

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Caractérisation et implication de l'AMP-activated kinase (AMPK) dans la sclérose latérale amyotrophique familiale (SLA)

GENARD, Géraldine

Award date:
2013

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences



Caractérisation et implication de l'AMP-activated kinase (AMPK) dans la sclérose latérale amyotrophique familiale (SLA)

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Géraldine GENARD

Co-promoteurs: Olivier Debacker et Emmanuel Hermans

Encadrant : Anthony Sternotte

2012 - 2013



Remerciement

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur Emmanuel Hermans, qui, en tant que promoteur, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire. Je le remercie également pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à Anthony Sternotte, qui m'a encadré et soutenu tout au long de mon mémoire. Je le remercie pour sa disponibilité, sa générosité et la grande patience dont il a su faire preuve envers moi.

J'exprime ma gratitude envers les doctorants Sabrina, Amélie, Morgane et Maxime ainsi qu'envers les Docteurs Stéphanie, Barbara et Ronald pour leur écoute et les réponses qu'ils ont fourni à mes nombreuses questions. Je remercie également les techniciens de laboratoire, Rick et Nathalie, pour leur aide précieuse et leurs explications.

Je n'oublie pas les étudiants Marion, Pierre et Lina Amandine, Caroline, Andrea, Jonathan et Isaline pour leur écoute, leur encouragement et leur bonne humeur.

Par ailleurs, je suis extrêmement reconnaissant envers mes parents et ma sœur pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers Mme Morlot qui a eu la gentillesse de lire et corriger ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches, Emilie et amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au fil de ce mémoire.

Enfin, je remercie tout particulièrement Mathieu pour le soutien qu'il m'a apporté tout au long de ce mémoire et pour ses encouragements dans les moments les plus difficiles.

Sommaire

ABRÉVIATIONS	5
RÉSUMÉ	7
I. INTRODUCTION	9
1. <i>La sclérose latérale amyotrophique</i>	10
1.1. Généralités	10
1.1.1. Épidémiologie	11
1.1.2. Caractéristiques cliniques.....	11
1.1.3. Étiologie	11
1.1.4. Facteurs génétiques	12
1.2. Modèles animaux	13
1.3. Motoneurons et cellules gliales et leur implication dans la SLA	14
1.3.1. Les motoneurons.....	14
1.3.2. Les cellules gliales.....	14
1.3.2.1. Les astrocytes	15
1.3.2.2. La microglie.....	18
1.3.3. Implication de ces cellules dans la SLA	18
1.3.4. Excitotoxicité.....	19
1.3.5. Neuroinflammation.....	20
1.3.5.1. La microglie.....	21
1.3.5.2. Les astrocytes	21
1.4. Toxicité causée par l'accumulation de la SOD1 mutée	22
1.4.1. Agrégation protéique	22
1.4.2. Dysfonctionnement mitochondrial	23
1.4.3. Stress oxydatif	25
1.4.4. Stress du réticulum endoplasmique	25
1.4.5. Dysfonctionnement du protéasome	26
1.4.6. Déficit du transport axonal	26
2. <i>L'AMP-activated protein (AMPK)</i>	27
2.1. Introduction	27
2.2. Généralités	27
2.3. Structure de l'AMPK	28
2.3.1. La sous-unité α	28
2.3.2. La sous-unité β	29
2.3.3. La sous-unité γ	29
2.4. Fonctionnement de l'AMPK	30
2.4.1. Les AMPK kinases	30
2.5. Activation pharmacologique de l'AMPK	31
2.6. Localisation de l'AMPK	32
2.7. AMPK et inflammation.....	33
II. OBJECTIFS	35
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES	37
1. <i>Animaux utilisés</i>	38
2. <i>Comportement</i>	39
2.1. La mesure du gripstrength.....	39
2.2. Openfield.....	40
2.3. Catwalk	41
3. <i>Mise en culture d'astrocytes et activation</i>	42
3.1. Dissection.....	42
3.2. Changement du milieu	43
3.3. Trypsinisation.....	44
3.4. Activation des cellules	44
4. <i>Prélèvement de tissus</i>	44

5.	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT PCR)</i>	45
5.1.	Extraction d'ARN	45
5.2.	Traitement des échantillons à la DNase et Reverse Transcription.....	46
5.3.	Quantification d'ADNc	46
6.	<i>Western Blot</i>	47
6.1.	Extraction des protéines	47
6.2.	Migration des protéines	47
6.3.	Transfert des protéines sur membrane PVDF.....	48
6.4.	Exposition aux anticorps et révélation.....	48
7.	<i>Analyse de l'activité de l'AMPK totale</i>	49
7.1.	Extraction des protéines	49
7.2.	Mesure de l'activité de l'AMPK au P32	49
8.	<i>Analyse statistique</i>	50
IV.	RÉSULTATS	51
1.	<i>Caractérisation de l'AMPK dans les astrocytes exposés ou non à divers médiateurs</i>	52
1.1.	Pureté des cultures primaires d'astrocytes corticaux	52
1.2.	Analyse de l'expression du gène codant pour l'AMPK α 2 dans les astrocytes soumis à l'influence de divers médiateurs	53
1.3.	Analyse de l'expression protéique de l'AMPK dans les astrocytes soumis à l'influence de divers médiateurs	55
1.4.	Activité de l'AMPK dans les astrocytes soumis à l'influence de divers médiateurs	57
1.5.	Limites de l'utilisation des cultures d'astrocytes.....	58
2.	<i>Caractérisation de l'AMPK dans le système nerveux central</i>	59
2.1.	Analyse de l'expression du gène codant pour l'AMPK dans différents tissus nerveux.....	60
2.2.	Analyse de l'expression protéique de l'AMPK dans différents tissus nerveux	61
3.	<i>Conséquences de la suppression de l'AMPK sur l'activité motrice chez les souris SLA</i>	66
3.1.	Comparaison de l'évolution du poids des souris hSOD1 ^{G93A} AMPK α 2 ^{-/-} aux souris hSOD1 ^{G93A}	66
3.2.	Comparaison du début des symptômes des souris hSOD1 ^{G93A} AMPK α 2 ^{-/-} face aux souris hSOD1 ^{G93A} par l'analyse de la force musculaire des pattes postérieures.....	67
3.3.	Étude et comparaison de la mobilité des souris WT, hSOD1 ^{G93A} et hSOD1 ^{G93A} AMPK α 2 ^{-/-}	68
3.4.	Étude de la démarche des souris wild-type, SLA et double transgénique	72
V.	DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES	80
1.	<i>Généralités</i>	81
2.	<i>Compensation de l'activité de l'AMPK par la modulation de l'expression</i>	81
2.1.	Controverse de l'effet neuroprotecteur de l'activation de l'AMPK.....	81
2.2.	Implication de la suractivation de l'AMPK dans la SLA	82
3.	<i>Impact de la délétion de l'AMPK dans le modèle de souris de SLA familiale</i>	84
4.	<i>Conclusion générale</i>	85
	BIBLIOGRAPHIE	87

Abréviations

- **ACC** : Acétyl-CoA Carboxylase
- **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- **ADnc** : Acide DésoxiriboNucléique complémentaire
- **ADP** : Adenosine DiPhosphate
- **AICAR** : 5'-AminoImidazole-4-Carboxamide Ribonucléotide
- **AMP** : Adenosine MonoPhosphate
- **AMPA** : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
- **AMPK** : AMP-activated Kinase
- **ANLS** : Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle
- **ARN** : Acide RiboNucléique
- **ATP** : Adenosine TriPhosphate
- **BOS** : Base of Support
- **CaMKK β** : Ca²⁺/ Calmodulin-dependent protein Kinase Kinase β
- **CCL** : Chimiokine
- **CXCL** : Chémokine
- **EAAT** : Excitatory Amino Acid Transporter
- **FBS** : Fœtal Bovine Serum
- **FUS** : Fused in Sarcoma
- **G5** : Cocktail de facteur de croissance
- **GBR** : Glycogen-Binding Region
- **GLAST** : Glutamate Aspartate Transporter
- **GLT1** : Glutamate Transporter 1
- **GSH** : Glutathion
- **HMG CoA R** : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase
- **hSOD1^{MT}** : SuperOxyde Dismutase 1 humaine mutée
- **hSOD1^{G93A}** : hSOD1 mutée en position 93 (Glycine \rightarrow aniline)
- **hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-}** : hSOD1^{G93A} knockout pour l'AMPK α 2
- **IL** : Interleukine
- **INF** : Interféron
- **LKB1** : Liver kinase β 1
- **mGluRs** : récepteurs métabotropiques du glutamate
- **NGF** : Nerve Growth Factor

- **NMDA** : N-méthyl-D-aspartate
- **NO** : oxyde nitrique
- **PGK** : phosphoglycérate kinase
- **RE** : Réticulum Endoplasmique
- **ROS** : Reactive Oxygen Species
- **SLA** : Sclérose Latérale Amyotrophique
- **SNC** : Système Nerveux Central
- **SOD1** : SuperOxyde Dismutase 1
- **SOD2** : SuperOxyde Dismutase 2
- **TAK1** : Transforming Growth Factor
- **TDB43** : TAR DNA Binding 43
- **TNF α** : Tumor Necrosis Factor α
- **UPS** : Système Protéasome Ubiquitine
- **WT** : Wild-Type

Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une pathologie de l'adulte caractérisée par la perte sélective des motoneurons du cortex et de la moelle épinière, résultant en une paralysie progressive suivie de la mort des patients en 3 à 5 ans. Il faut savoir que les astrocytes prennent part de manière importante à la dégénérescence des motoneurons dû à l'altération de l'ensemble de leurs fonctions. Dans la plupart des cas hérédités, la maladie est causée par la présence de mutations ponctuelles dans le gène codant pour la superoxyde dismutase 1 (SOD1) menant à l'agrégation de l'enzyme. La SLA peut effectivement être modélisée dans les rongeurs par la surexpression du mutant SOD1 humain en position 93 (hSOD1^{G93A}). La mutation de cette enzyme entraîne, entre autres, son accumulation dans la mitochondrie. Ce phénomène cause un dysfonctionnement mitochondrial et des altérations métaboliques, caractérisés par la perte du potentiel de membrane mitochondrial entraînant dès lors le déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale. Néanmoins, le lien entre ces altérations métaboliques et la neurodégénération n'a pas encore pu être élucidé.

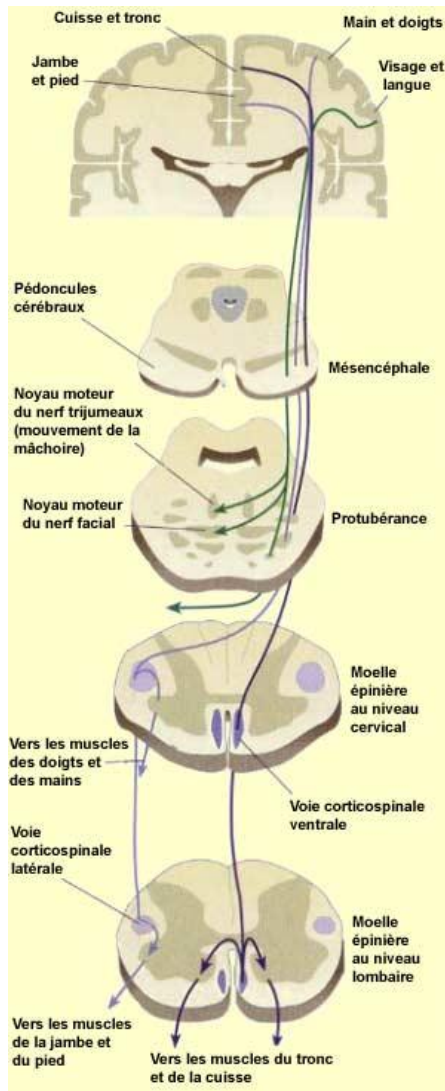
Au vu des altérations mitochondriales et métaboliques observées dans le contexte de la SLA, l'AMP-activated protein kinase (AMPK), une enzyme clef du métabolisme, semble être une cible potentielle. L'AMPK est un senseur énergétique ayant pour fonction le maintien de l'homéostasie énergétique au sein des cellules de l'organisme.

Afin de déterminer l'implication de l'AMPK dans la SLA, deux approches différentes ont été utilisées : la première vise à caractériser l'expression génique et protéique ainsi que l'activité de l'AMPK dans les astrocytes et le système nerveux central (SNC) issus de rats wild-type (WT) et hSOD1^{G93A}, la seconde approche consiste en l'inactivation de l'AMPK dans le modèle de souris hSOD1^{G93A} afin d'en analyser les répercussions sur le comportement moteur. Il semble que l'inactivation de l'AMPK soit protectrice pour les souris hSOD1^{G93A} puisqu'elle retarde l'apparition de la paralysie. Les résultats *in vitro* suggèrent également l'effet délétère de la suractivation de l'AMPK dans les animaux hSOD1^{G93A}.

I. Introduction

1. La sclérose latérale amyotrophique

1.1. Généralités



La sclérose amyotrophique latérale (SLA) fut initialement connue sous le nom de maladie de Charcot suite à la description qu'a posée le neurologue Jean Martin Charcot de l'ensemble des maladies touchant les nerfs sensitifs et moteurs en 1868. Aux Etats-Unis, son appellation se fera plutôt sous le nom de maladie de Lou Gehrig, du nom du joueur de baseball renommé, décédé en 1941 de cette pathologie. Enfin, l'appellation « sclérose amyotrophique latérale » désigne quant à elle la pâleur de la portion latérale de la moelle épinière. Cette pâleur traduit une dégénérescence et une perte des motoneurones dits « supérieurs » et « inférieurs », suivie du remplacement de ces cellules par du tissu conjonctif, une étape finale d'un processus d'inflammation chronique. Rappelons que les corps cellulaires des motoneurones supérieurs sont situés au niveau du cortex cérébral et du tronc cérébral alors que ceux des motoneurones dits inférieurs sont quant à eux localisés dans la corne antérieure de la moelle épinière. Les motoneurones inférieurs sont sous le contrôle des motoneurones supérieurs. Le terme « sclérose latérale amyotrophique » fait également référence à la voie efférente du cortex moteur et plus précisément la voie corticospinale latérale qui contient les motoneurones innervant les muscles des extrémités des membres (voir figure 1). Dès lors, la perte progressive des motoneurones regroupés dans la voie corticospinale latérale a pour conséquence directe une atrophie des tissus musculaires qui y sont associés.

Figure 1 : Les neurones pyramidaux ont pour cible les motoneurones, qui sont situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière. « On distingue deux voies pyramidales descendantes qui prennent en charge les mouvements volontaires. La voie corticobulbaire rejoint les motoneurones situés dans les noyaux du tronc cérébral. Ceux-ci stimulent les muscles du visage, de la mâchoire, de la langue et du pharynx par l'entremise des nerfs crâniens. L'autre voie, appelée corticospinale, stimule quant à elle les motoneurones responsables du mouvement des membres et qui sont situés dans la moelle épinière. La voie corticospinale emprunte deux trajets différents pour descendre dans la moelle épinière. L'une des deux voies est appelée système latéral et contient les axones des neurones corticaux qui sont responsables des muscles des extrémités des membres. Les fibres de ce faisceau passent sur la surface ventrale du tronc cérébral pour former deux renflements qu'on appelle les pyramides. Ensuite, à la jonction entre la médula et la moelle, les fibres de cette voie latérale croisent la ligne médiane pour continuer leur descente dans la moelle épinière du côté opposé. » ⁽¹⁾

1.1.1. Épidémiologie

La SLA est une maladie très peu fréquente puisque son taux d'incidence varie de 0.35 à 2.5 cas sur 100 000 par an et que sa prévalence est de 5 à 7 cas sur 100 000. En général, cette pathologie se déclare entre 40 et 60 ans et l'espérance de vie après diagnostic se situe entre 3 et 5 ans. Dans 90% des cas, la SLA est dite sporadique, c'est-à-dire sans composante génétique connue alors qu'elle est héritée dans 10% des cas, on parle alors de SLA familiale. Malgré que les symptômes soient similaires entre les deux formes de SLA, la forme familiale se déclare généralement quelques années plus tôt que la forme sporadique ^(2,3).

1.1.2. Caractéristiques cliniques

On distingue deux grands types de SLA qu'elle soit sporadique ou familiale : la forme spinale et la forme bulbaire. La forme spinale est la forme qui touche les motoneurones innervant les muscles des membres supérieurs et inférieurs. Elle est caractérisée par une faiblesse progressive des muscles, des fasciculations, une spasticité et une atrophie musculaire. Les fasciculations se définissent comme la contraction involontaire et isolée d'un groupe de fibres musculaires dépendant d'un même motoneurone alors que la spasticité indique la contraction d'un muscle au repos. Dans la forme spinale, on reconnaît les formes cervicales des formes lombaires. Les premières touchent de prime abord les membres supérieurs alors que les formes lombaires portent atteinte, avant tout, aux membres inférieurs. Dans les formes bulbaires, touchant les motoneurones de l'aire bulbaire, on remarque une difficulté à la déglutition et à la mobilisation des muscles de la face et de la langue. Il faut savoir que les formes spinales sont plus rencontrées que les formes bulbaires. Outre ces différences, la dénervation des muscles respiratoires et du diaphragme est généralement l'événement conduisant aux décès des patients ^(2,3).

1.1.3. Étiologie

Les facteurs de risque concernant la SLA sporadique sont principalement des facteurs environnementaux tels que l'exposition aux armes chimiques, la cigarette et bien d'autres. Par ailleurs, il existe également une influence du sexe puisque les hommes seraient plus fréquemment atteints que les femmes (20% en plus) ⁽³⁾. En effet, certains pensent que cela serait dû à l'action d'hormones masculines dont l'effet serait aggravant pour les cas de SLA sporadique. Néanmoins, ceci peut tout de même être discuté puisqu'une étude a montré que la testostérone améliore les fonctions motrices des patients SLA (Yoo and Ko, 2012). D'autres chercheurs avancent plutôt un lien avec la nature de la profession ou de l'activité physique des hommes. Enfin, des études ont été réalisées sur la ménopause des femmes atteintes de SLA montrant qu'une exposition aux oestrogènes était favorable et protectrice face à la

dégénérescence des motoneurones. Effectivement, au plus la ménopause est postposée, au plus la survie des patientes est allongée (de Jong et al., 2012). Par ailleurs, une étude sur des souris SLA a également montré que la maladie se déclarait plus tôt chez ces souris lorsque celles-ci avaient subi une ovariectomie. Par contre, les souris SLA ayant subi une ovariectomie et traitées par un complément d'oestrogènes déclarent également la maladie plus tôt mais sa progression est ralentie (Choi et al., 2008).

1.1.4. Facteurs génétiques

Comme signalé précédemment, la SLA est causée dans 10% des cas par des mutations génétiques qui sont héritées de manière dominante ou récessive, ou qui sont liées au chromosome X. La plupart des recherches effectuées dans le domaine de la SLA se focalisent sur plus d'une centaine de mutations, environ 170⁽⁴⁾, retrouvées dans le gène codant pour la superoxyde dismutase 1 (SOD1), situé sur le chromosome 21. La SOD catalyse la dismutation du superoxyde (O_2^-), produit toxique de la respiration cellulaire, en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Les dismutases se distinguent par le métal qu'elles présentent au sein de leur site actif et également par leur localisation. Ainsi, chaque sous-unité de la SOD1, une enzyme dimérique, contient dans son site actif un atome de cuivre et de zinc alors que les sous-unités de la SOD2, une enzyme tétramérique, comportent quant à elles un atome de manganèse.

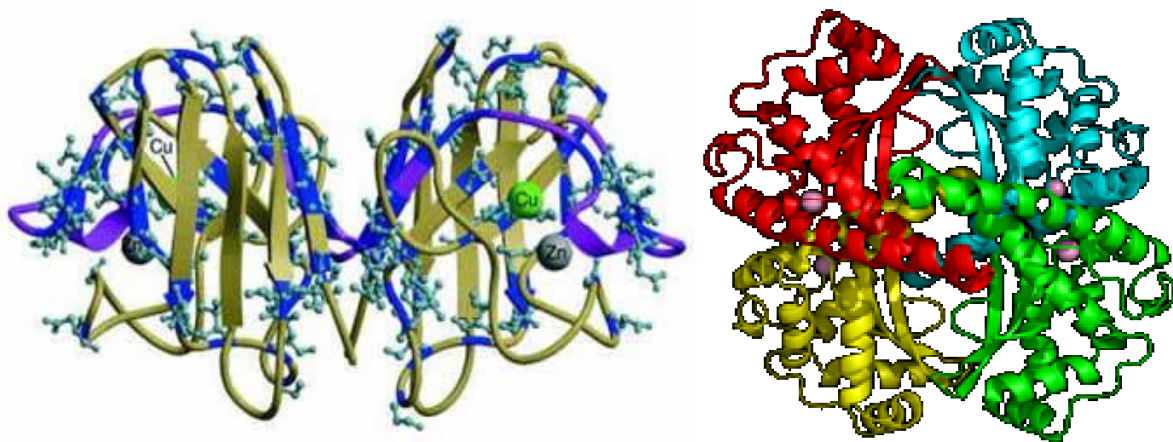


Figure 2 : Représentation de la Cu/ZnSOD1 (à gauche)⁽⁵⁾ et de la MnSOD2 (à droite)⁽⁶⁾.

Dans la plupart des cas, les mutations associées à la Cu/Zn SOD1 n'induisent pas une perte de fonction de la protéine mais provoquent un changement de conformation. Ce changement de conformation conduit à l'agrégation de l'enzyme et mène à un gain de fonction. Par ailleurs, pour la plupart des mutations de la SOD1 retrouvées dans la SLA, la fonction de la SOD1 ne serait pas diminuée mais bien augmentée (Ferraiuolo et al., 2011b). Alors que la surexpression de la SOD1 humaine mutée (hSOD1^{MT}) chez la souris conduit à la dégénérescence des motoneurones et par conséquent au phénotype SLA, des chercheurs ont montré que la suppression du gène codant pour la SOD1 non mutée permettait un développement normal chez les souris et n'entraînait pas de dégénérescence des motoneurones. Ceci démontre donc que ce n'est pas la perte de fonction qui est responsable

de la maladie mais que c'est bien l'agrégation de la SOD1^{MT}, due aux changements de conformation qu'elle subit, qui est la cause des divers phénomènes retrouvés dans la SLA. Par ailleurs, il est important de noter que les mutations de la SOD1 peuvent être retrouvées en dehors du site catalytique de l'enzyme. (Ferraiuolo et al., 2011d) De fait, que les animaux possèdent des mutations pour les formes actives ou inactives de la SOD1, ils développent la maladie de façon similaire à ce que l'on retrouve chez les patients atteints de SLA.

D'autres protéines font également l'objet d'importantes recherches dans le cadre de la SLA, telles que la protéine TAR DNA Binding 43 (TDB43), impliquée dans la régulation transcriptionnelle et l'épissage, et la protéine de liaison à l'ARN Fused in Sarcoma (FUS) jouant un rôle dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle.

1.2. Modèles animaux

Plusieurs modèles transgéniques ont été générés pour étudier la SLA et ceux-ci se distinguent par le début des symptômes et la progression de la maladie. Afin de réaliser notre étude, nous avons choisi l'un des modèles les plus utilisés et les plus étudiés qui surexprime la SOD1 humaine, mutée de façon ponctuelle, à savoir hSOD1^{G93A}, consistant en le remplacement d'une glycine par une alanine en position 93 (Rothstein, 2009b) ; (Gerber et al., 2012b).

Tous les modèles surexprimant la hSOD1^{MT} présentent une dégénérescence des motoneurons dans la corne ventrale de la moelle épinière, tel que dans la pathologie humaine. Cette dégénérescence conduit généralement à l'atrophie musculaire et la paralysie des extrémités, inférieures puis supérieures. Néanmoins, la dégénérescence des motoneurons supérieurs avant celles des motoneurons inférieurs peut être observée dans certains modèles de la SLA (SOD1^{G93A}, SOD1^{G85R} et SOD1^{G37R}) (Bruijn et al., 1998a; Ozdinler et al., 2011). Ainsi, tous les modèles impliquant une surexpression de la hSOD1^{MT} montrent les mêmes caractéristiques histopathologiques que celles retrouvées chez les patients atteints de SLA, c'est-à-dire une agrégation de SOD1 avec d'autres protéines ou organites, une dégénérescence des motoneurons et une gliose, c'est-à-dire l'activation des astrocytes et de la microglie (Boillee et al., 2006).

Les souris surexprimant la hSOD1^{G93A} développent la maladie après trois à quatre mois et meurent environ trois semaines après le début des symptômes (Gurney et al., 1994). Cependant, le nombre de copies du transgène dans ce modèle a une grande importance et doit avoisiner les 28 copies. Au cours des croisements, il est possible que des copies se perdent suite à des réarrangements chromosomiques durant la méiose et cette diminution du nombre de copies est associée avec une augmentation de la durée de vie, un début des symptômes postposés et une progression plus lente (Alexander et al., 2004).

1.3. Motoneurones et cellules gliales et leur implication dans la SLA

Le système nerveux se compose de plusieurs types cellulaires comprenant notamment les neurones, assurant la transmission de l'information, et les cellules gliales, associées à une fonction de soutien ainsi qu'à toute une série de fonctions annexes, importantes pour la survie des neurones. Chez l'homme, les cellules gliales sont davantage représentées dans le cerveau que les neurones (Azevedo et al., 2009) mais la diversité des neurones est beaucoup plus importante puisqu'ils sont classés en différents types selon leur localisation, leur fonction et leur morphologie.

Dans le cadre de la SLA, seul un type particulier de neurones est touché, il s'agit des motoneurones. Malgré tout, les motoneurones ne sont pas les seules cellules impliquées dans cette pathologie. En effet, les cellules gliales se sont révélées aussi importantes dans le cadre de la maladie (Shi et al., 2010a; Julien, 2007a).

1.3.1. Les motoneurones

Les motoneurones sont les neurones du système nerveux central (SNC) projetant leurs prolongements dans le système nerveux périphériques pour établir le contrôle des fibres musculaires. Ces neurones réalisent une jonction avec les fibres musculaires afin de faire mouvoir l'organisme. On distingue deux voies principales au cortex moteur, la première est la voie centro-médiane permettant un contrôle postural et certains réflexes, et la deuxième est la voie latérale qui contrôle les mouvements volontaires à proprement dits ⁽¹⁾. Comme signalé précédemment, les motoneurones supérieurs, c'est-à-dire ceux dont le corps cellulaire se situe dans le cortex moteurs, sont relayés, au niveau de la moelle épinière, par les motoneurones inférieurs, autrement dit les motoneurones innervant les muscles. Ces deux types de motoneurones communiquent entre eux par la libération de glutamate dans la fente synaptique. Ce neurotransmetteur excitateur, est le plus utilisé dans SNC puisqu'environ 50% des synapses excitatrices du système nerveux sont glutamatergiques.

1.3.2. Les cellules gliales

Les cellules gliales ont longtemps été considérées comme des cellules dont la seule fonction était de fournir un support physique aux neurones. Pourtant depuis plusieurs décennies, les fonctions astrocytaires et microgliales se sont révélées être d'une importance capitale pour les neurones.

1.3.2.1. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses du SNC puisqu'elles représentent près de la moitié du volume d'un cerveau humain (Chen and Swanson 2003). Ces cellules possèdent un corps cellulaire irrégulièrement entouré par de fins prolongements, telles des étoiles, qui se placent entre les neurones pré- et post-synaptiques pour participer aux synapses. Ils entrent également en contact avec la paroi des vaisseaux sanguins pour participer à l'établissement de ce que l'on appelle la barrière hémato-encéphalique. En effet, en contact étroit avec les cellules sanguines, les astrocytes peuvent puiser les éléments nutritifs nécessaires dans le sang tout en protégeant l'ensemble du cerveau des pathogènes et agents toxiques circulant dans le sang. Ainsi, on distingue les astrocytes de type I, en contact avec les cellules sanguines, des astrocytes de type II participant à la synapse.

Afin de transmettre l'information, les neurones et astrocytes vont former ce que l'on appelle une synapse tripartite. Le neurone présynaptique propage un potentiel d'action via une dépolarisation de la membrane axonale et lorsque cette dépolarisation atteint la terminaison axonale, elle déclenche la sécrétion de neurotransmetteurs. Ceux-ci sont alors libérés dans la fente synaptique, formée par le neurone pré-synaptique, le neurone post-synaptique et l'astrocyte. Le rôle de l'astrocyte est de contribuer à l'élimination des neurotransmetteurs libérés dans la synapse dont l'action prolongée pourrait être néfaste pour ces neurones, tel est le cas du glutamate. Pour ce faire, les astrocytes possèdent beaucoup de récepteurs, identiques à ceux des neurones, qui seront activés au même moment que ceux situés sur les neurones. Une fois activés, ces récepteurs permettent l'activation des transporteurs astrocytaires du glutamate et par conséquent la recapture de celui-ci.

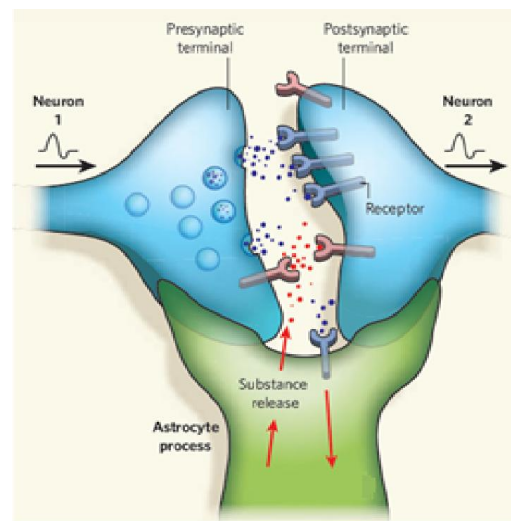


Figure 3 : Les astrocytes expriment beaucoup de récepteurs qui sont identiques à ceux que l'on retrouve sur les neurones. Lorsque le neurotransmetteur est libéré par le neurone présynaptique dans la fente synaptique, les récepteurs situés sur le neurone post-synaptique et l'astrocyte sont activés. Dans l'astrocyte, cette activation conduit, pour certains récepteurs, à l'augmentation de la concentration en ions calciques et à la libération de diverses substances actives ⁽⁷⁾.

