart H, Palamiuc L, Metz-Boutigue MH, Dupuis L, Marchioni E, Gonzalez De

- Aguilar JL, Loeffler JP. 2013. Systemic Down-Regulation of Delta-9 Desaturase Promotes Muscle Oxidative Metabolism and Accelerates Muscle Function Recovery following Nerve Injury. *PLoS One* 8(6):e64525.
- Shanklin J, Whittle E, Fox BG. 1994. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33(43):12787-12794.
- Sharp PS, Dick JR, Greensmith L. 2005. The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 130(4):897-910.
- Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ. 1995. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4(2):209-216.
- Shi P, Gal J, Kwinter DM, Liu X, Zhu H. 2010. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1802(1):45-51.
- Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Dal Canto MC, Gurney ME, Komori T, Umahara T, Asayama K. 1998. Presence of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) immunoreactivity in neuronal hyaline inclusions in spinal cords from mice carrying a transgene for Gly93Ala mutant human Cu/Zn SOD. *Acta Neuropathol* 95(2):136-142.
- Shirakawa K, Suzuki H, Ito M, Kono S, Uchiyama T, Ohashi T, Miyajima H. 2009. Novel compound heterozygous ALS2 mutations cause juvenile amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Neurology* 73(24):2124-2126.
- Siddique T, Figlewicz DA, Pericak-Vance MA, Haines JL, Rouleau G, Jeffers AJ, Sapp P, Hung WY, Bebout J, McKenna-Yasek D, et al. 1991. Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N Engl J Med* 324(20):1381-1384.
- Siddons MA, Pickering-Brown SM, Mann DM, Owen F, Cooper PN. 1996. Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism frequencies in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 208(1):65-68.
- Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH. 1996. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39(2):203-216.
- Singh M. 2005. Essential fatty acids, DHA and human brain. *Indian J Pediatr* 72(3):239-242.
- Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sorensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J. 2005. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 37(8):806-808.
- Spencer PS. 1987. Guam ALS/parkinsonism-dementia: a long-latency neurotoxic disorder caused by "slow toxin(s)" in food? *Can J Neurol Sci* 14(3 Suppl):347-357.
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph A, Roy DN. 1986. Motorneuron disease on Guam: possible role of a food neurotoxin. *Lancet* 1(8487):965.
- Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le Forestier N, Marouan A, Dib M, Meininger V. 2002. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci* 193(2):73-78.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-

- Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE. 2008. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319(5870):1668-1672.
- Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ. 1998. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci* 1(5):366-373.
- Strange RW, Antonyuk S, Hough MA, Doucette PA, Rodriguez JA, Hart PJ, Hayward LJ, Valentine JS, Hasnain SS. 2003. The structure of holo and metal-deficient wild-type human Cu, Zn superoxide dismutase and its relevance to familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Biol* 328(4):877-891.
- Strickland D, Smith SA, Dolliff G, Goldman L, Roelofs RI. 1996. Amyotrophic lateral sclerosis and occupational history. A pilot case-control study. *Arch Neurol* 53(8):730-733.
- Strong MJ. 2010. The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neurol Sci* 288(1-2):1-12.
- Strong MJ, Kesavapany S, Pant HC. 2005. The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? *J Neuropathol Exp Neurol* 64(8):649-664.
- Subramanian V, Feng Y. 2007. A new role for angiogenin in neurite growth and pathfinding: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 16(12):1445-1453.
- Sutedja NA, Sinke RJ, Van Vught PW, Van der Linden MW, Wokke JH, Van Duijn CM, Njajou OT, Van der Schouw YT, Veldink JH, Van den Berg LH. 2007a. The association between H63D mutations in HFE and amyotrophic lateral sclerosis in a Dutch population. *Arch Neurol* 64(1):63-67.
- Sutedja NA, Veldink JH, Fischer K, Kromhout H, Wokke JH, Huisman MH, Heederik DJ, Van den Berg LH. 2007b. Lifetime occupation, education, smoking, and risk of ALS. *Neurology* 69(15):1508-1514.
