

Année 2017/2018

N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Jean-Baptiste DELAYE

Né(e) 10/11/1989 à MONTARGIS (45)

TITRE

EVALUATION DES EFFETS D'UN ANTICORPS AGONISTE DE LA VOIE DU
FGF21 DANS UN MODELE MURIN DE SCLEROSE LATERALE
AMYOTROPHIQUE (SLA)

Présentée et soutenue publiquement le **08/10/2018** devant un jury composé de :

Président du Jury :

Professeur Christian ANDRES, Biochimie et biologie moléculaire, PU, Faculté de médecine -Tours

Membres du Jury :

Professeur Philippe CORCIA, Neurologie, PU, Faculté de médecine – Tours

Docteur Diane DUFOUR, Biophysique et médecine nucléaire, MCU-PH, Faculté de médecine – Tours

Professeur Patrick EMOND, Biophysique et médecine nucléaire, PU, Faculté de pharmacie – Tours

Professeur François MAILLOT, Médecine interne, PU, Faculté de médecine – Tours

Directeur de thèse :

Professeur Helene BLASCO, Biochimie et biologie moléculaire, PU, Faculté de médecine – Tours

EVALUATION DES EFFETS D'UN ANTICORPS AGONISTE DE LA VOIE DU FGF21 DANS UN MODELE MURIN DE SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE (SLA)

RESUME :

De nombreux mécanismes physiopathologiques ont été identifiés dans la SLA et une approche thérapeutique intéressante pourrait être l'utilisation de molécules ciblant plusieurs mécanismes physiopathologiques de manière concomitante.

Dans ce cadre la voie du Fibroblast growth factor 21 (FGF21) liée à l'inflammation et au métabolisme énergétique pourrait être une cible thérapeutique potentielle.

Douze souris porteuses du gène muté SOD1*G93A ont été traitées en intrapéritonéal par le R1Mab1, un anticorps agoniste de la voie du FGF21. Des contrôles mutants et sauvages ont reçu aux mêmes doses du tampon phosphate ou du R1Mab1.

Nous avons observé que la perte de poids des souris TG traitées par le R1Mab1 est plus importante que chez les souris sauvages (S13 $p < 0,009$, S14 $p < 0,01$, S15 $p < 0,01$, S16 $p < 0,01$, S17 $p < 0,01$, S18 $p < 0,001$, S19 $p < 0,001$ et S20 $p < 0,001$). De plus, cette variation pondérale est plus marquée que chez les souris WT ($p < 0,01$). Les résultats de l'échographie montrent une augmentation significative du ratio surface musculaire sur poids chez les souris TG traitées vs TG non traitées ($p = 0,036$). Une amélioration significative des performances motrices évaluées par rotarod est présente à la 20^e semaine de vie chez les souris TG traitées vs TG non traitées ($p = 0,032$).

Le R1Mab1 a donc eu des effets inattendus dans le traitement de la forme murine de la SLA, en améliorant les performances au test du rotarod des souris traitées, malgré une perte pondérale importante normalement de mauvais pronostique.

Mots-clés : Sclérose latérale amyotrophique, FGF21, métabolisme, inflammation, souris SOD1*G93A

EVALUATION OF THE EFFECTS OF AN AGONIST ANTIBODY OF THE FGF21 PATHWAY IN A MURINE MODEL OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)

ABSTRACT :

Many pathophysiological mechanisms have been identified in ALS and an interesting therapeutic approach could be the use of molecules targeting several pathophysiological mechanisms concomitantly.

In this context, the Fibroblast growth factor 21 (FGF21) pathway linked to inflammation and energy metabolism could be a potential therapeutic target.

Twelve mice carrying the SOD1*G93A mutated gene were treated intraperitoneally with R1Mab1, an agonist antibody of the FGF21 pathway. Mutant and wild-type controls were given the same doses of phosphate buffer or R1Mab1.

We observed that the weight loss of R1Mab1-treated TG mice was greater than in wild-type mice (S13 p <0.009, S14 p <0.01, S15 p <0.01, S16 p <0.01, S17 p <0.01, S18 p <0.001 S19 p <0.001 and S20 p <0.001). In addition, this weight variation is more marked than in WT mice (p <0.01). Ultrasound results show a significant increase in the ratio of muscle area to weight in treated TG vs. untreated TG mice (p = 0.036). Significant improvement in rotarod-assessed motor performance was seen at week 20 in treated TG vs. untreated TG mice (p = 0.032).

R1Mab1 had unexpected effects in the treatment of the murine form of ALS, by improving the rotarod test performance of the treated mice, despite a significant weight loss normally of poor prognosis.

Keywords : amyotrophic lateral sclerosis, FGF21, metabolism, inflammation, SOD1*G93A mice.

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Pr Henri MARRET

ASSESEURS

Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*

Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*

Pr Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*

Pr Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*

Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*

Pr Patrick VOUREC'H, *Recherche*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

Mme Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Pr Emile ARON (†) – 1962-1966

Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962

Pr Georges DESBUQUOIS (†) – 1966-1972

Pr André GOUAZE – 1972-1994

Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Pr Daniel ALISON

Pr Philippe ARBEILLE

Pr Catherine BARTHELEMY

Pr Christian BONNARD

Pr Philippe BOUGNOUX

Pr Alain CHANTEPIE

Pr Pierre COSNAY

Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL

Pr Loïc DE LA LANDE DE CALAN

Pr Alain GOUDEAU

Pr Noël HUTEN

Pr Olivier LE FLOCH

Pr Yvon LEBRANCHU

Pr Elisabeth LECA

Pr Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ

Pr Gérard LORETTE

Pr Roland QUENTIN

Pr Alain ROBIER

Pr Elie SALIBA

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P. BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – J.C. BESNARD – P. BEUTTER – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – C. COUET – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUAZE – J.L. GUILMOT – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – E. LEMARIE – G. LEROY – Y. LHUINTE – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – J.C. ROLLAND – D. ROYERE – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian.....	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis	Cardiologie
AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique	Cardiologie
BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle.....	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie clinique
BERNARD Anne	Cardiologie
BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
BODY Gilles	Gynécologie et obstétrique
BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
BRILHAULT Jean.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent.....	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck.....	Urologie
BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent.....	Psychiatrie d'adultes
CHANDENIER Jacques.....	Parasitologie, mycologie
COLOMBAT Philippe.....	Hématologie, transfusion
CORCIA Philippe.....	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
DEQUIN Pierre-François.....	Thérapeutique
DESOUBEAUX Guillaume.....	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe	Anatomie
DIOT Patrice.....	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
DUMONT Pascal.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
EL HAGE Wissam.....	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan	Réanimation
FAUCHIER Laurent	Cardiologie
FAVARD Luc.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand	Gériatrie
FOUQUET Bernard.....	Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
FROMNT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
GAUDY-GRAFFIN Catherine.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOGA Dominique.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
GRUEL Yves.....	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel.....	Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier.....	Urologie
HALIMI Jean-Michel.....	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
LABARTHE François	Pédiatrie
LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd.....	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie
LAURE Boris.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry.....	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel.....	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent	Dermato-vénéréologie
MAILLOT François	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie

MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel	Dermatologie-vénérologie
MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis	Rhumatologie
ODENT Thierry	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna	Gynécologie-obstétrique
PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Dominique	Réanimation médicale, médecine d'urgence
PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean	Ophtalmologie
PLANTIER Laurent	Physiologie
QUENTIN Roland	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénérologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
TOUTAIN Annick	Génétique
VAILLANT Loïc	Dermato-vénérologie
VELUT Stéphane	Anatomie
VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé	Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien	Soins palliatifs
POTIER Alain	Médecine Générale
ROBERT Jean	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

BAKHOS David	Physiologie
BARBIER Louise	Chirurgie digestive
BERHOUET Julien	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERTRAND Philippe	Biostat., informatique médical et technologies de communication
BRUNAUT Paul	Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CLEMENTY Nicolas	Cardiologie
DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane	Biophysique et médecine nucléaire
FAVRAIS Géraldine	Pédiatrie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe	Néphrologie
GOUILLEUX Valérie	Immunologie
GUILLON Antoine	Réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille	Immunologie
IVANES Fabrice	Physiologie
LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste	Radiologie pédiatrique

PIVER Éric.....Biochimie et biologie moléculaire
REROLLE Camille.....Médecine légale
ROUMY JérômeBiophysique et médecine nucléaire
SAUTENET BénédicteNéphrologie
TERNANT David.....Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
ZEMMOURA IlyessNeurochirurgie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....Neurosciences
BOREL Stéphanie.....Orthophonie
DIBAO-DINA ClarisseMédecine Générale
MONJAUZE CécileSciences du langage - orthophonie
PATIENT Romuald.....Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET CécileMédecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

BOUAKAZ AyacheDirecteur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
CHALON SylvieDirecteur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
COURTY YvesChargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY HuguesChargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
ESCOFFRE Jean-Michel.....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
GILOT Philippe.....Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX FabriceDirecteur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7001
GOMOT Marie.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice.....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER FrédéricChargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 1253
LE PAPE Alain.....Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
MAZURIER Frédéric.....Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
MEUNIER Jean-ChristopheChargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
PAGET ChristopheChargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL William.....Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
SI TAHAR MustaphaDirecteur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

DELORE ClaireOrthophoniste
GOUIN Jean-Marie.....Praticien Hospitalier
PERRIER DanièleOrthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

LALA Emmanuelle.....Praticien Hospitalier
MAJZOUB Samuel.....Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

BIRMELE Béatrice.....Praticien Hospitalier

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

REMERCIEMENTS :

Au Président du Jury, Monsieur le Professeur Christian ANDRES :

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et d'évaluer ce travail. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre service il y a maintenant quelques années. Merci pour vos conseils qui ont enrichi mes réflexions.

A ma Directrice de Thèse, Madame le Professeur Helene BLASCO :

Merci d'avoir accepté de m'aider à forger ce travail. Merci pour la pertinence de tes remarques et la justesse de tes corrections qui m'ont permis de progresser et d'améliorer mon travail, surtout que je sais que ce ne fut pas toujours facile.

A Madame le Docteur Diane DUFOUR :

Merci de m'avoir donné l'opportunité de passer dans votre service et votre bienveillance et vos enseignements.

A l'équipe de Biochimie et de MNIV du CHRU de Tours :

Merci pour votre bienveillance, et le respect du travail bien fait qui me donne chaque jour envie de venir travailler avec vous.

A mes amis de faculté, Olive, Jul, Rémi, Ronan, Kiki et bien d'autres pour tout ces moments passés ensemble sur les « bancs » de la fac (ou devant un clavier d'ordinateur / manette de console).

A Nicolas Drillaud, parce que même si tu ne m'aimais pas au début on dirait qu'on a bien rattrapé le tir.

A Nicolas Vallet pour toutes ces discussions intéressantes en passant de statistiques à Benzaie

A Coco, pour réussir à me supporter malgré tout mes côtés un peu énervants, pour l'aide que tu m'apportes et la joie que tu m'offres au quotidien.

TABLES DES MATIERES

Abréviations.....	12
Table des figures.....	13
Table des tableaux.....	14
INTRODUCTION.....	15
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	16
1.1 La Sclérose Latérale Amyotrophique.....	16
1.1.1 Clinique de la SLA	16
1.1.2 Diagnostic et évaluation	17
1.1.3 Hypothèses étiologiques.....	21
1.1.4 Mécanismes physiopathologiques.....	23
1.1.5 Neuroinflammation.....	28
1.1.6 Altérations métaboliques de la SLA	31
1.1.7 Lien inflammation et métabolisme énergétique	31
2.1 Fibroblast Growth Factor.....	32
2.1.1 Caractéristiques générales.....	32
2.1.2 Structures	32
2.1.3 Mécanisme d'action.....	33
2.1.4 Rôles physiologiques et pathologiques des FGFs	36
2.1.5 Fibroblast Growth Factor 21	37
2.1.6 Rôle dans le métabolisme	38
2.1.7 Role dans l' inflammation.....	39
2.2 Méthodologie générale	39
MATÉRIELS ET METHODES.....	40
3.1 Choix de la thérapeutique	40
3.2 Animaux.....	42
3.2.1 Lignée B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J.....	42

3.2.2	Éthique	42
3.2.3	Schéma expérimental.....	43
3.3	Prélèvements biologiques	43
3.4	Marqueurs phénotypiques	44
3.4.1	Pesée et échographie	44
3.4.2	Analyse comportementale	44
3.5	Marqueurs biologiques.....	45
3.5.1	Lipoprotéines.....	45
3.5.2	Cytokines et adipokines	45
3.5.3	Métabolomique.....	45
3.6	Analyse statistique.....	47
RÉSULTATS		47
4.1	Pesée et échographie	47
4.2	Analyse comportementale	50
4.3	Marqueurs biologiques.....	51
4.3.1	Lipoprotéines.....	51
4.3.2	Cytokines et adipokines	52
4.3.3	Mise au point métabolomique.....	53
DISCUSSION		54
5.1	Modification des courbes de poids des souris traitées.....	54
5.2	Différence induite par le traitement dans les capacités motrices	54
5.3	Modification du profil lipoprotéique.....	55
5.4	Validation des méthodes métabolomiques	55
5.5	Limites.....	56
5.6	Conclusion	56
BIBLIOGRAPHIE		57

ABREVIATIONS

ACP : Analyse en Composante Principale

ALSFRS-R : Amyotrophic Lateral Sclerosis
Functional Rating Score - Revisited

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-
méthylisoxazole-4-propionate

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

CQ : Contrôle de Qualité

CV : Coefficient de Variation

DFT : Démence Fronto-Temporale

EAAT2 : Excitatory Amino-Acid Transporter 2

EMG : Electro-MyoGramme

FGF : fibroblast growth factor

FGFR : récepteur au FGF

FUS : Fused in Sarcoma

GRB2 : growth factor receptor bound 2

GSK3 : glycogen synthase kinase 3

Hsp : heat shock protein

IGF-1 : insulin-like growth factor

IgG : Immunoglobuline G

IMC : indice de masse corporelle

LCR : Liquide céphalo-rachidien

mTOR : mammalian target of Rapamycin

NF- κ B : nuclear factor κ -light-chain-enhancer
of activated B cells

NMc et NMp et MN : neurone moteur central et
périphérique, motoneurone

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate

NMJ : Neuromuscular junction

OPLS-DA : Orthogonal Partial Least Square -
Discriminant Analysis

PBS : Phosphate Buffered Solution

PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated
receptor γ coactivator α

PI3K ; phosphoinositide 3 kinase

PKC : protéine kinase C

PLC γ : phospholipase C γ

PLS : Partial Least Square

PPAR α , γ , β/δ ; peroxisome proliferator-
activated receptor α , γ , β/δ

Ras : Rat sarcoma

ROS : Reactive Oxygen Species

Sirt : Sirtuin

SLA F et S : Sclérose Latérale Amyotrophique
Familiale et Sporadique

SOS : son of sevenless

STAT : Signal transducer and activator of
transcription

TDP-43 : transactive response DNA-binding
protein 43

TGF- β : Transforming growth factor β

TK : tyrosine kinase

UCP : uncoupling protein

VEGF : Vascular endothelial growth factor

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition des principaux gènes de causalité liés à la SLA dans la forme familiale et sporadique, d'après Turner et <i>al.</i> 2013, Corcia et al 2014.	22
Figure 2 : Principaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la mort du motoneurone, d'après Veyrat-Durebex et al., 2014.....	24
Figure 3 : Impact du complexe SOD muté/Bcl-2, d'après Tan et al. 2014	27
Figure 4 : Mécanisme de modulation de la réponse neuroinflammatoire par les cellules gliales dans la SLA, d'après Puentes et al., 2016.	29
Figure 5 : Relations évolutives au sein de la famille des gènes Fgfs humains, d'après Itoh et Ornitz 2011.	33
Figure 6 : la dimérisation du FGFR1 conduit à la phosphorylation séquentielle des résidus tyrosine (1P-6P), augmentant ainsi son activité, d'après Ornitz et al., 2015	34
Figure 7 : Voies de signalisation des FGFs, d'après Ornitz et al., 2015.....	36
Figure 8 : Structure protéique du FGF21, d'après Kharitononkov et al., 2005.....	37
Figure 9 : Effets métaboliques du FGF21, d'après Gimeno and Moller, 2014.....	38
Figure 10 : Présentation schématique de l'action du FGF21 sur les effets antagonistes de NF- κ B et SIRT1 dans la régulation de l'inflammation et des réponses métaboliques.....	39
Figure 11 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA ciblés par le FGF21.....	40
Figure 12 : Schéma expérimental de l'étude.....	43
Figure 13 : Ensemble des mesures de poids en gramme au cours de l'étude entre les souris WT + PBS (n=12), WT + R1Mab1 (n=12), Tg + PBS (n=12) et Tg + R1Mab1 (n=12).....	48
Figure 14 : Variation relative du poids au cours du temps entre souris WT, Tg traitées par R1Mab1 ou PBS.	49
Figure 15 : Comparaison de surfaces musculaires du membre inférieur entre des souris WT (n=5) et des souris Tg (n=8) à 12 semaines de vie.	50
Figure 16 : Performance au test rotarod.....	51
Figure 17 : Profil des lipoprotéines à 12 semaines de vie obtenue par électrophorèse sur gel polyacrylamide en gradient selon la méthode Lipoprint.....	52

TABLES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères diagnostiques de SLA (critères d'EI Escorial révisés)	18
Tableau 2 : ALS functional rating scale – Revisited (ALSFRS-R). Score (sur 48) qui évalue l'état de progression de la maladie (Cedarbaum et al., 1999).	19
Tableau 3 : Gènes impliqués dans la SLA	21
Tableau 4 : Exemples de mimétique du FGF21 avec leurs propriétés hypolipémiantes connues.	42
Tableau 5 : Poids moyens (gr) de la semaine 12 à 20 entre les différents groupes.	48
Tableau 6 : Ensemble des résultats issus de l'analyse par Lipoprint du sérum des souris contrôles (WT n=5) et mutées (Tg n=5).....	52
Tableau 7 : Principales caractéristiques analytiques des techniques métabolomiques utilisées.	53

INTRODUCTION

Les maladies des motoneurones (MND) sont caractérisées par la dégénérescence progressive des motoneurones supérieurs et/ou inférieurs associée à une atrophie musculaire, estimées avec une incidence en Europe de 2,16/100 000 habitants par an (Logroscino et al., 2010). La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), décrite pour la première fois par le Pr Charcot en 1869 est la plus fréquente de ces MND, les sites d'apparition peuvent être (i) spinal, manifesté par une atteinte des membres supérieurs et inférieurs (65% des cas) ou (ii) bulbaire qui affecte les muscles de la déglutition (30% des cas). Pour la majorité des patients l'âge de début est vers 50 ans et le décès survient 3 à 5 ans après le diagnostic, avec une médiane de survie de 36 mois, principalement due à la dénervation et l'atrophie des muscles respiratoires entraînant une insuffisance respiratoire (Kieman et al., 2011). Le diagnostic de la SLA est difficile à poser, reposant sur un ensemble d'arguments cliniques et paracliniques et il n'existe, à ce jour, aucun marqueur diagnostique spécifique de la maladie. Aucun traitement curatif de la SLA n'est disponible à l'heure actuelle, les seules options pharmacologiques existantes permettent seulement de prolonger l'espérance de vie des patients de quelques mois.

De multiples étiologies ont été évoquées, parmi lesquelles se mêlent hypothèses génétiques et causes environnementales (polluants, virus, métaux lourds, activité physique intense) (Chio et al., 2013), mais elles ne permettent pas d'expliquer à elles seules le développement de la pathologie. Dans environ 10 %, les SLA sont familiales (SLAF), avec un mode de transmission principalement dominant, les 90 % restant sont dit sporadiques, aucune étiologie ne pouvant être retrouvée.

Des essais cliniques menés depuis des dizaines d'années ont ciblé les principales voies physiopathologiques impliquées dans la SLA dont l'inflammation et le métabolisme. Cependant, les échecs successifs nous conduisent à repenser la stratégie de développement thérapeutique et l'une des pistes prometteuses serait de cibler plusieurs mécanismes physiopathologiques de manière concomitante. Afin d'approfondir les mécanismes liés à l'utilisation de nouvelles thérapeutiques, et notamment d'évaluer les relations entre les mécanismes physiopathologiques et les échanges inter-organes, nous avons mené une étude pré-clinique basée sur le modèle murin G93A. L'objectif principal de l'étude est d'évaluer les effets d'une thérapeutique ciblant la voie du FGF21 sur un modèle murin de SLA.

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 *La Sclérose Latérale Amyotrophique*

1.1.1 Clinique de la SLA

La SLA se caractérise par une atteinte diffuse du neurone moteur central (NMc) et du neurone moteur périphérique (NMp) lentement évolutive. La diffusion des signes se fait dans quatre régions distinctes, bulbaire, cervicale thoracique et lombaire.

L'atteinte du neurone moteur centrale se manifeste par une raideur, une dyspraxie, une spasticité, des réflexes ostéotendineux vifs et diffus et éventuellement un signe de Babinski et/ou Hoffman.