Par la suite, une série de substances sont sécrétées dans la fente synaptique et peuvent, à leur tour, inhiber l'activité neuronale. En outre, les astrocytes libèrent des protéines qui participent à la cohésion de la synapse et régulent également la fonction pré-synaptique et la réponse post-synaptique. Par conséquent, les astrocytes participent à la régulation de la transmission synaptique et répondent à son activité. Un même astrocyte peut participer à des dizaines de milliers de synapses et contrôler ainsi une multitude d'informations transmises et ce, en même temps (Bushong et al., 2002).

Contrairement aux cellules microgliales et aux oligodendrocytes, dont les fonctions sont reconnues comme spécifiques, les astrocytes possèdent de multiples rôles qui ne se limitent pas seulement à la cohésion et à l'interaction avec les neurones (Chen and Swanson 2003). En effet, les astrocytes peuvent réguler localement l'homéostasie ionique et du pH, afin de préserver les conditions optimales pour la transmission synaptique. En plus du soutien physique et de leur implication dans la synapse, ils assurent un rôle de soutien métabolique en maintenant l'approvisionnement en glucose et en substrats nécessaires aux neurones, tels que les facteurs de croissance (neurotropines, nerve growth factor (NGF), Transforming Growth Factor β (TGF β),...), le lactate, la cystine,... De cette manière, ils régulent et optimisent l'environnement des neurones. En outre, ces cellules permettent aussi l'élimination des déchets du métabolisme ainsi que celle des neurotransmetteurs s'accumulant dans les synapses. En effet, alors que l'acétylcholine est dégradée dans la synapse par l'acétylcholinestérase, le glutamate doit quant à lui être éliminé de la synapse par les astrocytes pour éviter une suractivation des motoneurones. Mais encore, les astrocytes sont impliqués dans le développement du système nerveux puisqu'ils guident la migration neuronale et promeuvent l'expansion du réseau synaptique (Helmuth, 2001). Enfin, les astrocytes régulent l'activité électrique du cerveau, assurent une communication intercellulaire via les jonctions gap (Bennett et al., 2003) et permettent l'activité synaptique ainsi que les seuils et la plasticité neuronale (Swanson and Chen 2003).

Comme indiqué ci-dessus, les astrocytes sont les principaux fournisseurs de substrats aux motoneurones. En effet, l'hypothèse de l'astrocyte – neuron lactate shuttle (ANLS) présente le lactate, produit par les astrocytes, comme une source énergétique importante et captée par les neurones. Ce lactate est alors directement utilisé par les mitochondries motoneuronales après sa transformation en pyruvate. Par ailleurs, il a été montré qu'en cas d'activation, les motoneurones voient l'expression de leur récepteur au glucose diminuée afin d'utiliser le lactate comme source énergétique (Costalat et al., 2006).

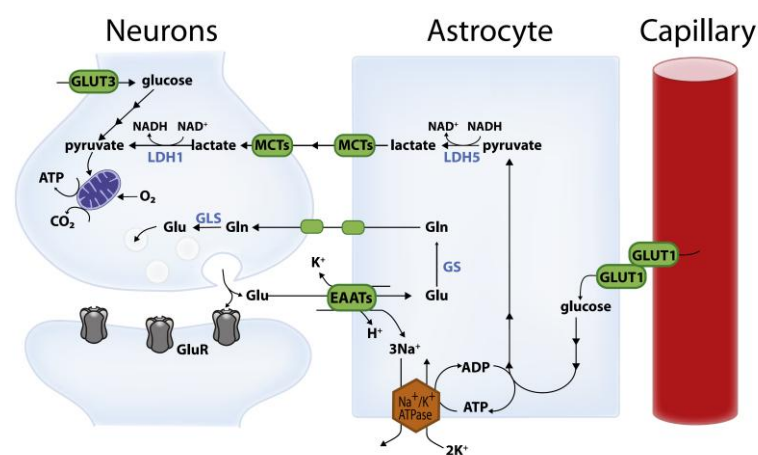


Figure 4 : Représentation schématique de l'astrocyte – neuron lactate shuttle (ANLS): le glutamate (Glu) est relargué dans la synapse par le neurone pré-synaptique et peut ainsi stimuler les récepteurs glutamatergiques. Une grande proportion du glutamate libéré dans la synapse est captée par les transporteurs du glutamate situés sur le neurone post-synaptique et l'astrocyte et dont le fonctionnement nécessite le transport d'ions sodiques. Ces ions sodiques sont extraits de la cellule par une pompe Na⁺/K⁺ATPase consommant de l'ATP. D'autre part, dans l'astrocyte, le glucose sanguin est transformé en pyruvate puis en lactate, une substance qui sera fournie aux neurones. Ainsi, une fois dans le neurone, le lactate est converti en pyruvate et est alors utilisé pour la phosphorylation oxydative. En parallèle, une

partie du glutamate est transformée en glutamine et redistribuée aux neurones. Ces derniers convertissent alors la glutamine en glutamate, ce qui requiert moins d'énergie que la synthèse *de novo* du glutamate. (GLUT = Glutamate transporter ; EAATs = excitatory amino acid transporters ; Glu = glutamate ; Gln = glutamine, LDH = lactate déshydrogénase ; MTCs = monocarboxylate transporters ; GluR = Glutamate receptor ; GS = glutamine synthase ; GLS = glutaminases)

(Belanger et al., 2011)

Chez les patients SLA et les modèles animaux qui y sont associés, les chercheurs ont mis en évidence une diminution de la transcription des gènes astrocytaires impliqués dans la voie du lactate, tels que la pompe Na^+/K^+ ATPase et la phosphoglycérate kinase (PGK). Conséquemment, la transcription des gènes impliqués dans le cycle tricarboxylique, de la chaîne respiratoire et du métabolisme des lipides se voit augmenter dans les motoneurones. Ceci suggère une déprivation de l'énergie dans les motoneurones en réponse à un manque de provision de substrats de la part des astrocytes. Néanmoins, lorsque les astrocytes SLA sont cultivés seuls, ils ne présentent pas de dysfonctionnement au niveau de la production de lactate alors que ce n'est pas le cas lorsqu'ils sont en présence de motoneurones sains ou atteints. Par conséquent, cette déprivation en lactate attribuée aux astrocytes se ferait en réponse aux motoneurones (Ferraiuolo et al., 2011c).

D'autre part, les astrocytes permettent également aux neurones de se protéger contre le stress oxydatif en leur fournissant du glutathion (GSH), un composé qui neutralise les dérivés toxiques tels que les ROS. Dans le milieu extracellulaire, la cystéine (Cys-SH) est oxydée en cystine (Cys-S-S-Cys) mais une fois dans l'astrocyte, la cystine est à nouveau réduite en cystéine et peut être utilisée pour la biosynthèse du glutathion. Effectivement, la γ -glutamylcystéine synthase transforme la cystéine et le glutamate en une molécule qui sera prise en charge par la glutathion synthase. Un composé intermédiaire est alors fourni aux neurones afin que celui-ci produise son propre GSH {McBean 2002 20 /id}. Cette fonction est très importante dans le cadre de la SLA puisque le stress oxydatif, causé par l'agrégation de la SOD1^{MT} aux mitochondries, est une caractéristique majeure (Boillee et al., 2006).

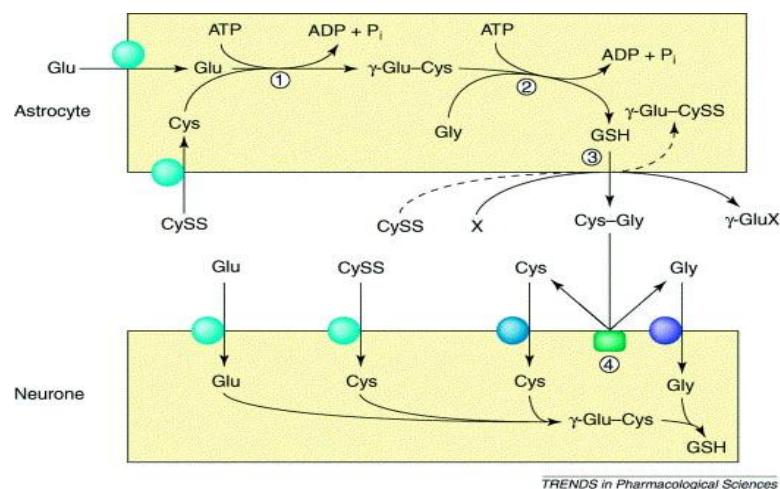


Figure 5 : La relation entre les astrocytes et les neurones dans la synthèse du glutathion (GSH). Le transport de glutamate (Glu) et de la cystine (CySS) dans l'astrocyte fournit des substrats à la γ -glutamylcystéine synthase (1), qui catalyse la production de γ -glutamylcystéine. La GSH synthase (2) catalyse alors la conversion du γ -glutamylcystéine

(γ – Glu – Cys) en GSH. Le GSH libéré par les astrocytes est un substrat pour la γ -glutamyltranspeptidase (3) qui transfère le γ -glutamyl (γ -glu) du GSH sur un acide aminé accepteur (X) et laisse sortir un dipeptide, le cystéinyl – glycine (Cys – Gly) hors de l'astrocyte. Ce dipeptide est alors clivé en acide aminé par une ectopeptidase (4) et le GSH peut être reformé dans le neurone à base de glycine et de γ -Glu – Cys {McBean 2002 20 /id}

1.3.2.2. La microglie

Les cellules microgliales jouent un rôle important dans l'immunité innée du SNC puisque, contrairement aux astrocytes et oligodendrocytes dont l'origine est épiblastique. La microglie provient du mésenchyme et plus précisément de la moelle hématopoïétique. Ces macrophages résidents forment une ligne de défense active face aux les lésions du système nerveux et face à l'inflammation.

1.3.3. Implication de ces cellules dans la SLA

Les chercheurs ont longtemps considéré que la SLA était uniquement causée par l'implication des motoneurones. Toutefois, plusieurs expériences ont montré que les cellules gliales étaient tout aussi engagées que les motoneurones dans cette pathologie. Plusieurs études sur des souris ont montré que l'expression sélective de la hSOD1^{MT} dans les motoneurones ne suffit pas à induire la SLA mais induit tout de même des anomalies pathologiques (Shi et al., 2010b) (Julien, 2007b). Lorsqu'il y a une surexpression sélective de la hSOD1^{MT} dans les motoneurones de souris, ces dernières développent un phénotype de neurodégénérescence moyen accompagné d'une apparition tardive des symptômes, comparé aux souris surexprimant la hSOD1^{MT} de façon ubiquitaire (Julien, 2007b). Par contre, lorsqu'on supprime l'expression de la hSOD1^{MT} dans les motoneurones, l'apparition de la maladie se voit retardée et les souris voient également leurs chances de survie augmenter. Par conséquent, il semblerait que d'autres cellules aient un rôle à jouer dans la neurodégénérescence mise en évidence dans la SLA.

Lorsque la hSOD1^{MT} est exprimée de manière sélective dans les astrocytes ou les cellules microgliales, aucune dégénérescence des motoneurones n'est observée (Gong et al., 2000b). En revanche, lorsqu'on supprime l'expression de la hSOD1^{MT} dans les astrocytes ou dans les cellules microgliales, la progression de la maladie est ralentie et la survie des souris augmentée (Haidet-Phillips et al., 2011b), (Jaarsma et al., 2001), (Rothstein, 2009a). Par conséquent, il en a été déduit que l'expression de hSOD1^{MT} dans les motoneurones contrôlerait l'apparition des symptômes alors que l'expression de hSOD1^{MT} dans les cellules gliales interviendrait dans la progression de la maladie. (Ferraiuolo et al., 2011a), (Gong et al., 2000a).

Deux phénomènes majeurs expliquent l'importante implication des cellules gliales dans la maladie : l'excitotoxicité et la neuroinflammation.

1.3.4. Excitotoxicité

Lorsque le glutamate est libéré par le neurone pré-synaptique, ce neurotransmetteur va se retrouver en grande quantité dans la synapse et va pouvoir stimuler les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) ou les récepteurs métabotropiques (mGluRs) situés sur le neurone post-synaptique et l'astrocyte. D'une part, les astrocytes ont pour rôle la capture du glutamate afin de fournir aux neurones le substrat initial pour la synthèse de ce glutamate, la glutamine. D'autre part, la capture de ce neurotransmetteur par les astrocytes permet d'assurer une réponse à des changements rapides dans les neurones présynaptiques et limite la désensibilisation du récepteur (Alain Longstaf 2005).

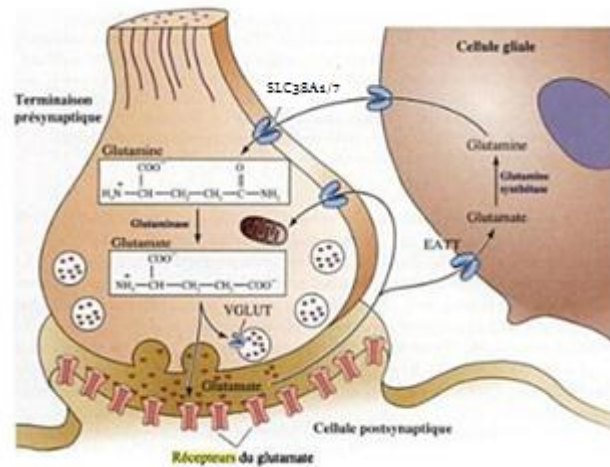


Figure 6 : La transmission d'informations entre les neurones se fait via la sécrétion de neurotransmetteurs, tel le glutamate (Glu). Une fois libéré par le neurone pré-synaptique, le glutamate va se retrouver en grande quantité dans la fente synaptique et pouvoir stimuler les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), AMPA ou mGluRs situés sur le neurone post-synaptique et l'astrocyte. En stimulant les récepteurs du neurone post-synaptique, il permet la propagation de l'information. L'astrocyte, quant à lui, a pour rôle l'élimination d'un maximum de glutamate hors de la synapse pour éviter le phénomène d'excitotoxicité. Il transforme alors le glutamate en glutamine (Gln) afin de fournir le précurseur du glutamate au neurone.

(Alain Longstaf 2005)

En effet, l'information doit se propager assez vite et doit être de courte durée, c'est pourquoi les astrocytes possèdent des récepteurs et transporteurs au glutamate.

Il existe plusieurs types de récepteurs sur les neurones et les astrocytes : les récepteurs NMDA, AMPA et mGluRs. Les récepteurs NMDA et AMPA sont des canaux ioniques qui laisseront passer des cations tels que le calcium, le sodium et le potassium. Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) sont des récepteurs couplés aux protéines G qui se composent de trois groupes : le premier groupe comprend les récepteurs mGluR1 et mGluR5, principalement situés sur les neurones post-synaptiques, le deuxième groupe comporte le mGluR2 et mGluR3 et le troisième groupe rassemble les mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Les deux derniers groupes constituent une grande partie des autorécepteurs qui influencent la libération du glutamate par les neurones pré-synaptiques alors que les récepteurs du groupe I sont principalement post-synaptiques. Les récepteurs métabotropiques prédominants à la surface de l'astrocyte sont le mGluR3 et le mGluR5 (Cai et al., 2000).

En plus des récepteurs au glutamate, on trouve également des transporteurs au glutamate connu sous le nom d'EAAT 1 à 5 (Excitatory Amino Acid Transporter) chez l'humain ou de leurs homologues respectifs GLAST (Glutamate-Aspartate Transporter), GLT1 (Glutamate Transporter 1), EAAC1, EAAT4-5 chez la souris. Ces transporteurs ont pour fonction la capture du glutamate présent en grande quantité dans la synapse lors de la transmission

nerveuse et sont situés sur les astrocytes et les neurones présynaptiques. Par ailleurs, ces transporteurs sont également responsables du transport d'aspartate et leur activité dépend du gradient électrochimique établi par le sodium.

Chez les patients atteints de SLA et les modèles animaux, il a été montré que le transporteur EAAT2 ou GLT-1 se trouve diminué à la surface astrocytaire (Milanese et al., 2010). De cette manière, le glutamate ne peut être recapté par les astrocytes avec une efficacité normale, ce qui crée une excitotoxicité. En effet, l'excitotoxicité résulte d'une activation excessive des récepteurs au glutamate causée par une sensibilité accrue du neurone post-synaptique au glutamate ou par l'augmentation de la quantité de glutamate synaptique. Par conséquent, ce phénomène conduit à la mort cellulaire des neurones et de quelques cellules gliales (Alain Longstaf 2005).

À force de stimuler les récepteurs motoneuronaux au glutamate, les concentrations en calcium intracellulaires sont augmentées. En effet, une fois fixé au récepteur AMPA, le glutamate provoque l'entrée massive d'ions sodium (Na^+) déclenchant une dépolarisation. Lorsque la dépolarisation dépasse un certain seuil, l'ion magnésium se dissocie du canal des récepteurs NMDA qu'il bloquait. Il s'ensuit alors un influx important de calcium dans le neurone suite à l'ouverture du canal. Ainsi, l'entrée massive de calcium permet l'activation de plusieurs voies intracellulaires situées en aval qui, lorsqu'elles sont suractivées, conduisent généralement à la dégénérescence des neurones.

Enfin, une autre hypothèse concernant l'excitotoxicité a été proposée. Il a été présenté que le glutamate libéré de façon importante par les neurones pré-synaptiques, ne pourrait plus être recapté par les astrocytes. Il en découle par conséquent, une diminution du précurseur permettant la synthèse du glutathion, normalement fourni aux neurones. Ce glutathion permet aux neurones de contrer le stress oxydatif, c'est pourquoi, sans cette molécule, leur survie est compromise.

1.3.5. Neuroinflammation

Afin de protéger l'organisme contre les pathogènes et de réparer les lésions tissulaires et cellulaires, les premiers mécanismes de défense immunitaire mettent en place une réaction inflammatoire. L'inflammation agit ainsi comme un mécanisme de survie mais peut cependant être néfaste pour l'organisme lorsqu'elle est chronique. En effet, dans la SLA, l'inflammation agit comme un mécanisme de défense de prime abord mais parce qu'elle est soutenue et donc chronique, elle aggrave les symptômes de la pathologie.

La neuroinflammation est caractérisée par la mise en place de processus cellulaires et moléculaires conduisant à l'activation de la microglie et des astrocytes et à l'infiltration des cellules immunes. Dans la SLA, les cellules microgliales et les astrocytes voient leur morphologie ainsi que leurs sécrétions se modifier. En effet, des facteurs tels que le $\text{NF-}\kappa\text{B}$, un facteur de transcription pro-inflammatoire, le $\text{TNF-}\alpha$, l' IL-6 et l' $\text{IL-1}\beta$ sont augmentés en fin de vie des patients atteints et chez les modèles animaux qui y sont associés. Ceci reflète une inflammation de plus en plus importante et néfaste pour l'organisme malade (Appel et al.,

2011). Une autre étude a montré que le TNF- α était retrouvé en de hautes concentrations dans les moelles épinières de souris surexprimant la hSOD1^{G93A}. Sur base de ces observations, les chercheurs ont testé l'efficacité d'un antagoniste du TNF- α chez des souris SOD1^{MT} et ont pu montrer une meilleure survie des souris traitées (Boillee et al., 2006).

1.3.5.1. La microglie

La neurodégénérescence est accompagnée, chez les patients atteints de SLA et dans les modèles animaux, d'une réponse neuroinflammatoire caractérisée par une activation microgliale et une infiltration des cellules T dans les régions lésées. Généralement, le taux de microglie activée est en lien étroit avec le degré de sévérité de la maladie. En effet, les patients en stade symptomatique avancé, présentent une forte élévation du taux de microglie activée ainsi que du nombre de cellules T, et ce particulièrement dans la moelle lombaire. Ainsi, les cellules T régulatrices interagissent avec la microglie afin d'atténuer la neuroinflammation et ce, en stimulant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (Ferraiuolo et al., 2011d). David Beers et ses collègues ont également mis en évidence un rôle protecteur de l'inflammation, mis en place par les cellules microgliales, aux stades précoces de la maladie alors que cette inflammation accélère la progression de la pathologie au stade symptomatique avancé (Beers et al., 2006) (Beers et al., 2008). Cette inflammation n'est pas seulement restreinte au système nerveux mais est observée dans tout le système sanguin des patients. Malgré tout, nombreuses sont les études qui pointent la neuroinflammation comme une conséquence de la neurodégénérescence plutôt que comme la cause (Lewis et al., 2012) alors que d'autres montrent que la neuroinflammation précède la neurodégénérescence (Boillee et al., 2006).

1.3.5.2. Les astrocytes

Une augmentation du nombre d'astrocytes dans le cerveau de patients atteints de SLA, aussi bien familiale que sporadique, a été mise en évidence par de nombreux chercheurs (Klein et al., 2005). La toxicité et le non support des astrocytes SLA envers les motoneurons ont également été soulignés puisque des motoneurons sains co-cultivés avec des astrocytes issus de patients atteints de SLA familiale ou sporadique ont un taux de mortalité important alors que ce n'est pas le cas lorsque les astrocytes proviennent de sujets sains. Encore, plus impressionnant, le même type de co-culture a été réalisé avec d'autres types de neurones et leur taux de mortalité est identique à celui observé lorsque les astrocytes sont issus de sujets sains. Par conséquent, il semble que seuls les motoneurons soient ciblés par la toxicité des astrocytes SLA. (Haidet-Phillips et al., 2011a)

De même, les motoneurons meurent plus rapidement lorsqu'ils sont en contact avec un milieu conditionné par des astrocytes issus de patients SLA et ce, comparé à un milieu

conditionné par des astrocytes de sujets sains. Ceci suggère que les motoneurones sont sensibles à des facteurs solubles sécrétés par les astrocytes de patients atteints. En effet, la plupart des gènes impliqués dans l'inflammation, voient leur expression augmentée dans les astrocytes atteints (Haidet-Phillips et al., 2011a). Parmi ces gènes, on retrouve les cytokines et chémokines suivantes : IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-27, IFN- β , IFN- γ , TNF- α , TGF- β , CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10, et CXCL12 (Qin and Benveniste, 2012). D'autres médiateurs inflammatoires, tels que les prostaglandines E2, les leukotriènes B4 et l'oxyde nitrique sont sécrétés par les astrocytes lorsque ceux-ci sont activés, comme c'est le cas dans la SLA. Ainsi, l'ensemble de ces médiateurs seraient responsables de la toxicité envers les motoneurones.

Enfin, il semblerait que les astrocytes soient également activés par les médiateurs inflammatoires puisqu'une augmentation des récepteurs astrocytaires au TNF α a été mise en évidence en cas de SLA (Hensley et al., 2002).

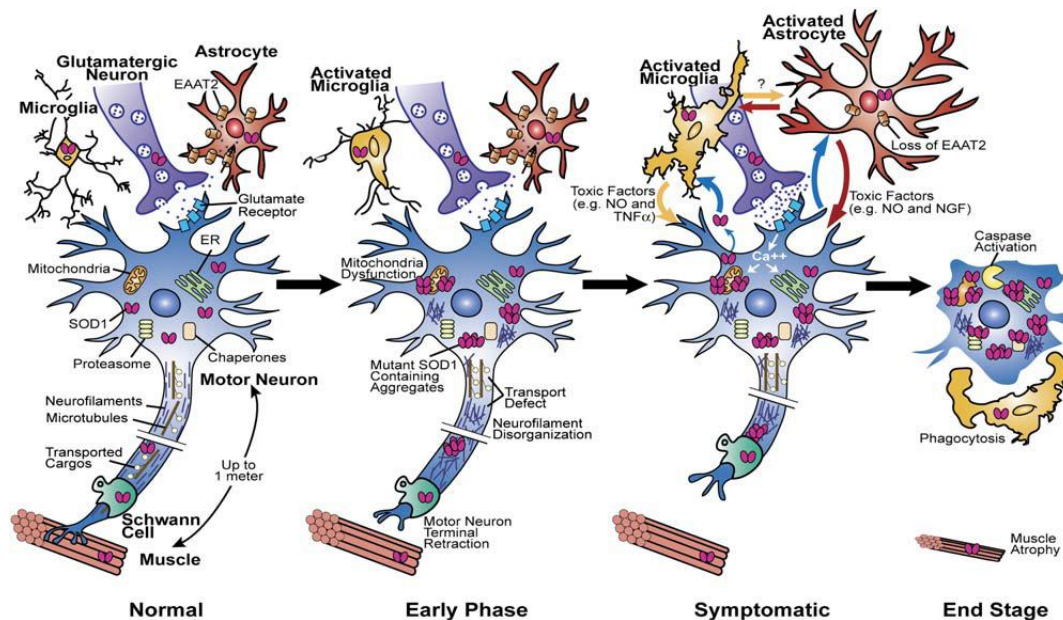


Figure 7 : Schéma représentant l'évolution de la dégénérescence des motoneurones et l'activation des cellules gliales lors de SLA. Quatre stades ont été définis : état normal, phase précoce, phase symptomatique et phase terminale de la maladie. La toxicité est dépendante des cellules non autonomes et est due à une combinaison de dommages directement causés aux motoneurones. Ces dommages sont une condition importante pour l'initiation de la pathologie. Les astrocytes et les cellules microgliales ont également une importance dans la pathologie puisque ces cellules amplifient les dommages initiaux et qu'elles sont impliquées dans la progression de la maladie. Il en résulte une rétraction du motoneurone de la jonction neuromusculaire établie avec les fibres motrices.

(Boillee et al., 2006)

1.4. Toxicité causée par l'accumulation de la SOD1 mutée

1.4.1. Agrégation protéique

Comme décrit antérieurement, les mutations au sein de la SOD1 conduisent à des changements de conformation de la protéine entraînant alors son agrégation au sein de la

cellule. D'une part, ces inclusions sont retrouvées avant l'apparition des symptômes et provoquent la séquestration d'autres protéines importantes pour les neurones et les cellules gliales. D'autre part, les mutations de SOD1 induisent des dérégulations cellulaires de par l'agrégation de l'enzyme aux protéines des organites intracellulaires tels que les mitochondries, le protéasome, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et également de par sa liaison aux protéines chaperonnes et aux filaments intermédiaires conduisant ainsi à des déficits de transport axonal. L'agrégation de la SOD1^{MT} avec les protéines de choc thermique ou la séquestration de protéines anti-apoptotiques par la SOD1^{MT}, entraîne également des dommages cellulaires importants, tels que l'apoptose (Boillee et al., 2006).

1.4.2. Dysfonctionnement mitochondrial

Physiologiquement, la SOD1 est une protéine homodimérique principalement localisée dans le cytoplasme et qui peut être retrouvée dans d'autres compartiments cellulaires avec une fréquence moindre, tels le noyau, le réticulum endoplasmique (RE) et l'espace intermembranaire mitochondrial. Enfin, il est possible de retrouver la SOD1 sous forme non mutée dans les lysosomes et les péroxysomes. À l'opposé, la MnSOD2 est presque exclusivement localisée dans la matrice mitochondriale (Boillee et al., 2006).

La SOD1 peut lier un atome de cuivre et un atome de zinc au sein de chacune de ses sous-unités (Field et al., 2003c) mais seule la forme immature de la SOD1, autrement dit la forme ne possédant ni l'atome de zinc, ni l'atome de cuivre, peut entrer dans la mitochondrie. Une fois dans la mitochondrie, l'enzyme est sujette aux mêmes étapes de maturation que dans le cytosol, c'est-à-dire l'insertion de l'atome de zinc et de cuivre. Une fois que le cuivre et le zinc lui sont ajoutés, elle ne peut ressortir de l'espace intermembranaire mitochondrial.

Plusieurs observations histopathologiques ont montré une vacuolisation et une dilatation des mitochondries chez les patients SLA et les modèles animaux. Ce phénomène est associé à la translocation et l'accumulation du SOD1^{MT} dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, induisant ainsi la formation de petites vacuoles dans cet espace intermembranaire mitochondrial. Ceci a été montré par la colocalisation de SOD1^{MT} et du cytochrome C situé dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Field et al., 2003b)f.

Par ailleurs, il semblerait que la SOD1^{MT} affecte la fonction des mitochondries puisque la composition en protéines diffère entre les mitochondries provenant de souris développant la SLA comparées aux souris WT. En effet, Liu et son équipe ont montré que l'association de la SOD1^{MT} au complexe TIM et TOM, deux protéines impliquées dans l'import des protéines cytosoliques, altère fortement leur fonction mais ce, uniquement dans les motoneurones et les cellules gliales. Par conséquent, on pourrait se demander s'il existe un signal spécifique sur les mitochondries des motoneurones et des cellules gliales qui induirait cet import dans la SLA (Boillee et al., 2006).

Cette accumulation de SOD1^{MT} et la déformation des mitochondries ont pour conséquence le déficit et l'altération de la phosphorylation oxydative et conséquemment la perte du potentiel de membrane. En effet, plusieurs chercheurs ont observé une altération des complexes de la chaîne respiratoire et une diminution de la production d'ATP qui s'en suit et ce, chez les modèles animaux et les patients atteints de SLA (Ghiasi et al., 2012). Fukada et ses collègues ont signalé que des neurones NSC-34 transfectés avec hSOD1^{G93A} présentaient des altérations de plusieurs protéines impliquées dans la respiration mitochondriale, de FOF1ATPase et de deux isoformes de canaux ioniques voltage dépendant (Fukada et al., 2004a). Rizzardini a montré quant à lui qu'il y avait une baisse dans l'activité du complexe I au niveau des mitochondries du cerveau issu d'un patient atteint de SLA (Rizzardini et al., 2005). Il a été également remarqué une baisse du niveau d'ATP dans le cortex cérébral des souris SOD1^{G93A} âgées de 30 jours (Field et al., 2003c).