- Suzuki H, Kanekura K, Levine TP, Kohno K, Olkkonen VM, Aiso S, Matsuoka M. 2009. ALS-linked P56S-VAPB, an aggregated loss-of-function mutant of VAPB, predisposes motor neurons to ER stress-related death by inducing aggregation of co-expressed wild-type VAPB. *J Neurochem* 108(4):973-985.
- Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Klein SM, Aebischer P, Svendsen CN. 2007. GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS. *PLoS One* 2(8):e689.
- Tarnopolsky MA, Bourgeois JM, Fu MH, Kataeva G, Shah J, Simon DK, Mahoney D, Johns D, MacKay N, Robinson BH. 2004. Novel SCO2 mutation (G1521A) presenting as a spinal muscular atrophy type I phenotype. *Am J Med Genet A* 125A(3):310-314.
- Tateno M, Sadakata H, Tanaka M, Itohara S, Shin RM, Miura M, Masuda M, Aosaki T, Urushitani M, Misawa H, Takahashi R. 2004. Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum Mol Genet* 13(19):2183-2196.
- Taylor AR, Gifondorwa DJ, Newbern JM, Robinson MB, Strupe JL, Pevette D, Oppenheim RW, Milligan CE. 2007. Astrocyte and muscle-derived secreted factors differentially regulate motoneuron survival. *J Neurosci* 27(3):634-644.
- Tews DS, Goebel HH, Meinck HM. 1997. DNA-fragmentation and apoptosis-related proteins of muscle cells in motor neuron disorders. *Acta Neurol Scand* 96(6):380-386.
- Thau N, Knippenberg S, Korner S, Rath KJ, Dengler R, Petri S. 2012. Decreased mRNA expression of PGC-1alpha and PGC-1alpha-regulated factors in the SOD1G93A

- ALS mouse model and in human sporadic ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* 71(12):1064-1074.
- Ticozzi N, Ratti A, Silani V. 2010. Protein aggregation and defective RNA metabolism as mechanisms for motor neuron damage. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9(3):285-296.
- Topp JD, Gray NW, Gerard RD, Horazdovsky BF. 2004. Alsin is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 279(23):24612-24623.
- Tortelli R, Conforti FL, Cortese R, D'Errico E, Distaso E, Mazzei R, Ungaro C, Magariello A, Gambardella A, Logroscino G, Simone IL. 2013. Amyotrophic lateral sclerosis: a new missense mutation in the SOD1 gene. *Neurobiol Aging* 34(6):1709 e1703-1705.
- Tortelli R, Ruggieri M, Cortese R, D'Errico E, Capozzo R, Leo A, Mastrapasqua M, Zoccolella S, Leante R, Livrea P, Logroscino G, Simone IL. 2012. Elevated cerebrospinal fluid neurofilament light levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a possible marker of disease severity and progression. *Eur J Neurol* 19(12):1561-1567.
- Towne C, Raoul C, Schneider BL, Aebischer P. 2008. Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Mol Ther* 16(6):1018-1025.
- Trappe TA, Fluckey JD, White F, Lambert CP, Evans WJ. 2001. Skeletal muscle PGF(2)(alpha) and PGE(2) in response to eccentric resistance exercise: influence of ibuprofen acetaminophen. *J Clin Endocrinol Metab* 86(10):5067-5070.
- Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman OM. 2000. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. *Arch Neurol* 57(8):1171-1176.
- Tsim KW, Choi RC, Siow NL, Cheng AW, Ling KK, Jiang JX, Tung EK, Lee HH, Xie QH, Simon J, Barnard EA. 2003. ATP induces post-synaptic gene expressions in vertebrate skeletal neuromuscular junctions. *J Neurocytol* 32(5-8):603-617.
- Turner BJ, Ackerley S, Davies KE, Talbot K. 2010. Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. *Hum Mol Genet* 19(5):815-824.