L'atteinte du NMp est caractérisée par la triade déficit moteur, amyotrophie, fasciculations. Le plus souvent l'atteinte est distale et peut être asymétrique voir unilatéral (Chio et al., 2011). Les fasciculations désignent de brèves contractions musculaires et témoignent de l'hyperexcitabilité de l'ensemble du neurone moteur (axone et fibres musculaires associées). Elles seraient présentes dans 90 % des cas, représentant donc un élément déterminant du diagnostic clinique.

L'absence de troubles sensitifs fait également partie intégrante de la définition classique de la SLA.

La présentation clinique habituelle de la SLA est définie en deux formes, qui dépend du site de début des signes neurologiques, (i) la forme bulbaire, relative à l'atteinte des muscles glosso-labio-pharyngiens, (ii) la forme spinale, relative à l'atteinte motrice d'un membre.

Forme à début bulbaire

Un début bulbaire est constaté dans 1/3 des cas et sont plus fréquentes chez la femme (Logroscino et al., 2010). Cette forme associe dysarthrie, dysphagie ainsi qu'un pronostic plus sombre avec une médiane de survie de 22 mois contre 34 mois dans la forme spinale (Logroscino et al., 2010).

Forme à début spinale

Elle représente 2/3 des cas de SLA, elle affecte le membre supérieur ou inférieur avec une fréquence identique et touche plus les hommes que les femmes.

Autres formes

Une démence de type fronto-temporale est présente dans 3% des cas de SLAS et 15% de SLAF, ces formes avec démence initiale sont de plus mauvais pronostic (Hodges et al., 2003)

1.1.2 Diagnostique et évaluation

La fédération mondiale de Neurologie a établi des critères diagnostiques internationaux surtout utiles au développement d'études cliniques et d'essais thérapeutiques (Brooks et al., 2000).

Ces critères reposent sur la mise en évidence d'une atteinte d'évolution progressive du NMc et du NMp dans une des 4 régions anatomiques précitées.

L'ensemble de ces critères est résumé dans le Tableau 1.

L'évaluation de la progression a pour objet d'apprécier l'état du patient par la mesure de son autonomie et de sa capacité avec le ALS Functional Rating Score Revisited (ALSFRS-R). Plus le score est faible, plus le patient est atteint dans les tâches de la vie quotidiennes (Tableau 2).

Tableau 1. Critères diagnostiques de SLA (critères d'EI Escorial révisés).

Signes présents	Signes absents
Atteinte du NMP clinique, EMG ou anatomopathologique Atteinte clinique du NMc	Signes clinique ou EMG évoquant d'autres maladies qui peuvent expliquer les signes d'atteinte du NMc ou du NMP ou des deux
Diffusion progressive des signes au sein d'une région ou extension à d'autres régions	Examen de neuro-imagerie mettant en évidence des anomalies susceptibles d'expliquer les signes cliniques et EMG
Niveaux de certitude	Caractéristiques
SLA définie	Signes d'atteinte du NMc et du NMP dans 3 régions spinales ou 2 régions spinales et la région bulbaire
SLA familiale définie	Signes d'atteinte du NMc et/ou du NMP dans au moins une région et une mutation SOD1 causale chez le patient index ou histoire familiale avec un individu présentant une mutation SOD1 causale
SLA probable	Signes d'atteinte du NMc et du NMP dans 2 régions au moins avec atteinte du NMc rostrale par rapport à celle du NMP
SLA probable étayée par des examens paracliniques	Signes d'atteinte du NMc et du NMP dans 1 région ou du NMc dans 1 région et NMP par EMG dans au moins 2 membres
SLA possible	Signes d'atteinte du NMc et du NMP dans 1 région ou du NMc dans 2 régions ou du NMP rostrale par rapport à celle du NMc

Tableau 2, ALS functional rating scale – Revisited (ALSFRS-R). Score (sur 48) qui évalue l'état de progression de la maladie (Cedarbaum et al., 1999)

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

7 Mobilisation au lit	<p>4 – normale</p> <p>3 – lenteur et maladresse mais autonome</p> <p>2 – ajuste les draps avec difficulté</p> <p>1 – peut bouger mais se retourner dans le lit</p> <p>0 – dépendant</p>
8 Marche	<p>4 – normale</p> <p>3 – difficultés de déambulation</p> <p>2 – marche avec assistance</p> <p>1 – mouvement sans déambulation</p> <p>0 – pas de mouvement des jambes</p>
9 Montée d’escaliers	<p>4 – normale</p> <p>3 – lente</p> <p>2 – fatigue</p> <p>1 – aide nécessaire</p> <p>0 – impossible</p>
10 Dyspnée	<p>4 – absente</p> <p>3 – à la marche</p> <p>2 – dans une ou plus des situations suivantes : repas, toilette, habillage</p> <p>1 – au repos, difficultés respiratoires en position assise ou allongée</p> <p>0 – difficulté importante, envisage l’utilisation d’un appareil de ventilation mécanique</p>
11 Orthopnée	<p>4 – absente</p> <p>3 – quelques difficultés pour dormir la nuit en raison d’un souffle court, n’utilise habituellement pas plus de 2 oreillers</p> <p>2 – besoin de plus de 2 oreillers pour dormir</p> <p>1 – ne peut dormir qu’assis</p> <p>0 – ne peut pas dormir</p>
12 Insuffisance respiratoire	<p>4 – absente</p> <p>3 – utilisation intermittente d’une assistance ventilatoire</p> <p>2 – utilisation continue d’une VNI la nuit</p> <p>1 – utilisation continue d’une VNI jour et nuit</p> <p>0 – ventilation mécanique invasive par intubation ou trachéotomie</p>

1.1.3 Hypothèses étiologiques

1.1.3-a Origine génétique

Bien que la physiopathologie de la SLA reste à ce jour méconnue, il est unanimement admis que l'implication des facteurs génétiques est un des éléments majeurs dans la mort des motoneurones. Depuis la découverte de mutations du gène codant la superoxyde dismutase de type 1 (*SOD1*) (Rosen et al. 1993a), le nombre de gènes liés à, ou, favorisant la survenance de la SLA n'a cessé de croître. Plusieurs gènes responsables de la SLA (dans les SLAf) ou associés à la SLA (dans les SLAs) ont été décrits (Van Damme and Robberecht 2009). En plus des mutations *SOD1* (Rosen et al. 1993a), des mutations dans le gène codant la protéine TAR DNA-Binding Protein (*TARDBP*) (Sreedharan et al. 2008), fused in sarcoma (*FUS*) (Kwiatkowski et al. 2009), Ubiquilin2 (*UBQLN2*) (Deng et al. 2011), *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez et al. 2011) et plusieurs autres sont associées aux phénotypes de la SLA (Corcia et al. 2014) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Tableau 1: Gènes impliqués dans la SLA

Gène	Locus	Référence
Superoxyde dismutase 1 (<i>SOD1</i>)	21q22.1	(Rosen et al. 1993a)
Paraoxonase (<i>PON</i>)	7q21	(Ticozzi et al. 2010)
TAR DNA-binding protein (<i>TARDBP</i>)	1p36.2	(Sreedharan et al. 2008)
Fused in sarcoma (<i>FUS</i>)	16q12	(Vance et al. 2009)
Senataxine (<i>SETX</i>)	9q34	(Avemaria et al. 2011)
Survival motoneuron (<i>SMN1</i>)	5p12	(Corcia et al. 2002b)
Angiogenin (<i>ANG</i>)	14q11.2	(van Es et al. 2011)
Vasculo endothelial growth factor (<i>VEGF</i>)	6p12	(Lambrechts et al. 2003)
Vasolin-containing protein (<i>VCP</i>)	9p13.3	(Johnson et al. 2010)
Ubiquilin 2 (<i>UBQLN2</i>)	Xp11	(Millecamps et al. 2012)
Polyphosphoinositide phosphate (<i>FIG4</i>)	6q21	(Chow et al. 2009)
Optineurin (<i>OPTN</i>)	10p13	(Millecamps et al. 2011)
Vesicle-associated membrane protein-associated protein (<i>VAPB</i>)	20q13.3	(Marques et al. 2006)
Alsine	2q33	(Yang et al. 2001)
D-amino acid oxidase (<i>DAO</i>)	12q24	(Mitchell et al. 2010)
Microtubule-associated protein tau (<i>MAPT</i>)	17q21	(Sundar et al. 2007)
Ataxine (<i>ATXN2</i>)	12p24	(Lee et al. 2011)
Chromosome 9 open reading frame 72 (<i>C9ORF72</i>)	9q21-q22	(DeJesus-Hernandez et al. 2011)

Parmi les gènes impliqués dans la SLA, quatre (*SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72*) sont considérés de manière unanime comme des facteurs génétiques pathogènes majeurs de la SLA et sont responsables d'un peu plus de la moitié des formes familiales et environ 5% des formes sporadiques (Turner et al. 2013b) (Figure 1). Plusieurs critères doivent au préalable être validés pour retenir l'implication d'un gène dans la SLA : la mutation doit co-ségréger avec la maladie dans les familles et cette mutation ne doit pas être trouvée chez des sujets contrôles (Corcia et al. 2014).

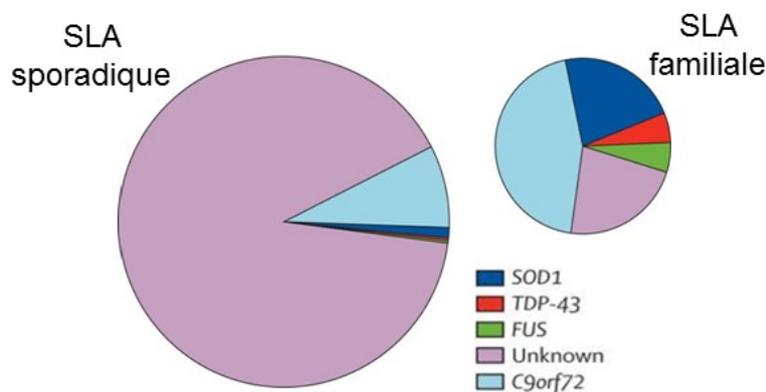


Figure 1 : Répartition des principaux gènes de causalité liés à la SLA dans la forme familiale et sporadique (d'après Turner et al. 2013, Corcia et al 2014)

Plusieurs gènes de susceptibilité ont été identifiés mais leur pathogénèse reste mal comprise (Corcia et al. 2014). Leur présence augmente le risque de développer la maladie (Corcia et al. 2014), comme par exemple le gène de l'ApoE (Siddique et al. 1998), de la survie des motoneurones (SMN) (Corcia et al. 2002a), de la paraoxonase (PON) (Ticozzi et al. 2010), du vasculo endothelial growth factor (VEGF) et de l'angiogénine (ANG) (van Es et al. 2011).

1.1.3-b Facteurs environnementaux

L'observation de foyers dans lesquels l'incidence de la SLA était anormalement élevée, notamment sur l'île de Guam (Mulder et al., 1987) ont fait suspecter l'intervention de facteurs toxiques environnementaux.

Les études épidémiologiques et expérimentales ont mis en évidence un rôle de l'environnement dans la pathogénèse de la SLA. Parmi eux, il y a les facteurs liés au mode de

vie (Fang et al. 2006), les expositions environnementales (métaux lourds, pesticides, toxines...) (Kamel et al. 2005; Qureshi et al. 2006), professionnelles ou chimiques (Malek et al. 2012; Sutedja et al. 2009; Vinceti et al. 2010), les agents infectieux (Douville et al. 2011), les apports nutritionnels (Fitzgerald et al. 2014), le degré d'activité physique (Huisman et al. 2013), et la traumatologie (Peters et al. 2013). A ce jour, aucune association entre un facteur de risque environnemental et la SLA n'a pu être démontrée de manière convaincante et reproductible (Gil et al. 2007).

Parmi les toxiques les plus décrits comme potentiellement à l'origine de la SLA, le β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) un acide aminé non protéique produit par des cyanobactéries, et s'accumulant dans certaines plantes a été impliqué comme facteur de risque de SLA. Il a notamment été mis en évidence dans des graines très consommées sur l'île de Guam où l'incidence de la SLA est anormalement élevée (Bradley et al., 2009). L'intoxication par le BMAA et la SLA sont associées dans de nombreuses études (Caller et al., 2012 ; Masseret et al., 2013).

L'exposition aux pesticides a aussi été étudiée mais les résultats sont controversés, le petit nombre de cas exposés et le biais éventuel lié à l'interaction avec le travail physique intense des agriculteurs, autre hypothèse étiologique de la SLA, font interpréter les résultats avec prudence.

Enfin, certaines habitudes de vie pourraient être des facteurs de risque, tels que le tabagisme (Wang et al., 2011) ou encore l'activité physique intense (Gotkine et al., 2014).

1.1.4 Mécanismes physiopathologiques

L'étiologie de la SLA reste inconnue à ce jour, Sans répondre à toutes les interrogations sur la physiopathologie de la maladie, le développement de modèles animaux et cellulaires ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques conduisant à la mort des neurones moteurs. Différentes voies cellulaires semblent perturbées et intriquées (Shaw et al., 2005). Bien que l'implication des autres types cellulaires du système nerveux soit admise, il reste difficile d'établir une chronologie précise responsable de cette neurodégénérescence.

Les différentes hypothèses physiopathologiques et le rôle de chaque acteur cellulaire sont représentés dans la Figure 2.

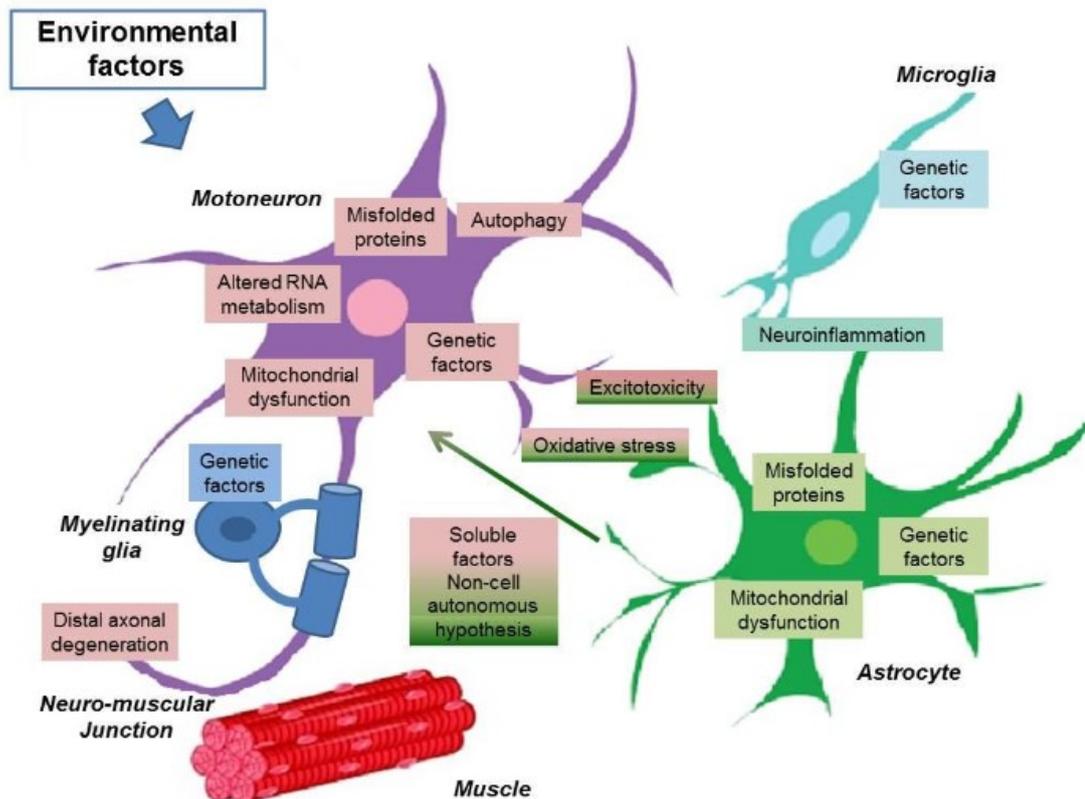


Figure 2 : Principaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la mort du motoneurone. Les astrocytes et la microglie contribuent à la dégénérescence motoneuronale via l'activation d'une cascade inflammatoire via la production de cytokines. Une agrégation anormale des protéines, une altération de la métabolisation des ARN, un stress oxydant, une augmentation de la stimulation au glutamate ou encore un dysfonctionnement mitochondrial sont également décrits, d'après Veyrat-Durebex et al., 2014

1.1.4-a Agrégation protéique

L'accumulation toxique d'agrégats protéiques, à la suite d'un mauvais repliement de protéines mutantes conduisant à la formation d'agrégats intracellulaires, est un phénomène fréquent dans les maladies neurodégénératives, et sont impliqués dans l'apoptose neuronale. Dans le cas du gène SOD1, des agrégats sont décrits chez les patients et les modèles animaux (Watanabe et al., 2001). Leur présence coïncide avec l'âge d'apparition de la pathologie chez la souris, mais étant absents avant l'apparition d'une faiblesse musculaire, ils ne semblent pas être un élément déclencheur, mais au contraire un mécanisme de protection cellulaire vis-à-vis de l'activité enzymatique toxique de la SOD1 (Brown et al., 1998). De nombreuses protéines interagissent avec mSOD1 incluant le protéasome, l'ubiquitine ou les membres de la famille des heat shock proteïn (Hsp) (Watanabe et al., 2001)

Une accumulation de preuves suggère que mSOD1 a une action toxique qui conduit à la même évolution indépendamment de la position de la mutation, en déstabilisant la structure tertiaire de SOD1. Idée qui est appuyée par le fait que les altérations non génétiques (oxydation) de SOD1 peuvent entraîner un mauvais repliement de celle-ci, et donnent des propriétés toxiques similaires à celle de mSOD1 (Kabashi et al., 2007). Des agrégats TDP-43 positif sont aussi retrouvés perturbant le rôle de cette protéine dans la régulation de l'expression génique au niveau de la transcription et de l'épissage de l'ARNm (Janssens et al., 2013).

1.1.4-b Stress oxydant

Un intérêt particulier a été porté sur le stress oxydant dans la SLA du fait de la mutation du gène SOD1, qui code une protéine anti-oxydante majeure dans toutes les cellules. En outre, les analyses du liquide céphalo-rachidien (LCR), des urines, du plasma et des tissus du système nerveux central (SNC) post-mortem des patients SLA, ont montré une élévation des marqueurs biochimiques de dommages par les radicaux libres ou d'un métabolisme anormal des radicaux libres (Shibata et al. 2001). Des études faites sur des modèles animaux et cellulaires de la SLA ont montré des dommages oxydatifs (Kiskinis et al. 2014 ; Parakh et al. 2013). L'une des plus importantes conséquences du stress oxydatif est l'oxydation des ARNm principalement dans les motoneurones et les astrocytes à des stades précoces et pré-symptomatiques de la maladie. Certains ARNms paraîtraient plus sensibles à l'oxydation, comme les ARNm impliqués dans la chaîne de transport des électrons mitochondriaux, la biosynthèse protéique, la myélinisation et les voies du cycle de Krebs et de la glycolyse (Mancuso and Navarro 2015). Cependant les mécanismes pathogéniques à l'origine de l'augmentation de l'oxydation dans la SLA sont très peu connus.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que le stress oxydatif interagit avec d'autres mécanismes physiopathologiques qui participent à la dégénérescence des motoneurones, tels que l'excitotoxicité au glutamate, le dysfonctionnement mitochondriale, l'agrégation des protéines et les altérations de signalisation dans les astrocytes et la microglie.

1.1.4-c Pathologie mitochondriale

Les premières études réalisées sur les tissus des patients atteints de la SLA avaient montré des anomalies structurelles et morphologiques dans les mitochondries au niveau des muscles, du foie, de la moelle épinière et du cortex moteur (Hirano et al. 1984 ; Sasaki and Iwata 1999). Cela paraît évident par la fréquence élevée des mutations de l'ADN mitochondrial identifiées

dans les tissus du cortex moteur et de la diminution de l'ADN mitochondrial dans le muscle et la moelle épinière dans des cas de SLAs (Wiedemann et al. 2002). Il a également été rapporté une diminution des copies d'ADN mitochondriaux (ADNmt) et une augmentation du nombre des mutations d'ADNmt, une dérégulation du métabolisme calcique intracellulaire (Zhou et al. 2010) et du transport axonal mitochondrial (Perlson et al. 2010) dans la SLA. Cette dysfonction mitochondriale semble être multifactorielle (Tan et al. 2014). L'agrégation de la SOD1 mutée dans les mitochondries est une caractéristique commune dans la SLA. Le consensus de la localisation mitochondriale est que la SOD1 sauvage soit dans l'espace intermembranaire, cependant lorsque la SOD1 est mutée, elle s'accumule au niveau de la membrane externe (Pasinelli et al. 2004) et dans la matrice mitochondriale. Il a été montré que leur présence provoque un changement dans l'état redox des mitochondries et entraîne un dysfonctionnement des complexes respiratoires (Ferri et al. 2006). Cela suggère une forte association entre le dysfonctionnement mitochondriale induit par la SOD1 mutée et la pathogenèse de la SLA. L'une des hypothèses de l'implication de la SOD1 mutée dans le mécanisme de dysfonctionnement mitochondrial dans la SLA est que la SOD1 mutée interagirait avec la protéine Bcl-2 (Pasinelli et al. 2004), qui elle pourrait déclencher, dans une certaine mesure, la toxicité mitochondriale induite par la SOD1 mutée. En interagissant avec SOD1, Bcl-2 est convertie en une protéine toxique via un réarrangement structural qui expose son domaine toxique BH3 (Pedrini et al. 2010). La formation de ce complexe toxique avec Bcl-2 est l'événement majeur dans le dysfonctionnement mitochondrial induit par SOD1 mutée. Il a été montré dans les cellules et souris transgéniques SOD1 que l'exposition du domaine BH3 modifie l'interaction entre Bcl-2 et le canal sélectif des anions voltage-dépendant (VDAC1, porine mitochondriale localisée au niveau de la membrane externe mitochondriale) réduisant ainsi la perméabilité de la membrane mitochondriale externe (Figure 3). La protéine VDAC1 régule la respiration mitochondriale et le flux ATP de la membrane externe vers le cytosol et l'ADP dans les mitochondries pour la phosphorylation oxydative. Dans les motoneurones, le complexe SOD1 mutée/Bcl-2 entraîne une augmentation de la concentration calcique et de la production des ROS, une hyperpolarisation mitochondriale et inhibe la perméabilité mitochondriale à l'ADP conduisant ainsi à la mort cellulaire (Tan et al. 2013).