La dégénérescence des motoneurons inférieurs est plus précoce que celle des motoneurons supérieurs chez les patients et les modèles animaux atteints de SLA. Étant donné leur plus grande vulnérabilité face aux déficits métaboliques, les motoneurons inférieurs seraient les premiers à être touchés par les conséquences de la SOD1^{MT}. En effet, l'axone et les dendrites sont situés loin du noyau, ce qui signifie que les systèmes de réparations sont moins accessibles et que l'énergie demandée pour réparer les dommages causés est alors beaucoup plus importante (Field et al., 2003c).

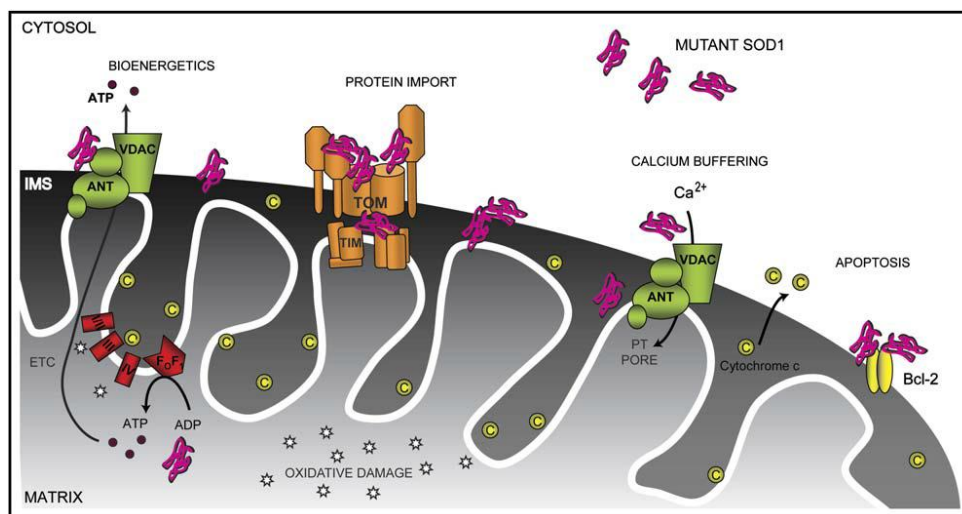


Figure 8 : Dommages causés à la mitochondrie par le mutant SOD1. La protéine SOD1^{MT} est préférentiellement importée dans les mitochondries des tissus affectés dans le cadre de la SLA. Le mutant SOD1 interfère avec les éléments de la chaîne de transport d'électrons, altérant ainsi la production d'ATP par la phosphorylation oxydative. Ce mutant altère également d'autres fonctions de la mitochondrie telle que son implication dans l'apoptose et dans la libération de calcium. Ainsi, l'ensemble de ces mécanismes conduisent à une dérégulation de l'homéostasie cellulaire qui a pour conséquence la mort cellulaire.

(Boillee et al., 2006)

1.4.3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif résulte du déséquilibre entre la production d'espèce réactive de l'oxygène (ROS), les mécanismes qui permettent l'élimination de ces ROS et la réparation des dommages qui ont été causés. En effet, la production de peroxydes et de radicaux libres provoque des dommages aux divers composants cellulaires, tels que l'ADN, les lipides, les protéines, ... Plusieurs études ont mis en évidence une élévation des marqueurs des dommages causés par les radicaux libres. Ceci s'explique par les difficultés des cellules gliales et des motoneurones retrouvés chez les patients SLA ou les modèles animaux à éliminer les ROS qui s'accumulent (Ferraiuolo et al., 2011d).

Le stress oxydatif exacerberait les autres processus physiologiques qui conduisent à la dégénérescence des motoneurones tels que l'excitotoxicité, le dysfonctionnement mitochondrial, l'agrégation des protéines, les stress du RE et les altérations dans la signalisation entre les astrocytes et la microglie (Ferraiuolo et al., 2011d). Néanmoins, l'élévation du taux de ROS chez les patients SLA n'est pas liée de manière directe à la protéine SOD1^{MT} puisque la plupart des mutations de cette protéine n'entraînent pas une perte de fonction (Bruijn et al., 1998b). En effet, c'est le dysfonctionnement mitochondrial, dû à l'agrégation de la protéine mutée qui serait responsable de cette production excessive de ROS (Ferraiuolo et al., 2011d).

1.4.4. Stress du réticulum endoplasmique

La SLA est également associée à un important dysfonctionnement du RE. En effet, il a été montré que l'homéostasie du calcium, normalement assurée par le réticulum, est totalement dérégulée dans les motoneurones provenant d'animaux surexprimant la SOD1^{MT}. En réalité, les niveaux d'expression de plusieurs protéines régulatrices des stocks de calcium dans le RE sont nettement augmentés dans les motoneurones surexprimant la SOD1^{MT} comparés aux motoneurones sains, ce qui crée un épuisement des stocks de calcium. Puisque l'homéostasie du calcium est fortement perturbée, le repliement et les modifications post-traductionnelles corrects des protéines sont empêchés. Ainsi, l'accumulation de protéines non ou mal repliées conduit au stress du RE. Ce stress cellulaire est caractérisé par une inhibition de la synthèse des protéines et par l'activation des chaperonnes résidant dans le RE dont le rôle est de reconnaître et replier les protéines aberrantes. Il en découle également une suppression générale de la traduction afin d'éviter une surcharge du RE et une dégradation des protéines associées au RE. Malgré tout, il faut également noter que ce stress lié au RE est une caractéristique des motoneurones et n'implique donc pas les cellules gliales (Ferraiuolo et al., 2011d).

1.4.5. Dysfonctionnement du protéasome

Le système protéasome-ubiquitine (UPS) a pour fonction principale la dégradation des protéines mal repliées, dénaturées ou anormales. En effet, lorsqu'une protéine est reconnue comme non fonctionnelle, elle est marquée pour la dégradation par plusieurs molécules d'ubiquitine et une fois marquée, la protéine est dirigée vers le protéasome pour y être digérée.

Les amas de protéines agrégées que l'on retrouve chez les patients atteints de SLA et les modèles animaux sont, dans la plupart des cas, positifs au marquage contre l'ubiquitine. En réalité, l'activité du protéasome serait diminuée par l'agrégation de la SOD1^{MT} et favoriserait donc l'accumulation de protéines anormales dans le cytoplasme. Par ailleurs, des chercheurs ont montré que certaines sous-unités du protéasome présentaient une expression réduite chez les souris surexprimant la SOD1^{MT}, ce qui expliquerait également l'accumulation de protéines anormales dans les motoneurones et les cellules gliales (Cheroni et al., 2009) (Boillee et al., 2006).

1.4.6. Déficit du transport axonal

La mutation de la SOD1 entraîne l'agrégation de nombreuses protéines, dont notamment la kinésine et la dynéine, deux protéines interagissant avec les microtubules. Ces protéines sont essentielles pour le transport d'éléments du corps cellulaire vers les terminaisons nerveuses, dit transport antérograde et pour le transport rétrograde lorsque les molécules font le chemin inverse. Par conséquent, la SOD1^{MT} provoque une dérégulation du transport axonal qui est responsable de plusieurs caractéristiques de la maladie, telle la diminution du nombre de mitochondries dans les terminaisons nerveuses. La baisse de l'importation des mitochondries dans l'axone s'accompagne d'une diminution des autres éléments vers cette terminaison de par le déclin d'énergie à cet endroit. Ces événements, couplés aux autres, conduisent dès lors à la rétraction des motoneurones de la jonction neuromusculaire (Ferraiuolo et al., 2011d)

2. L'AMP-activated protein (AMPK)

2.1. Introduction

Le cerveau est l'un des organes les plus demandeurs en énergie et comme décrit ci-dessus, aussi bien les patients SLA que les modèles animaux montrent une déplétion en ATP de par l'atteinte mitochondriale observée (Boillee et al., 2006). Malheureusement, le lien entre ces déficits métaboliques et mitochondriaux et la neurodégénérescence n'a pas encore été complètement élucidé. Néanmoins, il est trivial de se demander si ces phénomènes ne peuvent pas activer d'autres protéines qui auraient un rôle à jouer dans la maladie. Un maillon clef dans le contrôle métabolique énergétique est l'AMPK ainsi que son activateur physiologique, l'adénosine monophosphate (AMP), dont les concentrations intracellulaires s'élèvent en cas de baisse des concentrations intracellulaires en adénosine triphosphate (ATP).

2.2. Généralités

Les cellules ont un besoin constant d'énergie pour renouveler leurs constituants et pour supporter les réactions métaboliques. Cette énergie est essentiellement stockée sous forme d'ATP, une molécule utilisée dans la plupart des réactions cellulaires. Toutefois, afin d'éviter un manque ou un surplus d'énergie, le taux d'ATP doit être finement régulé et ce rôle est assuré par l'AMPK. L'AMPK fut caractérisée pour la première fois en 1973 par deux groupes de chercheurs. Les uns ont caractérisé l'AMPK comme phosphorylant et inhibant la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG CoA réductase), une protéine impliquée dans la synthèse du cholestérol. Les autres ont montré que l'AMPK inhibait par phosphorylation l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), responsable de la synthèse des acides gras, en présence d'ATP. Ce n'est que des années plus tard que Hardie a montré que ces deux protéines n'en formaient qu'une seule. Sa dénomination lui fut attribuée en référence à son activateur allostérique, le AMP (Hardie, 2003).

L'AMPK est retrouvée chez les eucaryotes primitifs, ce qui laisse penser que cette protéine est une caractéristique universelle des eucaryotes. Par ailleurs, sa structure est fortement conservée au cours de l'évolution, depuis les organismes unicellulaires aux organismes les plus complexes, ce qui souligne son importance dans les cellules eucaryotes (Hardie et al., 2003).

Par phosphorylation de ses cibles, cette kinase est impliquée dans la régulation de nombreux processus, tels que le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, dans le vieillissement, le système cardiovasculaire, la croissance cellulaire et aussi l'apoptose. L'AMPK est une enzyme considérée comme un senseur énergétique et est impliquée dans l'homéostasie de l'énergie puisqu'elle maintient l'équilibre énergétique au sein de la cellule. En effet, elle est sensible au taux d'AMP et de ses dérivés, l'ADP et l'ATP. Elle ajuste de

cette manière le taux de consommation d'ATP via les voies cataboliques, ou son taux de production, via les voies anaboliques. Par ailleurs, le choc thermique, les inhibiteurs métaboliques, l'hypoxie, l'ischémie, la déprivation de glucose, l'exercice physique, la contraction musculaire et les hormones peptidiques (leptine et adiponectine) sont des événements qui jouent également un rôle dans la régulation de l'AMPK. L'AMPK peut agir à court terme, en phosphorylant d'autres protéines, ou sur le long terme, en modifiant l'expression de gènes via la phosphorylation de facteurs de transcription par exemple (Yang et al., 2001).

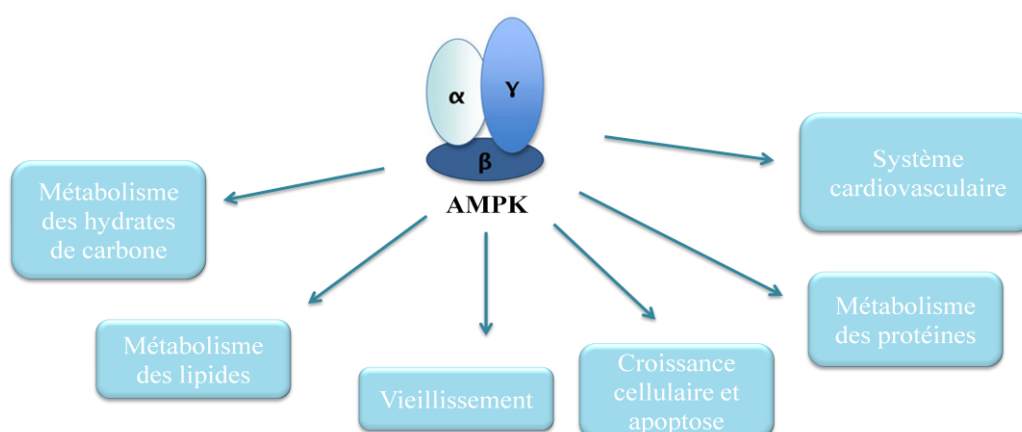


Figure 9 : L'AMPK joue un rôle majeur dans l'homéostasie de l'énergie cellulaire. Cette kinase est activée en réponse à des stress cellulaires qui tendent à diminuer la concentration en ATP, tels que le faible taux de glucose, l'hypoxie, l'ischémie et les chocs thermiques. Cette kinase est composée de plusieurs sous-unités dont deux sont régulatrices (β et γ) et la troisième est catalytique (α). La liaison de l'AMP à la sous-unité γ permet d'activer le complexe AMPK et le rend plus attractif pour les kinases de l'AMPK, telles LKB1 et CaMKK β .

2.3. Structure de l'AMPK

L'AMP-activated kinase est une protéine hétérotrimérique, c'est-à-dire qu'elle se compose de trois sous-unités différentes, dont l'une est catalytique (α) et les deux autres sont régulatrices (β et γ). Il existe plusieurs isoformes de ces sous-unités (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 et γ_3), encodés par différents gènes (PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG1, PRKAG2 et PRKAG3), qui s'assemblent sous diverses combinaisons pour former au total pas moins de 12 hétérotrimères différents sans compter la diversité suite à l'épissage alternatif (Hardie et al., 2003).

2.3.1. La sous-unité α

La sous-unité α possède un site catalytique situé au niveau du résidu thréonine 172 (Thr¹⁷²) qui, lorsqu'il est phosphorylé, permet l'activation partielle de l'AMPK. Ce site catalytique est

situé au niveau du domaine kinase sérine thréonine (KDST) en position N-terminale. Cette sous-unité comporte également un domaine d'auto-inhibition (AID), une cette séquence qui n'est active qu'en présence d'ATP. Enfin, un domaine d'interaction avec les sous-unités β et γ est retrouvé en position C-terminale (Hardie et al., 2003) (Amato and Man, 2011).

2.3.2. La sous-unité β

La sous-unité β permet l'assemblage de l'AMPK grâce à ses domaines d'interaction pour les sous-unités α et γ en position C-terminale (ou carboxyl-terminal domain, CTD). Elle contient également un domaine semblable au domaine N-amylase qui, retrouvé dans plusieurs enzymes, permet de métaboliser les branches glycanes (glycogène,...), il s'agit du domaine de liaison au glycogène (ou glycogen-binding region, GBR) (Carling, 2004;Amato and Man, 2011).

2.3.3. La sous-unité γ

La sous-unité γ possède quatre domaines cystathionine β -synthase (CBS) dont la paire forme le domaine de Bateman. Trois des quatre sites de liaison CBS peuvent être occupés : un de ces trois sites est en permanence lié à une molécule d'AMP alors que les deux autres sont soit liés à l'AMP soit à l'ATP qui entrent alors en compétition (Xiao et al., 2011a).

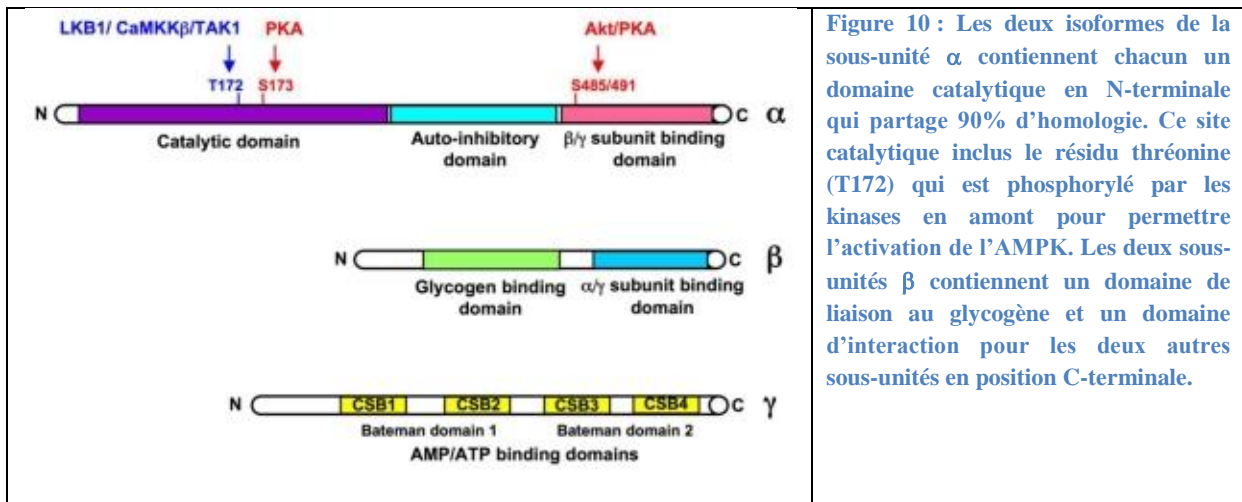


Figure 10 : Les deux isoformes de la sous-unité α contiennent chacun un domaine catalytique en N-terminale qui partage 90% d'homologie. Ce site catalytique inclut le résidu thréonine (T172) qui est phosphorylé par les kinases en amont pour permettre l'activation de l'AMPK. Les deux sous-unités β contiennent un domaine de liaison au glycogène et un domaine d'interaction pour les deux autres sous-unités en position C-terminale.

Les trois isoformes de la sous-unité γ (γ 1, γ 2 et γ 3) possèdent pour deux d'entre eux des variants d'épissage (long [L] ou court [S]) qui sont situés en N-terminale. Notons que γ 1 est l'isoforme prédominante dans le SNC alors que γ 3 est restreint au muscle squelettique.

(Viollet et al., 2010)

2.4. Fonctionnement de l'AMPK

Trois événements principaux sont à l'origine de l'activation de l'AMPK : le premier est la phosphorylation du site catalytique Thr¹⁷² au niveau de la sous-unité α (1), le deuxième est la liaison du 5'AMP au niveau des domaines CBS situés sur la sous-unité γ (2) et le dernier est l'inhibition de la déphosphorylation de la Thr¹⁷² par les phosphatases (3) assurée par un changement de conformation de la protéine. En effet, une interaction entre le domaine kinase (KDST) et le domaine d'auto-inhibition (AID) de cette sous-unité permet de protéger le site Thr¹⁷² de la déphosphorylation par les phosphatases.

Comme signalé précédemment, le 5'AMP, l'ADP et l'ATP peuvent entrer en compétition pour lier les sites CBS de la sous-unité γ . Lorsque le ratio [AMP/ATP] ou [ADP/ATP] est élevé, la liaison d'un premier AMP au niveau du domaine CBS permet la liaison des AMP suivants sur les autres sites CBS avec une efficacité augmentée. Une fois que les molécules de 5'AMP occupent tous les sites CBS sur l'AMPK, un changement de conformation permet d'exposer le site catalytique Thr¹⁷² dans la boucle α rendant la phosphorylation par les AMPK kinases possible. Cette phosphorylation permet d'augmenter l'activité de l'AMPK d'un millier de fois. À l'opposé, lorsque le ratio [AMP/ATP] ou [ADP/ATP] est faible, les molécules d'ATP vont pouvoir se fixer aux domaines CBS de la sous-unité γ , inhibant alors la phosphorylation de la Thr¹⁷² et favorisant sa déphosphorylation (Xiao et al., 2011b). Malgré que l'ATP ait une moins bonne affinité que l'AMP pour les sites CBS, il peut agir comme un antagoniste sur l'AMPK lorsqu'il est en concentration importante (Amato and Man, 2011).

2.4.1. Les AMPK kinases

La phosphorylation du site Thr¹⁷² implique différentes AMPK kinases (AMPKK) : le complexe LKB1/STRAD/MO25, la CaMKK β et la TAK1. Il semble que l'isoforme $\alpha 1$ soit majoritairement activée par la CaMKK β et soit donc dépendante du calcium alors que l'isoforme $\alpha 2$ est activée, quant à elle, par la LKB1 et est, par conséquent, plutôt importante pour la régulation du métabolisme.

La protéine LKB1 (Liver Kinase B1), aussi découverte pour son rôle suppresseur de tumeur, est une série thréonine kinase qui forme un complexe trimérique avec deux pseudo-kinases : l'une est une protéine adaptatrice connue sous le nom de STE20-related adaptor (STRAD) et l'autre est une protéine d'échafaudage (MO25). Les souris ayant une suppression de la protéine LKB1 montrent une absence d'activation de l'AMPK $\alpha 2$ et une légère diminution de l'activation de l'AMPK $\alpha 1$, ce qui suggère que LKB1 se trouve essentiellement en aval de la sous-unité $\alpha 2$. Ceci suggère également que l'AMPK $\alpha 1$ peut être régulée par une autre AMPKK que LKB1. En effet, une élévation des concentrations calciques permet l'activation de l'AMPK dans les souris knockout pour LKB1, ce qui suggère que CaMKK β active plutôt la sous-unité AMPK $\alpha 1$ (Viollet et al., 2009c)

La CaMKK β (Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase kinase β) est l'un des isoformes de la CaMKK qui a été reconnu comme activant l'AMPK en fonction des flux intracellulaires de calcium et agit donc indépendamment de la concentration en AMP.

Enfin de récentes études ont montré qu'une autre kinase, TAK1 (Transforming growth Factor β -activated kinase 1) est également responsable de l'activation de l'AMPK mais ce, uniquement dans le cerveau (Amato and Man, 2011). TAK1 est un membre de la famille des mitogen-activated protein kinase kinase kinase.

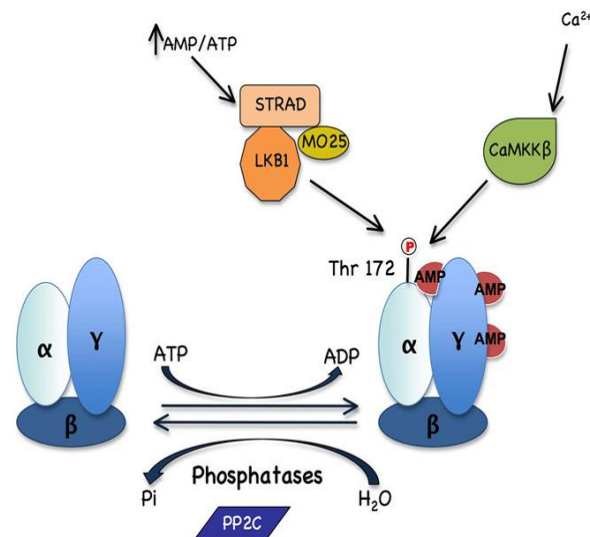


Figure 11 : Régulation de l'activation de l'AMPK. L'AMPK est activée par phosphorylation au niveau de la thréonine 172 située sur la sous-unité α . Cette phosphorylation est catalysée par le complexe LKB1/STRAD/MO25 en réponse à une augmentation du ratio AMP/ATP. La CaMKK β peut également activer l'AMPK par phosphorylation en réponse à des changements de concentration en calcium. Enfin, le site T172 peut être déphosphorylé par des phosphatases (PP2C) qui rendent dès lors l'AMPK inactive.

(Viollet et al., 2009c)

2.5. Activation pharmacologique de l'AMPK

Outre l'activation physiologique de l'AMPK, certaines substances sont capables d'activer ou d'inhiber la protéine. L'action des substances sur l'AMPK se fait, soit par l'utilisation de molécules mimant l'AMP, soit par une action directe sur de la protéine. L'AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) est un composé qui, lorsqu'il est fourni aux cellules est converti en AICA-ribose (ZMP), un analogue de l'AMP mimant l'effet de ce dernier sur l'AMPK. Un autre activateur de l'AMPK est la metformine, notamment utilisée dans le cadre du diabète. La metformine agit en interagissant avec la sous-unité γ de l'AMPK, ce qui provoque un changement de conformation de la sous-unité α (Zhang et al., 2012). Ceci faciliterait ainsi l'activation de l'AMPK par les AMPKK. À l'opposé, le principal inhibiteur de l'AMPK est le composé C dont l'action est, à ce jour, encore inconnue.

2.6. Localisation de l'AMPK

De par leurs localisations cellulaires différentes, les divers isoformes possèdent un rôle qui diffère quelque peu. En effet, les isoformes $\alpha 1$ et $\beta 1$ sont distribués de manière ubiquitaire alors qu'on retrouve les isoformes $\alpha 2$ et $\beta 2$ plus particulièrement dans le muscle squelettique, le cœur et le foie. Enfin, l'AMPK $\gamma 3$ est exprimée exclusivement dans le muscle squelettique alors que les deux autres isoformes ($\gamma 1$ et $\gamma 2$) sont retrouvés à parts égales dans le reste de l'organisme. D'un point de vue cellulaire, l'AMPK $\alpha 2$ trouve une localisation cytosolique et nucléaire alors que l'AMPK $\alpha 1$ est plutôt cytosolique et membranaire. La localisation nucléaire de l'isoforme $\alpha 2$ expliquerait l'activation de facteurs de transcription par l'AMPK. (Viollet et al., 2010).

Malgré les nombreuses études sur l'AMPK, peu d'entre elles se sont focalisées sur le SNC. Les premières localisations de l'AMPK dans le cerveau ont été décrites par Gao et Stapleton qui ont montré que les différentes sous-unités de l'AMPK étaient exprimées dans le cerveau adulte (Gao et al., 1995b; Gao et al., 1996a; Gao et al., 1995a). Plus tard, Turnley et son équipe ont présenté une étude plus approfondie de l'AMPK dans le cerveau et ont observé que l'AMPK $\alpha 2$ était plus exprimée que son homologue $\alpha 1$ dans le cerveau adulte. Effectivement, dans la substance grise, la sous-unité $\alpha 1$ est faiblement exprimée dans le corps cellulaire et est donc plutôt retrouvée dans le neuropile. En revanche, la sous-unité $\alpha 2$ est fortement exprimée dans les motoneurons alors que son expression est plus faible dans les autres cellules. Dans la substance blanche, on remarque une forte expression de l'isoforme $\alpha 2$ dans les astrocytes activés et les oligodendrocytes. Concernant la sous-unité β , l'isoforme $\beta 1$ est plutôt retrouvée dans les neurones alors que l'isoforme $\beta 2$ est fortement présente dans les astrocytes. Enfin, la sous-unité $\gamma 1$ possède la même distribution et le même niveau d'expression que la sous-unité $\alpha 2$ mais est peu exprimée dans les astrocytes alors que la sous-unité $\gamma 2$ est faiblement exprimée dans le cerveau.

Outre la distribution cellulaire, la distribution intracellulaire est également différente pour les diverses sous-unités. En effet, dans les neurones, l'AMPK $\alpha 2$ est préférentiellement localisée dans le noyau alors que sa localisation cytosolique reste assez faible et variable. Au contraire dans les astrocytes, la sous-unité $\alpha 2$ est principalement localisée dans le cytoplasme. Les sous-unités $\beta 1$ et $\gamma 1$ ont la même distribution que $\alpha 2$ et sont surtout retrouvées dans le noyau alors que les sous-unités $\beta 2$ et $\gamma 2$ sont surtout distribuées dans le cytoplasme des cellules du cerveau (Turnley et al., 1999e).

TABLE 1. Cellular distribution and expression level of AMPK isoforms in CNS

CNS region	Cell type	$\alpha 1^a$	$\alpha 2$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\gamma 1$	$\gamma 2$
Cortex	Neuron	+	+++	- to +++	++	+++	\pm
	Astrocyte	-	-	-	-	-	-
Hippocampus/ corpus callosum	Neuron/pyramidal	+	+++	+ to +++	++	+++	+
	Astrocyte	-	- to +++	- to +	- to +	-	-
	Activated astrocyte	ND	++++	- to \pm	\pm to ++	-	ND
Cerebellum	Neuron/granule	+	++	\pm	+	++	\pm
	Neuron/Purkinje	+	+++	\pm to ++	++++	+++	\pm
	Astrocyte	-	- to +++	- to +	- to +	-	++ ^b
Spinal cord	Motor neuron	\pm	++	\pm to +++	\pm	++++	\pm to +
	Astrocyte	-	- to +++	- to ++	- to ++	-	-
Facial nucleus	Motor neuron	- to +	+++	\pm to +++	-	++++	\pm to +
Olfactory bulb	Neuron/mitral	-	+++	+++	-	+++	-
	Neuron/granule	-	+++	-	-	+++	-
	Neuron/periglomerular	-	+++	+++	-	++	-

- , not detectable above background; \pm , barely detectable above background; + , low expression; ++ , medium expression; +++ , high expression; ++++ , very high expression; ND , not determined.

^a $\alpha 1$ staining was confined mainly to low, diffuse staining of the neuropil and was not restricted to cell bodies.

^b $\gamma 2$ staining of Bergmann glia, but not other astrocytes.

TABLE 2. Nuclear versus cytoplasmic localization of the AMPK isoforms

Cell type	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\gamma 1$	$\gamma 2$
Neurons	c >> n ^a	n >> c	n >> c	c	n \geq c	c > n
Astrocytes—white matter	NA	c > n	c	c	NA	c ^b

c, cytoplasmic; n, nuclear; > , greater than; >> , much greater than; \geq , greater than or equal to; NA, not applicable.

^a $\alpha 1$ staining was confined mainly to low, diffuse staining of the neuropil and was not restricted to cell bodies.

^b $\gamma 2$ staining of Bergmann glia, but not other astrocytes.

Figure 12 : Tableaux résumant les diverses localisations des différents isoformes de l'AMPK dans les structures (Table 1) et les cellules (Table 2) du SNC.