- Turner BJ, Atkin JD. 2006. ER stress and UPR in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Mol Med* 6(1):79-86.
- Turner BJ, Atkin JD, Farg MA, Zang DW, Rembach A, Lopes EC, Patch JD, Hill AF, Cheema SS. 2005. Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 25(1):108-117.
- Turner BJ, Lopes EC, Cheema SS. 2003. Neuromuscular accumulation of mutant superoxide dismutase 1 aggregates in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 350(2):132-136.
- Turner BJ, Parkinson NJ, Davies KE, Talbot K. 2009. Survival motor neuron deficiency enhances progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neurobiol Dis* 34(3):511-517.
- Turner BJ, Talbot K. 2008. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 85(1):94-134.
- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB. 2004. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15(3):601-609.
- Ulbrich M, Schmidt VC, Ronsiek M, Mussmann A, Bartsch JW, Augustin M, Jockusch H, Schmitt-John T. 2002. Genetic modifiers that aggravate the neurological phenotype of the wobbler mouse. *Neuroreport* 13(4):535-539.

- Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP. 2006. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 9(1):108-118.
- Vaisman N, Lusaus M, Nefussy B, Niv E, Comaneshter D, Hallack R, Drory VE. 2009. Do patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have increased energy needs? *J Neurol Sci* 279(1-2):26-29.
- Valdmanis PN, Rouleau GA. 2008. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70(2):144-152.
- van Blitterswijk M, Landers JE. RNA processing pathways in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* 11(3):275-290.
- van Blitterswijk M, van Vught PW, van Es MA, Schelhaas HJ, van der Kooi AJ, de Visser M, Veldink JH, van den Berg LH. 2012. Novel optineurin mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Aging* 33(5):1016 e1011-1017.
- van Blitterswijk M, Wang ET, Friedman BA, Keagle PJ, Lowe P, Leclerc AL, van den Berg LH, Housman DE, Veldink JH, Landers JE. 2013. Characterization of FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis using RNA-Seq. *PLoS One* 8(4):e60788.
- Van Damme P, Van Den Bosch L, Van Houtte E, Callewaert G, Robberecht W. 2002. GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity. *J Neurophysiol* 88(3):1279-1287.
- Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB, Clay D, Wood EM, Chen-Plotkin AS, Martinez-Lage M, Steinbart E, McCluskey L, Grossman M, Neumann M, Wu IL, Yang WS, Kalb R, Galasko DR, Montine TJ, Trojanowski JQ, Lee VM, Schellenberg GD, Yu CE. 2008. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol* 7(5):409-416.
- Van Den Bosch L, Tilkin P, Lemmens G, Robberecht W. 2002. Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS. *Neuroreport* 13(8):1067-1070.
- Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, Smith BN, Hu X, Sreedharan J, Siddique T, Schelhaas HJ, Kusters B, Troost D, Baas F, de Jong V, Shaw CE. 2006. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain* 129(Pt 4):868-876.
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE. 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323(5918):1208-1211.
- Vande Velde C, McDonald KK, Boukhedimi Y, McAlonis-Downes M, Lobsiger CS, Bel Hadj S, Zandona A, Julien JP, Shah SB, Cleveland DW. 2011. Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. *PLoS One* 6(7):e22031.
- Vande Velde C, Miller TM, Cashman NR, Cleveland DW. 2008. Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(10):4022-4027.
- Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA. 2008. Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 28(50):13574-13581.
- Veldink JH, Kalmijn S, Groeneveld GJ, Wunderink W, Koster A, de Vries JH, van der Luyt J, Wokke JH, Van den Berg LH. 2007. Intake of polyunsaturated fatty acids

- and vitamin E reduces the risk of developing amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78(4):367-371.
- Veldink JH, Kalmijn S, Van der Hout AH, Lemmink HH, Groeneveld GJ, Lummen C, Scheffer H, Wokke JH, Van den Berg LH. 2005. SMN genotypes producing less SMN protein increase susceptibility to and severity of sporadic ALS. *Neurology* 65(6):820-825.