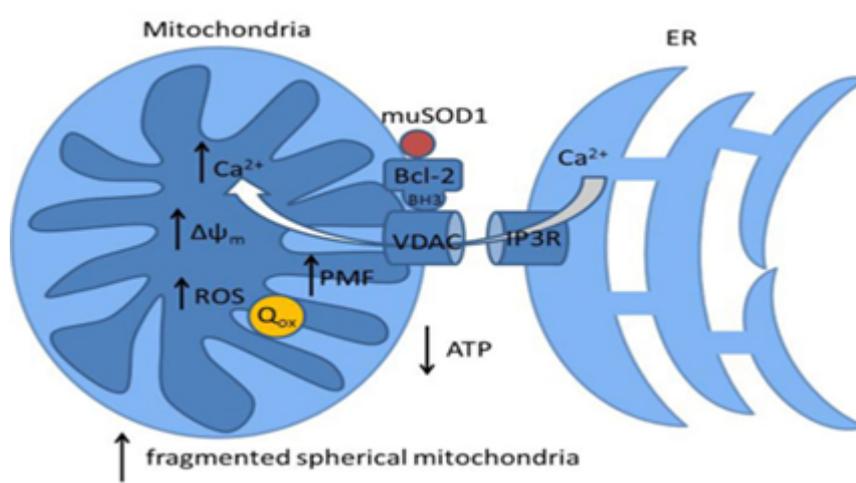


Figure 3 : Impact du complexe SOD muté/Bcl-2, d'après Tan et al. 2014

Le canal VDAC participe activement au couplage calcique mitochondrie-réticulum endoplasmique (RE). Il est capable d'interagir avec le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3) du réticulum endoplasmique (ER) ainsi qu'avec d'autres protéines chaperonnes pour former un complexe de jonction entre ces deux organelles facilitant ainsi le transfert direct et local du calcium (Figure 3).

D'autres études ont mis en évidence une altération de la bioénergétique mitochondriale comme mécanisme mitochondrial conduisant à la mort cellulaire dans la SLA, nous pouvons citer la déficience du complexe I et la diminution du rapport ATP / ADP (Ghiasi et al. 2012). En outre, la suppression de VDAC1 dans les souris exprimant la mutation SOD1, accélère l'apparition de la maladie (Israelson et al. 2010), ceci suggère que la bioénergétique mitochondriale est essentielle pour la survie des motoneurones.

Cependant le dommage mitochondrial n'est pas exclusif aux mutations SOD1. D'autres protéines, telles que la TDP-43 ou la FUS mutée, peuvent aussi provoquer un dysfonctionnement mitochondrial en altérant l'expression des protéines mitochondriales impliquées dans le métabolisme énergétique (Cozzolino et al. 2013 ; Turner et al. 2013a). Toutefois, il est à noter que certaines de ces anomalies décrites pourraient être la conséquence de la SLA, et non la cause.

1.1.4-d Excitotoxicité liée au glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus important du système nerveux centrale (SNC), les synapses cérébrales étant à 80-90 % glutamatergique. Les cellules post-synaptiques possèdent trois types de récepteurs ionotropiques au glutamate (NMDA, AMPA et kainate) ainsi que trois types de récepteurs métabotropiques au glutamate (I, II et III). La

neurotoxicité du glutamate est connue depuis les années 1970, pouvant induire une neurodégénérescence. Depuis, de nombreuses conditions pathologiques ont été mises en lien avec l'excitotoxicité liée au glutamate dont l'épilepsie et diverses maladies neurodégénératives incluant la SLA. La première association entre SLA et l'excitotoxicité liée au glutamate met en évidence une augmentation du glutamate dans le liquide cébrospinal (LCS) de 18 patients SLA (Rothstein et al., 1990).

Cet effet neurotoxique est expliqué par l'entrée de Ca^{2+} qui est délétère à forte concentration pour la cellule. Cette théorie suppose que le glutamate est trouvé en excès dans la fente synaptique, ce qui conduit à une surstimulation des récepteurs au glutamate post-synaptique (AMPA et NMDAR).

La raison de cet excès de glutamate est en lien avec les astrocytes, qui sont responsables de la clairance via l'action de transporteur du glutamate. L'absence de ces transporteurs, et particulièrement EAAT2, conduit à la neurodégénérescence (Rothstein et al., 1996). Les patients atteints de SLA présentent une diminution de EAAT2 par rapport aux témoins sains, (Rothstein et al., 1995). La surexpression de EAAT2 dans les modèles transgéniques SOD1 murins diminue la mort des motoneurones mais ne retarde pas l'apparition de la symptomatologie et n'augmente pas l'espérance de vie (Guo et al., 2003).

Actuellement, la thérapeutique majeure utilisée pour les patients atteints de SLA est le *Riluzole*. Le Riluzole cible l'excitotoxicité liée au glutamate et bien qu'il soit efficace sur les modèles transgéniques (Gurney et al., 1996), son action chez l'homme reste limitée (Miller et al., 2012).

1.1.5 Neuroinflammation

Bien que la SLA n'apparaisse pas résulter d'un dérèglement ou d'une anomalie du système immunitaire, les mécanismes inflammatoires et la réactivité immunitaire jouent un rôle dans la pathogenèse de la SLA (Philips and Robberecht 2011). Le LCR et le plasma de patients SLA contiennent des concentrations plus élevées de cytokines proinflammatoires et chimiokines telles que l'IL-6 (interleukine-6), le TNF- α (tumor necrosis factor α), le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), le MCSF (monocyte colony-stimulating factor), le TGF- β (transforming growth factor β) (Puentes et al. 2016).

La mort des motoneurones dans la SLA est accompagnée par une réponse neuro-inflammatoire marquée par l'activation de la microglie, des astrocytes et des lymphocytes T localisés au niveau des régions touchées dans le SNC (Kawamata et al. 1992). Cette activation

est suivie par la sécrétion des marqueurs d'inflammation tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS), de l'oxyde nitrique (NO), de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), des molécules pro-inflammatoires (prostaglandines, TNF- α , IL-1 β et IL-6) et du glutamate (Frakes et al. 2014; Puentes et al. 2016). Par ailleurs, le niveau d'expression de la COX-2, une enzyme impliquée dans la synthèse des prostaglandines inflammatoires, est plus élevé dans la moelle épinière de patients SLA et de modèles murins de la pathologie (Almer et al. 2001). Plusieurs autres facteurs sont également impliqués dans les interactions cellules gliales-motoneurones, il s'agit notamment des facteurs neurotrophiques (NT) tels que le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), bFGF, le NT issu du cerveau (BDNF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance des nerfs (NGF) (Moisse and Strong 2006) (Figure 4-A).

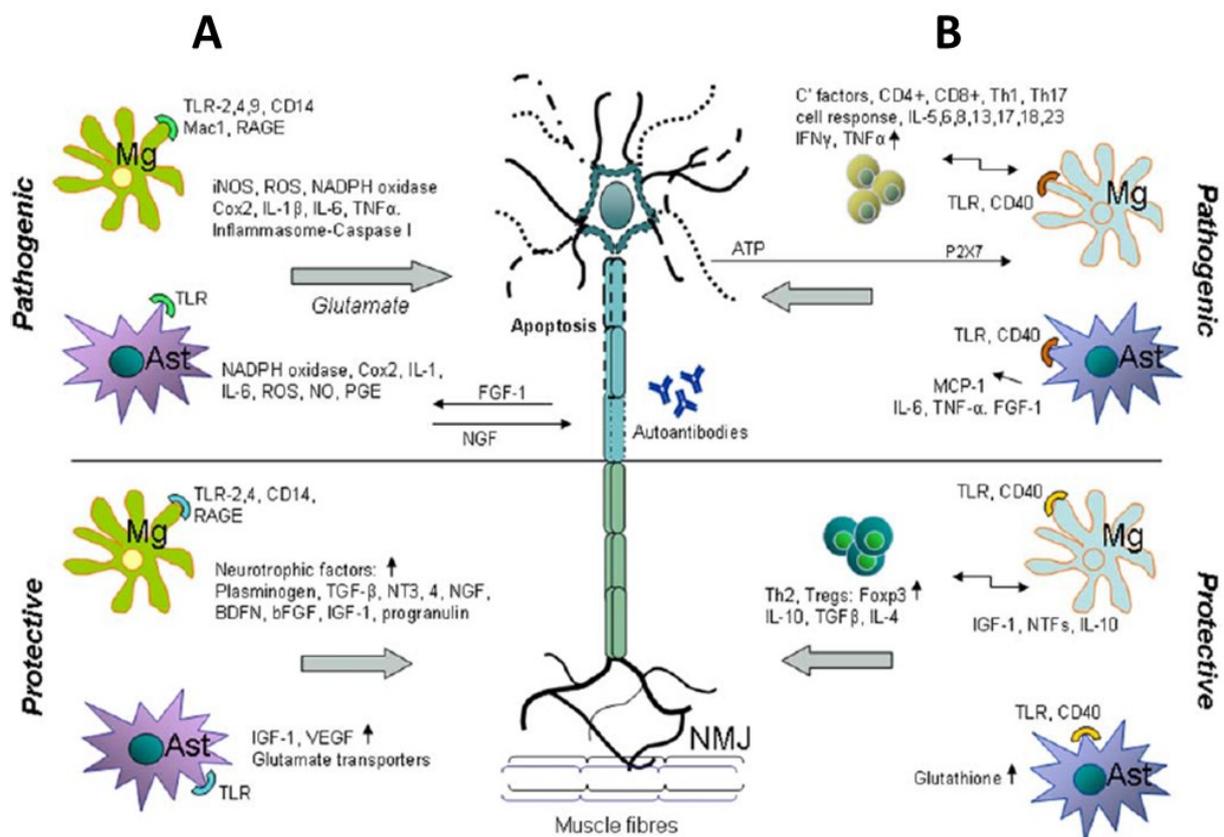


Figure 4 : Mécanisme de modulation de la réponse neuroinflammatoire par les cellules gliales dans la SLA. A- par activation des cellules gliales, B- par infiltration des cellules immunitaires. Mg, microglie ; Ast, astrocytes ; NMJ, jonction neuromusculaire, d'après Puentes *et al.*, 2016

Plusieurs études ont rapporté chez des modèles murins *SOD1* une augmentation de l'expression de facteurs pro-inflammatoires avant l'apparition de la maladie, avec une activation microgliale soutenue tout au long de la phase active de la progression de la maladie. Par exemple, l'expression de TGF- β et de MCSF est augmentée dans les souris durant la phase pré-symptomatique, tandis que l'expression de TNF- α augmente bien avant le début des déficits moteurs (Cozzolino et al. 2008).

Outre l'activation des cellules gliales, l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC est l'une des caractéristiques de la SLA et le rôle des cellules T dans la progression de la maladie a été clairement établi. En effet, les cellules T sont associées à la mort des motoneurones et le nombre des cellules T cytotoxiques CD8⁺ et les cellules NK (Natural Killer) corrèle avec la progression de la maladie. *A priori* les cellules T semblent jouer un rôle protecteur, Beers et ses collaborateurs avaient montré que les cellules T CD4⁺ renforçaient la neuroprotection médiée par les cellules gliales et permettaient ainsi de ralentir la progression de la maladie dans les modèles murins (Beers et al. 2008). Comme le montre la figure 4-B, l'expression de la protéine CD40 dans les cellules gliales semble être un élément clé de reconnaissance pour les cellules T. Les microglies activées peuvent d'avantage renforcer les réponses pro-inflammatoires (sécrétion de TNF- α , IL-6 et IL-1 β ...). La protéine MCP-1 secrété par les astrocytes favorise l'infiltration des microglies et des macrophages dans les tissus atteints.

Les cellules gliales peuvent également exercer un rôle protecteur dans la pathophysiologie de la SLA. Les cellules microgliales sécrètent des facteurs anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) et aussi des facteurs de croissance (Beers et al. 2011). L'augmentation de taux des cellules régulatrices T FoxP3⁺ et la production de TGF- β et IL-4 protégeraient les motoneurones et seraient associées au ralentissement de la progression de la SLA (Henkel et al. 2013). Les astrocytes jouent un rôle protecteur en sécrétant des facteurs de croissance, en régulant l'expression du transporteur au glutamate GLT1 et en augmentant la sécrétion du glutathion qui protégerait les motoneurones du stress oxydatif (Vargas and Johnson 2010).

1.1.6 Altérations métaboliques de la SLA

Depuis plusieurs années, un dysfonctionnement du métabolisme est mis en évidence dans la SLA. Plusieurs études ont montré que les patients SLA présentent une altération de l'homéostasie énergétique qui influence négativement la survie des patients (Desport et al., 2001 ; Dupuis et al., 2004 ; Dupuis et al., 2011). Altérations également retrouvées sur les modèles murins de SLA qui présentent un hypermétabolisme et une altération du métabolisme glucido-lipidique (Dupuis et al., 2004 ; Dupuis et al., 2011).

Dans la population générale, l'équilibre entre les dépenses énergétiques et les besoins est assuré par l'alimentation. Chez les patients SLA une prévalence élevée d'hypermétabolisme est retrouvée (Desport et al., 2005). La balance énergétique est altérée, accompagnée généralement d'une dyslipidémie, un IMC faible et une augmentation de la dépense énergétique de repos (DER) (Dupuis et al., 2011). Altérations qui sont également retrouvées dans les modèles murins de SLA (Fergani et al., 2007). La correction de ce déficit énergétique par un régime riche en graisse semble être bénéfique avec une augmentation de la survie et une diminution de la mort des neurones moteurs, alors que la restriction calorique aggrave la pathologie et réduit la survie (Patel et al., 2010). Cet hypermétabolisme basal semble être un évènement précoce dans la SLA.

Il existe également une altération du métabolisme du glucose et un défaut dans la β -oxydation des acides gras chez les patients SLA (Pradat et al., 2010). Des études rétrospectives mettent également en évidence une association entre le diabète et l'apparition de la SLA (Matisa et al., 2015), l'altération du métabolisme du glucose pouvant jouer un rôle clé dans le déséquilibre énergétique.

Le métabolisme lipidique est également perturbé ; il a été rapporté qu'une hypercholestérolémie est présente au diagnostic chez près de 70 % des patients avec SLA sporadique (Patin et al., 2015), une augmentation du cholestérol, du LDL, des triglycérides et du ratio LDL/HDL (Dupuis et al., 2008).

Cependant les causes exactes des troubles du métabolisme énergétique dans la SLA restent encore difficiles à déterminer.

1.1.7 Lien inflammation et métabolisme énergétique

Le système NF- κ B joue un rôle essentiel dans la régulation des réponses immunitaires innées dans les tissus de l'hôte. Il existe de nombreuses preuves indiquant que la signalisation NF- κ B peut également contrôler les changements métaboliques énergétiques en coordination

avec SIRT1, un régulateur majeur du métabolisme énergétique et de la survie cellulaire. Ces 2 acteurs ont des profils d'actions antagonistes, c'est-à-dire que NF- κ B conduit à un phénotype pro-inflammatoire avec métabolisme glycolytique, tandis que SIRT1 favorise la respiration oxydative et les réponses anti-inflammatoires. L'interdépendance des mécanismes impliqués dans le métabolisme énergétique et l'inflammation est donc à prendre en compte dans une maladie comme la SLA où ces 2 mécanismes coexistent.

2.1 *Fibroblast Growth Factor*

2.1.1 Caractéristiques générales

La famille des Fibroblast Growth Factors (FGFs) regroupe des gènes conservés depuis les invertébrés, et exprimés chez tous les organismes pluricellulaires. Les premiers à avoir été identifiés sont les FGF1 et FGF2, purifiés à partir d'extraits de glandes pituitaires et montrant des propriétés mitogéniques (Gospodarowicz et al., 1974). Chez les mammifères, cette famille comprend désormais 22 membres appelés FGF1-23 (le FGF19 humain étant l'orthologue du Fgf15 murin) (Ornitz et al., 2008). Ils possèdent des activités biologiques variées, impliquées dans des processus développementaux ou métaboliques.

Les FGFs agissent pour la plupart via leurs récepteurs (FGFRs), selon la combinaison ligand-récepteur, différentes voies de signalisation seront activées et interviendront dans une multitude de processus. De nombreuses pathologies sont associées des mutations des FGFs ou de leurs récepteurs et sont souvent associés à plusieurs types de cancer ou à des défauts de développement (Ornitz et al., 2015)

2.1.2 Structures

Les FGFs sont de petites protéines de 150 à 300 acides aminés, partageant un domaine central commun de 120 acides aminés qui présentent de 30 à 60 % d'identité (Ornitz et al., 2004). Chez les mammifères, des analyses phylogénétiques ont montré que les 22 gènes *FGF* pouvaient être regroupés en 7 sous-familles contenant chacune de 2 à 4 membres. Ces sous-familles sont regroupées selon leur mode d'action : intracrine, paracrine ou endocrine (Figure 5) (Itoh et Ornitz, 2011).

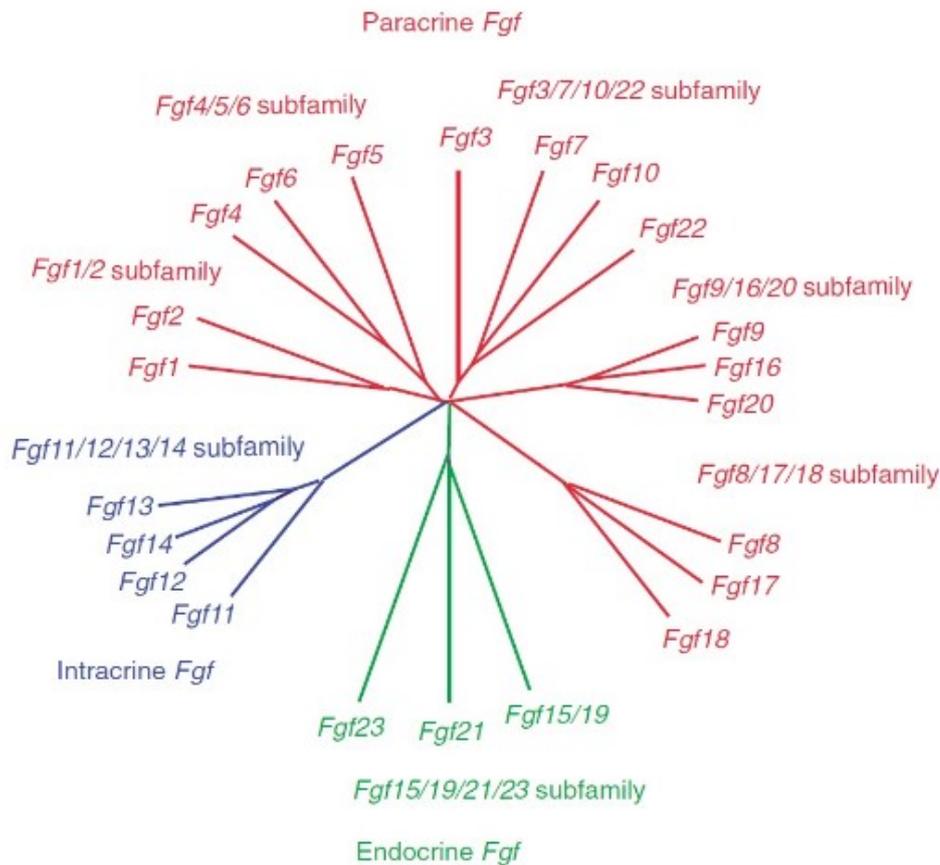


Figure 5 : Relations évolutives au sein de la famille des gènes *Fgfs* humains, d'après Itoh et Ornitz 2011.

2.1.3 Mécanisme d'action

2.1.3-a Les récepteurs aux FGFs

Il existe deux types de récepteurs aux FGFs, de haute affinité (FGFRs) ou de faible affinité que sont les HSPGs. Les FGFs peuvent, grâce à leur domaine de liaison à l'héparine, se lier aux HSPGs indépendamment des FGFRs ou bien les utiliser comme co-récepteurs pour faciliter leur liaison aux FGFRs.