(Turnley et al., 1999a)

2.7. AMPK et inflammation

La voie de signalisation de l'AMPK joue un rôle important pour garantir la survie cellulaire en cas de stress métabolique. Depuis plusieurs années, les chercheurs mettent l'accent sur son implication de cette protéine dans l'inhibition de l'inflammation (Salt and Palmer, 2012). Effectivement, plusieurs études ont montré qu'une diminution de son activité était associée à une élévation de la réponse inflammatoire. L'AMPK activée peut atténuer l'expression de médiateurs inflammatoires en inhibant par exemple l'expression du gène de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), diminuant ainsi la production d'oxyde nitrique (NO). De plus, l'activation de l'AMPK peut également inhiber la translocation nucléaire de médiateurs inflammatoires tels que le NF κ B et le CEBP (CCAAT-enhancer-binding proteins) (Giri et al., 2004). L'activation de l'AMPK permet de diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 notamment impliquées dans la plupart des maladies neurodégénératives. Ainsi, l'AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside), un analogue de l'AMP et donc activateur de l'AMPK, diminue de façon importante la réponse inflammatoire et ce, même dans les cellules gliales et les neurones.

Toutefois, comme il en sera discuté plus tard dans ce mémoire, les conséquences de l'activation de l'AMPK dans les maladies neurodégénératives sont fortement controversées. Certains prétendent que son activation est bénéfique pour les cellules et peut les aider à

contrer les déficits métaboliques alors que d'autres prônent les multiples effets néfastes de sa suractivation dans un contexte de stress métabolique.

II. Objectifs

La SLA est une maladie neurodégénérative impliquant principalement les motoneurones, les astrocytes et les cellules microgliales. Au vu des modifications métaboliques qui sont observées chez les patients atteints de SLA et les modèles animaux, on peut se questionner sur l'impact qu'a l'AMPK sur le cours de la maladie, ou au contraire, les modulations que pourraient entraîner la SLA sur l'AMPK.. Nous avons décidé d'aborder ces deux questions sous différentes approches.

Premièrement, puisque l'isoforme AMPK α 2 plus exprimé dans le SNC que son homologue α 1, nous nous sommes interrogés sur l'expression de la sous-unité α 2 et l'activité de l'AMPK dans les astrocytes WT et hSOD1^{G93A}. Les astrocytes sont effectivement très impliqués dans la pathologie et participent à la dégénérescence des motoneurones. En cas de déficits métaboliques importants, on pourrait se demander si ces cellules continueraient à assurer leurs fonctions de support, physique et métabolique envers les motoneurones.

Ensuite, il a été question d'analyser le profil d'expression de l'AMPK α 2 de manière plus globale, c'est-à-dire dans le cortex et la moelle épinière. Cette étude permettrait d'étudier l'impact qu'a le cours de la pathologie sur l'expression de l'AMPK.

Enfin, nous avons tenté d'étudier l'impact que pourrait avoir l'AMPK sur le cours de la SLA. Pour ce faire, l'inactivation du gène codant pour l'AMPK α 2 a été réalisée chez les souris développant la SLA (hSOD1^{G93A}). Des tests comportementaux ont alors été utilisés pour déterminer la présence d'une différence de motricité entre les souris hSOD1^{G93A} et les souris hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{-/-} et donc d'un effet protecteur, ou au contraire délétère, de cette inactivation.

III. Matériels et Méthodes

1. Animaux utilisés

Les souris (C57Black6) et les rats (Sprague Dawley ; Charles River, Wilmington, Massachussets) SLA utilisés dans cette étude possèdent un grand nombre de copies du gène codant pour la hSOD1 mutée en position 93 via le remplacement d'une glycine par une alanine. En effet, la mutation ponctuelle d'une guanine en une cytosine en deuxième position du codon de la glycine induit un changement dans le code génétique. Les deux types de rongeurs surexpriment donc le gène codant pour la SOD1^{G93A} humaine encadré par un promoteur humain.

Afin de mener à bien notre recherche, ces souris, ont été croisées avec des souris pour lesquelles l'AMPK α 2 a été supprimée de façon ubiquitaire. Etant donné que les souris hSOD1^{G93A+/-} femelles sont stériles, seuls les mâles ont pu être utilisés pour l'accouplement. Les mâles hSOD1^{G93A+/-} sont dès lors croisés avec des souris AMPK α 2^{-/-} afin d'obtenir entre autres des souris hSOD1^{G93A+/-} AMPK α 2^{+/-}. À nouveau, seuls les mâles hSOD1^{G93A+/-} AMPK α 2^{+/-} pourront être utilisés. Ces mâles sont ensuite croisés avec des femelles AMPK α 2^{-/-} pour permettre l'obtention de souris double transgéniques hSOD1^{G93A+/-} AMPK α 2^{-/-}.

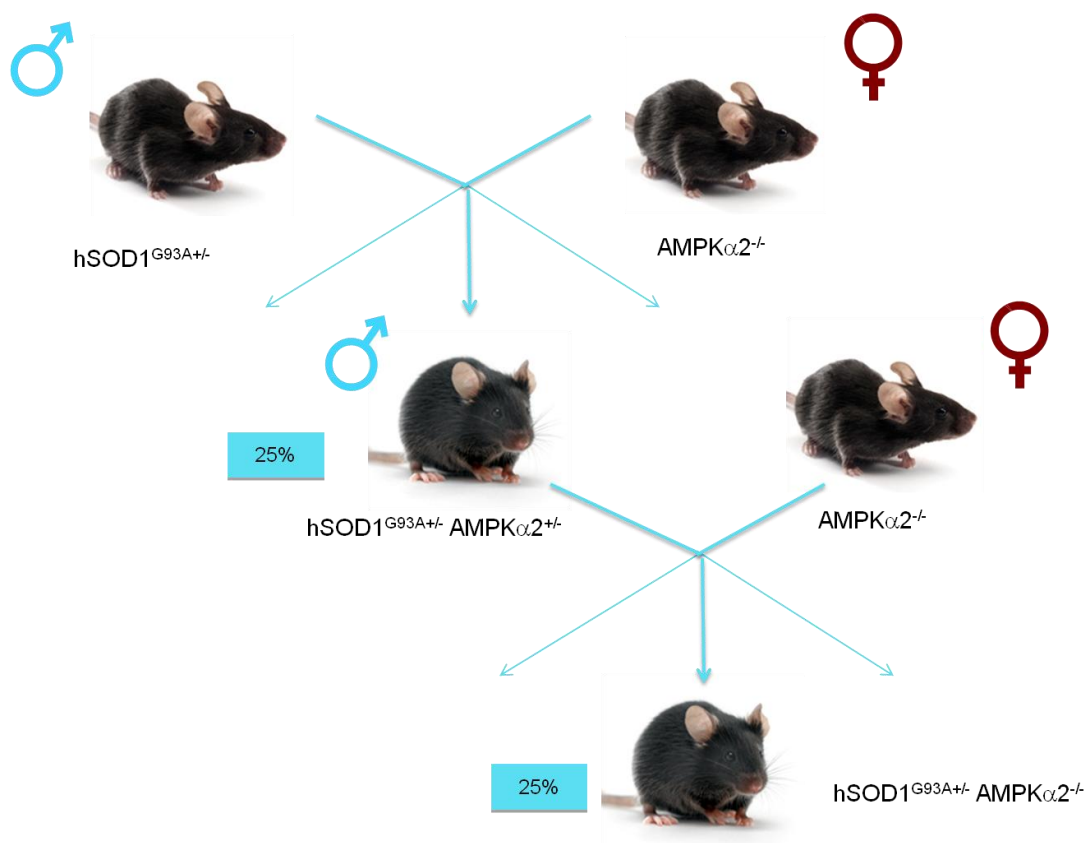


Figure 1 : Afin d'obtenir des souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-}, des mâles hSOD1^{G93A} ont été croisés avec des femelles AMPK α 2^{-/-}. Ce croisement permet d'obtenir des souris hétérozygotes pour la suppression de l'AMPK α 2 (hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{+/-}). Un second croisement entre les mâles hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{+/-} avec des femelles AMPK α 2^{-/-} permet l'obtention de souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-}.

Toutes les souris sont génotypées pour le gène hSOD1^{G93A} sur base d'un petit bout de queue. En effet, des amorces spécifiques pour le gène humain codant pour la SOD1 mutée ont été utilisées pour déterminer la présence de la mutation chez les animaux. Les animaux sont suivis selon les règles dictées par le « Guide pour les soins et l'utilisation d'animaux de laboratoire » et sont nourris par une alimentation spécialisée (SAFE A03 breeding for mice : protéines 21.4%, graisses 5.1%, minéraux 5.7%, cellulose 4.0%, vitamine A 14.000 IU/kg, vitamine D3 1.200 IU/kg, vitamine E 50 IU/kg, CuSO₄.5H₂O 22 mg/kg, Zn ; Scientific Animal Food ; Engineering, Perotech Science, Inc. Toronto, Canada). Notons que la concentration en zinc et en cuivre peut influencer le cours de la maladie. En effet, Ermilova et son équipe ont mis en évidence qu'un supplément modéré (12 mg/kg/jour) en zinc pouvait retarder la mort alors que de hautes doses (à partir de 18 mg/kg/jour) de zinc pouvaient au contraire avancer la mort. Lorsque ces mêmes doses sont utilisées en plus de petites doses de cuivre (0.3 mg/kg/jour), la mort est également postposée (Ermilova et al., 2005). En outre, les patients traités par l' α -tocophérol (vitamine E) ont montré une stabilisation voire une amélioration de la maladie en fonction des doses utilisées (Graf et al., 2005). Par conséquent, il est très important que les doses en zinc, cuivre et vitamine E soient contrôlées et constantes dans l'alimentation des souris et des rats.

2. Comportement

Les tests comportementaux sont réalisés sur des souris WT, hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{-/-}. Ces tests sont utilisés pour distinguer les différences d'activité motrice entre les groupes de souris utilisés. Trois approches comportementales ont été exploitées : le gripstrength, l'openfield et le catwalk. Ces tests comportementaux sont connus pour pouvoir discriminer les souris WT des souris SLA.

2.1. La mesure du gripstrength

La mesure du « gripstrength » permet d'évaluer la force dans les pattes des souris. Il s'agit en réalité d'une grille reliée à un dynamomètre procurant une mesure en gramme, newton ou en pound. Cette grille peut être placée à l'horizontale, afin de mesurer la force des pattes antérieures et des quatre pattes, ou inclinée sous un angle de 45° pour évaluer la force présente dans les pattes postérieures. Afin d'effectuer la mesure des pattes arrières, ces dernières sont posées sur l'échelon le plus haut alors que les pattes avant sont positionnées sur un rebord en métal amovible. Cinq essais sont réalisés pour chaque paire de pattes testées et seule la valeur la plus élevée est prise en compte. Notons que cette mesure est effectuée deux fois par semaine, le même jour à la même heure.



2.2. Openfield

L'openfield est un test permettant la mesure la motricité des animaux sans l'influence quelconque de l'examineur. Cette méthode est également beaucoup utilisée pour évaluer l'anxiété chez les animaux. En effet, l'openfield consiste en une arène carrée (60x60x60 cm) correspondant à un espace ouvert entouré de murs pour empêcher l'animal de s'enfuir. Cette arène se compose de deux parties, l'une plus éclairée, le centre, l'autre plus sombre, la périphérie. Il est alors possible de mesurer le temps passé dans chacune des zones et de déterminer l'anxiété de l'animal puisque la lumière est plus anxiogène que les zones sombres. D'autres paramètres peuvent être utilisés pour mesurer la mobilité de l'animal.

Les arènes sont placées sous un système vidéo (Ethovision 6.1, Noldus ; Wageningen, The Netherland) permettant de suivre et d'analyser l'ensemble des paramètres désirés. Afin d'éviter un stress trop important, chaque animal est placé dans une arène face à un mur, c'est-à-dire dans la périphérie, où la luminosité est moins importante. Ils y sont laissés et suivis durant une période de 20 minutes. Il est alors important que les animaux se retrouvent dans un calme parfait durant une période de 20 minutes afin qu'aucune influence externe ne puisse perturber le parcours de l'animal.



Une fois le suivi des animaux terminé, les paramètres de mobilité suivants peuvent être analysés : le mouvement, la distance parcourue, la vitesse, le temps en mouvement, l'immobilité, le temps passé dans le centre ou la périphérie, le nombre d'entrées dans le centre, la position sur deux pattes, le toilettage. Le mouvement se définit comme les mouvements spatiaux du nez, du centre du corps ou de la base de la queue avec une vitesse

excédant ou non un seuil défini. Ces seuils sont définis durant un temps d'entraînement afin d'exclure le toilettage, la position sur deux pattes, les reniflements et le léchage. Dans le cas des maladies neurodégénératives, les paramètres de mobilité seront les plus appropriés pour distinguer deux souris de souches différentes, ce qui est notre cas : les souris hSOD1^{G93A} et les souris hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{-/-}.

Les analyses ont débuté à 8 semaines pour les souris hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{-/-} et à 11 semaines pour les souris hSOD1^{G93A} et les souris WT. Ces mesures sont effectuées une fois par semaine, le même jour à la même heure afin d'éviter le moins possible de variations diurnes.

2.3. Catwalk

Le catwalk est un test comportemental permettant l'analyse de la démarche des rongeurs nous permettant ainsi de déterminer si la suppression de l'AMPK α 2 a un impact sur la motricité des souris hSOD1^{G93A}.

Ce dispositif fut développé pour évaluer les déficits fonctionnels des lésions de la moelle épinière. Aujourd'hui, le catwalk est utilisé pour de nombreuses autres applications sur les modèles de rats et de souris et notamment pour l'étude des modèles de trauma neurologique, de neurodégénérescence, de maladies neurologiques ou pour l'analyse de la douleur. En effet, la recherche concernant les lésions de la moelle épinière, la douleur neuropathique, l'arthrite, les accidents cérébrovasculaire, la maladie de Parkinson, l'ataxie, les lésions traumatiques du cerveau et les dommages des nerfs périphériques ont connu de grandes avancées grâce à cette méthode.

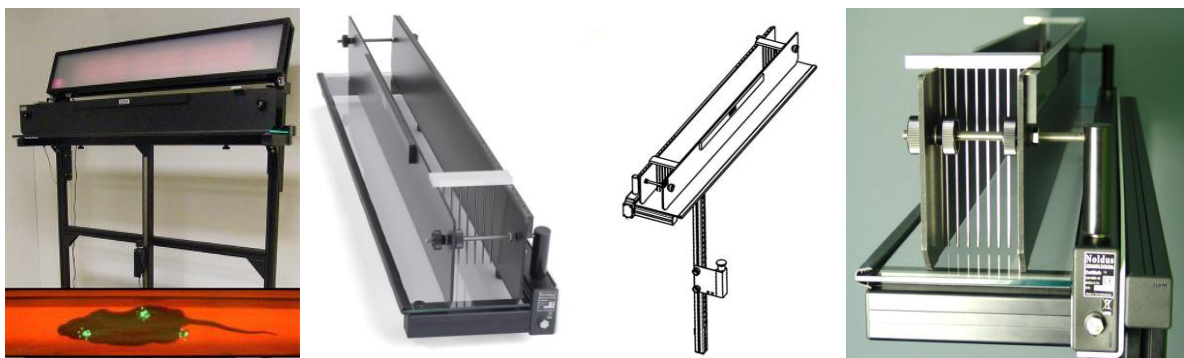
Le Catwalk est un appareil de mesure utilisé pour déterminer de façon précise la démarche des souris et des rats. Ce dispositif inclut une vitre éclairée par un faisceau phosphorescent sur laquelle se positionne un couloir qui cadre la démarche des rongeurs. Les rayons traversant la vitre sont réfractés par chaque contact avec la vitre, il est donc important qu'aucune impureté ou saleté ne soit présente sur la vitre car ceci rend l'analyse compliquée. Une caméra positionnée en dessous de la vitre, à une distance de 25 cm pour les souris, permet de filmer les empreintes de pattes phosphorescentes que laissent les souris lorsqu'elles courent d'un bout à l'autre du couloir. Pour ce faire, il est nécessaire que la pièce soit plongée dans un noir absolu.

La couleur de l'empreinte dépend de la quantité de lumière qui a été envoyée à la caméra par l'empreinte de pas. Ainsi, puisque la patte se pose sur la vitre puis se retire dans un cycle de marche, la pression imposée par la patte va peu à peu augmenter pour diminuer ensuite. Autrement, dit l'intensité de lumière envoyée à la caméra augmente elle aussi et diminue ensuite lorsque la patte se retire.

Les empreintes de pas phosphorescents créées au contact des pattes de la souris avec la vitre sont enregistrées par la caméra et permettent dès lors le suivi de trois catégories de paramètres : les paramètres liés aux empreintes individuelles tels que l'intensité, l'aire

maximale, la durée de contact, la longueur et la largeur de la patte ; les paramètres liés à la position des empreintes des pattes tels que le « base of support », la « relative print position », la distance entre les foulées ; et les paramètres analysant les empreintes les unes par rapport aux autres dans un système espace/temps tels que la structuration des empreintes, les phases de dispersions et les différents profils d'appui de la souris.

Les analyses sont réalisées sur les trois parcours les plus rapides, dont la démarche est la plus constante possible et qui ne sont pas interrompus. De même que l'openfield, le catwalk est effectué une fois par semaine le même jour à la même heure. Pour permettre une habitude et donc éviter les biais, les tests débutent deux semaines avant l'analyse (à 6 semaines pour les souris $hSOD1^{G93A}AMPK\alpha2^{-/-}$ et à 4 semaines pour les souris $hSOD1^{G93A}$ et les souris wild-type).



3. Mise en culture d'astrocytes et activation

La mise en culture des astrocytes corticaux comporte différentes parties : la dissection du cerveau pour l'obtention du cortex, la mise en culture, le maintien des cultures, l'activation de ces cellules et enfin leur utilisation pour diverses expériences.

3.1. Dissection

Les cultures réalisées par nos soins sont pratiquées sur des rats Sprague Dawley WT ou $hSOD1^{G93A}$ âgé de 2 à 4 jours. Ces rats possédant une hémoglobine fœtale fixant l'oxygène avec une haute affinité ne peuvent pas être euthanasiés par l'usage de la cuve à dioxyde de carbone. Par ailleurs, l'usage de substances euthanasiantes compromet fortement la conservation des astrocytes dans leur état initial. C'est pourquoi la méthode la moins anxiogène et la plus rapide a été adoptée, il s'agit de la décapitation.

La peau de la tête est ensuite découpée de la base du cou vers la pointe du museau, donnant ainsi accès à la fine boîte crânienne. Cette dernière est également incisée de la même manière que l'épiderme, c'est-à-dire via une incision partant de la base du cou vers les globes oculaires. Deux incisions perpendiculaires sont alors pratiquées afin d'enlever la boîte crânienne sans endommager le cerveau qu'elle contient. Une fois la boîte crânienne ôtée,

l'accès au cerveau est maintenant libre et il convient d'extraire le cerveau hors de la tête. Pour ce faire, il est nécessaire de séparer le cerveau du tronc cérébral et de détacher les nerfs optiques qui y sont fixés.

Le cerveau est alors maintenu dans milieu nutritif isotonique pour la dissection au moyen de PBS glucose ou Phosphate Buffer Saline glucose (1g de glucose dans 500 ml de PBS ; Gibco, Life Technologies et Sigma Aldrich). Il convient ensuite de détacher le cervelet du cerveau et de séparer les deux hémisphères afin d'en extraire le cortex. Les astrocytes utilisés pour les cultures ne proviennent que de la substance grise, il est dès lors nécessaire d'enlever la substance blanche pour ne garder que la substance grise. Par la suite, les méninges doivent également être retirées à l'aide d'une pince courbe afin d'empêcher la contamination des astrocytes par d'autres cellules telles que des fibroblastes pouvant notamment adopter une morphologie astrocytaire en présence d'astrocytes et par conséquent fausser nos résultats.

Deux cerveaux sont utilisés pour réaliser une culture d'astrocytes dans une flasque de 175 cm². Par conséquent, quatre hémisphères sont homogénéisés à l'aide d'une pipette pasteur dans 2 ml de PBS glucose. Après une centrifugation de 5 minutes à 2260 g, le culot est resuspendu dans 2 ml de PBS glucose pour enlever un maximum de débris cellulaires. Les 2 ml de PBS glucose contenant les quatre hémisphères homogénéisés sont déposés délicatement sur un coussin de 2 ml de Percoll 30% (60 ml de PBS glucose auquel sont ajoutés 30 ml d'une solution stock de Percoll isotonique ; PercollTM/RediGradTM, GE Healthcare Uppsala, Suisse). Après une centrifugation de 20 minutes à 3200 g, la fraction solide contenant les astrocytes est prélevée et resuspendue dans 13 ml de PBS glucose. Cette étape permet de séparer les astrocytes des autres cellules retrouvées dans le culot telles que la microglie, les cellules sanguines, les oligodendrocytes et ce, grâce à un gradient de séparation par densité. Les astrocytes resuspendus dans 13 ml de PBS glucose sont alors centrifugés durant 5 minutes à 3200 g puis resuspendus dans 40 ml de milieu (Dulbecco Modified Eagle Medium or DMEM 21885 (GlutaMAX, 1000 mg/l D-glucose, 110 mg/l de pyruvate de sodium ; Gibco Life Technologies) contenant 10% of sérum bovin fœtal décomplémenté, 1% de L-proline, 1% de fungizone and 1% d'un mélange de pénicilline et de streptomycine (Gibco , Life Technologies) dans une flasque 175 cm² (Greiner Bio-one ; Wemmel, Belgium). Cette étape permet d'éliminer un maximum de percoll, une substance toxique pour les cellules.

3.2. Changement du milieu

Les astrocytes sont maintenus en flasque à une température de 37°C, en présence de 5% de CO₂ et une humidité contrôlée durant 14 jours. Les deux premières semaines en flasque ainsi que les deux premiers jours en plaque six puits permettent une expansion de la population astrocytaire par un taux de division important alors que la dernière semaine en plaque six puits permet la maturation des astrocytes. Le milieu (contenant 10% de FBS) est changé au septième jour de culture afin de maintenir un taux adéquat d'éléments nutritifs pour les cellules.

3.3. Trypsinisation

Les astrocytes sont ensuite placés en plaque six puits afin d'effectuer diverses activations. Pour ce faire, on enlève le milieu et on rince les cellules au PBS stérile afin d'enlever un maximum de protéines contenues dans le sérum et ainsi augmenter l'efficacité de la trypsine. Ensuite, on ajoute 4 ml de trypsine (Gibco ; Life Technologies) une enzyme qui est normalement retrouvée dans les sucs pancréatiques et qui permet la digestion des protéines. En effet, la trypsine est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques et est ainsi utilisée pour détacher notamment les astrocytes de la flasque. Elle agit en clivant les protéines membranaires d'adhésion pour mettre les cellules en suspension. Après trois minutes à 37°C, l'action de la trypsine est neutralisée par l'ajout de milieu contenant 10% de FBS. Ce milieu contient beaucoup de protéines qui feront compétition aux protéines d'adhésion et l'action de la trypsine sera ainsi diminuée fortement auprès des protéines d'adhésion astrocytaire.

Une fois que les cellules sont mises en suspension et récupérée, elles sont centrifugées à 2260 g puis sont homogénéisées dans 10 ml de milieu contenant 10% de FBS. Après comptage, elles sont déposées dans une plaque six puits à raison de 100 000 ou 200 000 cellules par puits selon l'activation qu'elles vont subir.

3.4. Activation des cellules

Après deux jours de maturation en plaque six puits (16^e jour), le milieu contenant 10% de FBS est changé par du milieu contenant 3% de FBS. L'activation par un cocktail de facteurs de croissance (G5 1/100 : insuline 500µg/ml, transferrine humaine 5 mg/ml, sélénite 0.52 µg/ml, biotine 1 µg/ml, hydrocortisone 0.36 µg/ml, FGF 20,52 µg/ml, EGF 1 µg/ml; Invitrogen) se fait également deux jours après l'ensemencement en plaque six puits sur 100 000 cellules. Par contre, l'activation des astrocytes (200 000) par le Tumor Necrosis Factor α (TNF α ; AbD Serotec) et l'interleukine 1 β (IL-1 β , AbD Serotec) a lieu 24 heures avant l'expérience à laquelle elles sont destinées, c'est-à-dire au 22^e jour après la mise en flasque. Le TNF α et l'IL-1 β sont deux médiateurs inflammatoires qui sont utilisés pour mimer l'inflammation présente de façon importante dans la SLA. Une série d'astrocytes est désignée comme contrôle et sera donc cultivée dans un milieu contenant 3% de FBS.

4. Prélèvement de tissus

Plusieurs expériences ont requis l'utilisation de tissus du système nerveux central. Pour ce faire, les rats Sprague Dawley WT ou hSOD1^{G93A} sont euthanasiés par le dioxyde de carbone. Les animaux sont euthanasiés au stade non symptomatique (60 jours), au stade pré-symptomatique (120 jours), au stade symptomatique (150 jours) et en fin de maladie, c'est-à-dire aux environs des 195 jours.

Une fois euthanasiés, les animaux sont guillotiné en vue de récupérer le cortex ainsi que la moelle épinière. Tout comme pour la culture primaire d'astrocytes, le cerveau est extrait de la boîte crânienne et seul le cortex est prélevé. La moelle épinière cervicale, thoracique et lombaire est, quant à elle, extraite par pression. En effet, une seringue contenant du PBS stérile est utilisée pour pousser la moelle épinière au niveau du sacrum afin qu'elle ressorte au niveau du cou. Les méninges sont ensuite retirées et la moelle épinière est incisée pour récupérer trois parties : cervicale, thoracique et lombaire.

La dissection s'effectue dans du PBS stérile afin de garder les tissus dans un état intact. Le cortex et de la moelle épinière sont ensuite congelés dans l'azote liquide afin d'établir une congélation rapide et sont conservés au congélateur à -80°C .

5. Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT PCR)

La q RT PCR a été employée afin d'analyser l'expression génique de l'AMPK α 2 dans les cultures d'astrocytes et les tissus du SNC de rats wild-type (WT) et hSOD1^{G93A}.

5.1. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN sur tissus (cortex et moelle épinière cervicale, thoracique et lombaire) ou sur culture primaire d'astrocytes est réalisée de la même façon : 1 ml de Tripure Isolation Reagent (Tripure RNA isolation reagent ; Roche Diagnostic, Mannheim, Allemagne) est ajouté à chaque tissu ou pour la moitié d'une plaque six puits. Le tripure est une solution de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui permet la lyse de la membrane cellulaire et des compartiments et qui dénature les endonucléases endogènes, ce qui empêche la dégradation des acides nucléiques. Le tripure est laissé au contact des cellules ou des tissus durant 5 minutes à température ambiante. L'addition de 0.2 ml de chloroforme pure (solution extra pure stabilisée avec de l'éthanol ; Acros Organics) par millilitre de tripure suivi d'une centrifugation de 15 minutes à 19720 g (4°C) permet la séparation de la solution en trois phases : la phase aqueuse incolore surplombe l'interphase blanche et la phase organique rouge. Ces deux dernières phases contiennent les protéines et l'ADN alors que l'ARN reste exclusivement dans la phase aqueuse. Une fois la phase aqueuse prélevée (0.5 ml), l'ARN qu'elle contient est précipité par ajout de 0.5 ml d'isopropanol (2-propanol ; Merck) dans chaque eppendorf. Après une incubation de 10 minutes, l'ARN précipité est culoté par une centrifugation de 15 minutes à 19720 g (4°C). Ensuite, seul le culot est conservé et séché par l'ajout d'éthanol 75% (70 ml d'éthanol auquel est ajouté 30 ml d'eau exempt d'ARN ; Fisher chemical) afin d'éliminer les sels présents.

5.2. Traitement des échantillons à la DNase et Reverse Transcription

L'ARN contenu dans les tubes est alors dilué dans 20 μl (pour les cellules) ou 50 μl (pour les tissus) d' H_2O traité au diéthylpyrocarbonate (DEPC Ultrapure ; Invitrogen), c'est-à-dire exempte de RNase. L'ARN est ensuite dosé et dilué afin d'obtenir une concentration de 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Seul 1 μg d'ARN est traité à la DNase (RQ1 RNase Free DNase) et rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) via reverse transcription (iScriptTM cDNA Synthesis Kit [Invitrogen] contenant le tampon, le MgCl_2 , les dNTP, la transcriptase inverse, les inhibiteurs de RNase et les primers et ce, au moyen de l'iCycler PCR detection system [Biorad]). Les échantillons sont premièrement maintenus durant 5 minutes à une température de 25°C. Par la suite la température est fixée à 42°C durant une demi-heure, afin de permettre l'activité optimale de la reverse transcriptase. Enfin, l'enzyme est inactivée par une élévation de la température à 85°C durant 5 minutes.

5.3. Quantification d'ADNc

L'ADN complémentaire est dilué à une concentration de 0.2 ng/ μl ou 1.6 ng/ μl avec de l'eau DEPC afin de déposer une quantité finale de 2 ng (pour les tissus) ou 16 ng (pour les cultures primaires d'astrocytes) d'ADNc dans chaque tube. Les dNTP, le fluorochrome, le MgCl_2 et la TAQ polymérase sont contenus dans le SyberGreen (Biorad). Les amorces (Invitrogen, Merelbeke, Belgique) et le syberGreen sont ajoutés à l'ADNc afin d'amplifier le nombre de copies de l'ADNc désiré.

Le couple d'amorce utilisé pour l'amplification de l'AMPK α 2 est le suivant :

		PRIMER (5' VERS 3')	TAILLE DU FRAGMENT	
SÉRIE 3 (Lim et al., 2012)	Forward	agctcgcagtggcttatcat	179 paires de base	Rat/souris
	Reverse	ggggctgtctgctatgagag		Rat/souris

Les primers pour la GAPDH sont les suivants :

GAPDH				
	Forward	gtctcctgtgacttcaacag	76 paires de base	Rat/souris
	Reverse	agttgtcattgagagcaatgc		Rat/souris

Le SyberGreen est un agent fluorescent se fixant sur tous les acides nucléiques doubles brins et permet donc la détection et la quantification d'ADNc d'intérêt. En effet, à chaque cycle l'ADNc d'intérêt est recopié, ce qui signifie que l'on double la quantité d'ADN complémentaire tous les cycles. Il existe alors un cycle seuil auquel la fluorescence est assez importante pour être détectée et suivant que le gène est fortement exprimé ou non. Le nombre de cycles effectués pour atteindre ce seuil sera faible ou non.