- Veldink JH, van den Berg LH, Cobben JM, Stulp RP, De Jong JM, Vogels OJ, Baas F, Wokke JH, Scheffer H. 2001. Homozygous deletion of the survival motor neuron 2 gene is a prognostic factor in sporadic ALS. *Neurology* 56(6):749-752.
- Vinceti M, Bottecchi I, Fan A, Finkelstein Y, Mandrioli J. 2012. Are environmental exposures to selenium, heavy metals, and pesticides risk factors for amyotrophic lateral sclerosis? *Rev Environ Health* 27(1):19-41.
- Vleminckx V, Van Damme P, Goffin K, Delye H, Van Den Bosch L, Robberecht W. 2002. Upregulation of HSP27 in a transgenic model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(11):968-974.
- Vucic S, Kiernan MC. 2006. Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* 117(7):1458-1466.
- Vucic S, Kiernan MC. 2009. Pathophysiology of neurodegeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Mol Med* 9(3):255-272.
- Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC. 2007. Fatigue and activity dependent changes in axonal excitability in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78(11):1202-1208.
- Vukosavic S, Dubois-Dauphin M, Romero N, Przedborski S. 1999. Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 73(6):2460-2468.
- Vukosavic S, Stefanis L, Jackson-Lewis V, Guegan C, Romero N, Chen C, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. 2000. Delaying caspase activation by Bcl-2: A clue to disease retardation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 20(24):9119-9125.
- Wada M, Uchihara T, Nakamura A, Oyanagi K. 1999. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis on Guam: a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural investigation. *Acta Neuropathol* 98(2):150-156.
- Waldmeier PC, Tatton WG. 2004. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? *Drug Discov Today* 9(5):210-218.
- Wang J, Caruano-Yzermans A, Rodriguez A, Scheurmann JP, Slunt HH, Cao X, Gitlin J, Hart PJ, Borchelt DR. 2007a. Disease-associated mutations at copper ligand histidine residues of superoxide dismutase 1 diminish the binding of copper and compromise dimer stability. *J Biol Chem* 282(1):345-352.
- 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. 2009. Progressive aggregation despite chaperone associations of a mutant SOD1-YFP in transgenic mice that develop ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(5):1392-1397.
- Wang J, Slunt H, Gonzales V, Fromholt D, Coonfield M, Copeland NG, Jenkins NA, Borchelt DR. 2003. Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature. *Hum Mol Genet* 12(21):2753-2764.
- Wang J, Xu G, Borchelt DR. 2002. High molecular weight complexes of mutant superoxide dismutase 1: age-dependent and tissue-specific accumulation. *Neurobiol Dis* 9(2):139-148.
- Wang J, Xu G, Li H, Gonzales V, Fromholt D, Karch C, Copeland NG, Jenkins NA, Borchelt DR. 2005. Somatodendritic accumulation of misfolded SOD1-L126Z in

- motor neurons mediates degeneration: alphaB-crystallin modulates aggregation. *Hum Mol Genet* 14(16):2335-2347.
- Wang L, Popko B, Roos RP. 2011. The unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 20(5):1008-1015.
- Wang L, Pytel P, Feltri ML, Wrabetz L, Roos RP. 2012. Selective knockdown of mutant SOD1 in Schwann cells ameliorates disease in G85R mutant SOD1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 48(1):52-57.
- Wang Y, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA, Jin K. 2007b. Vascular endothelial growth factor overexpression delays neurodegeneration and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci* 27(2):304-307.
- Warita H, Manabe Y, Murakami T, Shiote M, Shiro Y, Hayashi T, Nagano I, Shoji M, Abe K. 2002. Tardive decrease of astrocytic glutamate transporter protein in transgenic mice with ALS-linked mutant SOD1. *Neurol Res* 24(6):577-581.
- Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. 2001. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 8(6):933-941.
- Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. 2006. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(2):E275-281.
- Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. 2002. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem* 80(4):616-625.
- Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz WS. 1998. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 156(1):65-72.
- Wilbourn AJ. 1998. Clinical neurophysiology in the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: the Lambert and the El Escorial criteria. *J Neurol Sci* 160 Suppl 1:S25-29.
- Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, Cuijt I, Smits V, Ceuterick-de Groote C, Van Broeckhoven C, Kumar-Singh S. 2010. TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8):3858-3863.
- Witzemann V, Brenner HR, Sakmann B. 1991. Neural factors regulate AChR subunit mRNAs at rat neuromuscular synapses. *J Cell Biol* 114(1):125-141.
- Wojcik S, Engel WK, Askanas V. 2006. Increased expression of Noga-A in ALS muscle biopsies is not unique for this disease. *Acta Myol* 25(3):116-118.
- Wong M, Martin LJ. 2010. Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 19(11):2284-2302.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14(6):1105-1116.
- Woodhoo A, Sommer L. 2008. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia* 56(14):1481-1490.
- Wootz H, Hansson I, Korhonen L, Napankangas U, Lindholm D. 2004. Caspase-12 cleavage and increased oxidative stress during motoneuron degeneration in transgenic mouse model of ALS. *Biochem Biophys Res Commun* 322(1):281-286.
- Worms PM. 2001. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci* 191(1-2):3-9.

- Wu CH, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, Piotrowska K, Lowe P, Koppers M, McKenna-Yasek D, Baron DM, Kost JE, Gonzalez-Perez P, Fox AD, Adams J, Taroni F, Tiloca C, Leclerc AL, Chafe SC, Mangroo D, Moore MJ, Zitzewitz JA, Xu ZS, van den Berg LH, Glass JD, Siciliano G, Cirulli ET, Goldstein DB, Salachas F, Meininger V, Rossoll W, Ratti A, Gellera C, Bosco DA, Bassell GJ, Silani V, Drory VE, Brown RH, Jr., Landers JE. 2012. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 488(7412):499-503.
- Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, Lin WL, D'Alton S, Sheng H, Casey MC, Tong J, Knight J, Yu X, Rademakers R, Boylan K, Hutton M, McGowan E, Dickson DW, Lewis J, Petrucelli L. 2010. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci* 30(32):10851-10859.
- Xu ZP, Tsuji T, Riordan JF, Hu GF. 2002. The nuclear function of angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production. *Biochem Biophys Res Commun* 294(2):287-292.
- Yang Y, Gozen O, Watkins A, Lorenzini I, Lepore A, Gao Y, Vidensky S, Brennan J, Poulsen D, Won Park J, Li Jeon N, Robinson MB, Rothstein JD. 2009. Presynaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1. *Neuron* 61(6):880-894.
- Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. 2006. Proteolytic mRNA expression in response to acute resistance exercise in human single skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 101(5):1442-1450.
- Yao-Borengasser A, Rassouli N, Varma V, Bodles AM, Rasouli N, Unal R, Phanavanh B, Ranganathan G, McGehee RE, Jr., Kern PA. 2008. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 gene expression increases after pioglitazone treatment and is associated with peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11):4431-4439.
- Yasojima K, Tourtellotte WW, McGeer EG, McGeer PL. 2001. Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy. *Neurology* 57(6):952-956.
- Yasui M, Ota K. 1998. Aluminum decreases the magnesium concentration of spinal cord and trabecular bone in rats fed a low calcium, high aluminum diet. *J Neurol Sci* 157(1):37-41.
- Yip PK, Pizzasegola C, Gladman S, Biggio ML, Marino M, Jayasinghe M, Ullah F, Dyll SC, Malaspina A, Bendotti C, Michael-Titus A. 2013. The omega-3 Fatty Acid eicosapentaenoic Acid accelerates disease progression in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 8(4):e61626.
- Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. 2008. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 63(4):538-542.
- Yoshida K, Gage FH. 1991. Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Res* 538(1):118-126.
- Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G. 2002. Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 80(1):158-167.
- Yoshii Y, Hadano S, Otomo A, Kawabe K, Ikeda K, Iwasaki Y. 2010. Lower serum lipid levels are related to respiratory impairment in patients with ALS. *Neurology* 74(24):2027; author reply 2027-2028.
- Yrjanheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against

- focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13496-13500.
- Zhao Y, Calon F, Julien C, Winkler JW, Petasis NA, Lukiw WJ, Bazan NG. 2011. Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPARgamma-mediated mechanisms in Alzheimer's disease models. *PLoS One* 6(1):e15816.
- Zoccolella S, Beghi E, Palagano G, Fraddosio A, Guerra V, Samarelli V, Lepore V, Simone IL, Lamberti P, Serlenga L, Logroscino G. 2008. Analysis of survival and prognostic factors in amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(1):33-37.
- Zou T, Ilangovan R, Yu F, Xu Z, Zhou J. 2007. SMN protects cells against mutant SOD1 toxicity by increasing chaperone activity. *Biochem Biophys Res Commun* 364(4):850-855.

Rôle de la stéaroyl-coenzyme A désaturase 1, une enzyme de synthèse des acides gras mono-insaturés, dans un modèle transgénique d'étude de la Sclérose Latérale Amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative associée à un dysfonctionnement métabolique. Des altérations du métabolisme des lipides, décrites chez les patients SLA et les animaux modèles, pourraient participer à la mise en place des premières étapes de la maladie. L'objectif de cette thèse était d'étudier le rôle de la stéaroyl-coenzyme A désaturase 1 (SCD1), une enzyme clé du métabolisme des lipides, dans la SLA. En étudiant le profil d'acides gras périphériques dans un modèle de souris SLA, les souris SOD1m, nous avons vu une diminution de l'activité de la SCD1 dès les stades précoces (subcliniques) de la maladie. Cette diminution pourrait expliquer, à elle seule, les altérations du métabolisme des lipides caractéristiques de la SLA. La répercussion de la perte de l'activité de la SCD1 sur l'axe moteur a été étudiée. Une délétion du gène ou une inhibition pharmacologique de la SCD1 améliore la récupération fonctionnelle après lésion du nerf sciatique chez la souris sauvage. Nous avons cherché à voir si la perte d'activité de la SCD1 trouvée chez les souris SOD1m est un mécanisme de protection mis en place pour lutter contre l'évolution de la SLA. Nous avons traité des souris SOD1m avec un inhibiteur de l'activité de la SCD1. Le traitement a conduit à une augmentation du métabolisme oxydatif, une préservation de l'intégrité neuromusculaire ainsi qu'une amélioration de la survie des motoneurones. Nous concluons que l'inhibition de la SCD1 représente une cible thérapeutique prometteuse dans la SLA.

Amyotrophic lateral sclerosis is a neurodegenerative disease, associated with metabolic dysfunction. Alteration of lipid metabolism has been documented in ALS patients and animal models, and could participate to the first pathological steps of the disease. The objective of this thesis was to study the role of stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), a key enzyme of lipid metabolism, in ALS. By studying the profile of peripheral fatty acids in an animal model of ALS, the SOD1 mice, we found that SCD1 activity was strongly reduced at early (sub-clinical) disease stage, and that this reduction could explain in itself the alteration of lipid metabolism characteristic of ALS. The impact of loss of SCD1 activity for the motor axis was then studied. Genetic deletion or pharmacological inhibition of SCD1 enhanced functional recovery after sciatic nerve injury in mice. We further explored if the loss of SCD1 activity found in SOD1 mice is a protective mechanism elicited in response to ALS. We treated SOD1 mice with an inhibitor of SCD1 activity. The treatment resulted in exacerbated muscular oxidative metabolism, preservation of neuromuscular integrity and enhanced motor neuron survival. We conclude that inhibition of SCD1 represents a promising therapeutic target for ALS.