2.1.3-b Récepteur à haute affinité (FGFRs)

Quatre gènes *Fgfr* ont été identifiés chez les mammifères : les *FGFR1-4* (Ornitz et al., 2004), ils sont les acteurs majeurs de la signalisation des FGFs sécrétés

Les FGFRs sont des récepteurs transmembranaires à domaine tyrosine kinase (TK) contenant :

- De deux à trois domaines immunoglobuline like (I, II et III)

La boucle II contient le domaine de liaison à l'héparine. Par épissage alternatif, les Fgfr1-3 codent pour deux versions de la partie C-terminale du domaine immunoglobulin-like III (IIIb et IIIc). Ce domaine est nécessaire pour la spécificité de l'interaction ligand-récepteur (Miki et al., 1992). Ce qui donne 7 formes de FGFRs générées à partir de ces 4 gènes (FGFRs 1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c, et 4) qui ont chacune des affinités différentes pour les FGFs.

- Un domaine transmembranaire
- Un domaine TK intracellulaire bipartite.

Le domaine TK est interrompu par un insert, séparant TK1 et TK2. Sept sites d'autophosphorylation y sont décrits et peuvent servir de sites d'amarrage pour des messagers intracellulaires possédant des domaines SH2 (Src homology 2) (Wesche et al., 2011). La tyrosine 766 du FGFR1, très conservée parmi les quatre FGFRs, localisée à l'extrémité C-terminale du récepteur est requise pour la transduction du signal via son interaction avec la phospholipase C γ (PLC γ).

2.1.3-c Signalisations induites par les FGFRs

La dimérisation du complexe ternaire FGF/FGFR/HSPG induit une modification de la conformation du FGFR qui conduit à la transactivation par phosphorylation du domaine TK intracellulaire (Figure 6).

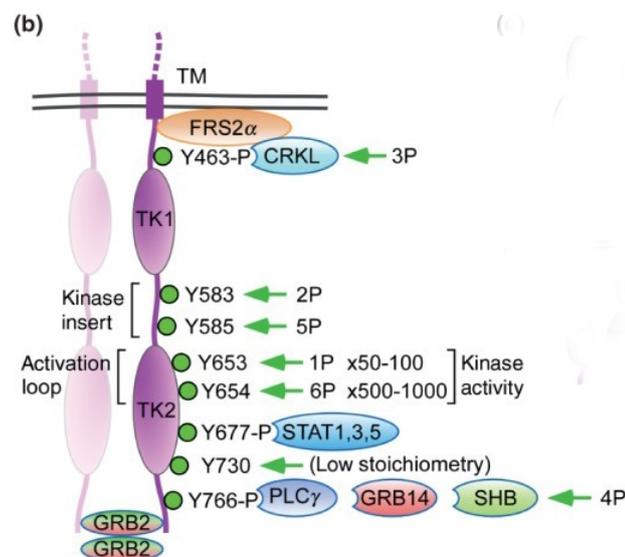


Figure 6 : la dimérisation du FGFR1 conduit à la phosphorylation séquentielle des résidus tyrosine (1P-6P), augmentant ainsi son activité, d'après Ornitz et al., 2015.

Les activités biologiques induites dépendront du type de FGF et de FGFR, deux substrats permettent la transduction du signal : la PLC γ et le FGFR substrate 2 (FRS2).

La protéine FRS2 est liée au domaine cytosolique du FGFR de manière constitutive et est phosphorylée lors de l'activation du récepteur. Suite à cela elle peut s'associer à la protéine Growth Factor Receptor-Bound 2 (GRB2), qui permet ensuite l'activation des voies de signalisation Ras (Rat sarcoma)/MAPK (Mitogen Associated Protein Kinase) et PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt/mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (Wesche et al., 2011)

A l'inverse, la PLC γ se lie à la phosphotyrosine 766 du FGFR activé, et active la protéine kinase C (PKC) (Mohammadi et al., 1991).

Ras/MAPK

La formation du complexe FRS2-GRB2 recrute le facteur d'échange nucléotidique Son Of Sevenless (SOS) qui permet l'activation de la GTPase Ras et donc de la cascade MAPKs. Cette voie joue un rôle dans la prolifération cellulaire, l'invasion tumorale et métastatique ainsi que la différenciation (Raju et al., 2014).

PI3K/Akt/mTOR

La protéine GAB1 (GRB2-associated-binding protein 1) recrutée par le complexe FRS2 entraîne l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR, qui régule de nombreux processus comme la croissance, la prolifération ou la migration cellulaire (Wesche et al., 2011).

PLC γ /PKC

Contrairement aux deux voies précédemment décrites, l'activation de la PLC γ /PKC est indépendante du complexe FRS2. La PLC γ se lie à la phosphotyrosine 766 de l'extrémité C-terminale du FGFR activé et hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) pour produire du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Ce qui entraîne une libération d'ions Ca²⁺ et l'activation de la PKC (Ornitz et al., 2015). Cette voie de signalisation intervient dans un grand nombre de mécanismes, dont la prolifération et la différenciation cellulaire (Choi et al., 2007).

Toutes ces voies (Figure 7) peuvent interagir entre elles, Raf peut être phosphorylé par la PKC activée, ce qui renforcera la voie Ras/MAPK (Sözeri et al., 1992).

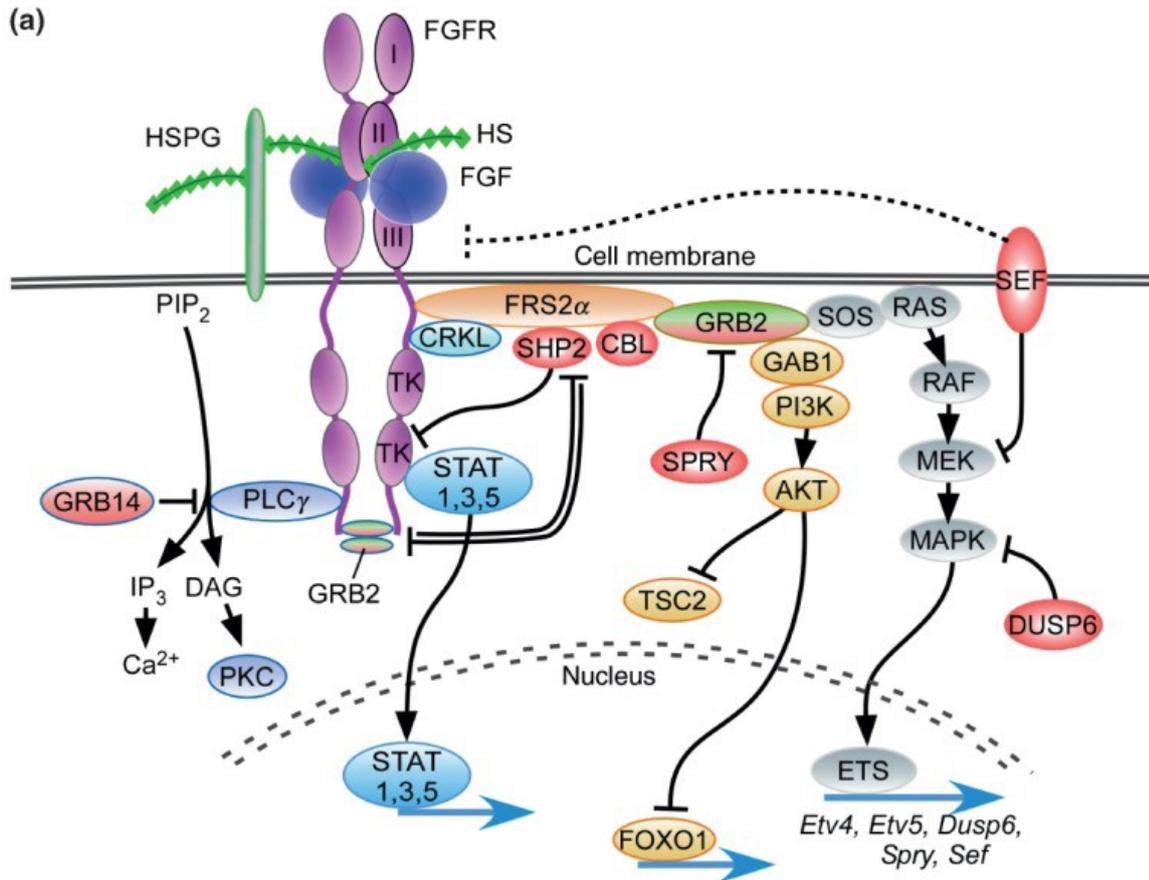


Figure 7 : Voies de signalisation des FGFs, d'après Ornitz et al., 2015.

2.1.3-d Récepteurs à basse affinité (HSPG)

Les HSPGs (Héparanes Sulfates Protéoglycanes) sont les récepteurs/co-récepteurs les plus décrits des FGFs. Ce sont des glycoprotéines contenant une ou plusieurs chaînes d'héparanes sulfate, un type de glycosaminoglycane (GAG). Ils interagissent avec les FGFs grâce à leur charge négative permettant des interactions électrostatiques (Wesche et al., 2011).

2.1.4 Rôles physiologiques et pathologiques des FGFs

Les FGFs et leurs récepteurs régulent une grande diversité de processus au cours du développement, comme l'établissement de l'axe dorso-ventral, l'ostéogenèse ou encore la différenciation neuronale.

Il est à noter que la perte de fonction totale de certains FGFs ou FGFRs conduit à des défauts majeurs du développement, comme le FGFR1. Il existe cependant des effets de redondance, comme entre les FGFs 9 et 20, ou le FGFR4 et 1 (Ornitz et al., 2015).

Du fait de la grande diversité d'action des FGFs et de leurs récepteurs, ils sont associés à de nombreuses pathologies humaines. Les mutations gain de fonction des FGFRs conduisent à

leur activation constitutive, responsables du syndrome de Kallmann qui entraîne des défauts squelettiques (fusion précoce des soudures crâniennes), impliquant les FGFRs 1 et 2 (Kan et al., 2002), ou encore le FGFR3 dans le syndrome de Muenke (Muenke et al., 1997).

La surexpression des FGFs, ainsi que les mutations gain de fonction des FGFRs ont été associées dans un grand nombre d'études à différents types de cancers, ce qui a suscité le lancement de nombreux essais cliniques visant à antagoniser leurs effets (Brooks et al., 2012).

2.1.5 Fibroblast Growth Factor 21

Défini comme une hormone pléiotrope, le FGF21 est une protéine de 209 acides aminés pour environ 20 kDa (Figure 8), il est exprimé dans de nombreux tissus incluant le foie, le pancréas, le thymus, les testicules, le muscle squelettique, le tissu adipeux blanc (WAT), le tissu adipeux brun (BAT), le cœur et le cerveau. Le FGFR1c a été mis en évidence comme le médiateur principal de l'action *in vivo* du FGF21 via sa dimérisation avec le corécepteur β -Klotho (KLB). La co-expression de ces deux récepteurs détermine la sensibilité d'un tissu ou d'un organe à la voie du FGF21.

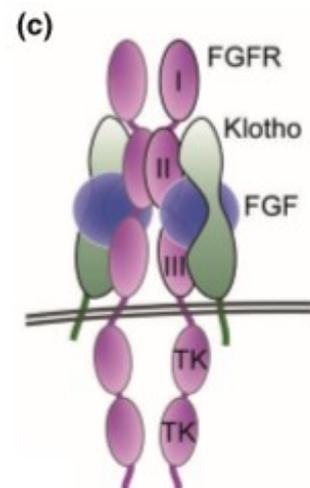
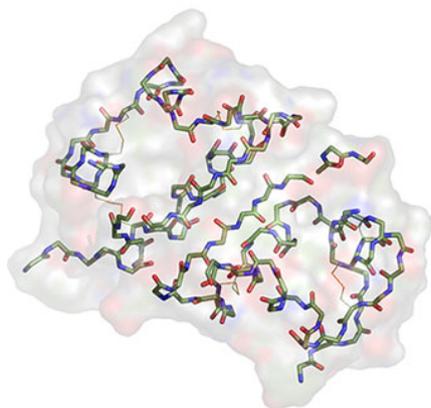


Figure 8 –Structure protéique du FGF21 (Kharitononkov et al. 2005), la liaison directe entre le FGF21 et le dimère FGFR / β -klotho conduit à i) la phosphorylation de cibles en aval, dont le substrat FGFR 2 (FRS2), la protéine kinase B (Akt), la sirtuine 1 (Sirt1), la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), Raf, et le transducteur de signal et activateur de la transcription 3 (STAT3), ii) l'augmentation rapide du calcium intracellulaire, ce qui induit l'expression des gènes cibles impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides (d'après Ornitz et al., 2015).

2.1.6 Rôle dans le métabolisme

Le FGF21 est un régulateur majeur dans les situations de stress métaboliques, incluant le jeûne, la suralimentation et l'exposition au froid. Son expression est fortement induite par le récepteur α du peroxydase activé par les proliférateurs (PPAR α) dans le foie pendant le jeûne, favorisant ainsi la néoglucogenèse hépatique via un axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Liang et al., 2014). Dans les adipocytes, FGF21 forme une boucle régulatrice avec PPAR γ , un régulateur clé de l'adipogénèse. Le FGF21 augmente l'absorption du glucose en modulant l'expression du transporteur de glucose 1 (GLUT1) via les actions synergiques du facteur de réponse sérique (SRF) et de la protéine Ets-like 1 (Elk-1) (Ge et al., 2011). En outre, il augmente directement l'expression et la sécrétion de l'adiponectine, une puissante adipokine sensibilisante à l'insuline. FGF21 est également acteur de la thermogénèse par l'intermédiaire de la régulation de PPAR γ coactivateur 1 α (PGC-1 α) (Cuevas-Ramos et al, 2012).

De nombreuses études montrent son intérêt dans la prise en charge de l'insulino-résistance et de l'obésité (Xu *et al.*, 2009). Paradoxalement l'augmentation de ces concentrations est associée à l'obésité et au risque de diabète, laissant penser à des phénomènes d'insulinorésistance (Chen et al., 2008). Il semble de plus être un marqueur des myopathies en lien avec une souffrance mitochondriale. (Suomalainen et al, 2011)

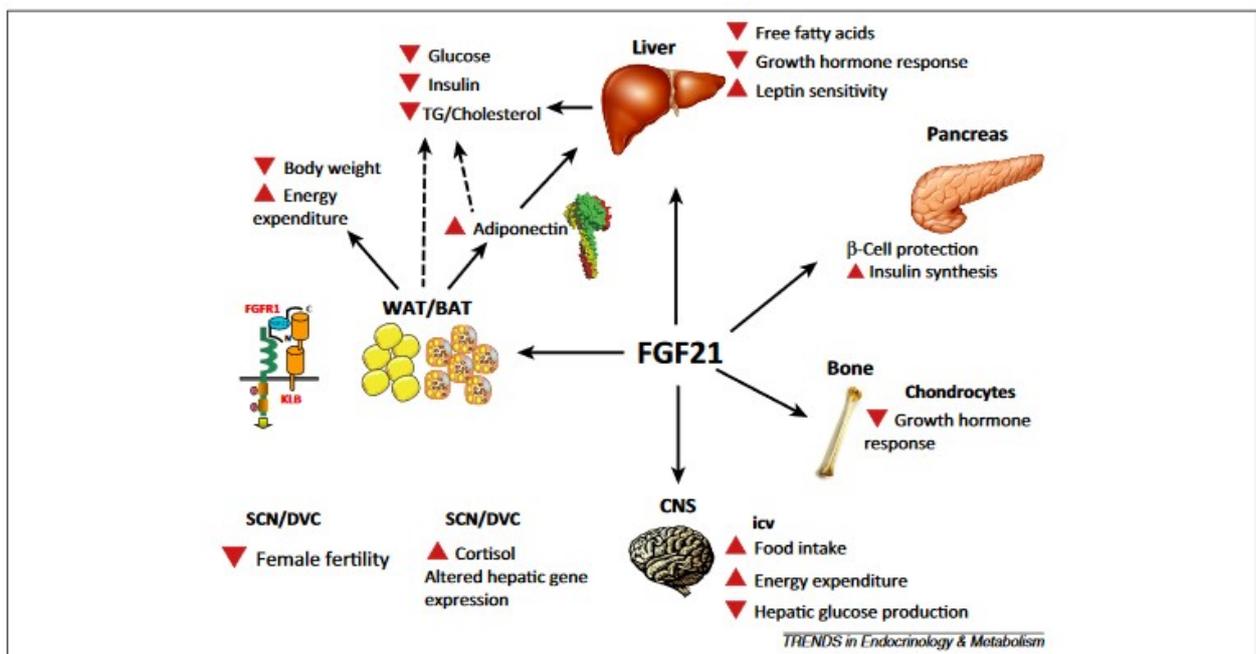


Figure 9 : schéma récapitulatif des effets métaboliques du FGF21, d'après Gimeno and Moller, 2014.

2.1.7 Role dans l' inflammation

En plus de son action sur le métabolisme, un nombre croissant d'études mettent en évidence le rôle du FGF21 dans la régulation de l'inflammation de bas grade liée à l'obésité, que ce soit par la diminution de la production de TNF α ou de l'interleukine-6 (Wang et al., 2015), en agissant sur SIRT1 et NF- κ B (Zhang et al, 2018) (Figure 10), il diminuerait ainsi les réactions inflammatoires locales et systémiques

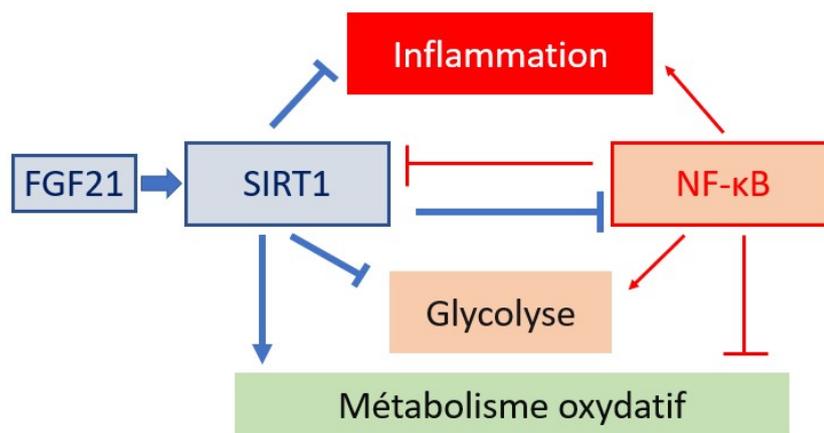


Figure 10 : Présentation schématique de l'action du FGF21 sur les effets antagonistes de NF- κ B et SIRT1 dans la régulation de l'inflammation et des réponses métaboliques.

De plus il possède des propriétés neuroprotectrices en limitant l'excitotoxicité induite par le glutamate (Leng et al, 2014), tout en favorisant la remyélinisation au sein du système nerveux central via la prolifération des précurseurs des oligodendrocytes (Kuroda et al, 2017). Par ailleurs, une étude pilote testant l'association du lithium et de l'acide valproïque chez des patients SLA (Boll et al, 2014), a révélé des effets neuroprotecteurs passant par l'induction du FGF21 (Leng et al, 2014).

2.2 Méthodologie générale

Basés sur les arguments précédents, la modulation de la voie du FGF21 pourrait interférer avec des mécanismes clés de la physiopathologie de la SLA (figure 11), nous avons choisi d'explorer cette voie par une thérapeutique spécifique.

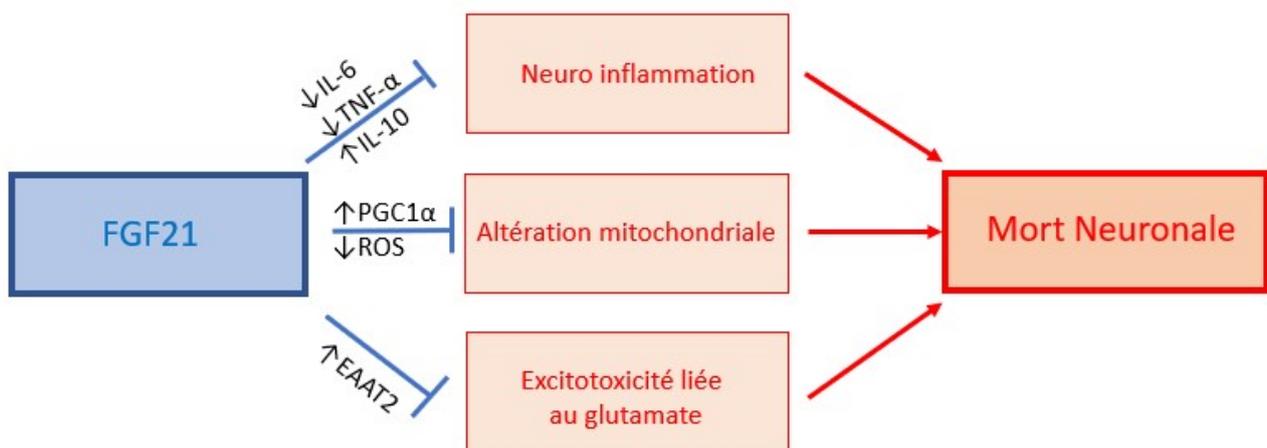


Figure 11 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA ciblés par le FGF21

Nous prévoyons d'évaluer l'efficacité thérapeutique de ce traitement avec comme critère de jugement principal le phénotype clinique, via le test du rotarod, l'évaluation de la masse musculaire ainsi que la perte de poids. Nous évaluons également les effets biologiques de cette thérapeutique, notamment les acteurs du métabolisme énergétique et sa régulation.