6. western Blot

En plus de l'étude de l'expression génique, il a été choisi d'analyser l'expression protéique de l'AMPK α 2 dans les cultures d'astrocytes et les tissus du SNC de rats WT et hSOD1^{G93A}, via le western blot.

6.1. Extraction des protéines

Les protéines sont extraites au départ de cultures primaires d'astrocytes ou de tissus (cortex et moelle épinière cervicale, thoracique et lombaire) au moyen d'un tampon de lyse (Hepes 50 mM (Sigma Aldrich), NaCl 150 mM (Acros Organique), DTT 1 mM (DL- dithiothréitol ; Sigma Aldrich), 1 μ l/ml Triton X-100 pH 7.4, PIC [protease and phosphatase inhibitor cocktail (ThermoScientific HalTM single use inhibitor cocktail 100x)] 1%, EDTA 0.5 mM). Ce tampon de lyse permet la lyse cellulaire et la conservation des protéines. Une centrifugation de 15 minutes à 19720 g permet de séparer les protéines cytosoliques retrouvées dans le surnageant des protéines membranaires situées dans le culot. Puisque l'AMPK étant une protéine cytosolique, le surnageant est récupéré et un dosage protéique est effectué via la méthode de Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay).

6.2. Migration des protéines

Après le dosage, les protéines cytosoliques sont diluées à une concentration de 1 μ g/ μ l au moyen d'H₂O milliQ auquel est ajouté une solution concentrée deux fois de bleu de bromophénol, du sodium dodécyl sulfate 10% (SDS) et du β -mercaptoéthanol. Les protéines sont ensuite chargées dans un gel de compression (acrylamide [30% Acrylamide Bis solution 37.5.1 ; Biorad], Tris Base 0.5 M [Sigma Aldrich], SDS 10%, HCl pH 8.5, ammonium persulfate 10% [Biorad], TEMED 10% [NNN'N' – tétraméthyl – éthylènediamine ; Sigma Aldrich], H₂O) à raison de 20 μ l par puits pour les tissus et 40 μ l par puits pour les astrocytes. Une fois la migration des protéines dans cette première partie du gel effectuée, ces protéines migrent sur un gel de séparation à 8% (acrylamide30%, SDS 5%, H₂O, Tris Base 1M, ammonium persulfate, tétraméthyléthylènediamine) en continuité du gel de compression. La migration s'effectue dans un tampon de migration (Tris-HCl 2.5 mM [Sigma Aldrich], glycine 19.2 mM [Electrophoresis Grade ; MP Biomedicals, Fisher Scientific], 10% SDS, pH8.3) 10 minutes à 200 Volts dans le « stacking gel » et environ 50 minutes à 150 Volts dans le « running gel ».

6.3. Transfert des protéines sur membrane PVDF

Une fois que les protéines cytosoliques ont migré au travers du gel, elles sont transférées sur des membranes PVDF (Millipore ; Immobilon-P^{SQ} Membrane, PVDF, 0.2 µm, 26 x 26 cm sheet) durant une heure à 100 volts dans un tampon de transfert (Tris base 2.5 mM, glycine 19.2 mM, pH 8.3-8.5, méthanol 10%, d'H₂O milliQ 80%). Pour se faire, les membranes doivent être préalablement activées au méthanol pur.

6.4. Exposition aux anticorps et révélation

Afin d'empêcher une fixation non spécifique des anticorps, les membranes sont immergées dans une solution de BSA 5% TBS-Tween 0.05% (Tris-HCl 4mM, NaCl 100 mM, pH 7.5, 0.05% Tween 20) et ce pendant une heure. Ensuite, ces membranes sont par la suite exposées à l'anticorps primaire détectant l'AMPK α 2 (1:5000; AB-141, mouton, polyclonal ; Kinasource) durant une heure. Après plusieurs rinçages au TBS-Tween 0.05%, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire (1:10,000; anti-mouton couplé à la Horse Raddish Peroxydase (HRP), lapin, polyclonal; Pierce 31480,) pendant une heure. Enfin, les protéines sont révélées au moyen d'agents chémiluminescents (Chemoluminescence Reagent Plus) et de films photographiques (Multimodal Imaging System of Kodak Image, Station 2000). En effet, la HRP est capable d'oxyder le luminol, une réaction accompagnée de l'émission de lumière. Le signal lumineux pourra alors s'imprimer sur les films photographiques.

La protéine de référence utilisée dans ce cas-ci est la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Afin de détecter cette protéine, il est nécessaire d'éliminer les anticorps primaires et secondaires dirigés contre l'AMPK via une solution de glycine (glycine 0.1M HCl pH 2.9) et d'exposer la membrane à la BSA 0.5% TBS-Tween 0.05%, aux anticorps primaires contre la GAPDH (1:30,000; G9545, lapin) puis aux anticorps secondaires couplés à la HRP anti-lapin (1:30,000; A-6154, chèvre).

Enfin, la quantification des données est effectuée au moyen du programme Image J. Ce programme nous permet de quantifier le signal imprimé sur les films photographiques. Ce signal reflète la quantité de protéines sur la membrane. En effet, l'aire de chaque spot est mesurée et comparée suivant les conditions. Notons que le signal ne peut être saturé pour réaliser une bonne analyse.

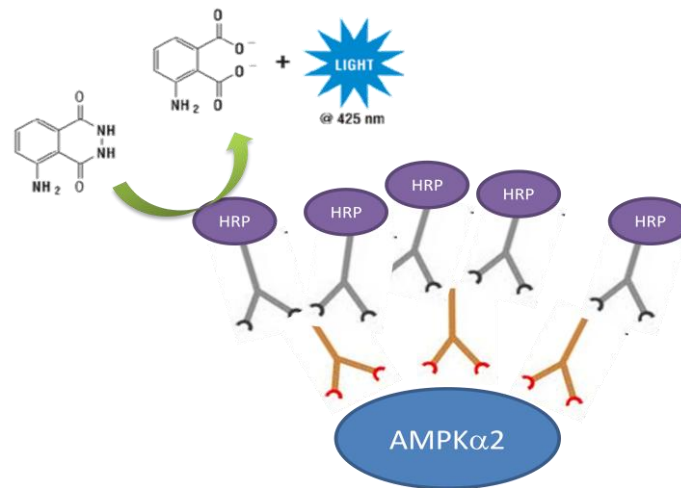


Figure 2 : L'AMPK α 2 est reconnue par son anticorps primaire, reconnu lui-même par un anticorps secondaire couplé à une Horse Radish Peroxydase (HRP). Cette enzyme réagit au contact du luminol pour former un composé oxydé. Cette réaction libère également de l'énergie sous forme lumineuse.

7. Analyse de l'activité de l'AMPK totale

Afin de compléter la caractérisation de l'AMPK, son activité a été étudiée dans les cultures d'astrocytes et dans les tissus du SNC de rats WT et hSOD1^{G93A}.

7.1. Extraction des protéines

Les protéines sont extraites au départ de cultures d'astrocytes ou sur le cortex et la moelle épinière issus de rats WT et hSOD1^{G93A} à l'aide d'un tampon d'extraction : Triton 1%, Vanadate 1mM, H₂O milliQ, inhibiteurs de protéase 7 fois (1 pastille dans 1,5 ml H₂O milliQ, Roche), mix 5 fois (Hepes 0,05M, KF 0,05 M, KP_i 0,001M, EDTA 0,005M, EGTA 0,005M, β -mercaptoéthanol 0,005M et H₂O milliQ). Ensuite, une centrifugation de 15 minutes à 19720 g permet de séparer les protéines cytosoliques, retrouvées dans le surnageant, des protéines membranaires, situées dans le culot. Puisque l'AMPK étant une protéine cytosolique, le surnageant est récupéré et un dosage protéique est effectué via la méthode de Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay).

7.2. Mesure de l'activité de l'AMPK au P32

La fraction contenant les protéines cytosoliques est par la suite diluée à une concentration de 150 μ g/100 μ l. Afin de précipiter les protéines, le polyéthylène glycol (PEG, 0.25g/ml) est ajouté à cette fraction. Les échantillons sont alors maintenus dans ces conditions durant 30 minutes sur glace. Une centrifugation de 15 minutes à 13150g permet de récupérer les protéines, concentrées dans le culot. Les protéines sont alors resuspendues dans 20 μ l de

lopamix 5 fois (100 mM Tris HCl, pH = 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 3,5% glycerol, 50 mM NaF and 5 mM NaPPi) afin dissoudre le PEG. Après 5 minutes sur glace, les échantillons sont centrifugés durant 15 minutes à 13150g. Le culot est à nouveau récupéré et resuspendu dans le tampon de réaction (Hepes 250 mM, KCL 400 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, MgCl₂ 25 mM, glycérol 5%, H₂O milliQ) suivant un nouveau dosage des protéines. Le tampon échantillon contenant du tampon AMPK 1 fois, de l'AMP 200 μM, du SAMS 200 μM, H₂O milliQ et le mix ATP (γ^{32} - ATP, MgATP 10 mM, H₂O milliQ) est ensuite ajouté à chaque échantillon. Il faut savoir que le SAMS est un peptide qui est reconnu et phosphorylé par l'AMPK, notamment grâce au phosphate radiomarqué du γ^{32} -ATP. En effet, le tampon échantillon contient une concentration traceuse d'ATP radiomarqué, dont le rapport sur la concentration en MgATP sera calculé et utilisé pour déterminer l'activité de l'AMPK. Afin d'éliminer le bruit de fond, un tampon blanc est également préparé. Ce tampon équivaut au tampon échantillon excepté qu'il ne contient pas le SAMS.

Les échantillons sont ensuite déposés sur du papier Waterman 81 (phosphocellulose, Millipore) dont les propriétés facilitent la fixation des protéines. Les morceaux de papier sur lesquels sont déposés les échantillons sont trempés dans l'acide phosphorique permettant ainsi la fixation des protéines, puis sont lavés par l'acétone et séchés afin d'extraire l'eau des échantillons. Enfin, les morceaux de papier Waterman sont utilisés pour le comptage à scintillation solide.

8. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées par l'utilisation du programme GraphPad Prism 5.0 (Graph-Pad, San Diego, CA, USA). Pour déterminer le début des symptômes par l'analyse de la force des pattes postérieures (gripstrength), la « Break Point Analysis » a été employée. Cette méthode d'analyse permet séparer l'ensemble des points sur le graphique, obtenus pour chaque souris, en deux segments. Par conséquent, cette analyse met en évidence un point de cassure (X0) entre les deux droites obtenues, indiquant ainsi un changement de pente. Ce X0 correspond au moment t auquel la force des pattes postérieures à commencer à diminuer. Ensuite, un t-test a été réalisée pour comparer l'ensemble des X0 des souris hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-}. Le t-test a également été employée pour l'étude du poids des souris. Pour les autres expériences, une analyse ANOVA à deux voies suivie d'un test de Bonferroni a été utilisée.

IV. Résultats

Avant d'étudier l'impact qu'aurait la suppression de l'AMPK α 2 sur le cours de la SLA familiale, il nous a semblé nécessaire de s'intéresser à l'expression de cette protéine dans un des types cellulaires fortement impliqués dans la pathologie, à savoir les astrocytes. Dans le même but, l'analyse du profil d'expression de l'AMPK α 2 dans le système nerveux central (SNC) a permis de compléter l'analyse réalisée sur les astrocytes. Enfin, la comparaison de la motricité des souris hSOD1^{G93A} aux souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} pourrait aider à déterminer si la sous-unité AMPK α 2 est impliquée dans la progression de la pathologie.

1. Caractérisation de l'AMPK dans les astrocytes exposés ou non à divers médiateurs

La contribution des astrocytes à la dégénérescence des motoneurones dans le cadre de la SLA a été soulignée plus tôt. En effet, il semble que les nombreuses fonctions normalement assurées par les astrocytes ne soient plus accomplies correctement chez les patients atteints de SLA et les modèles animaux de la maladie. Rappelons que le rôle des astrocytes ne se limite pas au soutien physique des neurones mais s'est révélé être beaucoup plus complexe. En effet, ces cellules se sont montrées plus impliquées que ce que l'on ne le croyait dans les fonctions du SNC et se sont vues attribuer une multitude de rôles très importants. Ainsi, ces cellules gliales sont impliquées entre autres dans le support physique et le support métabolique des neurones, et dans le contrôle de la transmission de l'information.

Afin de contribuer à l'ensemble de ces fonctions, les astrocytes, comme toutes autres cellules, nécessitent un apport d'énergie constant et une régulation fine de la balance entre l'apport et la consommation de cette énergie. Dans la plupart des cellules de l'organisme, l'homéostasie de l'énergie requiert l'AMPK, sensible aux changements de concentrations en ATP. Suite à la déplétion en ATP qui a été observée chez les patients atteints de SLA et les modèles animaux de la maladie, il y a lieu de se demander si la régulation de l'expression et de l'activité de l'AMPK est modifiée dans le cadre de la maladie. Contre toute attente, peu de chercheurs se sont intéressés à la caractérisation de l'AMPK dans le système nerveux et encore moins dans les différentes cellules qui le composent. Turnley et ses collègues ont tout de même montré que l'AMPK α 2 était retrouvée principalement dans les neurones et les astrocytes activés (Turnley et al., 1999b). Par conséquent, il a été décidé d'étudier l'expression et l'activité de l'AMPK dans les astrocytes issus de rats développant la SLA (hSOD1^{G93A}) et de les comparer à celles retrouvées dans les astrocytes issus de rats wild-types (WT).

1.1. Pureté des cultures primaires d'astrocytes corticaux

Les cultures primaires d'astrocytes sont effectuées au départ de cortex de rats WT ou hSOD1^{G93A}. Le cortex étant composé de plusieurs types cellulaires autres que les astrocytes, tels que les cellules microgliales, les neurones, les oligodendrocytes et les fibroblastes, il est nécessaire de séparer les astrocytes des autres types cellulaires. Pour ce faire, nous employons

une méthode de séparation par densité à base de percoll. Cette méthode s'est révélée être très efficace pour isoler les astrocytes du reste des cellules. Il est toutefois indispensable de contrôler la présence de cellules contaminantes dans nos cultures afin d'éviter d'introduire un biais lors de l'analyse des résultats. En effet, une contamination importante de nos cultures pourrait influencer la morphologie et la physiologie des astrocytes.

Afin de contrôler la pureté de nos cultures, une analyse immunohistochimique a été réalisée visant à détecter d'une part la GFAP, un filament intermédiaire présent uniquement dans les astrocytes et d'autre part CD11b, une intégrine présente à la surface des cellules microgliales. Ce marquage immunohistochimique témoigne une contamination particulièrement limitée de nos cultures d'astrocytes puisque 98.2% des cellules expriment la GFAP. À l'origine de cette faible contamination, on trouve vraisemblablement les cellules microgliales, les oligodendrocytes et les fibroblastes. La présence de cellules microgliales est la plus à craindre puisqu'en sécrétant, entre autres, des facteurs inflammatoires et de l'ATP, ces cellules peuvent activer les astrocytes. La présence d'oligodendrocytes et de fibroblastes pourraient biaiser l'analyse de l'expression de notre protéine d'intérêt. Toutefois, au vu de la faible contamination, l'ensemble de ces cellules ne devrait pas influencer les astrocytes de manière importante.

1.2. Analyse de l'expression du gène codant pour l'AMPK α 2 dans les astrocytes soumis à l'influence de divers médiateurs

La première expérience qui a été réalisée pour caractériser l'AMPK α 2 dans les astrocytes corticaux est l'étude de l'expression génique de cette protéine par RT qPCR.

L'expression génique de la protéine a été analysée dans des cultures primaires d'astrocytes corticaux sous l'influence de plusieurs médiateurs : une condition contrôle pour laquelle les astrocytes sont maintenus dans un milieu de culture additionné de 3% de FBS, une condition d'activation et de croissance induite par l'ajout de G5 dans le milieu, et une condition inflammatoire suscitée par l'addition de TNF α . Rappelons que l'inflammation est l'une des caractéristiques clefs de la SLA puisqu'elle est connue pour sa toxicité envers les cellules gliales et les motoneurones. L'ajout de G5 dans le milieu a lieu 7 jours avant l'expérience alors que le TNF α est laissé durant 24 heures en contact avec les cellules, c'est-à-dire la veille de l'expérience.

Afin d'étudier l'expression génique de l'AMPK α 2 par RT qPCR plusieurs couples d'amorces ont été testés. Il a été choisi d'utiliser le couple d'amorces mis au point lors des travaux expérimentaux effectués par Lim (Lim et al., 2012). Ce couple d'amorce s'est avéré être très efficace et permet d'éviter le risque de faux positifs suite à des problèmes internes au laboratoire.

Origine	F/R	Primer (5' vers 3')	Taille du fragment	Espèce
(Lim et al., 2012)	Forward	agctcgcagtggcttatcat	179 paires de base	Rat/souris
	Reverse	ggggctgtctgctatgagag		Rat/souris

De prime abord, une concentration standard en ADNc a été utilisée pour étudier l'influence de plusieurs médiateurs sur les astrocytes contrôles ou hSOD1^{G93A}, à savoir 2 ng/10µl. Il s'est avéré que l'AMPK α 2 est très peu exprimée dans les astrocytes et qu'à cette concentration, l'analyse du profil d'expression est impossible. La quantification qu'à fait Turnley par northern blot et immunomarquage révèlent effectivement une faible expression de l'AMPK α 2 dans les astrocytes corticaux (Turnley et al., 1999c). Afin de remédier à ce problème, la concentration en ADNc a été augmentée d'un facteur 8, c'est à dire à 16ng/10µl. Dans ce cas, le nombre de cycles seuils obtenus pour chaque échantillon se situent dans une gamme acceptable pour l'analyse, écartant dès lors la probabilité de faux positifs. Par ailleurs, la spécificité de l'amplification est confirmée par les courbes de fusion.

L'analyse de l'expression génique de l'AMPK α 2 dans les cultures d'astrocytes a révélé une différence hautement significative ($P < 0.001$) de la transcription du gène codant pour l'AMPK α 2 entre les astrocytes WT et hSOD1^{G93A}. En effet, les astrocytes hSOD1^{G93A} expriment l'isoforme α 2 de façon plus importante que les astrocytes WT. Comparés aux astrocytes WT, les astrocytes hSOD1^{G93A} montrent une expression génique de l'AMPK α 2 significativement plus élevée et ce, dans la condition contrôle et les deux conditions d'activation utilisées. En effet, on observe une différence entre les astrocytes hSOD1^{G93A} et les astrocytes WT au niveau de l'expression génique de l'AMPK α 2. Cette différence correspond à 7.6% en condition contrôle, 5,3% en présence de du cocktail de facteurs de croissance (G5) et de 9.1% suite à l'addition de TNF- α . Par contre, aucune différence significative n'a été observée au sein d'un même type d'astrocytes, WT ou hSOD1^{G93A}, sous l'influence des divers médiateurs.

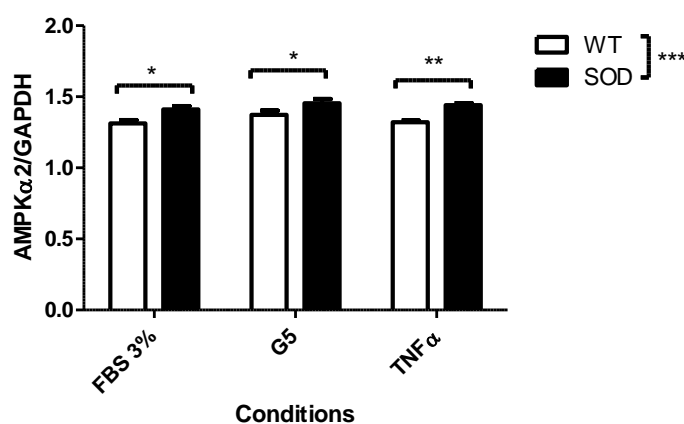


Figure 1 : étude de l'expression génique de l'AMPK α 2 dans des cultures primaires d'astrocytes corticaux soumis à l'influence de divers médiateurs (G5 ou TNF α) ou en condition contrôle (FBS 3%). L'analyse statistique comprend une ANOVA deux voies

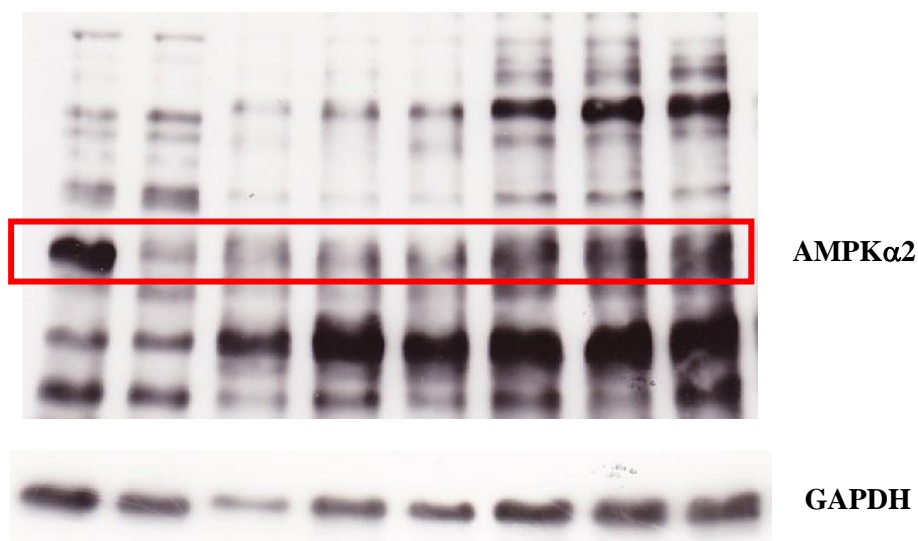
suivie d'un post-test de Bonferroni et a été effectuée sur 3 séries d'échantillons (n=3). (* ou $p<0.05$ = significatif ; ** ou $p<0.01$ = hautement significatif, *** ou $p<0.001$ = très hautement significatif).

1.3. Analyse de l'expression protéique de l'AMPK dans les astrocytes soumis à l'influence de divers médiateurs

Puisque l'expression génique de l'AMPK α 2 est plus importante dans les astrocytes hSOD1^{G93A} que dans les astrocytes WT, il a été décidé d'examiner l'expression de la protéine dans ces deux types d'astrocytes par western blot.

Dans la littérature, l'AMPK α 2 est connue pour posséder un poids moléculaire de 69 kDa. Afin d'être certain d'analyser la bonne protéine sur les membranes, des échantillons provenant respectivement de cortex cérébral de souris AMPK α 2^{+/+} ou AMPK α 2^{-/-} ont été utilisés comme contrôles positif et négatif.

L'analyse du profil d'expression protéique de l'AMPK α 2 suit le profil d'expression génique de la sous-unité puisque l'expression protéique de l'AMPK α 2 est significativement plus élevée ($p<0.01$) dans les astrocytes hSOD1^{G93A} que dans les astrocytes WT. Par ailleurs, une différence significative de l'expression de la protéine est rencontrée en présence d'un cocktail de facteurs de croissance (G5). En effet, l'AMPK α 2 est 2,5 fois plus exprimée dans les astrocytes hSOD1^{G93A} que dans les astrocytes WT. L'expression de l'AMPK α 2 tend également à être plus élevée dans les astrocytes hSOD1^{G93A} en condition contrôle (FBS3%) et en présence de médiateurs inflammatoires (TNF- α) que dans les astrocytes WT. Cette tendance devrait être confirmée par la répétition de l'expérience. Enfin, il semble que l'expression de l'AMPK α 2 soit réduite de moitié dans les astrocytes WT sous l'influence de facteurs de croissance (G5) comparé aux astrocytes en condition contrôle. De façon surprenante, cette tendance n'est pas observée dans les astrocytes hSOD1^{G93A} puisque l'expression de l'AMPK α 2 semble équivalente en fonction des divers médiateurs.



$\alpha 2^{+/+}$	$\alpha 2^{-/-}$	WT	WT	WT	SOD	SOD	SOD
		3%	G5	TNF α	3%	G5	TNF α

Figure 2 : étude de l'expression protéique de l'AMPK $\alpha 2$ dans des cultures primaires d'astrocytes corticaux soumis à l'influence de divers médiateurs (G5 ou TNF α) ou en condition contrôle (FBS 3%).

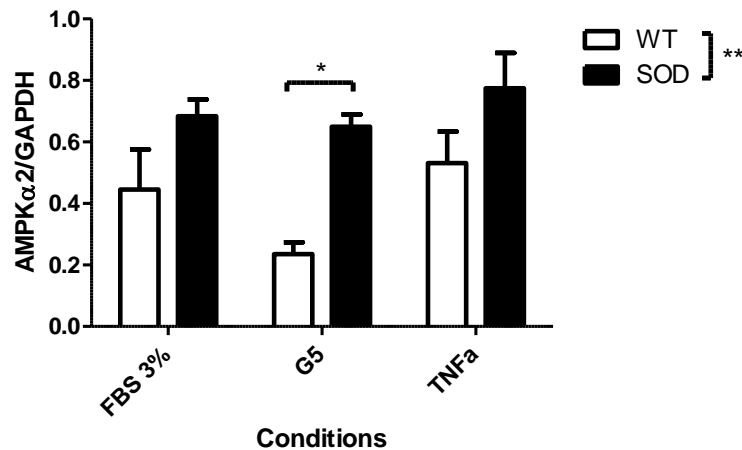


Figure 3 : étude de l'expression protéique de l'AMPK $\alpha 2$ dans des cultures primaires d'astrocytes corticaux soumis à l'influence de divers médiateurs (G5 ou TNF α) ou en condition contrôle (FBS 3%). L'analyse statistique utilisée est une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni (n=3). (* ou p<0.05 = significatif).

De manière générale, l'expression génique et protéique de l'AMPK $\alpha 2$ est plus élevée dans les astrocytes hSOD1^{G93A} que dans les astrocytes contrôles. Cette différence d'expression est probablement due à la diminution de la production d'ATP observée dans la pathologie. En effet, comme cela a été expliqué antérieurement, l'association de la SOD1^{MT} aux protéines de des mitochondries conduit au dysfonctionnement de cet organelle et à l'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale. Par conséquent, il s'en suit une diminution de la production d'ATP suivi d'un stress cellulaire important (Field et al., 2003c). (Fukuda et al., 2004b). Cette baisse chronique de la concentration en ATP intracellulaire pourrait conduire à la suractivation de l'AMPK, un phénomène proposé comme néfaste pour une cellule en condition de stress (Ronnett et al., 2009). En plus d'activer la protéine, cette baisse d'ATP pourrait renforcer l'expression de l'AMPK $\alpha 2$ dans les astrocytes hSOD1^{G93A}. Par ailleurs, on aurait pu s'attendre à ce que l'inflammation induise une hausse de l'expression de l'AMPK $\alpha 2$ dans les astrocytes WT et hSOD1^{G93A} puisque le TNF- α est connu pour augmenter l'activité de la protéine (Steinberg et al., 2006).

1.4. Activité de l'AMPK dans les astrocytes soumis à l'influence de divers médiateurs

L'analyse de l'activité de la protéine permet de compléter la caractérisation de l'AMPK dans les astrocytes. En effet, puisque l'expression de l'AMPK α 2 est plus importante dans les astrocytes hSOD1^{G93A}, il se pourrait que l'activité de la protéine soit également modifiée. Lorsque les astrocytes WT sont maintenus dans un milieu contenant 3% de FBS, l'activité de l'AMPK est faible, alors qu'elle semble augmentée dans les astrocytes WT soumis à l'influence de facteurs de croissance et ce, d'une vingtaine de fois. Dans les astrocytes hSOD1^{G93A}, l'activité de l'AMPK en condition contrôle est 15 fois plus importante que dans les astrocytes WT. Par contre, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les astrocytes hSOD1^{G93A} en condition contrôle et ces mêmes astrocytes soumis à l'influence de facteurs de croissance.

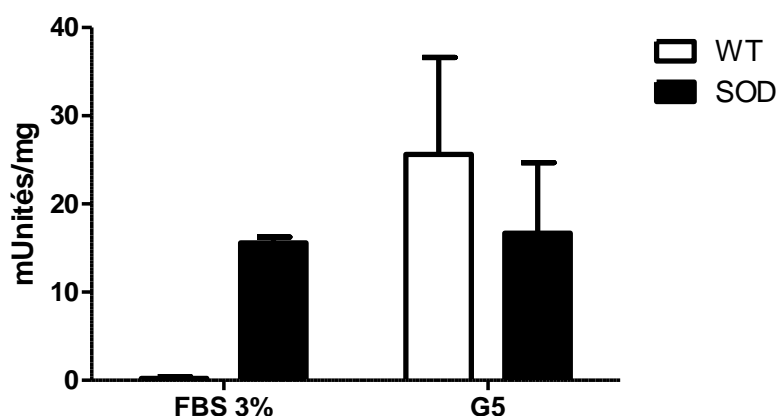


Figure 4 : étude de l'activité de l'AMPK dans des cultures primaires d'astrocytes corticaux soumis à l'influence de facteur de croissance (G5) ou en condition contrôle (FBS 3%). L'analyse statistique utilisée est une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni (n=2).

L'AMPK est une enzyme impliquée dans de nombreuses voies métaboliques telle que le métabolisme des hydrates de carbones et des acides gras, ainsi que dans la croissance cellulaire et l'apoptose. Les facteurs de croissance que l'on applique sur les astrocytes induisent leur prolifération cellulaire, un processus très coûteux en énergie. Ainsi, l'augmentation de l'activité de l'AMPK observée dans les astrocytes WT soumis à l'influence de facteurs de croissance serait mise en place en vue de conserver un taux optimal d'ATP, nécessaire pour la synthèse des constituants cellulaires et la prolifération.