MATÉRIELS ET METHODES

3.1 Choix de la thérapeutique

Pour ce projet nous souhaitons activer la voie du FGF21 et un certain nombre d'études animales et humaines (Wu et al., 2011) ont montré une efficacité supérieure des mimétiques du FGF21 par rapport au FGF21 natif en termes de demi-vie et de résistance à l'agrégation et à la dégradation *in vivo*. Les mimétiques du FGF21 peuvent être classés en analogues du FGF21 et en anticorps activateurs ciblant FGFR/ β -klotho. Les critères de choix étant la proximité d'action par rapport à la molécule initial, sa demi-vie, ainsi qu'une documentation de son efficacité.

Le R1MAb (anticorps monoclonal anti-FGFR1), anticorps monoclonal agoniste dérivé de phages spécifique de FGFR1 avec une affinité de l'ordre du nanomolaire a été le premier mimétique FGF21 identifié possédant des propriétés hypolipémiantes chez la souris (Wu et al., 2011). L'administration de R1MAb à des souris db/db génétiquement diabétiques a provoqué une réduction significative du cholestérol hépatique et des triglycérides, ainsi que du cholestérol sérique et des acides gras non estérifiés. Les effets bénéfiques conférés par le

R1MAb étaient similaires à ceux du FGF21 natif. De plus, une seule injection de cet anticorps monoclonal a montré une activité pendant plus de 30 jours.

Veniant et al. (Veniant et al., 2012) ont généré un FGF21 à action prolongée, en fusionnant un motif Fc à un FGF21 humain recombinant contenant deux mutations structurellement stabilisantes. Chez les souris obèses, le Fc-FGF21 (RG) a montré des propriétés pharmacocinétiques nettement améliorées par rapport au FGF21. Ses effets sur le cholestérol et les triglycérides sériques, administrés à 2,3 mg / kg tous les 5 jours, étaient comparables à ceux du FGF21 humain recombinant (hrFGF21) administré deux fois par jour à raison de 1,0 mg / kg. En outre, le Fc-FGF21 (RG) réduit significativement les triglycérides sériques chez les singes rhésus à jeun ou nourris

LY2405319 est un FGF21 à longue durée d'action qui possède une liaison disulfure stabilisante supplémentaire protégeant de la protéolyse l'extrémité N-terminale (Adams et al., 2013). Les propriétés hypolipémiantes de LY2405319 ont été étudiées de manière plus approfondie chez les singes rhésus diabétiques et chez les humains. L'administration quotidienne à raison de 3 mg / kg était suffisante pour une amélioration significative des concentrations de lipides circulants chez les singes rhésus dès 2 semaines de traitement. Les taux de triglycérides, de cholestérol total et de VLDL-C étaient nettement réduits, tandis que ceux de HDL-C étaient significativement plus élevés. LDL-C a été modestement réduit par le traitement LY2405319 (Adams et al., 2013).

Le mimétisme du FGF21 à partir d'anticorps est une option prometteuse pour le traitement à long terme des désordres métabolique. Devant la liste des thérapeutiques mises à dispositions pour cibler la voie du FGF-21, nous avons décidé d'utiliser le R1Mab1 de Genentech (San Francisco, USA) anticorps monoclonal dirigé contre le FGFR1b et FGFR1c, est le seul incluant un effet au niveau hépatique et sur les acides gras libres (NEFA) en plus de présenter l'avantage d'une demi vie prolongée.

L'anticorps est injecté à la dose de 3 mg/kg (soit environ 0,075 mg par dose), 1 fois toutes les 4 semaines, en intrapéritonéal.

Un résumé des différents mimétiques du FGF21 est présenté tableau I avec les modifications du FGF21 et les résultats sur sa pharmacocinétique.

Tableau 4 : Sélection de mimétique du FGF21 avec leurs propriétés hypolipémiantes connues. mAb, monoclonal antibody; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; NEFA, non-esterified fatty acid; DIO, diet-induced obesity; HPIP, histidine-prolineisoleucine- proline.

Nom	Fabricants	Modification structurelle	Effet hypolipémiant	Reference
R1MAb	Genentech	mAb agoniste ciblant FGFR1b/c , β -Klotho indépendant	↓ TC & TG Hépatique ; ↓ sérum TC & NEFA (<i>db/db</i> souris)	Wu et al 2011
Fc-FGF21(RG)	Amgen	L98R (↓ agrégation) P171G (↓ protéolyse) Fusion à un Fc (↑ demi-vie)	↓ sérum TC & TG (DIO souris) ↓ sérum TG (DIO singe) à jeun	Veniant et al., 2012
LY2405319	Lilly	L118C, A134C (pont disulfure) HPIP délétion (↓ protéolyse)	↓ sérum TG, TC & VLDL-C ↑ sérum HDL-C (singe rhésus diabétique) ↓ Sérum TG, TC, LDL-C & VLDL-C ↑ sérum HDL-C (humains)	Adams et al., 2013

3.2 Animaux

3.2.1 Lignée B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J

Pour cette étude, des souris transgéniques mâles de la lignée B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J ont été achetées au laboratoire Charles Rivers® (Wilmington, Etats-Unis). Les souris hémizygotés issues de cette lignée, notées SOD1^{G93A} ont une médiane de survie de 157±9,3 jours et un phénotype évoquant la maladie chez l'homme, avec une paralysie progressive affectant d'abord les membres inférieurs. On considère que les premiers signes de la maladie apparaissent dans ce modèle aux environs de la 10^{ème} semaine (Wooley *et al.*, 2005). Les souris ont été réceptionnées à l'âge de 6 semaines, et le traitement a débuté à la 12^{ème} semaine de vie et toute les 4 semaines, jusqu'à leur sacrifice. Les souris sont surveillées pendant 1h après chaque injection.

3.2.2 Éthique

Conformément à la législation en vigueur, relative aux animaux utilisés à des fins scientifiques, une demande d'autorisation de projet a été déposée auprès du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, et a reçu un avis favorable du comité d'éthique Val de Loire. Par ailleurs, l'utilisation d'animaux transgénique de classe de confinement I a également fait l'objet d'un signalement auprès du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

3.2.3 Schéma expérimental

Pour ce projet, 48 souris ont été réparties en 4 groupes. Vingt-quatre transgéniques (Tg) et 24 souris non transgéniques, ou Wild Type (WT) ont été traitées par FGF21 mimétique ou par du tampon phosphate salin de Dulbecco (PBS : CaCl₂, KCl, KH₂PO₄, MgCl₂, NaCl, Na₂HPO₄, pH 7,2-7,6).

La figure 12 ci-dessous, résume l'organisation générale du protocole expérimental.

Les souris sont hébergées en portoir ventilé, avec de l'eau et de l'alimentation *ad libidum*. Les souris sont identifiées par marquage colorée de la base de la queue. A partir de la 12^{ème} semaine, des aménagements sont pris afin que la paralysie ne gêne pas l'abreuvement et l'alimentation des souris. Le point limite défini dans l'expérimentation est l'échec au test de retournement après 20 secondes.

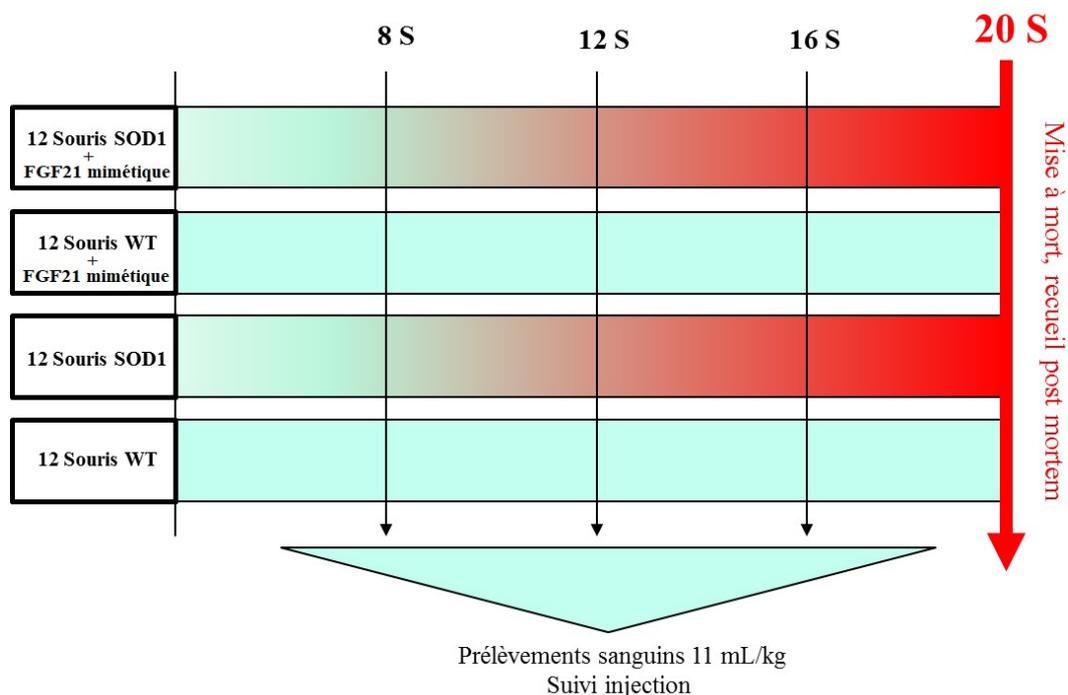


Figure 12 : Schéma expérimental de l'étude. 24 souris transgéniques ont été réparties en 2 groupes de 12, traitées et non-traitées par FGF21 mimétique pendant 8 semaines. 24 souris non-transgéniques ont été réparties en 2 groupes de 12 souris traitées et 12 souris non-traitées.

3.3 Prélèvements biologiques

Des prélèvements de sang sont réalisés aux 8^{ème}, 12^{ème}, 16^{ème} et 20^{ème} semaine de vie. Le prélèvement sanguin est réalisé sur la veine submandibulaire, sans anesthésie. Après contention de la souris, une piqûre est réalisée à l'aide d'une aiguille de calibre 22 Gauges au niveau de la veine mandibulaire, puis le sang qui s'écoule est récolté à l'aide d'un tube

Eppendorf de 0,5 mL. Le volume maximum prélevé est de l'ordre de 11 mL/kg, soit de 175 à 250 µL de sang à chaque prélèvement (environ 10 gouttes). Les fèces sont recueillies dans chaque cage toutes les 2 semaines à partir de la 8^e semaine. Des prélèvements d'organes seront réalisés après sacrifice des souris à leur 20^{ème} semaine de vie : cerveau, foie, muscle et moelle épinière qui seront immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C. Dans cette étude, nous nous focalisons sur le sérum, mais l'intégralité des organes sera conservée en vue d'éventuelles explorations complémentaires.

3.4 Marqueurs phénotypiques

3.4.1 Pesée et échographie

Les souris sont pesées 1 fois par semaine, à heure fixe. Une balance ayant une sensibilité de 0,1 g est utilisée. Un tarage de la balance a été réalisé régulièrement pendant les mesures. La date de début de perte du poids est relevée comme marqueur du début de la maladie, déterminée a posteriori comme la date où chaque animal atteint son poids maximal. Le poids évalué aux différents temps est rapporté au poids mesuré à l'instauration du traitement (S12).

Des mesures échographique haute fréquence à l'aide d'une sonde MS 550 40 MHz sur Vevo 2100 (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada) du membre inférieur sont réalisées sur un échantillon de souris vigile et exprimées en unité arbitraire (UA). Le traitement des données est réalisé à l'aide du logiciel Image J (National Institute of Mental Health) par intégration manuelle des aires sur coupe transversale du membre inférieur.

3.4.2 Analyse comportementale

L'analyse comportementale est réalisée par le test du rotarod qui permet d'évaluer la coordination motrice, la force, et l'équilibre. Le test du rotarod fournit une évaluation précoce, quantitative, et longitudinale des performances motrices. Chaque test est réalisé à heure fixe pour toutes les souris. Les souris sont placées sur un cylindre en rotation et le temps passé par chaque souris sur le cylindre était mesuré. Chaque test comporte plusieurs tentatives à 25 tours/minutes, le test est interrompu au bout de 5 minutes passées sur le cylindre. A l'issue de 3 tentatives, la valeur maximale passée sur le cylindre est conservée, à partir de la 18^e semaine, une version plus lente à 15 tours/minutes sera également réalisée du fait de la dégradation importante des performances motrices.

3.5 *Marqueurs biologiques*

3.5.1 **Lipoprotéines**

Les sous-classes de lipoprotéines sont obtenues par électrophorèse linéaire en gel de polyacrylamide non dénaturante (Lipoprint, Quantimetrix Corporation, USA) à partir de 25 µL de sérum. Nous évaluons ainsi 11 sous classes distinctes de lipoprotéines incluant les lipoprotéines de très faible densité (VLDLs), 3 de densité intermédiaire (IDL A, B et C), 7 de faible densité (LDLs) (1-2 : large LDLs, 3-7 : petit LDLs) ainsi que celles de haute densité (HDL). Les répartitions relatives des différentes sous-fractions sont comparées entre les 4 groupes de souris.

3.5.2 **Cytokines et adipokines**

Les concentrations en cytokines (IL-6, TNF α , MCP-1) et adipokines (Adiponectine, insuline, résistine) seront mesurées à partir de 10 µL de sérum, en utilisant le kit Milliplex Mouse Serum Cytokine and Adipokine (Millipore Corp, Billerica, MA) sur le Luminex IS 100 system (Luminex Corp, Austin, TX). Cette analyse repose sur une technologie ELISA multiplex offrant les avantages d'une grande sensibilité pour plusieurs analytes à partir de faible volume grâce à des anticorps spécifiques de chaque analyte.

3.5.3 **Métabolomique**

3.5.3-a Définition

La métabolomique se définit comme l'analyse de tous les composés organiques de petite taille (taille inférieure à 1,5 kDA) contenus dans un système biologique constituant ainsi le métabolome. Au sein de ces stratégies « omiques », on distingue les approches ciblées, semi-ciblées et globales. Premièrement, l'approche ciblée fait référence à l'identification et la quantification d'un nombre réduit de métabolites particuliers. Deuxièmement, l'approche semi-ciblée permet d'analyser tous les composés d'une voie métabolique ou d'une famille de composés. Troisièmement, l'approche globale est une approche chimiométrique destinée à la description phénotypique d'un système vivant et à la recherche de biomarqueurs, aboutissant à une classification des échantillons. Cette méthode permet d'identifier des profils spécifiques de pathologies sans nécessité d'identification ou de quantification des métabolites.

Nous utiliserons dans cette étude une analyse ciblée sur les acteurs métaboliques de la pathologie, notamment en lien avec le métabolisme énergétique.

3.5.3-b Chromatographie liquide haute résolution couplée à la spectrométrie de masse (LC-HRMS)

La mise au point de méthode a été précédemment réalisée sur sérum et différents tissus également (cerveau, foie, et muscle), donc nous nous sommes basés sur ces développements technologiques publiés (Madji Hounoum et al., 2015) pour les adapter aux besoins de notre étude. Devant le faible volume de sérum murin disponible et les différentes explorations biologiques prévues, nous avons testé la faisabilité de la métabolomique ciblée sur un faible volume de prélèvement. Nous avons évalué le niveau du signal et la reproductibilité sur un pool de sérums humains.

Des volumes de 10 μ L de sérum ont été extraits respectivement par 80 μ L de méthanol pendant 30 min à -20°C , avant centrifugation pendant 15 min à 5000 g puis évaporation du surnageant à l'aide d'un évaporateur sous vide. Les extraits secs ont été repris dans 120 μ L d'un mélange acétonitrile/eau et injectés sur un chromatogramme UPLC Ultimate system (Dionex®, Sunnyvale, Etats-Unis), couplé à un spectromètre de masse Q-Exactive Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific®, Bremen, Allemagne). Les échantillons ont été ionisés en mode électrospray positif et négatif. Nous avons évalué la reproductibilité sur 10 échantillons en estimant le coefficient de variation (CV%) et en prenant pour référence le profil effectué à partir de 100 μ L qui a été précédemment validé.

3.5.3-c Traitement des données

Une librairie de composé standard (Mass Spectroscopy Metabolite Library of standards MSML®, IROA Technologies™) est analysée avec les mêmes gradients de phase mobile ainsi que les mêmes conditions analytiques que celles utilisées pour les métabolites extraient du sérum. Afin de valider l'identité de chaque métabolite détecté, plusieurs critères sont requis : (1) correspondance du temps de rétention entre le métabolite détecté et le standard de référence (± 20 secondes), (2) correspondance de la masse moléculaire exacte entre le métabolite et le standard de référence (± 10 ppm), et (3) correspondance des rapports isotopiques entre le métabolite et le standard de référence. Le signal est calculé en utilisant le logiciel Xcalibur® (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) par l'intégration des pics chromatographiques des ions sélectionnés.

Après constitution d'une base de données comprenant les métabolites identifiés, nous effectuons une normalisation par rapport à l'air totale du spectre et évaluons la reproductibilité des concentrations relatives de ces métabolites afin de ne conserver dans notre base de données finale que ceux pour lesquels $\text{CV} < 30\%$. Puis une analyse multivariée sans

a priori (Analyse par Composante Principale (ACP)) est réalisée afin de vérifier l'homogénéité des métabolomes des différents échantillons. A la date de la rédaction de ce mémoire, seule la mise au point de l'analyse métabolomique sur faibles volumes a été effectuée. Le reste des analyses sera effectué à la fin du projet pour limiter la variabilité inter-essai.

3.6 *Analyse statistique*

Les variables quantitatives à savoir le poids, la variation pondérale, les surfaces musculaire ainsi que résultat au test rotarod sont comparés par un test de Student ou de Wilcoxon par paire entre chaque groupe. La corrélation entre les variables issues des différentes analyses est évaluée par un test de régression linéaire de Spearman. Les données de métabolomique sont traitées à l'aide du logiciel Simca P⁺® (Umetrics, Umea, Suède). Pour chaque modalité analytique, nous réalisons une analyse multivariée de type ACP. Pour toutes les analyses, le seuil de significativité de 0,05 est retenu. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel JMP 7.0 (SAS Institute®, Cary, Etats-Unis) et du logiciel Graphpad Prism (GraphPad, La Jolla, USA).

RÉSULTATS

4.1 *Pesée et échographie*

La figure 13 ainsi que le tableau 5 récapitulent les données de poids obtenues au cours de l'étude. On observe que les souris sauvages (WT) traitées par R1Mab1 sont significativement plus maigre de la semaine 13 à 17 par rapport au WT traitées par PBS ($p < 0,05$), les souris SOD1^{G93A} (Tg) traitées par R1Mab1 sont significativement plus maigre que les souris WT traitées et non traitées de la semaine 12 à 20, et de la semaine 13 à 20 par rapport au Tg traitées par PBS ($p < 0,05$). Les souris Tg traitées par PBS sont significativement plus maigre que les souris WT traitées par PBS de la semaine 12 à 20 ($p < 0,05$), ainsi que la semaine 19 et 20 pour les WT traitées par R1Mab1 ($p < 0,05$).