Dans les astrocytes WT, alors que l'activité de l'AMPK s'élève sous l'influence de facteurs de croissance, le taux d'expression de l'AMPK α 2 est quant à lui diminué par rapport à la condition contrôle. Par ailleurs, l'activité de l'AMPK est peu détecté dans les astrocytes WT en condition contrôle alors que le taux d'expression de l'AMPK α 2 est d'ordre moyen dans ces mêmes astrocytes. Il semble donc y avoir une corrélation négative entre l'activité de la protéine et son expression dans les astrocytes WT. En effet, il se pourrait qu'il y ait un

mécanisme de régulation qui tend à diminuer le taux d'AMPK α 2 en cas de forte activation, un processus qui pourrait être mis en place afin d'éviter les effets néfastes de la suractivation de l'AMPK en cas de stress cellulaire. Plusieurs études concernant l'ischémie ont effectivement révélé que la suractivation de l'AMPK pouvait être néfaste pour les cellules (Ronnelt et al., 2009).

Par contre, les astrocytes hSOD1^{G93A}, montrent, quant à eux, un niveau d'activation de l'AMPK très élevé, même en condition contrôle. Ceci s'expliquerait par la forte diminution de la concentration d'ATP recensée dans ces cellules et causée par l'agrégation de la SOD1^{MT} aux protéines des mitochondries. Lorsque ces astrocytes sont traités par le cocktail de facteurs de croissance, aucun changement d'activité n'est observé alors qu'une diminution a été observée pour les astrocytes WT. Il se pourrait donc que les astrocytes hSOD1^{G93A} aient atteint un niveau d'activation maximal qui ne permette pas une activation plus importante en cas de prolifération cellulaire. Par ailleurs, l'activité de l'AMPK n'a pas été étudiée dans les astrocytes en présence de TNF- α mais plusieurs expériences ont montré que le TNF α pouvait diminuer l'activité de l'AMPK dans plusieurs types cellulaires, tels que les muscles et les adipocytes {Steinberg, Michell, et al. 2006 1 /id}.

Les tendances observées nécessitent toutefois d'être confirmées. En effet, seules deux séries d'échantillons ont été utilisées pour étudier l'activité de l'AMPK et malgré que cette activité apparaisse identique entre les différentes expériences pour les astrocytes contrôles, elle semble très variable sous l'influence de médiateurs. En effet, cette variabilité est également retrouvée lors de l'application d'autres médiateurs que le G5 (non illustré).

Enfin, il faut reconnaître les limites de cette expérience puisque cette étude ne permet pas de distinguer l'activité des deux isoformes de la sous-unité α de l'AMPK. Malgré que Turnley ait montré que l'expression de l'AMPK α 1 était quasi nulle dans les astrocytes, cela ne suffit pour considérer que l'activité étudiée provient seulement de l'AMPK α 2.

1.5. Limites de l'utilisation des cultures d'astrocytes

Premièrement les astrocytes sont issus de rats nouveau-nés, c'est-à-dire lorsque la maladie ne s'est pas encore déclarée. Malgré que la présence de modifications biochimiques déjà présentes à cet âge, on pourrait se demander si les astrocytes hSOD1^{G93A} en culture sont réellement comparables aux astrocytes retrouvés dans les rats hSOD1^{G93A} au stade symptomatique de la maladie. Néanmoins, la culture d'astrocytes adultes n'a pas encore pu être mise en place.

En outre, il faut rappeler que les conditions de cultures ne sont pas représentatives de l'environnement physiologique des cellules puisque les éléments nutritifs et autres éléments nécessaires à la survie des cellules se trouvent en hautes concentrations dans le milieu de culture. En effet, les concentrations en glucose utilisées dans ce cas-ci sont le double (5.56 mM) des concentrations retrouvées en conditions physiologiques (0.82 à 2.4 mM) (Ronnelt et

al., 2009). Il se pourrait donc que les astrocytes maintenus dans leur environnement naturel aient un profil d'expression et d'activation différent de ce qui a été observé ici. Par conséquent, il faudrait répéter les expériences sur des astrocytes dans un milieu proche du milieu physiologique, c'est-à-dire possédant, en autres, des concentrations en glucose et en NO proches des concentrations physiologiques car ces substances peuvent influencer le cours de la pathologie.

2. Caractérisation de l'AMPK dans le système nerveux central

Puisqu'une différence de l'expression de l'AMPK α 2 a été observée dans les astrocytes issus de cortex de rats WT et hSOD1^{G93A}, il est intéressant d'examiner le profil d'expression de la sous-unité dans le SNC. En effet, il se pourrait que l'expression de l'isoforme α 2 soit également plus importante dans le SNC des animaux hSOD1^{G93A} que celui des animaux WT et suive donc le profil présent dans les astrocytes.

L'expression de l'AMPK est bien documentée dans les muscles, le cœur ou encore le foie mais la caractérisation de son expression dans le SNC est peu étudiée. Gao et Stapleton ont signalé la présence d'AMPK dans le cerveau en 1995 (Gao et al., 1995c; Gao et al., 1996b) (Stapleton et al., 1996) mais leur description reste assez sommaire. Ce n'est que quelques années plus tard que Turnley et ses collègues ont localisé les différents isoformes de l'AMPK dans le SNC. Alors que l'expression de l'AMPK α 2 est relativement variable suivant les régions du SNC étudiées, la présence d'AMPK α 1 est quasi nulle dans le SNC et son expression est restreinte au neuropile. Dans le cortex et la moelle épinière, l'AMPK α 2 est surtout exprimée dans certains types cellulaires particuliers à savoir dans certains neurones, tels que les motoneurones, et dans les astrocytes activés (Turnley et al., 1999d). Puisque l'AMPK α 2 est la sous-unité principalement exprimée dans le SNC, l'expression génique et protéique de cette sous-unité a été examinée dans le cortex et la moelle épinière de rats sains ou hSOD1^{G93A}. Afin d'être le plus précis possible la moelle épinière a été étudiée selon ses trois parties principales, à savoir cervicale, thoracique et lombaire.

Dans cette étude, seules les SLA de formes spinales lombaire ont été examinées. Ce choix repose d'une part sur la fréquence plus accrue des formes spinales lombaires et d'autre part sur l'impossibilité de réaliser une analyse correcte avec plusieurs phénotypes différents. En effet, dans les formes bulbaires, les muscles touchés sont principalement ceux de la face et de la déglutition alors que dans les formes cervicales et lombaires, ce sont respectivement les muscles des membres supérieurs et inférieurs qui sont ciblés par la paralysie. Par conséquent, prendre en compte toutes les formes de SLA rendrait l'étude trop complexe et introduirait de nombreux biais.

2.1. Analyse de l'expression du gène codant pour l'AMPK dans différents tissus nerveux

Afin d'étudier l'expression génique de l'AMPK α 2 dans le SNC, le cortex et la moelle épinière de rats sains et de rats hSOD1^{G93A} ont été prélevés et ce, à différents stades de la maladie pour les rats hSOD1^{G93A} et aux jours correspondant pour les rats WT. En effet, la SLA est caractérisée par plusieurs stades correspondant à différents âges chez le rat : non symptomatique (60 jours), pré-symptomatique (120 jours), symptomatique (150 jours) et la fin de vie. Afin d'obtenir un contrôle pour les animaux en fin de vie, les tissus ont été prélevés arbitrairement à 195 jours chez les rats WT. Il faut savoir que les rats élevés dans notre laboratoire débutent les symptômes à 150.8 jours de moyenne, variant de 147 à 158 jours. Malgré tout, l'analyse de l'expression de l'AMPK α 2 dans les tissus issus de rats non-symptomatiques et pré-symptomatiques peut se révéler très intéressante puisque des modifications biochimiques pourraient déjà se mettre en place à ces stades.

L'analyse de la quantification de l'ADNc par RT qPCR n'indique aucune différence au niveau de l'expression génique de l'AMPK α 2 dans le cortex et la moelle épinière issus d'animaux WT ou hSOD1^{G93A} aux différents âges étudiés. Par ailleurs, aucune différence significative n'a pu être observée entre les animaux WT et ceux surexprimant la hSOD1^{G93A}. Par conséquent, la maladie ne semble avoir aucune influence sur l'expression génique de l'AMPK α 2 dans le cortex et la moelle épinière. Le cours de la maladie n'influencerait pas non plus l'expression de l'AMPK α 2 dans ces tissus.

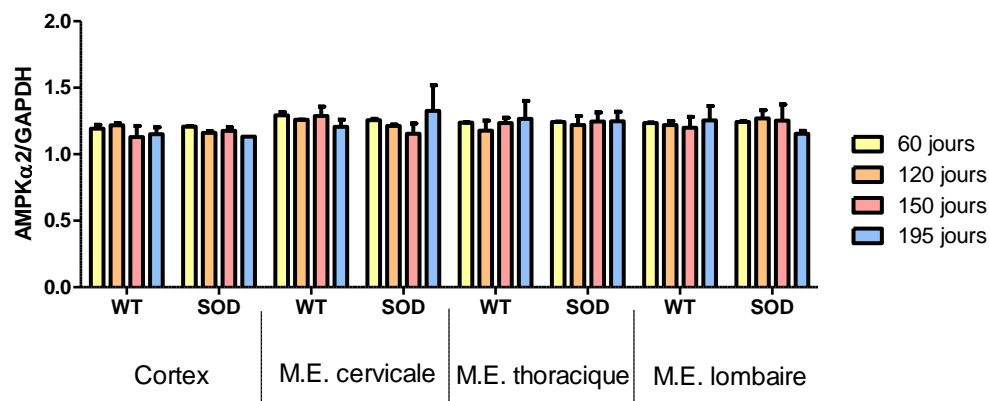


Figure 5 : étude l'expression génique de l'AMPK α 2 dans le cortex et les moelles épinières cervicale, thoracique et lombaire chez les rats WT et surexprimant la protéine hSOD1^{G93A}. Ces tissus sont prélevés aux différents stades de la maladie : stade non symptomatique (60 jours), stade présymptomatique (120 jours), stade symptomatique (150 jours) et en fin de vie. Les tissus des animaux sains ont également été prélevés à 60, 120 et 150 jours mais le stade de fin de vie correspond, chez les animaux WT, à 195 jours. L'analyse statistique comprend une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni et a été effectuée sur 2 séries d'échantillons (n=2).

2.2. Analyse de l'expression protéique de l'AMPK α 2 dans différents tissus nerveux

Puisque l'expression génique de l'AMPK α 2 a été réalisée, il convient dès lors d'étudier son expression protéique par western blot dans le cortex et la moelle épinière cervicale, thoracique et lombaire.

2.2.1. Le cortex

Dans le cortex, l'analyse de l'expression de l'AMPK α 2 des animaux WT et hSOD1^{G93A} révèle un profil d'expression semblable. En effet, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les rats WT et hSOD1^{G93A}. En effet, dans les cortex issus de rats hSOD1^{G93A}, l'expression de l'isoforme α 2 tend à être similaire et n'est donc pas modifiée par le cours de la maladie. Dans les animaux WT, l'expression de la sous-unité est également invariable au cours de l'âge.

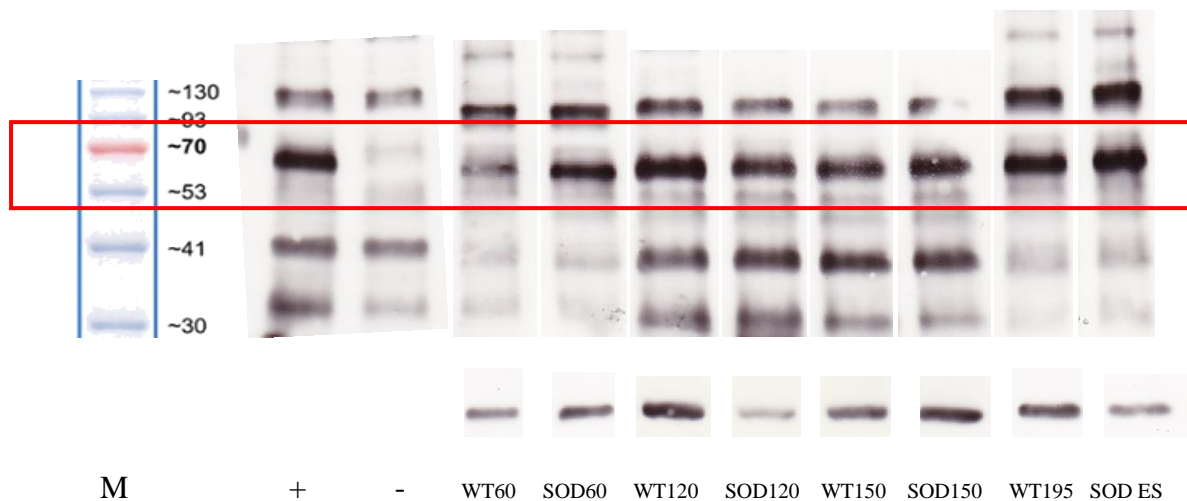


Figure 6: étude de l'expression protéique de l'AMPK α 2 dans le cortex chez les rats WT et surexprimant la protéine hSOD1^{G93A}. Ces tissus sont prélevés aux différents stades de la maladie (M = marqueur de poids moléculaire, « + » = contrôle positif chez des souris AMPK α 2 +/+, « - » = contrôle négatif provenant de souris AMPK α 2-/-, WT60 = tissus issus de rats WT à 60 jours, SOD60 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 60 jours, WT120 = tissus issus de rats WT à 120 jours, SOD120 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 120 jours, WT150 = tissus issus de rats WT à 150 jours, SOD150 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 150 jours, WT195 = tissus issus de rats WT à 195 jours, SOD ES = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} en fin de vie (end stage).

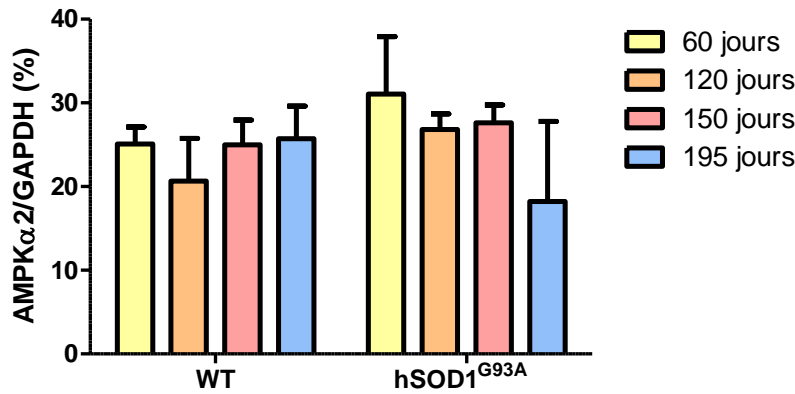


Figure 7 : Analyse statistique de l'expression de l'AMPKα2 dans le cortex chez les rats WT et surexprimant la protéine hSOD1^{G93A}. Ces tissus sont prélevés aux différents stades de la maladie. L'analyse statistique comprend une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni et a été effectuée sur 3 séries d'échantillons (n=3).

2.2.2. La moelle épinière cervicale

Dans la partie rostrale de la moelle, c'est-à-dire la partie cervicale, l'expression de l'AMPKα2 est plus importante chez les rats hSOD1^{G93A} comparés aux rats WT (p<0.05). Par ailleurs, l'expression de la sous-unité est constante tout au long de la période de temps étudiée chez les animaux sains alors qu'elle est augmentée de manière significative en fin de vie des animaux atteints de SLA (p<0.05). En effet, l'expression protéique de l'AMPKα2 est doublée en fin de vie des animaux hSOD1^{G93A} par rapport aux stades non symptomatiques.

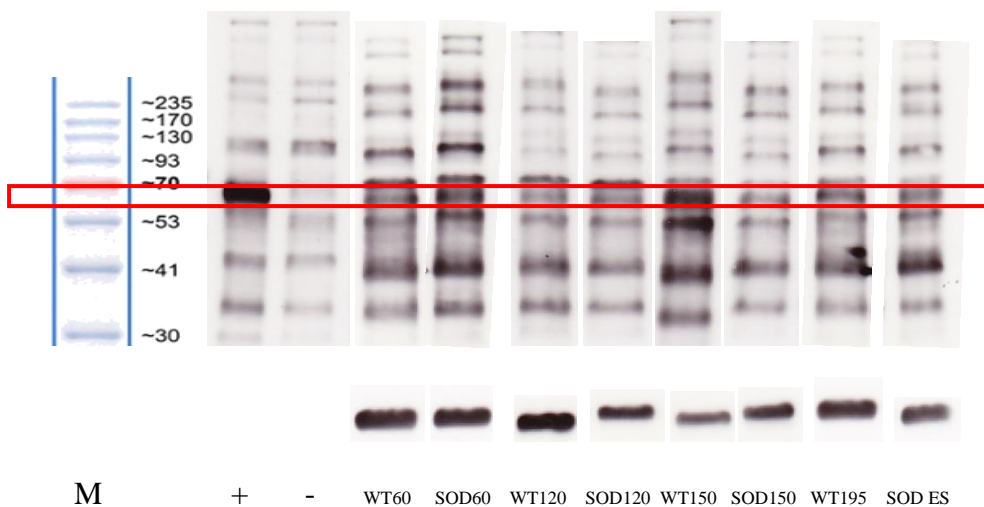


Figure 8 : étude de l'expression protéique de l'AMPKα2 dans la moelle cervicale chez les rats WT et surexprimant la protéine hSOD1^{G93A}. Ces tissus sont prélevés aux différents stades de la maladie. (M = marqueur de poids moléculaire, « + » = contrôle positif chez des souris AMPKα2 +/+, « - » = contrôle négatif provenant de souris AMPKα2 -/-, WT60 = tissus issus de rats WT à 60 jours, SOD60 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 60 jours, WT120 = tissus issus de rats WT à 120 jours, SOD120 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 120 jours, WT150 = tissus issus de rats WT à 150 jours, SOD150 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 150 jours, WT195 = tissus issus de rats WT à 195 jours, SODES = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} en fin de vie (end stage).

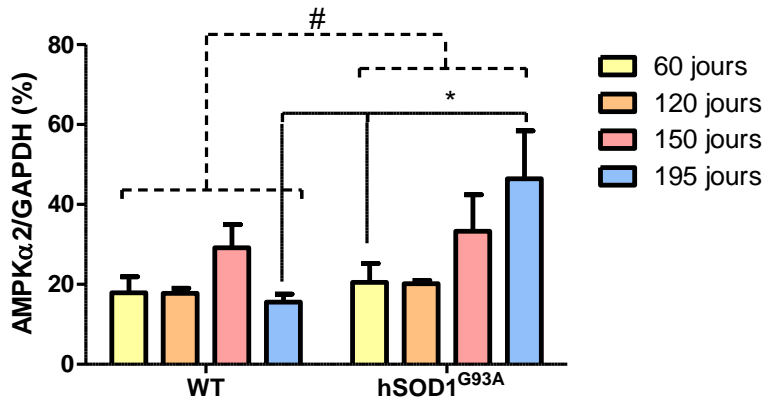


Figure 9 : Analyse statistique de l'expression de l'AMPKα2 dans la partie cervicale de la moelle épinière chez les rats WT et surexprimant la protéine hSOD1^{G93A}. Ces tissus sont prélevés aux différents stades de la maladie. L'analyse statistique comprend une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni et a été effectuée sur 3 séries d'échantillons (n=3). (* et # ou p<0.05 = significatif).

2.2.3. La moelle épinière thoracique

Dans la partie thoracique de la moelle épinière, l'expression de la sous-unité α2 de l'AMPK est également constante aux âges étudiés chez les animaux WT. Par contre, lorsque les symptômes apparaissent, c'est-à-dire à 150 jours, cette sous-unité est deux fois moins exprimée dans les tissus des animaux hSOD1^{G93A} que dans les tissus WT (p<0.05). Par ailleurs, l'expression de l'AMPKα2 tend à être augmentée en fin de vie des animaux SLA par rapport aux autres stades étudiés.

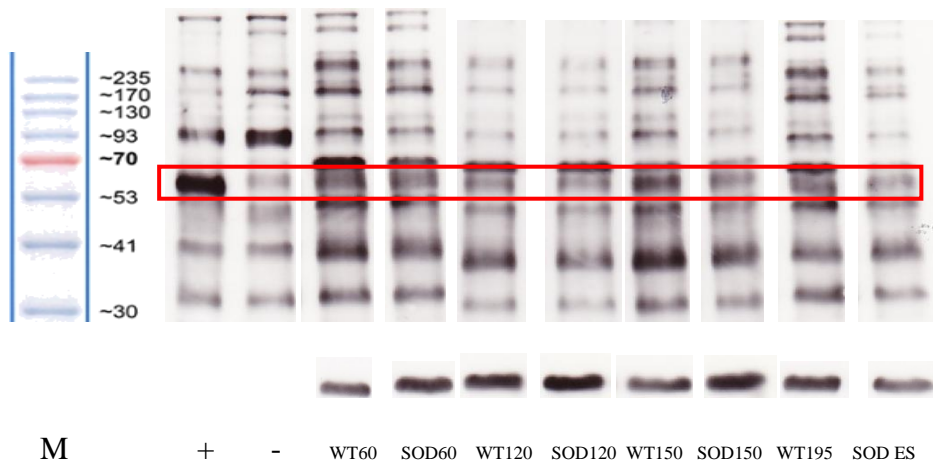


Figure 10 : étude de l'expression protéique de l'AMPKα2 dans la moelle thoracique chez les rats WT et surexprimant la protéine hSOD1^{G93A}. Ces tissus sont prélevés aux différents stades de la maladie. (M = marqueur de poids moléculaire, « + » = contrôle positif chez des souris AMPKα2 +/+, « - » = contrôle négatif provenant de souris AMPKα2 -/-, WT60 = tissus issus de rats WT à 60 jours, SOD60 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 60 jours, WT120 = tissus issus de rats WT à 120 jours, SOD120 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 120 jours, WT150 = tissus issus de rats WT à 150 jours, SOD150 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 150 jours, WT195 = tissus issus de rats WT à 195 jours, SOD ES = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} en fin de vie (end stage).

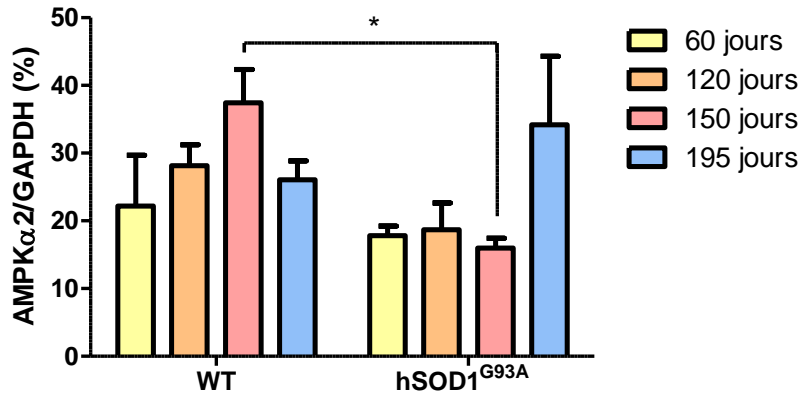


Figure 11 : Analyse statistique de l'expression de l'AMPKα2 dans la partie thoracique de la moelle épinière chez les rats WT et surexprimant la protéine hSOD1^{G93A}. Ces tissus sont prélevés aux différents stades de la maladie. L'analyse statistique comprend une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni et a été effectuée sur 3 séries d'échantillons (n=3). (* ou p<0.05 = significatif).

2.2.4. La moelle épinière lombaire

Dans la moelle épinière lombaire des animaux sains, l'AMPKα2 est toujours exprimée à un taux constant aux âges étudiés. Par contre, une différence de 23.53% (p<0.05) est observée au niveau de l'expression de l'AMPKα2 entre les animaux WT et hSOD1^{G93A}. En effet, cette sous-unité est moins exprimée dans la moelle lombaire issue des rats hSOD1^{G93A} que dans celle provenant de rats WT.

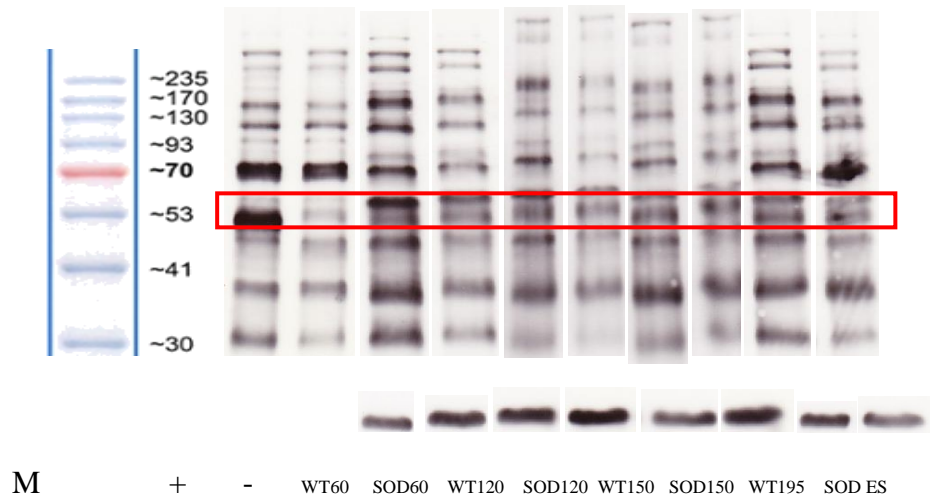


Figure 12: étude de l'expression protéique de l'AMPKα2 dans la moelle lombaire chez les rats WT et surexprimant la protéine hSOD1^{G93A}. Ces tissus sont prélevés aux différents stades de la maladie. (M = marqueur de poids moléculaire, « + » = contrôle positif chez des souris AMPKα2 +/+, « - » = contrôle négatif provenant de souris AMPKα2 -/-, WT60 = tissus issus de rats WT à 60 jours, SOD60 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 60 jours, WT120 = tissus issus de rats WT à 120 jours, SOD120 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 120 jours, WT150 = tissus issus de rats WT à 150 jours, SOD150 = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} à 150 jours, WT195 = tissus issus de rats WT à 195 jours, SODES = tissus issus de rats hSOD1^{G93A} en fin de vie (end stage).

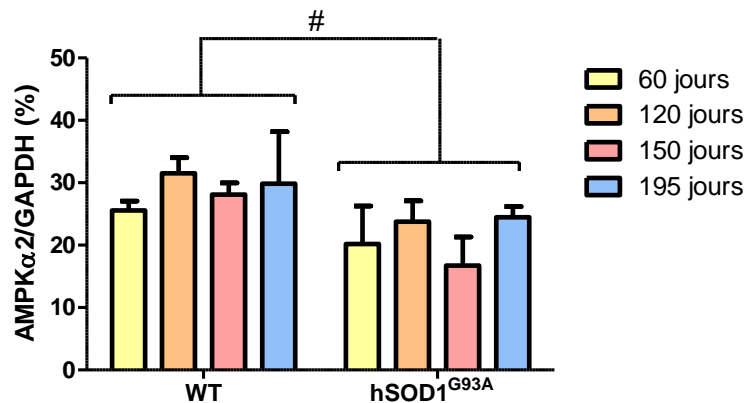


Figure 13 : Analyse statistique de l'expression de l'AMPK α 2 dans la partie lombaire de la moelle épinière chez les rats WT et surexprimant la protéine hSOD1^{G93A}. Ces tissus sont prélevés aux différents stades de la maladie. L'analyse statistique comprend une ANOVA deux voies suivi d'un post-test de Bonferroni et a été effectuée sur 3 séries d'échantillons (n=3). (# ou p<0.05 = significatif)

L'analyse de l'expression de l'AMPK α 2 dans la moelle épinière révèle une variation importante en fonction des parties étudiées mais ceci pourrait s'expliquer par l'ordre dans lequel les trois parties de la moelle épinière sont atteintes. Dans la forme spinale lombaire, il a été démontré que la dégénérescence des motoneurones inférieurs, situés dans la moelle épinière, était plus précoce que celle des motoneurones supérieurs, contenu dans le cortex. Certains tentent d'expliquer ce phénomène par une vulnérabilité plus importante des motoneurones inférieurs due leur taille plus élevée. Suite aux nombreuses modifications engendrées par l'agrégation de la SOD1, des mécanismes de réparations se mettent en place. Cependant, il se pourrait que ces mécanismes de réparation ne puissent s'établir lorsque les dommages sont causés trop loin du noyau (Field et al., 2003a). Ceci expliquerait aussi pourquoi la partie lombaire de la moelle épinière est la première à être atteinte par la dégénérescence des motoneurones lors de SLA de forme lombaire.

Les moelles thoracique et lombaire issues de rats hSOD1^{G93A} révèlent une expression plus faible de l'AMPK α 2 par rapport aux moelles thoracique et lombaire des animaux WT. Par ailleurs, une élévation de l'expression de l'AMPK α 2 est également observée dans la moelle thoracique des animaux hSOD1^{G93A} en fin de vie. Par contre, dans la partie cervicale de la moelle épinière, moins touchée par la perte des motoneurones, l'expression de l'AMPK α 2 est plus importante dans les animaux hSOD1^{G93A} que dans les animaux WT, surtout en fin de vie. Il est difficile d'attribuer ces profils d'expression à un ou plusieurs types cellulaires spécifiques. En effet, en étudiant les tissus dans leur intégralité, il faut reconnaître que d'autres cellules que les motoneurones et les astrocytes sont étudiées et prises en compte dans l'analyse du profil d'expression de l'AMPK α 2. Ainsi, même s'il y a une modification du profil d'expression de l'AMPK α 2 au cours de la maladie dans les astrocytes et les motoneurones, il se pourrait que ce phénomène soit noyé par l'expression de la protéine dans d'autres cellules moins atteintes, telles que les interneurones, la microglie et les oligodendrocytes. En outre, une modification du profil d'expression de l'AMPK α 2 serait alors visible au stade final de la maladie de par la perte importante des motoneurones.

Il serait intéressant d'étudier la modification de l'expression de l'AMPK α 2 dans la moelle épinière à des intervalles de temps plus rapprochées, surtout entre 120 et 195 jours. En outre,

l'étude de l'activité de l'AMPK permettrait de voir si cette activité tend à être similaire au profil d'expression observé ou si elle est inversement corrélée à l'expression.

3. Conséquences de la suppression de l'AMPK sur l'activité motrice chez les souris SLA

Afin de compléter les expériences biochimiques réalisées ci-dessus, l'inactivation de l'AMPK α 2 a été effectuée chez des souris hSOD1^{G93A}. Il a été choisi de supprimer la protéine et non de la surexprimer dans le cadre de la maladie car plusieurs études tendent à montrer que la suractivation de l'AMPK α 2 peut être néfaste dans certaines pathologies, telles que l'ischémie et les accidents cérébrovasculaires (Viollet et al., 2009b).

Puisque l'AMPK est fortement impliquée dans le métabolisme, le premier paramètre qui a été analysé est le poids des souris. Ensuite, pour tenter de discriminer les deux génotypes de souris étudiés, à savoir les souris hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-}, leur force musculaire, leur activité volontaire et leur démarche ont été analysées.

3.1. Comparaison de l'évolution du poids des souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} aux souris hSOD1^{G93A}

La suppression de l'AMPK α 2 dans les souris hSOD1^{G93A} entraîne une augmentation non significative du poids au moment de la mort. En rapportant le poids de chaque souris au moment de la mort sur son poids maximal mesuré lors de sa croissance, le ratio est similaire dans les deux modèles de souris. Il semble donc que les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} ont tendance à prendre plus de poids que les souris hSOD1^{G93A} au cours de leur vie mais que la perte de poids causée par la maladie soit similaire.

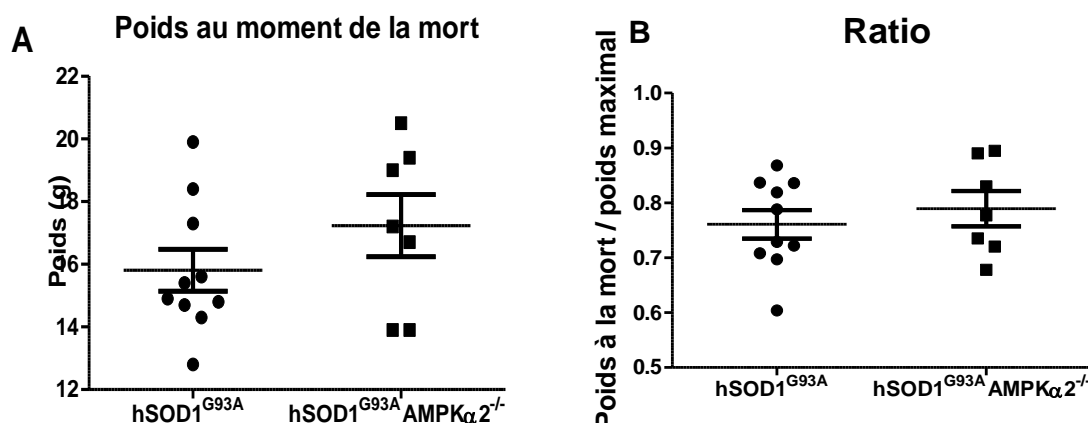


Figure 14 : étude du poids des souris hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} au moment de la mort (A) et ratio du poids des souris au moment de leur mort sur leur poids maximal (B).

maximal (B). La moyenne du poids à la mort atteint $15,8 \pm 0,7$ g (n=10) pour les souris hSOD1^{G93A} et $17,2 \pm 0,9$ g (n=7) pour les souris hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{-/-}. Lorsque ce poids est rapporté au poids maximal, le ratio est de $0,760 \pm 0,026$ (n=10) pour les souris hSOD1^{G93A} et de $0,789 \pm 0,032$ (n=7) pour les souris hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{-/-}. L'analyse statistique utilisée est un t-test non pairé.

Viollet et son équipe n'ont observé aucune différence significative entre le poids des souris WT et celui des souris AMPK α 2^{-/-}. Ceci se traduit par une masse grasseuse, un profil d'acides gras et une prise alimentaire identique entre les souris AMPK α 2^{-/-} et les souris WT (Viollet et al., 2003b). L'analyse du poids réalisée dans cette étude tend à montrer que la présence de la SOD1^{G93A} chez les souris AMPK α 2^{-/-} induirait donc une prise de poids légèrement plus élevée que les souris hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{+/+}, ceci pourrait s'expliquer par une prise alimentaire plus importante chez les souris hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{-/-}.

3.2. Comparaison du début des symptômes des souris hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{-/-} face aux souris hSOD1^{G93A} par l'analyse de la force musculaire des pattes postérieures

Chez les souris hSOD1^{G93A} développant une SLA spinale lombaire, la paralysie atteint les pattes postérieures avant les pattes antérieures. Les rares souris hSOD1^{G93A} développant une SLA cervicale ont été écartées afin de ne prendre en compte que les modèles animaux de la SLA de forme spinale lombaire. Dès lors, pour déterminer si le début des symptômes est différent entre les deux modèles de souris étudiés, à savoir hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{-/-}, la force musculaire des pattes postérieures de ces souris a été examinée par le système de mesure gripstrength. Étant donné que les souris varient entre elles par leur poids, leur taille mais aussi par leur force individuelle, une méthode statistique particulière, la « break point analysis », a été utilisée. Cette méthode, basée sur le modèle de régression linéaire segmentaire, permet de comparer chaque souris à elle-même et détermine donc le début des symptômes de façon individuelle. Lorsqu'on utilise une régression linéaire simple, une droite est créée sur l'ensemble des points du graphique, ajustant ainsi les valeurs de la pente pour trouver la droite qui prédira le mieux les coordonnées Y en fonction des coordonnées X. Par contre, la régression linéaire segmentaire divise l'ensemble des points obtenus pour chaque animal en deux segments. Par conséquent, cette analyse met en évidence un point de rupture (X0), obtenu par l'intersection entre les deux droites et indiquant dès lors un changement de pente. Ce X0 correspond, dans notre cas, au moment t auquel la force des pattes postérieures à commencer à diminuer. En réalisant ensuite un t-test pairé, il est alors possible de comparer les deux groupes de souris étudiés. Les résultats présentés ci-dessous ne révèlent aucune différence significative concernant le début des symptômes entre les souris hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A}AMPK α 2^{-/-} suite à l'étude la force musculaire des pattes postérieures.

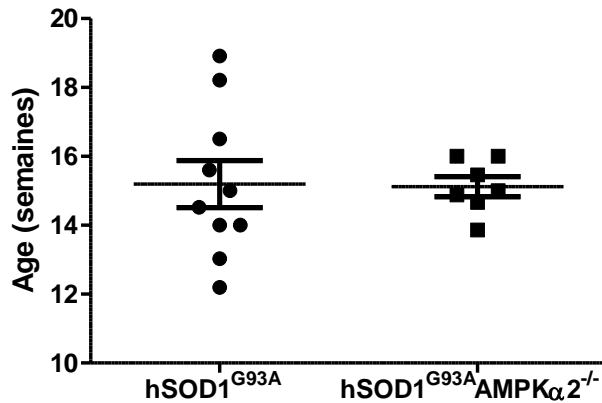


Figure 15 : étude du début des symptômes de la maladie par l'analyse de la force musculaire dans les pattes postérieures des souris hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A}AMPKα2^{-/-} : aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les deux modèles de souris (15,20 ± 0,6812 g (n=10) pour les souris hSOD1^{G93A} et 15,12 ± 0,2901 g (n=7) pour les souris hSOD1^{G93A}AMPKα2^{-/-}). L'analyse de la force musculaire requiert l'utilisation de la « break point analysis », une méthode qui permet de comparer chaque souris à elle-même. L'analyse statistique utilisée est un t-test non païré.

Néanmoins, la simple observation du comportement des souris dans leur cage a mis en évidence une différence de motricité entre les souris hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A}AMPKα2^{-/-}. Cependant, cette différence n'a pas pu être mise en évidence par l'étude de la force musculaire des pattes postérieures probablement dû la paralysie de muscles différents. En effet, il semblerait que la suppression de l'AMPKα2 limiterait la paralysie aux extrémités des pattes alors que les muscles en amont sont préservés. Il apparaît donc que les souris hSOD1^{G93A}AMPKα2^{-/-} ne puissent tout simplement plus agripper la grille de l'appareil de mesure altérant ainsi la mesure de la force des pattes postérieures. Cette hypothèse est confortée par le fait que les souris hSOD1^{G93A}AMPKα2^{-/-} soient encore capable de se déplacer en fin de vie alors que les souris hSOD1^{G93A} sont complètement paralysée des membres postérieurs. Pour tenter de mettre en évidence cette différence, d'autres tests comportementaux ont été utilisés : l'openfield et le catwalk. Ces tests comportementaux étudient respectivement l'activité volontaire et la démarche des souris.

3.3. Étude et comparaison de la mobilité des souris WT, hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A}AMPKα2^{-/-}

L'openfield consiste en une analyse des mouvements de l'animal dans une enceinte ouverte pendant une durée déterminée et sans quelconque influence de la part de l'expérimentateur. Cet outil de mesure permet ainsi l'étude de plusieurs paramètres cinétiques qui pourraient d'une aider à distinguer le comportement des souris hSOD1^{G93A} de celui des souris WT et d'autre part de déterminer quel est l'impact de l'invalidation de l'AMPKα2 sur la motricité des souris hSOD1^{G93A}. Quatre paramètres seront utilisés pour étudier la motricité des souris : la distance parcourue, le temps en mouvement, la durée de l'immobilité et la vitesse à laquelle les souris explorent l'openfield. Gerber et son équipe ont montré que la distance parcourue par les souris dans l'openfield commençait à diminuer à partir du 102^e jour de vie (Gerber et al., 2012a).

L'analyse de la **distance parcourue** ne permet pas à ce stade de différencier les souris WT des souris hSOD1^{G93A}. Cependant, une différence pourrait sûrement être observée entre les souris WT et hSOD1^{G93A} une fois que la paralysie installée.

Malheureusement, une grande partie des données concernant les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} sont indisponibles pour le moment suite à un problème informatique nous y empêchant l'accès. Dès le 95^e jour de vie, on remarque que les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} parcourent une distance significativement ($p < 0.05$) plus faible que les souris hSOD1^{G93A} et WT lorsqu'elles sont laissées dans l'openfield durant une période de 20 minutes. En effet, les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} parcourent une distance trois fois moindre que les souris WT et hSOD1^{G93A}.

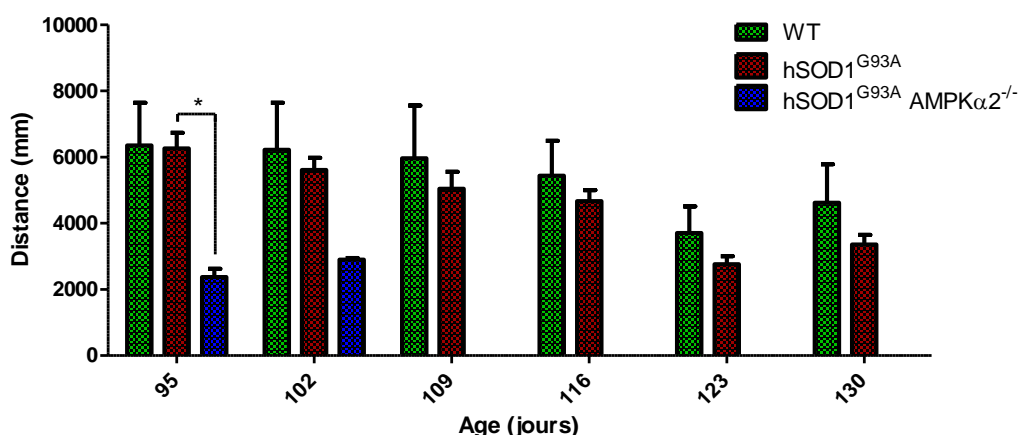


Figure 16 : L'analyse de la distance parcourue indique une diminution de cette distance avec l'âge ($p < 0.001$) qui est identique pour les souris WT ($n=4$) et les souris hSOD1^{G93A} ($n=11$). Les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} ($n=2$) montrent quant à elle une distance parcourue plus faible que les souris hSOD1^{G93A} dès 95 jours ($p < 0.05$). L'analyse statistique utilisée est une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni pour comparer les souris WT et hSOD1^{G93A} alors qu'il s'agit d'une One way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey pour comparer les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} aux deux autres. (* ou $p < 0.05$ = significatif).

L'analyse du **temps en mouvement** ne permet pas non plus de différencier les souris hSOD1^{G93A} des souris WT. Par contre, les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} possèdent un temps en mouvement trois fois plus faible ($p < 0.01$) que les souris WT et hSOD1^{G93A} dès le 95^e jour de vie. Cette différence tend à se maintenir, de façon moins prononcée, une semaine après.

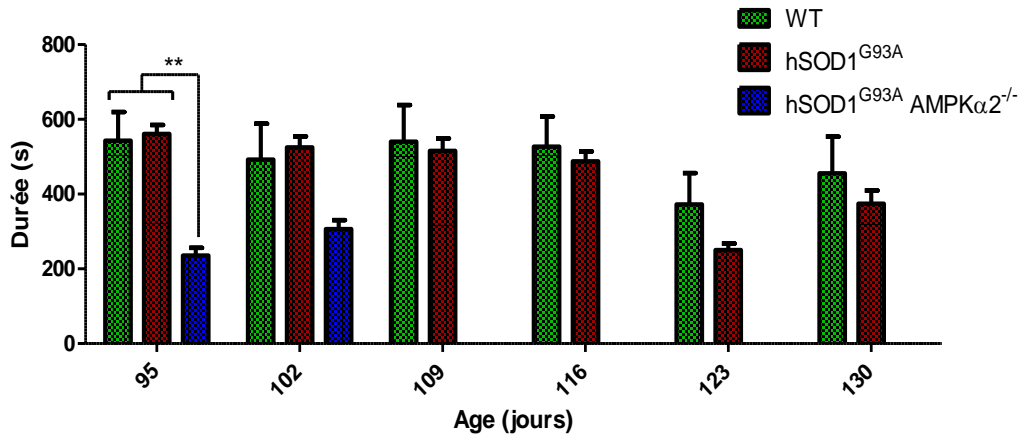


Figure 17 : L'analyse du temps en mouvement révèle une diminution avec l'âge ($p < 0.001$) qui est identique pour les souris WT ($n=4$) et les souris hSOD1^{G93A} ($n=11$). Les souris hSOD1^{G93A} AMPKα2^{-/-} ($n=2$) montrent quant à elle un temps en mouvement plus faible que les souris WT et hSOD1^{G93A} dès 95 jours ($p < 0.01$). L'analyse statistique utilisée est une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni pour comparer les souris WT et hSOD1^{G93A} alors qu'il s'agit d'une One way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey pour comparer les souris hSOD1^{G93A} AMPKα2^{-/-} aux deux autres. (* ou $p < 0.05$ = significatif ; ** ou $p < 0.01$ = hautement significatif et *** ou $p < 0.001$ = très hautement significatif).

L'analyse du temps d'**immobilité** des souris fourni des données assez similaires à celles obtenues par l'analyse du temps en mouvement des souris puisqu'aucune différence n'est observée entre les souris hSOD1^{G93A} et les souris WT. Toutefois, le temps d'immobilité prend en compte les mouvements spatiaux du nez et de la queue, repris également dans le temps en mouvement. Les souris hSOD1^{G93A} AMPKα2^{-/-} possèdent, quant à elles, un temps d'immobilité plus élevé que les souris contrôles ($p < 0.05$) par rapport aux souris hSOD1^{G93A} ($p < 0.01$) et ce, dès le début de l'analyse.

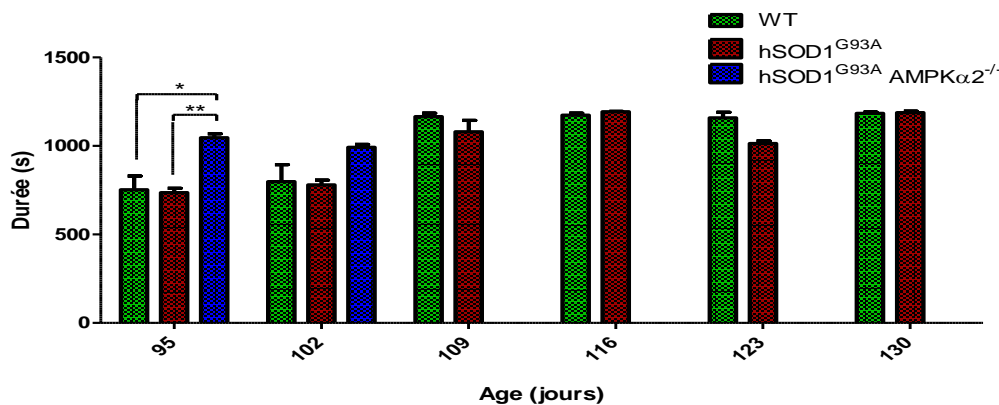


Figure 18 : L'immobilité des souris augmente avec l'âge ($p < 0.001$) que ce soit pour les souris WT ($n=4$) que hSOD1^{G93A} ($n=11$). Les souris hSOD1^{G93A} AMPKα2^{-/-} ($n=2$) montrent quant à elle une immobilité plus importante que les souris WT ($p < 0.05$) et hSOD1^{G93A} ($p < 0.01$) dès 95 jours. L'analyse statistique utilisée est une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni pour comparer les souris WT et hSOD1^{G93A} alors qu'il s'agit d'une One way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey pour comparer les souris hSOD1^{G93A} AMPKα2^{-/-} aux deux autres. (* ou $p < 0.05$ = significatif ; ** ou $p < 0.01$ = hautement significatif et *** ou $p < 0.001$ = très hautement significatif).

Enfin, l'étude de la **vitesse** à laquelle les souris explorent l'openfield montre la même tendance que les autres paramètres puisqu'on observe aucune différence significative entre les souris hSOD1^{G93A} et les souris WT. Par contre, les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} révèlent également une vitesse trois fois plus faible que les souris hSOD1^{G93A} ($p < 0.05$), en lien avec les autres paramètres étudiés.

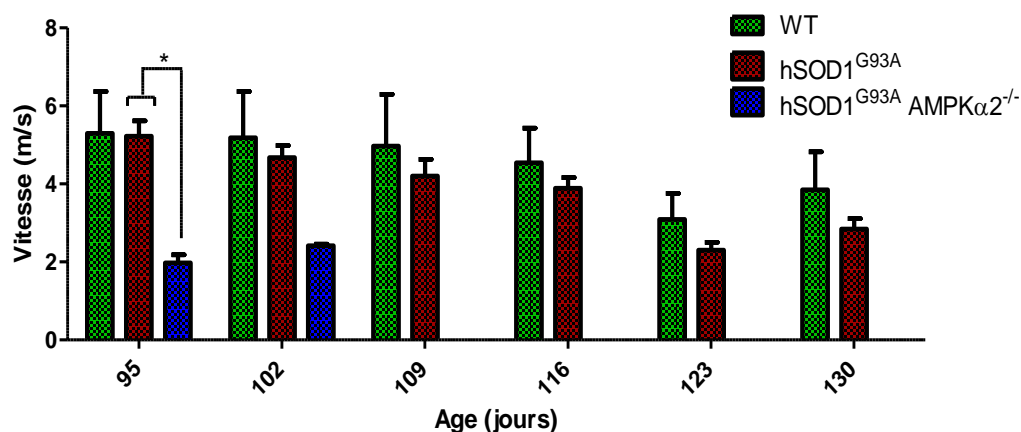


Figure 19 : La vitesse des souris diminue avec l'âge ($p < 0.001$) que ce soit pour les souris WT ($n = 4$) que hSOD1^{G93A} ($n = 11$). Les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} ($n = 2$) montrent quant à elle une vitesse plus faible que les souris hSOD1^{G93A} ($p < 0.05$) dès 95 jours. L'analyse statistique utilisée est une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni pour comparer les souris WT et hSOD1^{G93A} alors qu'il s'agit d'une One way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey pour comparer les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} aux deux autres. (* ou $p < 0.05$ = significatif)

Par conséquent, il semble que l'openfield ne soit pas le test comportemental idéal pour différencier la motricité des souris hSOD1^{G93A} des souris WT de façon précoce. En effet, les paramètres utilisés n'ont pu mettre aucune différence entre les deux génotypes étudiés avant l'apparition de la paralysie. Or, notre but est d'établir une différence de motricité entre les souris hSOD1^{G93A} et les souris WT afin de pouvoir comparer la motricité des souris hSOD1^{G93A} à celle des souris doubles transgéniques avant l'apparition de la paralysie, qu'elle concerne les pattes postérieures pour les souris hSOD1^{G93A} ou les extrémités de ces pattes pour les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-}.

En invalidant l'AMPK α 2 chez les souris hSOD1^{G93A}, l'ensemble des paramètres étudiés se voient altérés par rapport aux souris hSOD1^{G93A} et aux souris WT. En effet, d'autres études ont indiqué que les souris, dont l'AMPK α 2 a été supprimée, témoignent d'une certaine paresse et manifestent donc une activité volontaire moindre. Par conséquent, la diminution de l'activité volontaire entraîne un biais dans l'étude de la motricité des souris et empêche donc l'analyse correcte des résultats. Des tests supplémentaires de l'étude de la motricité des souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} et AMPK α 2^{-/-} devraient être réalisés pour déterminer si la faible activité volontaire des souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} est causée par la suppression de l'AMPK α 2 ou si cette suppression a un réel impact sur la SLA. Par conséquent, il faudrait peut-être se tourner vers d'autres tests comportementaux obligeant les souris à se mouvoir. Le rotarod, par exemple, permet notamment d'étudier la distance parcourue et la vitesse des souris sur base d'une activité imposée.

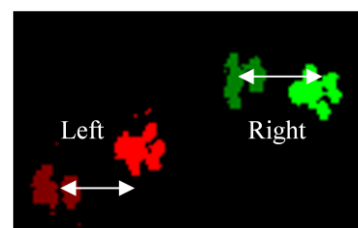
3.4. Étude de la démarche des souris wild-type, SLA et double transgénique

Avant tout, je tiens à signaler que la dernière étude de la démarche des souris a débuté le 14 septembre 2012 et se terminera le 28 décembre 2012. Par conséquent, l'entièreté des données ne pourront être présentées dans ce mémoire mais seront disponibles pour la présentation orale en janvier 2013.

Plusieurs paramètres de la démarche ont été analysés afin de tenter de différencier les souris hSOD1^{G93A} des souris WT d'une part et de déterminer si la suppression de l'AMPK α 2 dans le modèle de souris développant la SLA a un impact sur le cours de la maladie.

3.4.1. « Relative position »

La « relative position » est la moyenne de la distance entre la position de l'empreinte des pattes postérieures par rapport à la position de l'empreinte des pattes antérieures, gauche ou droite, lors d'un même cycle de marche. La « relative position » d'une souris WT se situe aux environs de 5 mm.



La « relative position » a déjà été utilisée auparavant pour montrer une différence entre la démarche des souris WT et celle des souris hSOD1^{G93A} et ce dès le 60^e jour de vie (Gerber 2012). Cette différence reflète donc une faiblesse musculaire, déjà présente à 60 jours.

De manière générale, on remarque également une différence très hautement significative ($p < 0.001$) entre les souris WT et les souris hSOD1^{G93A}. Une différence hautement significative ($p < 0.01$) de la « relative position » a été mise en évidence entre les souris hSOD1^{G93A} et les souris WT dès le 81^e jour de vie. En effet, à ce moment, la « relative position » est deux fois plus élevée chez les souris hSOD1^{G93A} que chez les souris WT. Cette différence est maintenue durant les semaines qui suivent et devient très hautement significative ($p < 0.001$) à partir du 95^e jour de vie des souris. Effectivement, la « relative position » s'accroît tout au long de la maladie chez les souris hSOD1^{G93A} alors qu'elle reste constante chez les souris WT. Au jour 123, la « relative position » est trois fois plus élevée dans les souris développant la SLA que dans les souris contrôle. Ce paramètre permet, par conséquent, de différencier les souris hSOD1^{G93A} des souris WT de façon très précoce puisque ces souris ne sont pas encore atteintes par la paralysie. La « relative position » semble donc être un paramètre relevant pour comparer la démarche des souris doubles transgéniques aux souris hSOD1^{G93A}.

Lorsque l'on supprime l'AMPK α 2 chez les souris hSOD1^{G93A}, la « relative position » a tendance à être similaire à celle des souris WT du 60^e au 81^e jour de vie. Par ailleurs, ce paramètre tend à être plus faible chez les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} comparé aux souris hSOD1^{G93A} et ce, tout au long de l'étude. En effet, alors que la « relative position » augmente au cours de la maladie chez les souris hSOD1^{G93A}, elle a tendance à rester faible chez les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} jusqu'au 102^e jour de vie. Dès le 109^e jour de vie, on observe une différence significative ($p < 0.05$) entre les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} et les souris WT,

révélant un accroissement de la « relative position » chez les souris double transgénique. De manière générale, une différence significative ($p < 0.05$) s'inscrit entre les souris atteintes de la SLA et ces mêmes souris à qui on a supprimé l'AMPK α 2. Par conséquent, alors que les souris hSOD1^{G93A} montrent une faiblesse musculaire dès le 81^e jour de vie, les souris hSOD1^{G93A} débute la paralysie au 116^e jour de la vie des souris.

En résumé, il semble que la suppression de l'AMPK α 2 dans le modèle de souris hSOD1^{G93A} retarde l'accroissement de la relative position. Puisque cet écart ne semble pas affecté de façon aussi précoce chez les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-}, il semble que la suppression de l'AMPK α 2 protège les souris hSOD1^{G93A} de la paralysie durant plusieurs semaines et retarde même l'apparition des premiers indicateurs de cette paralysie.

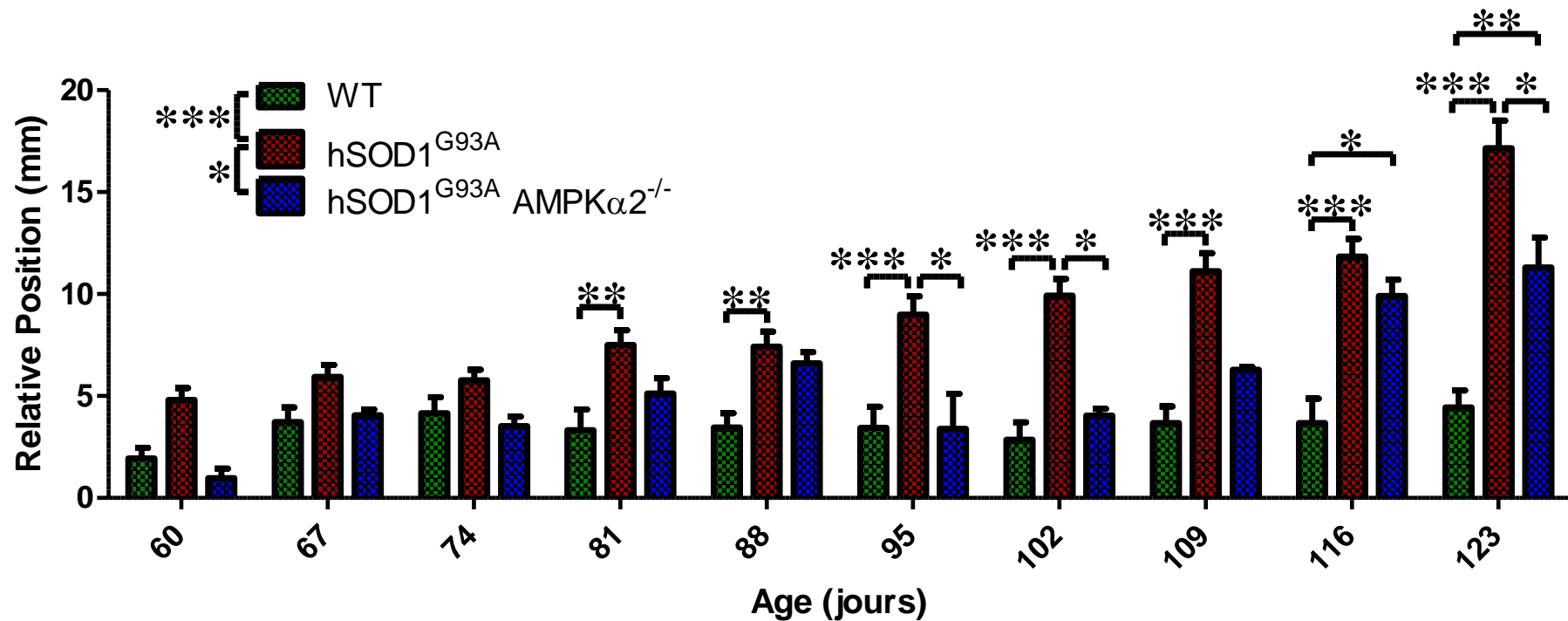


Figure 20 : Analyse de la « Relative Position » du 60^e au 116^e jour de vie des souris WT (n=7), hSOD1^{G93A} (n=11) et hSOD1^{G93A} AMPKα2^{-/-} (n=2). Une différence hautement significative (p<0.01) entre les souris contrôles et SLA est observée au jour 81 et 88 alors que cette différence est très hautement significative (p<0.001) à partir du jour 95 jusqu'au jour 116 de la vie des souris. Une différence significative (p<0.05) est observée entre les souris hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A} AMPKα2^{-/-} au jour 95 et 102 de la vie des souris. Enfin, une différence significative (p<0.05) est observée entre les souris contrôles et les souris SLA auxquelles l'AMPKα2 a été supprimée au jour 116 de la vie des souris. L'analyse statistique repose sur une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni (* ou p<0.05 = significatif ; ** ou p<0.01 = hautement significatif et *** ou p<0.001 = très hautement significatif).