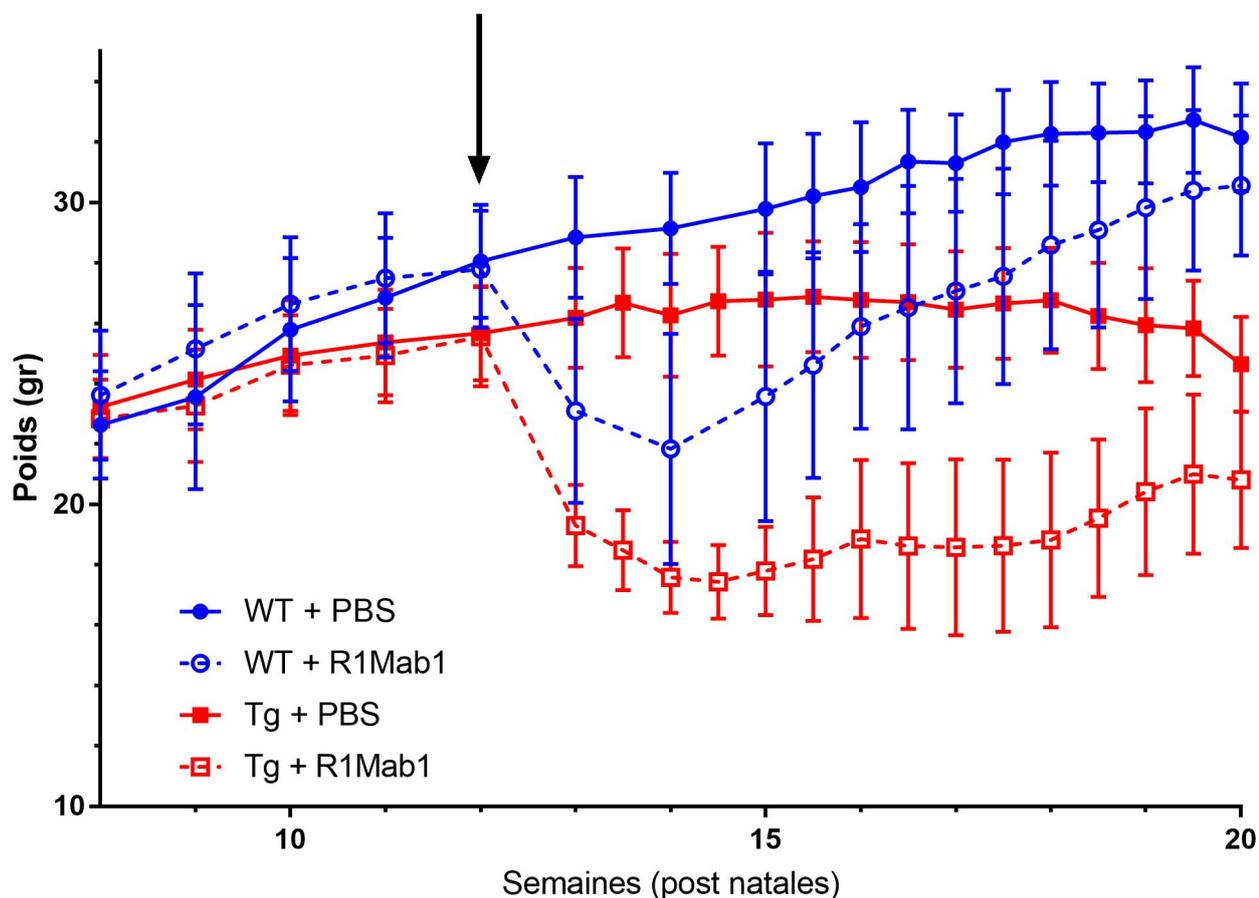


Figure 13 : Ensemble des mesures de poids en gramme au cours de l'étude entre les souris WT + PBS (n=12), WT + R1Mab1 (n=12), Tg + PBS (n=12) et Tg + R1Mab1 (n=12). La flèche noire symbolisant le début du traitement à S12. Entre les souris WT, il existe une perte de poids significative de la 13^e semaine jusqu'à la 18^e semaine.

Tableau 5 : Poids moyens (gr) de la semaine 12 à 20 entre les différents groupes

Semaines post natales	Poids moyen (gr) WT + PBS (n=12)	Poids moyen (gr) WT + R1Mab1 (n=12)	Poids moyen (gr) Tg + PBS (n=12)	Poids moyen (gr) Tg + R1Mab1 (n=12)
12	28,05*	27,79*	25,68*	25,56*
13	28,84•*	23,09•*	26,18▪*	19,3•*
14	29,14•*	21,84•°	26,26▪°	17,58▪*
15	29,79•*	23,57•*	26,78▪*	17,79▪*
16	30,51•*	25,89•*	26,77▪*	18,86▪*
17	31,3•*	27,06•*	26,46▪*	18,58▪*
18	32,28*	28,59*	26,76▪*	18,83▪*
19	32,33*	29,83°	25,93▪°	20,43▪*
20	32,16*	30,56°	24,64▪°	20,81▪*

• p<0,05 WT + PBS vs WT + R1Mab1 ; * p<0,05 WT + PBS et Tg + PBS ; * p<0,05 WT + R1Mab1 vs Tg + R1mab1 ; ° p<0,05 WT + R1mab1 vs Tg + PBS ; ▪ p<0,05 Tg + PBS vs Tg + R1Mab1.

A partir du début du traitement (semaine 12), la variation relative du poids par rapport à cette date a été utilisée et est représentée figure 14.

En comparant les souris traitées par R1Mab1, Tg vs WT, on observe que la variation pondérale absolue des souris Tg traitées par R1Mab1 est supérieure de la 13^e semaine jusqu'à la fin de l'étude (Figure 14B) ($p < 0,001$). Chez les souris traitées par PBS, Tg vs WT, on observe que la variation pondérale est statistiquement différente à partir de la 15^e semaine, en faveur des WT (Figure 14A) ($p < 0,01$). Chez les souris WT, celles traitées par R1Mab1 ont une variation pondérale différente de S13 à S17 (figure 14 C). Chez les Tg, celles traitées par R1Mab1 ont une variation pondérale plus importante de S12 à S20 ($p < 0,001$) (figure 14D).

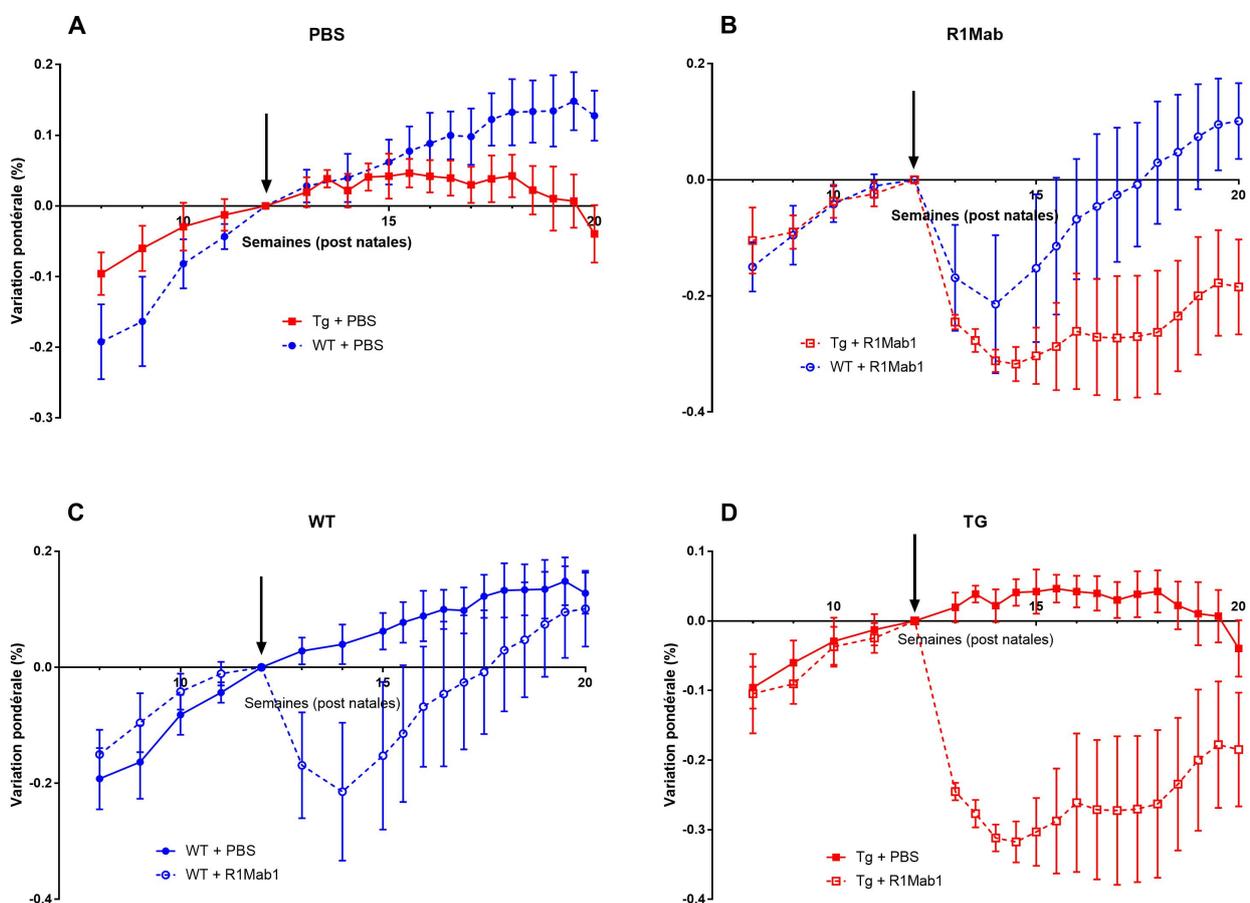


Figure 14 : A : Variation relative du poids, des souris traitées par PBS, au cours du temps WT vs Tg. On observe que les souris WT ont une variation pondérale plus importante de S15 à S20. B : Variation relative du poids, des souris traitées par R1Mab1, au cours du temps WT vs Tg. On observe que les souris Tg ont une variation pondérale plus importante de S13 à S20. C : Variation relative du poids par rapport au début du traitement chez les souris WT selon le traitement. D : Variation relative du poids par rapport au début du traitement chez les souris Tg selon le traitement.

Les données échographiques de surface musculaire de membre inférieur montrent une différence significative entre les souris WT et les souris Tg dès la 12^e semaine de vie (respectivement : 35,23 mm² vs 25,24 mm² ; p=0,016) (figure 15A), cette surface est corrélée positivement avec la masse corporelle (R²=0,47 ; p=0,0001) (figure 15B) Une image de coupe transversale du membre inférieur d'une souris WT à S12 est mise en illustration figure 15C.

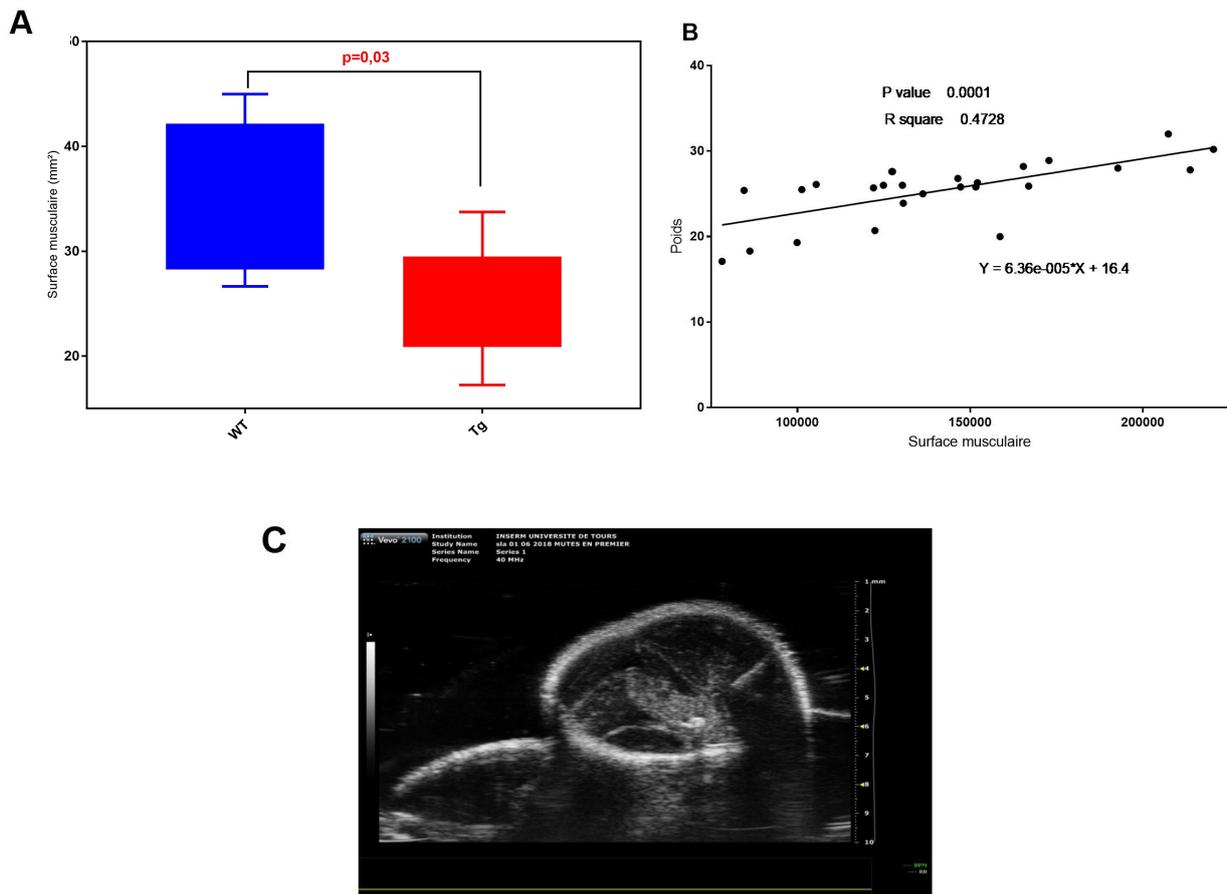


Figure 15 : A : Comparaison de surfaces musculaires du membre inférieur entre des souris WT (n=5) et des souris Tg (n=8) à 12 semaines de vie. On observe que les souris WT ont une surface musculaire plus importante à S12 (p<0,02). B : Relation entre le poids et la surface musculaire (R²=0,47 ; p=0,0001) C : image d'une section transversale d'une souris WT a S12.

4.2 Analyse comportementale

Le test du rotarod rapide (figure 16A), n'a pas mis en évidence de différence significative entre les groupes de souris transgéniques traitées et non-traitées. Cependant une version plus lente du test met en évidence une différence significative à S20 (p=0,032) (figure 16 B).

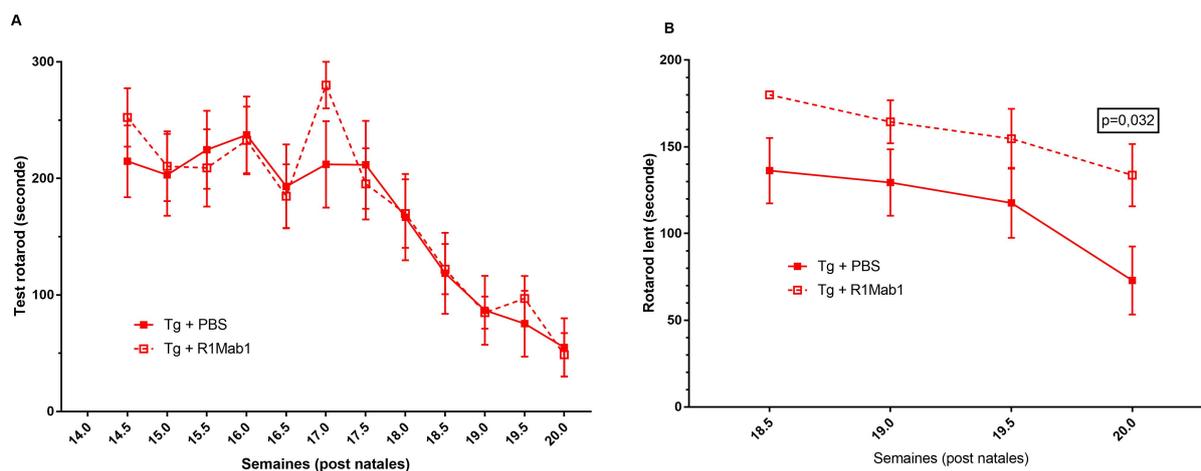


Figure 16 : A : Performance au test du rotarod (25 tours / minute) en seconde. Aucune différence significative n'est observée entre les souris transgéniques traitées et non-traitées pour le moment. B : performance au test du rotarod (15 tours / minute), on observe une différence significative en faveur des Tg + R1Mab1 ($p=0,032$).

4.3 Marqueurs biologiques

4.3.1 Lipoprotéines

Une précédente étude effectuée sur une cohorte de 30 patients SLA avait montré l'intérêt de l'analyse des lipoprotéines (Delaye et al., 2017). Dans le cadre de notre étude nous avons utilisé le lipoprinf pour avoir une analyse qualitative et semi-quantitative des différentes lipoprotéines sériques. Une première série d'analyses a été réalisée sur des prélèvements sériques effectués à 12 semaines de vie (WT vs TG) et est présentée Tableau 6.

Un exemple des profils obtenus est représenté figure 17.

Les résultats obtenus retrouvent une différence significative dans la répartition des sous-fractions lipoprotéiques au niveau de IDL-B (4,78(0,64) vs 6,06(0,87) ; $p=0,043$), LDL-3 (0,48(0,95) vs 1,74(0,33) ; $p=0,0259$), LDL-4 (1,28(1,08) vs 2,64(0,56) ; $p=0,043$), LDL-5 (1,63(0,59) vs 2,82(0,68) ; $p=0,0281$), HDL (69,73(4,87) vs 59,94(3,12) ; $p=0,0079$) et le total des LDL (18,5(6,35) vs 28,40(2,70) ; $p=0,0154$).

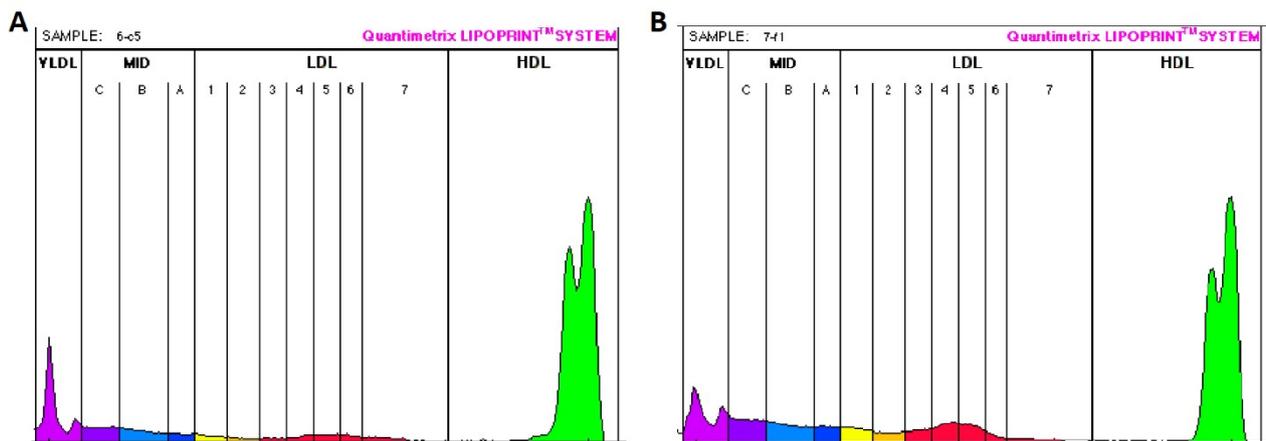


Figure 17 : Profil des lipoprotéines à 12 semaines de vie obtenue par électrophorèse sur gel polyacrylamide en gradient selon la méthode Lipoprint. A. une souris sauvage B. une souris SOD1^{G93A}

Tableau 6 : Ensemble des résultats issus de l'analyse par Lipoprint du sérum des souris contrôles (WT n=5) et mutées (Tg n=5), les valeurs en rouges représentent les résultats avec une p-value<0.05.

Sous-fraction	WT Moyenne (SD)	Tg Moyenne (SD)	P value
VLDL [%]	9,98 (1,51)	10,06 (3,62)	0,9664
IDL-C [%]	5,6 (0,96)	7,14 (1,02)	0,0542
IDL-B [%]	4,78 (0,64)	6,06 (0,87)	0,0434
IDL-A [%]	1,73 (0,47)	2,30 (0,35)	0,072
LDL-1 [%]	1,83 (0,66)	2,52 (0,54)	0,1237
LDL-2 [%]	0,75 (0,96)	1,88 (0,45)	0,0506
LDL-3 [%]	0,48 (0,95)	1,74 (0,33)	0,0259
LDL-4 [%]	1,28 (1,08)	2,64 (0,56)	0,043
LDL-5 [%]	1,63 (0,59)	2,82 (0,68)	0,0281
LDL-6 [%]	0 (0)	1,04 (1,06)	0,0942
LDL-7 [%]	0,55 (0,64)	0,22 (0,49)	0,4091
Total LDL [%]	18,5 (6,35)	28,40 (2,70)	0,0154
HDL [%]	69,73 (4,87)	59,94 (3,12)	0,0079

4.3.2 Cytokines et adipokines

A la date de la rédaction de ce mémoire, les analyses ne sont pas encore réalisées car le protocole expérimental n'est pas arrivé à son terme et ce type d'analyse doit être réalisé en une seule série afin d'éviter la variabilité inter-jour des résultats.

4.3.3 Mise au point métabolomique

Parmi les 600 composés répertoriés dans la bibliothèque, nous avons trouvé 101 métabolites identifiés en ionisation positive et 82 en ionisation négative. Parmi ces 183 molécules, nous en avons observés 134 avec un CV satisfaisant inférieur à 30 %. Les données issues de cette analyse sont rapportées dans le Tableau 7.

L'étude de reproductibilité effectuée sur 10 échantillons présente une répartition homogène en ACP représentée à la figure 18.

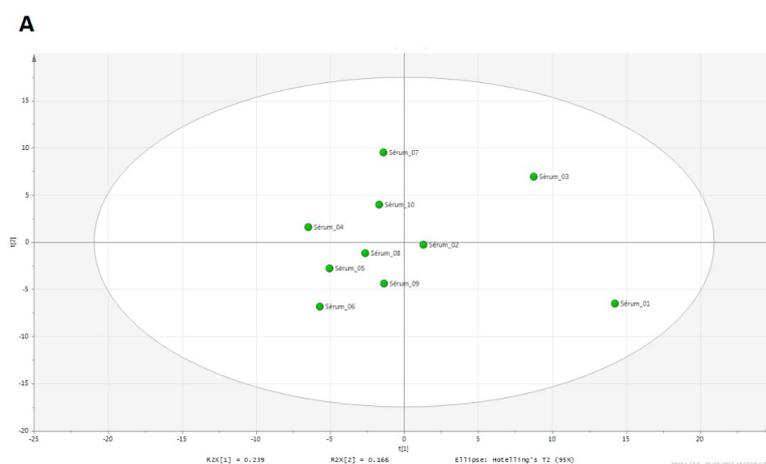


Figure 18 : Analyse en composante principale. Les données d'intégration des spectres des extractions répétées sur sérum ont été analysées par la méthode multivariée d'analyse en composante principale.

Tableau 7 - Principales caractéristiques analytiques des techniques métabolomiques utilisées. Le coefficient de variation (CV) est calculé pour chaque pic en divisant l'écart-type par la moyenne de l'intensité du même pic des 10 échantillons identiques.

Colonne	Ionisation	Métabolites totaux	Métabolites CV <30%	CV moyen %
C18	+	34	23	16,44
C18	-	36	27	11,44
HILIC	+	67	51	13,48
HILIC	-	46	35	11,5
Total		183	136	13,07

DISCUSSION

5.1 *Modification des courbes de poids des souris traitées*

L'évolution du poids de la souris SOD1^{G93A} est marquée par une croissance interrompue aux alentours de 100 jours d'âge, suivie par une décroissance se prolongeant jusqu'à la mort de la souris. Cette évolution a déjà été décrite (Wooley *et al.*, 2005). De nombreuses raisons peuvent expliquer cette décroissance, telles que l'hypermétabolisme ou la paralysie oro-lingual. L'âge auquel survient cette décroissance du poids, ainsi que la valeur du poids maximum, varient d'une étude à l'autre mais peuvent être influencées par le sexe des souris, le fond génique utilisé, ou les traitements à l'étude. Cet âge fournit un bon indicateur du début de la maladie dans les modèles murins de SLA (Boillée *et al.*, 2006).

La perte de poids après administration du R1Mab1 était attendue, mais nous avons mis en évidence que l'injection de R1Mab1 entraîne une variation pondérale supérieure chez les souris SOD1^{G93A} traitées par rapport aux souris sauvages traitées ($p < 0,009$). Cette observation peut s'expliquer soit par un excès de cibles de l'anticorps, soit par une sensibilité accrue du FGFR1, ou encore par un défaut des mécanismes de contre régulation normalement présents.

5.2 *Différence induite par le traitement dans les capacités motrices*

Le rotarod a mis en évidence une différence significative entre souris transgéniques traitées et non-traitées. Ces performances doivent être interprétées en tenant compte de l'appareillage utilisé, notamment du revêtement et du diamètre du cylindre, ou de la vitesse de rotation. Malgré ces précautions, le test du rotarod n'est pas un marqueur sensible de l'évolution des symptômes dans la SLA (Hayworth *et al.*, 2009). D'autres marqueurs cliniques existent, nécessitant parfois un appareillage coûteux, comme la mesure de la force d'agrippement, ou de la longueur de la foulée. Dans une autre étude, cette performance ne décroissait pas avant la 18^{ème} semaine de vie (Appolloni *et al.*, 2013). Un point intéressant est que malgré la perte de poids importante des souris traitées il n'y a pas eu de retentissement sur les performances motrices, alors qu'une perte de poids précoce est un marqueur de mauvais pronostic dans cette pathologie (Marin *et al.*, 2011). Les mesures échographiques se montrent intéressantes en révélant dès les 1ers signes clinique une différence significative entre les souris SOD1^{G93A} et sauvages ($p < 0,016$), preuve de l'intérêt de l'échographie musculaire dans le diagnostic précoce de cette pathologie et encore jamais étudié à notre connaissance dans ce modèle murin.

5.3 *Modification du profil lipoprotéique.*

Le Lipoprint bien qu'effectué sur un petit nombre d'échantillons montre dès la 12^e semaine de vie des différences intéressantes dans les répartitions des sous-fractions lipoprotéiques, alors que la pathologie commence tout juste à se déclarer. Les résultats montrent une augmentation des IDL-B, qui sont le produit de la consommation des triglycérides et du VLDL par les tissus musculaire et adipocytaire. L'augmentation de l'IDL-B est cohérente avec l'hypothèse d'une augmentation de la consommation lipidique par les tissus périphériques dans la SLA (Fergani *et al.*, 2007). Une autre hypothèse serait un défaut de dégradation par capture hépatique. L'augmentation des LDL-3, 4 et 5 ainsi que des LDL totaux pourraient appuyer l'idée d'un défaut de dégradation des IDL. En effet le taux de LDL est régulé par leur production à partir des IDL ainsi que leur élimination, toutes les deux dépendantes du nombre de récepteur hépatique au LDL. Ainsi une baisse de ces récepteurs hépatique entraîne une hausse de la production des LDL par défaut de recyclage des IDL (Feingold *et al.*, 2000). Il faut tenir compte des différences qui existent entre les études humaines qui retrouvent une tendance à l'hyperlipidémie chez l'homme (Dupuis *et al.*, 2008) et à l'hypolipidémie chez la souris (Fergani *et al.*, 2007), reflet d'une physiologie inter espèce différente.

L'analyse des prélèvements effectués à des temps plus tardifs (semaines 16 et 20) devrait permettre de mieux appréhender l'évolution du profil des lipoprotéines, dont les observations concordent avec la notion de dyslipidémie présente au cours de cette pathologie dès l'état pré symptomatique.

5.4 *Validation des méthodes métabolomiques*

L'une des étapes clé des analyses métabolomiques est le pré-traitement des échantillons. Dans le cadre de cette étude, nous sommes limités par le volume sanguin et la quantité tissulaire et nous devons assurer une reproductibilité maximale. Nous avons donc travaillé dans un premier temps à la faisabilité de la réduction de volume, avant d'analyser en séries nos échantillons issus de cette étude. Nous nous devons d'être rigoureux sur la reproductibilité intra série, afin de visualiser des modifications de concentrations de métabolites d'intérêts inhérentes aux conditions de l'étude et non aux artéfacts pré-analytiques et analytiques

Les résultats LC-HRMS sont corrects pour ce qui est de la reproductibilité intra-série. Cette technique étant très sensible, l'étape d'épuration des données pour ne conserver que les pics correspondant à des molécules identifiées et avec une variabilité moindre est cruciale.

Cependant, l'expertise dans l'équipe nous permet d'avoir une méthode systématique, limitant les problèmes de reproductibilité de cette phase d'épuration de la base de données brute. Les données précédentes avaient montré la reproductibilité des contrôles de qualité au sein de la plaque d'analyse (Blasco *et al.*, 2013). Nous ne ferons ici qu'une analyse métabolomique ciblée afin de pouvoir proposer une discussion sur les voies physiopathologiques pertinentes. Nous avons ainsi 136 molécules, correspondant aux acides aminés ainsi qu'aux voies du métabolisme énergétique, ce qui reste informatif malgré une perte de signal par rapport à un échantillon de 100 μ L.

5.5 *Limites*

Le choix du R1Mab1, bien qu'offrant les avantages des anticorps monoclonaux en termes de durée d'action présente l'inconvénient est d'être spécifique uniquement du FGFR1 sans prendre en compte la présence ou l'absence du corécepteur β -Klotho qui donne la spécificité d'action tissulaire du FGF21, pouvant entraîner des effets secondaires plus vastes que la protéine initiale. Le R1Mab1 étant un anticorps possède une pharmacodynamie différente de FGF21 qui diffuse à travers la barrière hémato encéphalique (BHE). Cependant, un passage accru des anticorps à travers la BHE existe chez les patients SLA (Fiala *et al.*, 2013).

5.6 *Conclusion*

Nous avons étudié les effets métaboliques, hormonologiques et cliniques d'un traitement par le R1Mab1, un anticorps agoniste de la voie du FGF21, sur un modèle murin de SLA.

Dans cette étude, nous avons observé que les souris transgéniques SOD1^{G93A} traitées par le R1Mab1 avaient une variation de pondérale plus importante que les souris sauvages tout en conservant des capacités motrices similaires, avec un ralentissement de la dégradation des performances motrice. A ce jour, ces données préliminaires ne nous permettent pas de statuer définitivement sur l'efficacité potentielle de cette thérapeutique dans la Sclérose Latérale Amyotrophique. Néanmoins, la validation du protocole et les développements de méthodes nécessaires à l'exploration des différents paramètres planifiés dans ce projet nous permettent d'assurer la poursuite de cette étude. Le matériel biologique disponible nous permet de proposer d'autres projets ancillaires, ciblés sur les résultats obtenus ici ou orientés vers d'autres mécanismes physiopathologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, A. C., Halstead, C. A., Hansen, B. C., Irizarry, A. R., Martin, J. A., Myers, S. R., ... Kharitononkov, A. (2013). LY2405319, an Engineered FGF21 Variant, Improves the Metabolic Status of Diabetic Monkeys. *PLoS ONE*, **8**(6), e65763.
- Allen SP, Rajan S, Duffy L, Mortiboys H, Higginbottom A, Grierson AJ, Shaw PJ. (2014) Superoxide dismutase 1 mutation in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis shifts energy generation from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Neurobiol Aging*. **35**(6) :1499-509
- Almer G, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, Hays AP, Chen C, Przedborski S. (2001). Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 49:176-85.
- Appel, S. H., R. G. Smith, M. Alexianu, L. Siklos, J. Engelhardt, L. V. Colom and E. Stefani (1995). "Increased intracellular calcium triggered by immune mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis." *Clin Neurosci* 3(6): 368-374.
- Arkan, M.C., Hevener, A.L., Greten, F.R., Maeda, S., Li, Z.-W., Long, J.M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 11: 191–198.
- Barbeito, A. G., L. Martinez-Palma, M. R. Vargas, M. Pehar, N. Manay, J. S. Beckman, L. Barbeito and P. Cassina (2010). "Lead exposure stimulates VEGF expression in the spinal cord and extends survival in a mouse model of ALS." *Neurobiol Dis* 37(3): 574-580
- Beckman, J.S., Carson, M., Smith, C.D., and Koppenol, W.H. (1993). ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364, 584.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH. (2008). CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15558-63.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Zhao, W., Wang, J., Huang, A., Wen, S., Liao, B., and Appel, S.H. (2011). Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **134** :1293–1314.
- Benajiba, L., I. Le Ber, A. Camuzat, M. Lacoste, C. Thomas-Anterion, P. Couratier, S. Legallic, F. Salachas, D. Hannequin, M. Decousus, L. Lacomblez, E. Guedj, V. Golfier, W. Camu, B. Dubois, D. Campion, V. Meininger and A. Brice (2009). "TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration." *Ann Neurol* 65(4): 470-473.
- Bendotti, C., M. Tortarolo, S. K. Suchak, N. Calvaresi, L. Carvelli, A. Bastone, M. Rizzi, M. Rattray and T. Mennini (2001). "Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels." *J Neurochem* 79(4): 737746.
- Blasco, H., Corcia, P., Pradat, P.-F., Bocca, C., Gordon, P.H., Veyrat-Durebex, C., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Moreau, C., Devos, D., et al. (2013). Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **12**: 3746–3754.
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* **312**: 1389–1392.

- Boll MC, Bayliss L, Vargas-Cañas S, Burgos J, Montes S, Peñaloza-Solano G, Rios C, Alcaraz-Zubeldia M. (2014) Clinical and biological changes under treatment with lithium carbonate and valproic acid in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* **340**(1-2):103-8
- Bowerman M, Vincent T, Scamps F, Perrin FE, Camu W, Raoul C (2013) Neuroimmunity dynamics and the development of therapeutic strategies for amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* 7:214.
- Bradley, W. G., S. A. Banack and P. A. Cox (2009). "The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis." *Neurology* 72(5): 473-474, 476; author reply 475-476.
- Brooks, B. R., R. G. Miller, M. Swash and T. L. Munsat (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, A.N., Kilgour, E., and Smith, P.D. (2012). Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res* 18, 1855–1862.
- Brown, R.H. (1998). SOD1 aggregates in ALS: cause, correlate or consequence? *Nat. Med.* 4, 1362–1364.
- Browne, S.E., Yang, L., DiMauro, J.-P., Fuller, S.W., Licata, S.C., and Beal, M.F. (2006). Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. *Neurobiol. Dis.* **22** :599–610.
- Byrne, S., M. Elamin, P. Bede, A. Shatunov, C. Walsh, B. Corr, M. Heverin, N. Jordan, K. Kenna, C. Lynch, R. L. McLaughlin, P. M. Iyer, C. O'Brien, J. Phukan, B. Wynne, A. L. Bokde, D. G. Bradley, N. Pender, A. Al-Chalabi and O. Hardiman (2012). "Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: a population-based cohort study." *Lancet Neurol* 11(3): 232-240.
- Caller, T. A., N. C. Field, J. W. Chipman, X. Shi, B. T. Harris and E. W. Stommel (2012). "Spatial clustering of amyotrophic lateral sclerosis and the potential role of BMAA." *Amyotroph Lateral Scler* 13(1): 25-32.
- Carri, M.T., and Cozzolino, M. (2011). SOD1 and mitochondria in ALS: a dangerous liaison. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 593–599.
- Cedarbaum, J. M., N. Stambler, E. Malta, C. Fuller, D. Hilt, B. Thurmond and A. Nakanishi (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.
- Chen W.W., Li L., Yang G.Y., Li K., Qi X.Y., Zhu W. (2008) Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes.* **116**(1) :65–68.
- Chio, A., A. Calvo, C. Moglia, L. Mazzini and G. Mora (2011). "Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study." *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*
- Chio, A., G. Logroscino, B. J. Traynor, J. Collins, J. C. Simeone, L. A. Goldstein and L. A. White (2013). "Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature." *Neuroepidemiology* 41(2): 118-130.
- Choi, J.H., Ryu, S.H., and Suh, P.G. (2007). On/off-regulation of phospholipase C-gamma 1-mediated signal transduction. *Adv Enzyme Regul* 47, 104–116.

- Corcia P, Mayeux-Portas V, Khoris J, de Toffol B, Autret A, Müh J-P, Camu W, Andres C, the French ALSRG. (2002a). Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 51:243-246.
- Corcia P, Blasco H, Camu W. (2014). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Presse Med* 43:555-62
- Couratier, P., Hugon, J., Sindou, P., Vallat, J.M., and Dumas, M. (1993). Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet* 341, 265–268.
- Cozzolino, M., and Carri, M.T. (2012). Mitochondrial dysfunction in ALS. *Prog. Neurobiol.* 97, 54–66.
- Crain JM, Nikodemova M, Watters JJ (2013) Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. *J Neurosci Res* 91:1143–1151.
- Cuevas-Ramos D, Aguilar-Salinas CA, Gómez-Pérez FJ. (2012) Metabolic actions of fibroblast growth factor 21. *Curr Opin Pediatr.* 24(4) : 523-9.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J and others. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72:245-56.
- Delaye JB, Patin F, Piver E, Bruno C, Vasse M, Vourc'h P, Andres CR, Corcia P, Blasco H. (2017) Low IDL-B and high LDL-1 subfraction levels in serum of ALS patients. *J Neurol Sci.* 380 :124-127
- Deng, H., Hentati, A., Tainer, J., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W., Getzoff, E., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R., et al. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* (80-). 261, 1047–1051.
- Desport, J.C., Preux, P.M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J.M., Beaufrère, B., and Couratier, P. (2001). Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 328–334.
- Dodge, J.C., Treleaven, C.M., Fidler, J.A., Tamsett, T.J., Bao, C., Searles, M., Taksir, T.V., Misra, K., Sidman, R.L., Cheng, S.H., et al. (2013). Metabolic signatures of amyotrophic lateral sclerosis reveal insights into disease pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:10812–10817.
- Douville R, Liu J, Rothstein J, Nath A. (2011). Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 69:141-151.
- Dupuis, L., Oudart, H., René, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., and Loeffler, J.-P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 : 11159–11164.
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J.-L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., Seilhean, D., Hauw, J.-J., Lacomblez, L., Loeffler, J.-P., et al. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70:1004–1009.
- Fang, F., L. C. Kwee, K. D. Allen, D. M. Umbach, W. Ye, M. Watson, J. Keller, E. Z. Oddone, D. P. Sandler, S. Schmidt and F. Kamel (2010). "Association between blood lead and the risk of amyotrophic lateral sclerosis." *Am J Epidemiol* 171(10): 1126-1133.

- Facchinetti, F., Sasaki, M., Cutting, F.B., Zhai, P., MacDonald, J.E., Reif, D., Beal, M.F., Huang, P.L., Dawson, T.M., Gurney, M.E., et al. (1999). Lack of involvement of neuronal nitric oxide synthase in the pathogenesis of a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 90, 1483–1492.
- Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. 2000. *Endotext* [Internet]
- Fergani, A., Oudart, H., Gonzalez De Aguilar, J.-L., Fricker, B., René, F., Hocquette, J.-F., Loeffler, J.-P. (2007). Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Lipid Research*, **48**(7): 1571–1580.
- Ferri A, Cozzolino M, Crosio C, Nencini M, Casciati A, Gralla EB, Rotilio G, Valentine JS, Carri MT. (2006). Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13860-5.
- Fisher FM, Maratos-Flier E. (2016) Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol.* **78**: 223-41
- Fitzgerald KC, O'Reilly EJ, Falcone GJ, McCullough ML, Park Y, Kolonel LN, Ascherio A. (2014). Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and risk for amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol* 71:1102-10.
- Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, Ladner KJ, Bevan AK, Foust KD, Godbout JP and others. (2014). Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 81:1009-23.
- Fujita, K., Yamauchi, M., Shibayama, K., Ando, M., Honda, M., and Nagata, Y. (1996). Decreased cytochrome c oxidase activity but unchanged superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 45, 276–281.
- Ge, X., Chen, C., Hui, X., Wang, Y., Lam, K. S. L., & Xu, A. (2011). Fibroblast Growth Factor 21 Induces Glucose Transporter-1 Expression through Activation of the Serum Response Factor/Ets-Like Protein-1 in Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**(40), 34533–34541
- Gerber, Y.N., Sabourin, J.-C., Rabano, M., Vivanco, M. d M., and Perrin, F.E. (2012). Early functional deficit and microglial disturbances in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 7: e36000.
- Ghiasi P, Hosseinkhani S, Noori A, Nafissi S, Khajeh K. (2012). Mitochondrial complex I deficiency and ATP/ADP ratio in lymphocytes of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Res* 34:297-303.
- Gil J, Funalot B, Torny F, Lacoste M, Couratier P. (2007). [Exogenous risk factors in sporadic ALS: a review of the literature]. *Rev Neurol (Paris)* 163:1021-30.
- Gimeno RE, Moller DE. (2014). FGF21-based pharmacotherapy –potential utility for metabolic disorders. *Trends Endocrinol Metab.* 25(6):303-11.
- Gospodarowicz, D., Jones, K.L., and Sato, G. (1974). Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 2295–2299.
- Gotkine, M., Y. Friedlander and H. Hochner (2014). "Triathletes are over-represented in a population of patients with ALS." *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 1-3.

- Goto, J. J., E. B. Gralla, J. S. Valentine and D. E. Cabelli (1998). "Reactions of hydrogen peroxide with familial amyotrophic lateral sclerosis mutant human copper-zinc superoxide dismutases studied by pulse radiolysis." *J Biol Chem* 273(46): 30104-30109.
- Guo, H., Lai, L., Butchbach, M.E.R., Stockinger, M.P., Shan, X., Bishop, G.A., and Lin, C.G. (2003). Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2519–2532.
- Gurney, M.E., Cutting, F.B., Zhai, P., Doble, A., Taylor, C.P., Andrus, P.K., and Hall, E.D. (1996). Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 39, 147–157.
- Hayworth, C.R., and Gonzalez-Lima, F. (2009). Pre-symptomatic detection of chronic motor deficits and genotype prediction in congenic B6.SOD1(G93A) ALS mouse model. *Neuroscience* 164: 975–985.
- Henkel, J.S., Beers, D.R., Zhao, W., and Appel, S.H. (2009). Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 4: 389–398.
- Henkel JS, Beers DR, Wen S, Rivera AL, Toennis KM, Appel JE, Zhao W, Moore DH, Powell SZ, Appel SH. (2013). Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med* 5:64-79.
- Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G. (1984). Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:471-80.
- Hodges, J. R., R. Davies, J. Xuereb, J. Kril and G. Halliday (2003). "Survival in frontotemporal dementia." *Neurology* 61(3): 349-354.
- Huisman MHB, Seelen M, de Jong SW, Dorresteyn KRIS, van Doormaal PTC, van der Kooij AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, van den Berg LH, Veldink JH. (2013). Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 84:976-981
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2011). Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* 149, 121–130.
- Janssens, J. and C. Van Broeckhoven (2013). "Pathological mechanisms underlying TDP-43 driven neurodegeneration in FTL-ALS spectrum disorders." *Hum Mol Genet* 22(R1): R77-87.
- Johnson, J. O., J. Mandrioli, M. Benatar, Y. Abramzon, V. M. Van Deerlin, J. Q. Trojanowski, J. R. Gibbs, M. Brunetti, S. Gronka, J. Wu, J. Ding, L. McCluskey, M. Martinez-Lage, D. Falcone, D. G. Hernandez, S. Arepalli, S. Chong, J. C. Schymick, J. Rothstein, F. Landi, Y. D. Wang, A. Calvo, G. Mora, M. Sabatelli, M. R. Monsurro, S. Battistini, F. Salvi, R. Spataro, P. Sola, G. Borghero, G. Galassi, S. W. Scholz, J. P. Taylor, G. Restagno, A. Chio and B. J. Traynor (2010). "Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS." *Neuron* 68(5): 857864.
- Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., and Rouleau, G.A. (2007). Oxidized/misfolded superoxide dismutase-1 : the cause of all amyotrophic lateral sclerosis? *Ann. Neurol.*62, 553–559.
- Kamel F, Umbach DM, Hu H, Munsat TL, Shefner JM, Taylor JA, Sandler DP. (2005). Lead exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2:195-201
- Kan, S., Elanko, N., Johnson, D., Cornejo-Roldan, L., Cook, J., Reich, E.W., Tomkins, S., Verloes, A., Twigg, S.R., Rannan-Eliya, S., et al. (2002). Genomic screening of fibroblast

- growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 472–486
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140:691-707.
- Kawamata, H., and Manfredi, G. (2010). Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech. Ageing Dev.* 131, 517–526.
- Kharitonov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., Shanafelt, A. B. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *Journal of Clinical Investigation*, **115**(6): 1627–1635.
- Kiskinis E, Sandoe J, Williams Luis A, Boulting GabriellaL, Moccia R, Wainger BrianJ, Han S, Peng T, Thams S, Mikkilineni S and others. (2014). Pathways Disrupted in Human ALS Motor Neurons Identified through Genetic Correction of MutantSOD1. *Cell Stem Cell* 14:781-795.
- Kuroda, M., Muramatsu, R., Maedera, N., Koyama, Y., Hamaguchi, M., Fujimura, H., Yamashita, T. (2017). Peripherally derived FGF21 promotes remyelination in the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation*, **127**(9), 3496–3509.
- Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T and others. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323:1205-8.
- Leng, Y., Wang, Z., Tsai, L.-K., Leeds, P., Fessler, E. B., Wang, J., & Chuang, D.-M. (2015). FGF-21, a novel metabolic regulator, has a robust neuroprotective role and is dramatically elevated in neurons by mood stabilizers. *Molecular Psychiatry*, **20**(2), 215–223.
- Liang Q, Zhong L, Zhang J, Wang Y, Bornstein SR, Triggler CR, Ding H, Lam KS, Xu A. (2014) FGF21 maintains glucose homeostasis by mediating the cross talk between liver and brain during prolonged fasting. *Diabetes*. **63**(12):4064-75
- Liu J, Gao L, Zang D (2015) Elevated levels of IFN- γ in CSF and serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 10:1–11.
- Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chio, A., Couratier, P., Mitchell, J.D., Swingler, R.J., Beghi, E., and EURALS (2008). Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **79** : 6–11.
- Logroscino, G., B. J. Traynor, O. Hardiman, A. Chio, D. Mitchell, R. J. Swingler, A. Millul, E. Benn and E. Beghi (2010). "Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81(4): 385-390.
- Madji Hounoum B, Blasco H, Nadal-Desbarats L, Diémé B, Montigny F, Andres CR, Emond P, Mavel S. (2015) Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS. *Anal Bioanal Chem*; **407**(29):8861-72.
- 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. *Environmental Research* 117:112-119.
- Mancuso R, Navarro X. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Prog Neurobiol* 133:1-26.

- 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):628-34
- Maruyama, H., H. Morino, H. Ito, Y. Izumi, H. Kato, Y. Watanabe, Y. Kinoshita, M. Kamada, H. Nodera, H. Suzuki, O. Komure, S. Matsuura, K. Kobatake, N. Morimoto, K. Abe, N. Suzuki, M. Aoki, A. Kawata, T. Hirai, T. Kato, K. Ogasawara, A. Hirano, T. Takumi, H. Kusaka, K. Hagiwara, R. Kaji and H. Kawakami (2010). "Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis." *Nature* 465(7295): 223-226.
- Masseret, E., S. Banack, F. Boumediene, E. Abadie, L. Brient, F. Pernet, R. Juntas-Morales, N. Pageot, J. Metcalf, P. Cox and W. Camu (2013). "Dietary BMAA exposure in an amyotrophic lateral sclerosis cluster from southern France." *PLoS One* 8(12): e83406.
- Menzies, F. M., M. R. Cookson, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, Z. M. Chrzanowska-Lightowlers, L. Dong, D. A. Figlewicz and P. J. Shaw (2002). "Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis." *Brain* 125(Pt 7): 1522-1533.
- Miki, T., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Smith, C.L., Burgess, W.H., Chan, A.M., and Aaronson, S.A. (1992). Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 246–250.
- Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. (2012) Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND) *Cochrane Database Syst Rev*.
- Mohammadi, M., Honegger, A.M., Rotin, D., Fischer, R., Bellot, F., Li, W., Dionne, C.A., Jaye, M., Rubinstein, M., and Schlessinger, J. (1991). A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5068–5078.
- Moisse K, Strong MJ. (2006). Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1083-93.
- Muenke, M., Gripp, K.W., McDonald-McGinn, D.M., Gaudenz, K., Whitaker, L.A., Bartlett, S.P., Markowitz, R.I., Robin, N.H., Nwokoro, N., Mulvihill, J.J., et al. (1997). A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 555.
- Mulder, D. W. and L. T. Kurland (1987). "Motor neuron disease: epidemiologic studies." *Adv Exp Med Biol* 209: 325-332.
- Muller, K., P. M. Andersen, A. Hubers, N. Marroquin, A. E. Volk, K. M. Danzer, T. Meitinger, A. C. Ludolph, T. M. Strom and J. H. Weishaupt (2014). "Two novel mutations in conserved codons indicate that CHCHD10 is a gene associated with motor neuron disease." *Brain*.
- Nishimura, A. L., M. Mitne-Neto, H. C. Silva, A. Richieri-Costa, S. Middleton, D. Cascio, F. Kok, J. R. Oliveira, T. Gillingwater, J. Webb, P. Skehel and M. Zatz (2004b). "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.
- Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biology*, **2**(3), reviews3005.1–reviews3005.12.
- Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, **4**(3), 215–266.

- Panov, A., Kubalik, N., Zinchenko, N., Hemendinger, R., Dikalov, S., and Bonkovsky, H.L. (2011). Respiration and ROS production in brain and spinal cord mitochondria of transgenic rats with mutant G93a Cu/Zn-superoxide dismutase gene. *Neurobiol. Dis.* 44, 53–62.
- Parakh S, Spencer DM, Halloran MA, Soo KY, Atkin JD. (2013). Redox Regulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013:12.
- Parone, P.A., Da Cruz, S., Han, J.S., McAlonis-Downes, M., Vetto, A.P., Lee, S.K., Tseng, E., and Cleveland, D.W. (2013). Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 33, 4657–4671.
- Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, Brown Jr RH. (2004). Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated SOD1 Mutant Proteins Bind and Aggregate with Bcl-2 in Spinal Cord Mitochondria. *Neuron* 43:19-30.
- Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ (2010) Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PLoS One* 5:e9386.
- Patin F, Corcia P, Madji Hounoum B, Veyrat-Durebex C, Respaud E, Piver E, Benz-de Bretagne I, Vourc'h P, Andres CR, Blasco H. (2015). Biological follow-up in amyotrophic lateral sclerosis: decrease in creatinine levels and increase in ferritin levels predict poor prognosis. *Eur J Neurol* 22:1385-90.
- Pedrini S, Sau D, Guareschi S, Bogush M, Brown RH, Jr., Naniiche N, Kia A, Trotti D, Pasinelli P. (2010). ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Hum Mol Genet* 19:2974-86.
- Perlson E, Maday S, Fu MM, Moughamian AJ, Holzbaur EL. (2010). Retrograde axonal transport : pathways to cell death ? *Trends Neurosci* 33 : 335-44.
- Peters TL, Fang F, Weibull CE, Sandler DP, Kamel F, Ye W. (2013). Severe head injury and amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14:267-72.
- Philips T, Robberecht W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 10:253-63.
- Potthoff MJ, Inagaki T, Satapati S, Ding X, He T, Goetz R, Mohammadi M, Finck BN, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA & Burgess SC (2009). FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**,10853-10858
- Puentes F, Malaspina A, van Noort JM, Amor S. (2016). Non-neuronal Cells in ALS: Role of Glial, Immune cells and Blood-CNS Barriers. *Brain Pathol* 26:248-57.
- Qureshi MM, Hayden D, Urbinelli L, Ferrante K, Newhall K, Myers D, Hilgenberg S, Smart R, Brown RH, Cudkovicz ME. (2006). Analysis of factors that modify susceptibility and rate of progression in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotroph Lateral Scler* 7:173-82
- Raju, R., Palapetta, S.M., Sandhya, V.K., Sahu, A., Alipoor, A., Balakrishnan, L., Advani, J., George, B., Kini, K.R., Geetha, N.P., et al. (2014). A Network Map of FGF-1/FGFR Signaling System. *J. Signal Transduct.* 2014, 1–16.

- Renton, A. E., E. Majounie, A. Waite, J. Simon-Sanchez, S. Rollinson, J. R. Gibbs, J. C. Schymick, H. Laaksovirta, J. C. van Swieten, L. Myllykangas, H. Kalimo, A. Paetau, Y. Abramzon, A. M. Remes, A. Kaganovich, S. W. Scholz, J. Duckworth, J. Ding, D. W. Harner, D. G. Hernandez, J. O. Johnson, K. Mok, M. Ryten, D. Trabzuni, R. J. Guerreiro, R. W. Orrell, J. Neal, A. Murray, J. Pearson, I. E. Jansen, D. Sondervan, H. Seelaar, D. Blake, K. Young, N. Halliwell, J. B. Callister, G. Toulson, A. Richardson, A. Gerhard, J. Snowden, D. Mann, D. Neary, M. A. Nalls, T. Peuralinna, L. Jansson, V. M. Isoviita, A. L. Kaivorinne, M. Holtta-Vuori, E. Ikonen, R. Sulkava, M. Benatar, J. Wu, A. Chio, G. Restagno, G. Borghero, M. Sabatelli, D. Heckerman, E. Rogaeva, L. Zinman, J. D. Rothstein, M. Sendtner, C. Drepper, E. E. Eichler, C. Alkan, Z. Abdullaev, S. D. Pack, A. Dutra, E. Pak, J. Hardy, A. Singleton, N. M. Williams, P. Heutink, S. Pickering-Brown, H. R. Morris, P. J. Tienari and B. J. Traynor (2011). "A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALSFTD." *Neuron* 72(2): 257-268.
- Rosen, D. R., T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'Regan, H. X. Deng and et al. (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." *Nature* 362(6415): 59-62
- Rothstein, J. D., G. Tsai, R. W. Kuncl, L. Clawson, D. R. Cornblath, D. B. Drachman, A. Pestronk, B. L. Stauch and J. T. Coyle (1990). "Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 28(1): 18-25.
- Rothstein, J. D., M. Van Kammen, A. I. Levey, L. J. Martin and R. W. Kuncl (1995). "Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 38(1): 73-84.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., et al. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675–686.
- Sasaki S, Iwata M. (1999). Ultrastructural change of synapses of Betz cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 268 : 29-32.
- Shaw, P. J. (2005). "Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(8): 1046-1057.
- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S, Kobayashi M. (2001). Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* 917:97-104.
- Siddique T, Pericak-Vance AM, Caliendo J, Hong S-T, Hung W-Y, Kaplan J, McKenna-Yasek D, Rimmler BJ, Sapp P, Saunders MA and others. 1998. Lack of association between apolipoprotein E genotype and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* 1:213-216.
- So, W. Y. and Leung, P. S. (2016), Fibroblast Growth Factor 21 As an Emerging Therapeutic Target for Type 2 Diabetes Mellitus. *Med. Res. Rev.*, **36**: 672-704.
- Song, W., Song, Y., Kincaid, B., Bossy, B., and Bossy-Wetzel, E. (2013). Mutant SOD1G93A triggers mitochondrial fragmentation in spinal cord motor neurons: neuroprotection by SIRT3 and PGC-1 α . *Neurobiol. Dis.* 51, 72–81.

- Sözeri, O., Vollmer, K., Liyanage, M., Frith, D., Kour, G., Mark, G.E., and Stabel, S. (1992). Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* 7, 2259–2262.
- Sreedharan, J., I. P. Blair, V. B. Tripathi, X. Hu, C. Vance, B. Rogelj, S. Ackerley, J. C. Durnall, K. L. Williams, E. Buratti, F. Baralle, J. de Bellerocche, J. D. Mitchell, P. N. Leigh, A. Al-Chalabi, C. C. Miller, G. Nicholson and C. E. Shaw (2008). "TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Science* 319(5870): 1668-1672.
- Suomalainen A, Elo JM, Pietiläinen KH, Hakonen AH, Sevastianova K, Korpela M, Isohanni P, Marjavaara SK, Tyni T, Kiuru-Enari S, Pihko H, Darin N, Öunap K, Kluijtmans LA, Paetau A, Buzkova J, Bindoff LA, Annunen-Rasila J, Uusimaa J, Rissanen A, Yki-Järvinen H, Hirano M, Tulinius M, Smeitink J, Tyynismaa H. (2011) FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol.* 10(9):806-18.
- Sutedja NA, Fischer K, Veldink JH, van der Heijden GJMG, Kromhout H, Heederik D, Huisman MHB, Wokke JJH, van den Berg LH. (2009). What we truly know about occupation as a risk factor for ALS: A critical and systematic review. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10:295-301.
- Su XW, Simmons Z, Mitchell RM, Kong L, Stephens HE, Connor JR. (2013) Biomarker-based predictive models for prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol.* 70(12):1505-11
- Tan W, Pasinelli P, Trotti D. 2014. Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et biophysica acta* 1842 : 1295-1301.
- Ticozzi N, LeClerc AL, Keagle PJ, Glass JD, Wills AM, van Blitterswijk M, Bosco DA, Rodriguez-Leyva I, Gellera C, Ratti A and others. (2010). Paraoxonase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 68:102-7.
- Turner MR, Bowser R, Bruijn L, Dupuis L, Ludolph A, McGrath M, Manfredi G, Maragakis N, Miller RG, Pullman SL and others. (2013a). Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14 Suppl 1:19-32.
- Valdmanis, P. N., H. Daoud, P. A. Dion and G. A. Rouleau (2009). "Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis." *Curr Neurol Neurosci Rep* 9(3): 198-205.
- Valentine, J. S., P. A. Doucette and S. Zittin Potter (2005). "Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis." *Annu Rev Biochem* 74: 563-593.
- van Blitterswijk, M., M. A. van Es, E. A. Hennekam, D. Dooijes, W. van Rheenen, J. Medic, P. R. Bourque, H. J. Schelhaas, A. J. van der Kooi, M. de Visser, P. I. de Bakker, J. H. Veldink and L. H. van den Berg (2012). "Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis." *Hum Mol Genet* 21(17): 3776-3784.
- Van Damme P, Robberecht W. (2009). Recent advances in motor neuron disease. *Curr Opin Neurol* 22:486-92.
- van Es MA, Schelhaas HJ, van Vught PWJ, Ticozzi N, Andersen PM, Groen EJM, Schulte C, Blauw HM, Koppers M, Diekstra FP and others. (2011). Angiogenin variants in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 70:964-973.
- Vance, C., B. Rogelj, T. Hortobagyi, K. J. De Vos, A. L. Nishimura, J. Sreedharan, X. Hu, B. Smith, D. Ruddy, P. Wright, J. Ganesalingam, K. L. Williams, V. Tripathi, S. Al-Saraj, A. AlChalabi, P. N. Leigh, I. P. Blair, G. Nicholson, J. de Bellerocche, J. M. Gallo, C. C.

- Miller and C. E. Shaw (2009). "Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6." *Science* 323(5918): 1208-1211.
- Vargas MR, Johnson JA. (2010). Astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics* 7:471-81.
- Veyrat-Durebex C, Corcia P, Dangoumau A, Laumonnier F, Piver E, Gordon PH, Andres CR, Vourc'h P, Blasco H. (2014). Advances in cellular models to explore the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol* 49:966-83.
- Vinceti M, Bonvicini F, Rothman KJ, Vescovi L, Wang F. (2010). The relation between amyotrophic lateral sclerosis and inorganic selenium in drinking water: a population-based case-control study. *Environ Health* 9:77.
- Wang, H., E. J. O'Reilly, M. G. Weisskopf, G. Logroscino, M. L. McCullough, M. J. Thun, A. Schatzkin, L. N. Kolonel and A. Ascherio (2011a). "Smoking and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a pooled analysis of 5 prospective cohorts." *Arch Neurol* 68(2): 207-213.
- Wang, Wen-Fei, Si-Ming Li, Gui-Ping Ren, Wei Zheng, Yu-Jia Lu, Yin-Hang Yu, et al. (2014). Recombinant murine fibroblast growth factor 21 ameliorates obesity-related inflammation in monosodium glutamate-induced obesity rats. *Endocrine*.
- Watanabe, M., M. Dykes-Hoberg, V. C. Culotta, D. L. Price, P. C. Wong and J. D. Rothstein (2001). "Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues." *Neurobiol Dis* 8(6): 933-941.
- Wesche, J., Haglund, K., and Haugsten, E.M. (2011). Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* 437, 199–213.
- 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* 80:616-25.
- Wooley, C.M., Sher, R.B., Kale, A., Frankel, W.N., Cox, G.A., and Seburn, K.L. (2005). Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve* 32: 43–50.
- Wu AL, Kolumam G, Stawicki S, Chen Y, Li J, Zavala-Solorio J, Phamluong K, Feng B, Li L, Marsters S, Kates L, van Bruggen N, Leabman M, Wong A, West D, Stern H, Luis E, Kim HS, Yansura D, Peterson AS, Filvaroff E, Wu Y, Sonoda J. (2011) Amelioration of type 2 diabetes by antibody-mediated activation of fibroblast growth factor receptor 1. *Sci Transl Med.* 3(113): 113-126.
- Wu, C. H., C. Fallini, N. Ticozzi, P. J. Keagle, P. C. Sapp, K. Piotrowska, P. Lowe, M. Koppers, D. McKenna-Yasek, D. M. Baron, J. E. Kost, P. Gonzalez-Perez, A. D. Fox, J. Adams, F. Taroni, C. Tiloca, A. L. Leclerc, S. C. Chafe, D. Mangroo, M. J. Moore, J. A. Zitzewitz, Z. S. Xu, L. H. van den Berg, J. D. Glass, G. Siciliano, E. T. Cirulli, D. B. Goldstein, F. Salachas, V. Meininger, W. Rossoll, A. Ratti, C. Gellera, D. A. Bosco, G. J. Bassell, V. Silani, V. E. Drory, R. H. Brown, Jr. and J. E. Landers (2012). "Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis." *Nature* 488(7412): 499-503.
- Xu, J., Lloyd, D. J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., Véniant, M. M. (2009). Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure, and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*, 58(1): 250–259.
- Zhang, Y., Liu, Z., Zhou, M., & Liu, C. (2018). Therapeutic effects of fibroblast growth factor-21 against atherosclerosis via the NF-κB pathway. *Molecular Medicine Reports*, 17(1), 1453–1460.

Zhou J, Yi J, Fu R, Liu E, Siddique T, Rios E, Deng HX. (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 : 705-12.

Vu, le Directeur de Thèse

**Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le**

Delaye Jean-Baptiste

Nombre de pages 71 – 7 tableaux – 17 figures

Résumé :

De nombreux mécanismes physiopathologiques ont été identifiés dans la SLA et une approche thérapeutique intéressante pourrait être l'utilisation de molécules ciblant plusieurs mécanismes physiopathologiques de manière concomitante. Dans ce cadre la voie du Fibroblast growth factor 21 (FGF21) liée à l'inflammation et au métabolisme énergétique pourrait être une cible thérapeutique potentielle.

Douze souris porteuses du gène muté SOD1*G93A ont été traitées en intrapéritonéal par le R1Mab1, un anticorps agoniste de la voie du FGF21. Des contrôles mutants et sauvages ont reçu aux mêmes doses du tampon phosphate ou du R1Mab1.

Nous avons observé que la perte de poids des souris TG traitées par le R1Mab1 est plus importante que chez les souris sauvages (S13 $p < 0,009$, S14 $p < 0,01$, S15 $p < 0,01$, S16 $p < 0,01$, S17 $p < 0,01$, S18 $p < 0,001$ S19 $p < 0,001$ et S20 $p < 0,001$). De plus, cette variation pondérale est plus marquée que chez les souris WT ($p < 0,01$). Les résultats de l'échographie montrent une augmentation significative du ratio surface musculaire sur poids chez les souris TG traitées vs TG non traitées ($p = 0,036$). Une amélioration significative des performances motrices évaluées par rotarod est présente à la 20^e semaine de vie chez les souris TG traitées vs TG non traitées ($p = 0,032$).

Le R1Mab1 a donc eu des effets inattendus dans le traitement de la forme murine de la SLA, en améliorant les performances au test du rotarod des souris traitées, malgré une perte pondérale importante normalement de mauvais pronostique.

Mots clés : Sclérose latérale amyotrophique, FGF21, métabolisme, inflammation, souris SOD1*G93A

Jury :

Président du Jury : Professeur Christian ANDRES

Directeur de thèse : Professeur Helene BLASCO

Membres du Jury : Professeur Philippe CORCIA

Docteur Diane DUFOUR

Professeur Patrick EMOND

Professeur François MAILLOT

Date de soutenance : 8 octobre 2018