La « relative position » a été calculée pour chaque souris au cours du temps. Ceci a permis de réaliser une régression linéaire de la courbe obtenue pour la « relative position » individuelle et d'en étudier la pente.

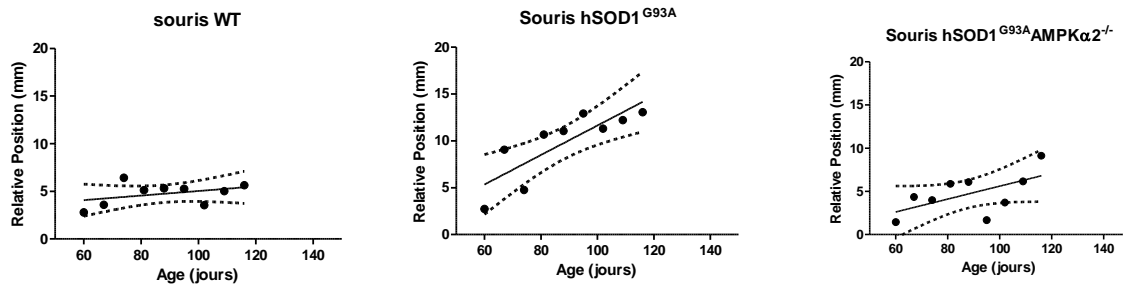


Figure 21 : Exemple de régression linéaire pour les trois génotypes de souris : WT, hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A}AMPKα2^{-/-}.

Le coefficient de pente de la « relative position » semble plus faible pour les souris hSOD1^{G93A} AMPKα2^{-/-} que pour les souris hSOD1^{G93A}, autrement dit, la progression de la paralysie aurait tendance à être moins marquée chez les souris hSOD1^{G93A}. Notons que le coefficient de pente des souris WT n'est pas représenté sur ce graphique car il est proche de zéro.

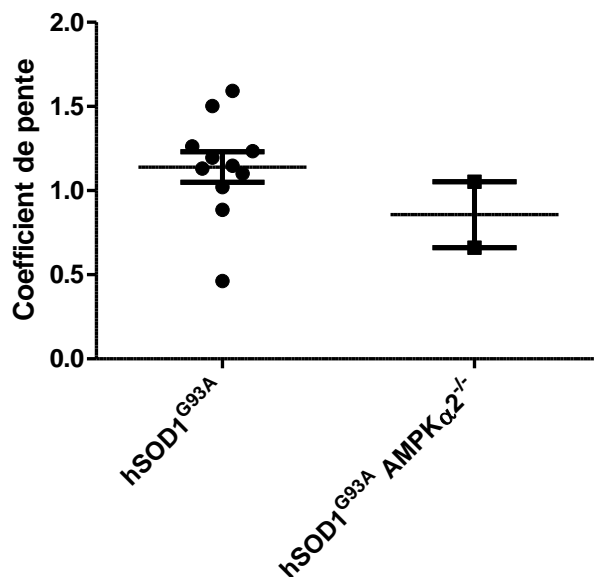


Figure 22 : Ce graphique reprend le coefficient de la pente calculée pour la « Relative position » de chaque souris au cours du temps. Pour chaque souris, une régression linéaire de la courbe de l'écart entre les pattes au cours du temps a été réalisée. L'analyse statistique du coefficient de pente est un t-test non païré. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les souris hSOD1^{G93A} (n=10) et les souris hSOD1^{G93A}AMPKα2^{-/-} (n=2).

3.4.2. « Base of support »

Un deuxième paramètre, issu de l'analyse approfondie des données du catwalk, pourrait permettre de différencier les souris hSOD1^{G93A} AMPKα2^{-/-} des souris hSOD1^{G93A}, il s'agit du

“**base of support**” (BOS). Ce paramètre indique la distance moyenne entre les empreintes des deux pattes antérieures ou des deux pattes postérieures. Le BOS est souvent utilisé dans l'étude des lésions de la moelle épinière. En effet, lors de telles lésions, ce paramètre est fréquemment modifié pour les pattes postérieures et non pas pour les pattes antérieures, excepté dans le cas où la lésion se situe au niveau de la moelle cervicale, comme c'est le cas pour les SLA cervicale.

Aucune différence significative n'a pu être observée entre les souris WT, hSOD1^{G93A} et hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} concernant le BOS des pattes antérieures et postérieures.

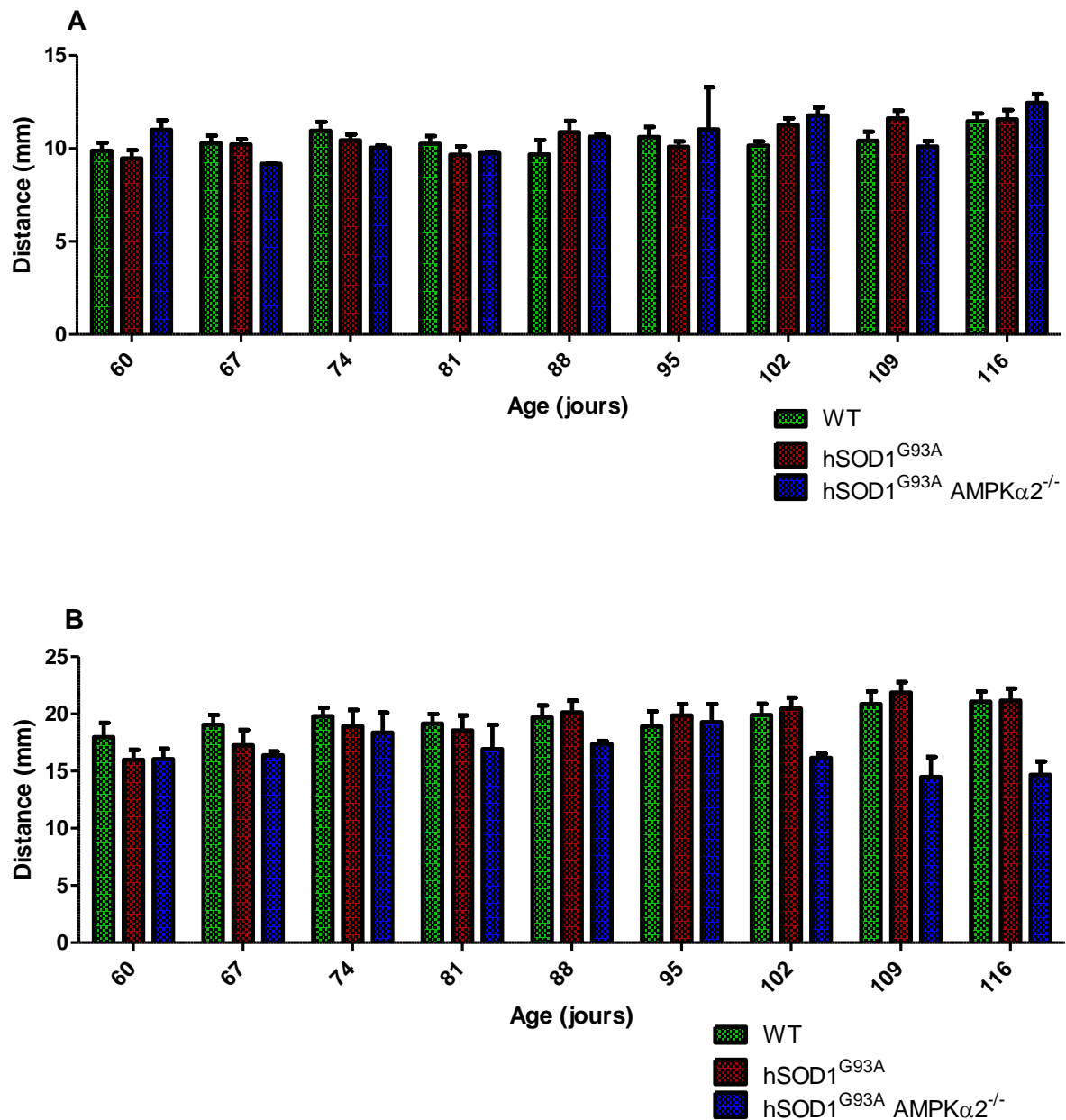


Figure 24 : Analyse de la distance entre les deux pattes antérieures (A) et postérieures (B) au cours de l'âge des souris. L'analyse statistique utilisée est une Two-way ANOVA et est suivie d'un post-test de Bonferroni. Cette analyse ne révèle aucune différence significative entre les trois génotypes de souris étudiés : WT (n=7) hSOD1^{G93A} (n=11) et hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} (n=2).

3.4.3. Formule d'appui

La formule d'appui ou le « support formula » indique le nombre de pattes qui sont posées sur la vitre à chaque instant du parcours. Afin de calculer ce paramètre, le parcours que fait la souris est divisé en différentes sections qui sont déterminées par le placement d'une nouvelle patte sur la vitre ou par le retrait d'une patte. Une souris WT se déplace en ne posant que deux pattes simultanément sur la vitre : une patte antérieure et une patte postérieure du côté opposé à celui de la patte antérieure, on parle de la diagonale. Une souris paralysée ou débutant une paralysie est contrainte à poser une ou deux pattes en plus.

L'analyse du pourcentage de la pose des pattes en diagonale révèle une différence significative ($p < 0.05$) entre les souris WT et les souris $hSOD1^{G93A}$. En effet, on observe généralement un plus faible pourcentage de la pose des pattes en diagonale pour les souris $hSOD1^{G93A}$. On remarque également une différence hautement significative ($p < 0.01$) entre les souris WT et les souris $hSOD1^{G93A} AMPK\alpha 2^{-/-}$ au 116^e jour.

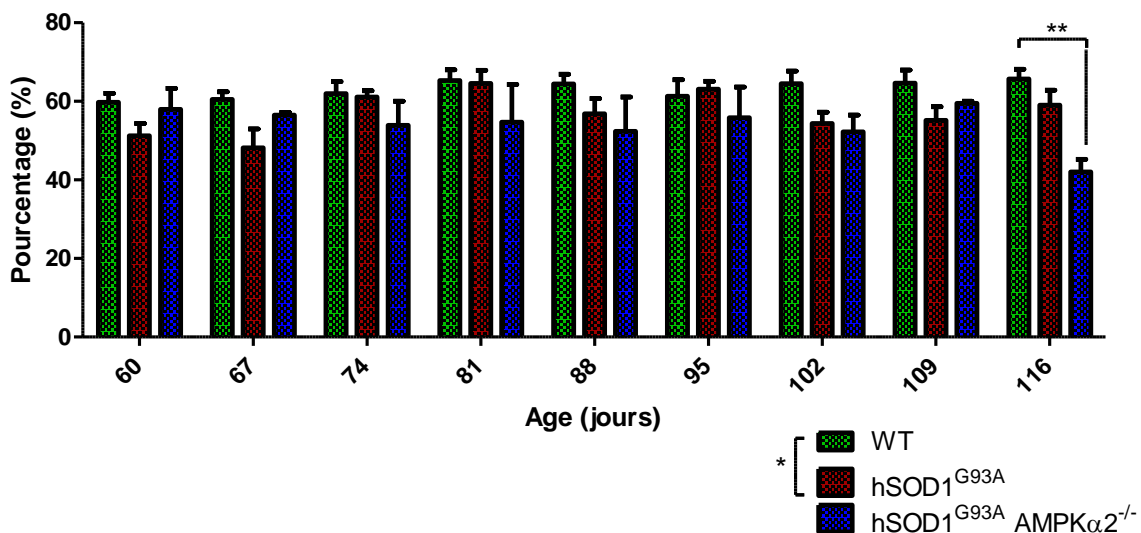


Figure 25 : L'analyse du pourcentage de la pose des pattes en diagonale révèle une différence significative ($p < 0.05$) entre les souris WT ($n=7$) et $hSOD1^{G93A}$ ($n=11$) et hautement significative entre les souris WT et $hSOD1^{G93A} AMPK\alpha 2^{-/-}$ ($n=2$). L'analyse statistique utilisée est une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni.

L'analyse du pourcentage de la pose de trois pattes révèle une différence hautement significative ($p < 0.01$) entre les souris WT et les souris $hSOD1^{G93A}$ et $hSOD1^{G93A} AMPK\alpha 2^{-/-}$ (figure 25 A). Cette différence repose sur une fréquence deux fois plus importante de la pose de trois pattes pour les souris $hSOD1^{G93A} AMPK\alpha 2^{-/-}$ par rapport aux souris WT. Par contre, ce paramètre ne semble pas affecté de manière importante dans les souris $hSOD1^{G93A}$.

L'analyse de la pose de quatre pattes sur la vite reflète une différence significative ($p < 0.05$) entre les souris WT et les souris hSOD1^{G93A}. En effet, le pourcentage de la pose de quatre pattes semble généralement plus élevé pour les souris hSOD1^{G93A} que pour les souris WT. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} et les souris WT. Il apparaît tout de même que ce pourcentage soit assez variable chez ces souris, tantôt proche de celui des hSOD1^{G93A}, tantôt similaire à celui des WT.

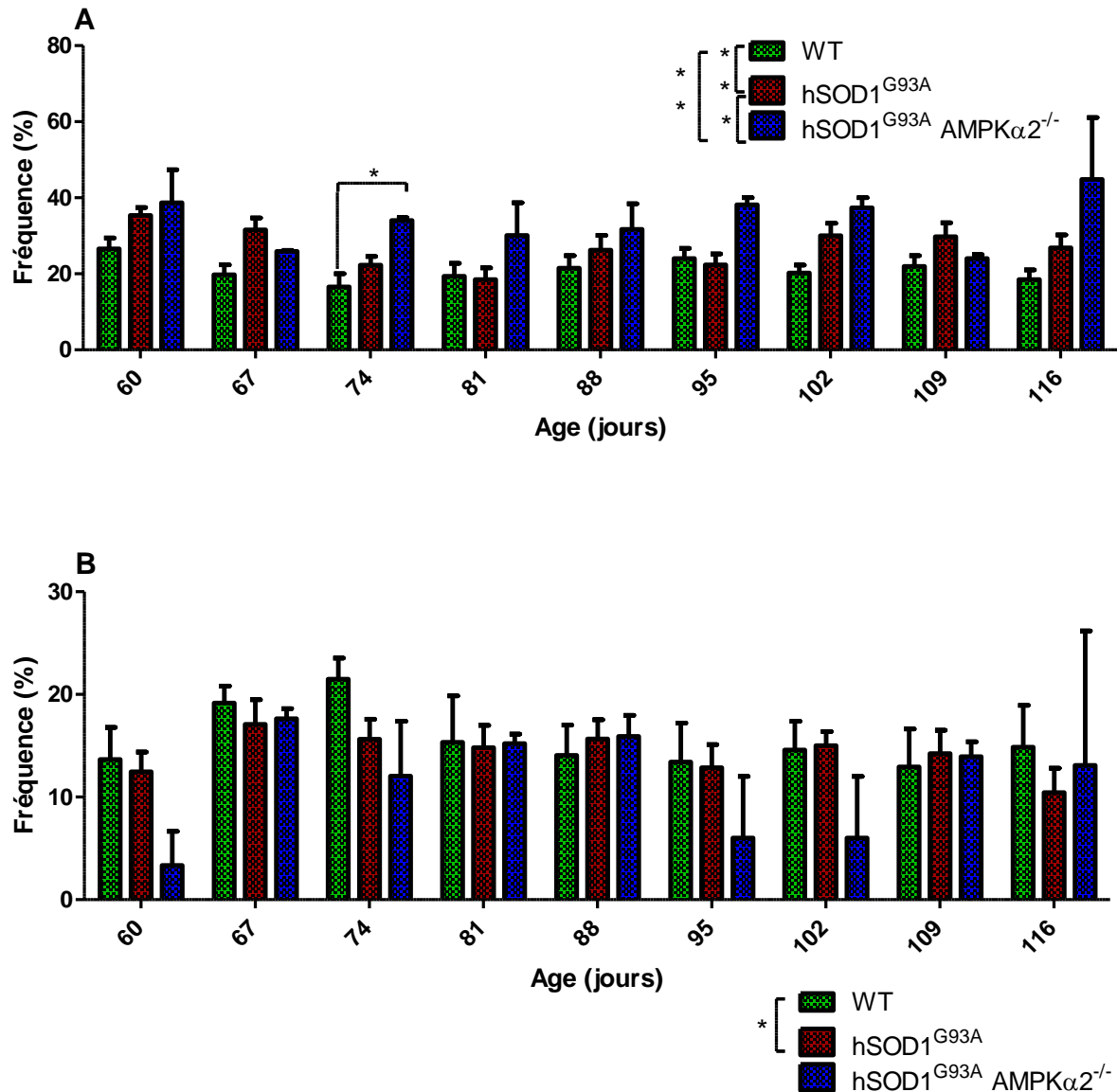


Figure 26 : L'analyse du pourcentage de la pose de trois (A) ou quatre (B) pattes entre les différents groupes de souris étudiés : WT (n=7), hSOD1^{G93A} (n=11) et hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} (n=2). L'analyse statistique utilisée est une ANOVA deux voies suivie d'un post-test de Bonferroni.

Il semble que la coordination des pattes soit, à ce stade, faiblement affectée par la maladie. Cependant, il faut remarquer que les souris hSOD1^{G93A} ont généralement tendance à poser les quatre pattes sur la vitre alors que les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} n'en pose généralement que trois.

Deux autres paramètres auraient pu être intéressants dans le cadre de cette étude. Le premier est le « **max area** », il s'agit de l'aire maximale de la patte (en pixels) qui entre en contact avec la vitre. Le deuxième paramètre est l'**intensité maximale**, se définissant comme la luminosité (en pixels) au moment du contact maximal. Cette intensité varie de 0 à 255 puisqu'elle varie suivant la pression exercée par la patte sur la vitre. Ces deux paramètres sont souvent utilisés pour étudier les douleurs neuropathiques et pourraient être utiles dans notre cas, puisqu'en cas de paralysie des pattes postérieures on observerait un appui plus important sur les pattes antérieures de l'animal. Par conséquent, ces paramètres auraient pu nous aider à montrer la différence visuelle qui a été constatée entre les souris $hSOD1^{G93A}$ et $hSOD1^{G93A} AMPK\alpha2^{-/-}$. Malheureusement, ces deux paramètres ne peuvent pas être employés dans notre étude étant donné l'élévation mineure du poids des souris $hSOD1^{G93A} AMPK\alpha2^{-/-}$ comparé aux souris $hSOD1^{G93A}$. En effet, la normalisation de ces paramètres par rapport au poids n'est pas conseillée dans le cadre du catwalk.

Parmi l'ensemble des paramètres étudiés, la « Relative position » est le paramètre le plus adapté pour étudier la SLA. En effet, ce paramètre permet de détecter la maladie de façon très précoce, une quarantaine de jours dans notre cas. Toutefois, les analyses statistiques seraient probablement différentes si le nombre de souris dans chaque groupe était plus élevé. En effet, il est peu prudent de réaliser une étude statistique sur un groupe comportant seulement deux souris, comme c'est le cas pour les souris $hSOD1^{G93A} AMPK\alpha2^{-/-}$. Malgré tout, les résultats obtenus sont très encourageants puisqu'ils suggèrent que la suppression de l' $AMPK\alpha2$ serait bénéfique pour les souris surexprimant la $hSOD1^{G93A}$. Néanmoins, il est également impératif d'étudier la démarche des souris $AMPK\alpha2^{-/-}$ afin de s'assurer que la simple délétion de la protéine n'affecte pas les différents paramètres étudiés. Les autres paramètres étudiés ne montrent pas d'altérations précoces. Il se peut, toutefois, que ces paramètres se voient modifiés dès l'apparition de la paralysie.

Ces résultats semblent très prometteurs, d'autant plus que Lim et son équipe ont montré, il y a peu, que la motricité de *C. Elegans* $SOD1^{G85R}$ est améliorée par la suppression de l' $AMPK\alpha2$ (Lim et al., 2012). Cette étude peut, bien entendu, être remise en question puisque *C. Elegans* est éloigné du modèle de souris et à fortiori de l'humain.

V. Discussions et perspectives

1. Généralités

L'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire tendent à démontrer que l'AMPK pourrait être impliquée dans la SLA, tant par la modulation de son expression que par l'augmentation de son activité. En effet, l'expression génique et protéique de la sous-unité $\alpha 2$ de l'AMPK se sont révélées être modifiées dans les cultures d'astrocytes et le SNC de rats hSOD1^{G93A}. Par ailleurs, les premières données concernant l'activité de l'AMPK suggèrent une suractivation de la protéine dans le cadre de la maladie. Cette suractivation semble cohérente avec la baisse de la production de l'ATP causée par le dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale chez les patients atteints de SLA et les modèles animaux de la maladie. Selon nous, cette suractivation serait délétère dans le cadre de la maladie.

Étant donné que la sous-unité $\alpha 2$ est l'isoforme catalytique principalement exprimé dans le cerveau, il a été décidé d'étudier l'invalidation de l'AMPK $\alpha 2$ chez les souris hSOD1^{G93A}. Les souris hSOD1^{G93A} AMPK $\alpha 2$ ^{-/-} ont été étudiées et comparées aux souris hSOD1^{G93A} via plusieurs tests comportementaux : le système de mesure grip strength, l'openfield et le catwalk. Premièrement, l'analyse du grip strength n'a pas révélé de différence de force entre les deux génotypes de souris. Par ailleurs, l'étude de l'activité volontaire n'a pas pu démontrer de différence précoces entre les souris hSOD1^{G93A} AMPK $\alpha 2$ ^{-/-} et les souris hSOD1^{G93A}. Cette approche pourrait être biaisée par la nature même des souris AMPK $\alpha 2$ ^{-/-}, puisqu'il semble que ces souris montrent une activité volontaire diminuée. Par contre, l'étude de la démarche des souris a, quant à elle, souligné un effet protecteur de la suppression de l'AMPK $\alpha 2$ face à la paralysie. En effet, les premiers signes de la paralysie semblent être retardés chez les souris hSOD1^{G93A} AMPK $\alpha 2$ ^{-/-} comparées aux souris hSOD1^{G93A}. Par conséquent, l'ensemble de ces expériences suggère d'une part que la suractivation de l'AMPK $\alpha 2$ est délétère chez les modèles de souris hSOD1^{G93A} et d'autre part que la suppression de la sous-unité $\alpha 2$ dans ce modèle retarde la progression de la maladie.

2. Compensation de l'activité de l'AMPK par la modulation de l'expression

2.1. Controverse de l'effet neuroprotecteur de l'activation de l'AMPK

De manière générale, l'effet neuroprotecteur de l'AMPK a été beaucoup étudié dans les maladies neurovasculaires, telles que les ischémies. Dans le cas d'un accident cérébrovasculaire (AVC), de nombreuses voies, consommatrices d'oxygène, sont mises en place afin de réparer les dommages créés dans les neurones et restaurer une homéostasie neuronale. Afin de maintenir une homéostasie de l'énergie, l'AMPK est fortement activée pour remédier aux problèmes établis. L'effet de la suractivation de l'AMPK est fortement

controversé puisqu'il est considéré comme bénéfique par certains alors que d'autres le voient plutôt comme délétère.

Culmsee et son équipe ont montré que l'activation de l'AMPK par l'AICAR protège les neurones de l'hippocampe contre la mort cellulaire, induite par la privation en glucose ou par hypoxie. Par ailleurs, la suppression de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$, via l'interférence RNA, entraîne une vulnérabilité accrue des neurones en cas de stress métabolique et contrecarre l'effet de l'AICAR (Culmsee et al., 2001). Kuramoto et son équipe ont, quant à eux, montré que l'activation de l'AMPK réduisait l'excitotoxicité en augmentant l'activité des récepteurs GABA dans les neurones soumis à des stress métaboliques ou après ischémie (Kuramoto et al., 2012). D'autres études viennent appuyer le rôle neuroprotecteur de l'AMPK en soulignant son implication dans le maintien de l'homéostasie énergétique en condition de stress métabolique intense ou de lésion ischémiques.

Toutefois, d'autres travaux vont à l'encontre de cet effet neuroprotecteur et plaident plutôt pour une suractivation néfaste de l'AMPK. En effet, McCullough a montré que l'activation de l'AMPK après une ischémie cérébrale est délétère pour la survie des neurones. D'autre part, ils ont observé une réduction des AVC lorsque les animaux sont traités préalablement avec un inhibiteur de l'AMPK, alors que l'administration d'AICAR aggrave les AVC. (McCullough et al., 2005). Une autre étude a montré que les animaux AMPK $\alpha 2^{-/-}$ se portent mieux en cas d'AVC que les animaux AMPK $\alpha 2^{+/+}$. Plusieurs événements peuvent induire la suractivation de l'AMPK, tels que déplétion en énergie, l'altération de la synthèse protéique et la production de radicaux libres.

La plupart des études rapportant un effet bénéfique de l'AMPK en cas de stress cellulaire important ont été réalisées sur des cultures de cellules alors que son effet délétère a été observé chez les animaux. Ceci pourrait s'expliquer par une différence entre les conditions de culture et l'environnement physiologique des cellules au sein de l'organisme. En effet, il existe des différences de concentrations en glucose entre les cultures (25mM) et l'environnement naturel des cellules (0,82 à 2,4 mM) (Ronnett et al., 2009).

2.2. Implication de la suractivation de l'AMPK dans la SLA

Puisqu'il est possible que la suractivation de l'AMPK soit délétère dans le contexte de la SLA, la caractérisation de l'AMPK a été réalisée d'une part dans les astrocytes et d'autre part dans le SNC de rats WT et hSOD1^{G93A}. Les résultats obtenus suite à la caractérisation de l'AMPK dans les cultures d'astrocytes suggèrent que la modulation de l'expression de l'AMPK $\alpha 2$ serait contrecarrée par l'augmentation de l'activité de l'AMPK, tel un processus de compensation. En effet, cette compensation semble s'établir dans les astrocytes WT alors que ce processus apparaît absent des astrocytes hSOD1^{G93A}.

Par ailleurs, dans les parties thoracique et lombaire de la moelle épinière de rats hSOD1^{G93A}, l'expression protéique de l'AMPK $\alpha 2$ est plus faible, soit de manière générale

pour la partie lombaire, soit au début des symptômes pour la partie thoracique. Cette régulation de l'expression pourrait laisser croire à un phénomène de compensation de l'activité de l'enzyme dans les tissus du SNC. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait étudier l'activité de l'AMPK dans le cortex et la moelle épinière.

L'étude de l'expression de l'AMPK α 2 ainsi que l'analyse de l'activité AMPK suggèrent des mécanismes différents dans le cadre de la maladie. On peut se demander si ces résultats sont comparables ? D'une part, il ne faut pas négliger la différence qui existe entre les conditions de cultures et l'environnement physiologique des cellules. En effet, les astrocytes ne sont pas cultivés en conditions physiologiques. Les différences de concentrations en glucose, en CO₂, O₂ et d'autres facteurs pourraient induire des modifications biochimiques dans les astrocytes, issus de rats WT ou hSOD1^{G93A}, modulant ainsi l'expression de l'AMPK α 2. L'AMPK étant un acteur du métabolisme, il ne serait pas surprenant d'observer un effet du glucose sur son expression. Par ailleurs, nos cultures sont réalisées sur des astrocytes issus du cortex de nouveau né. De nos jours, l'impact de la surexpression de la SOD1^{MT} sur l'ensemble des fonctions cellulaires n'est pas encore bien défini à cet âge. Par conséquent, l'ensemble des modifications cellulaires observées dans les astrocytes de patients atteints de SLA et dans les modèles animaux de la maladie pourraient ne pas encore être présentes dans les astrocytes âgés de deux jours et maturés *in vitro* pendant deux semaines. Toutefois, ces astrocytes constituent un modèle fréquemment utilisé pour étudier la maladie à ce jour. D'autre part, le cortex et la moelle épinière rassemblent plusieurs types cellulaires et il est donc difficile de comparer ces tissus aux astrocytes. En effet, il est impossible de déterminer si l'effet observé sur l'expression de l'AMPK α 2 dans le cortex et la moelle épinière provient d'un ou plusieurs types cellulaires particuliers ou si l'ensemble des cellules réagissent de la même façon. Si l'effet provient d'un ou plusieurs types cellulaires, cela pourrait expliquer la variation importante rencontrée dans les échantillons étudiés. Afin de répondre à cette question, il serait judicieux d'étudier l'expression génique et protéique de l'AMPK α 2 ainsi que l'état d'activité de la protéine dans les motoneurones, les cellules microgliales et d'autres types de neurones qui ne sont, à priori, pas impliqués dans la maladie. Par ailleurs, le nombre d'expériences réalisées pour l'étude de l'expression protéique et de l'activité n'est pas assez élevé pour pouvoir interpréter raisonnablement les résultats, que ce soit pour les cultures d'astrocytes ou pour le cortex et la moelle épinière.

En outre, il est surprenant de ne pas observer d'effets de l'inflammation sur l'expression de l'AMPK α 2 dans les astrocytes WT et hSOD1^{G93A}. Le TNF- α est connu pour moduler l'activité de la protéine (Steinberg et al., 2006) mais son impact sur l'expression de l'AMPK α 2 est beaucoup moins connu. Néanmoins, on aurait pu penser que l'expression de l'AMPK α 2 soit augmentée par l'inhibition de l'activité de l'AMPK par le TNF- α . Avant tout, il faudrait étudier l'activité de l'AMPK dans les astrocytes soumis à l'influence du TNF- α . En effet, il se peut que les astrocytes ne réagissent pas comme les cellules musculaires ou les adipocytes (Steinberg et al., 2006). Par ailleurs, d'autres médiateurs inflammatoires, tels que l'IL-1 β , l'INF- γ devraient être testés afin de vérifier si ceux-ci peuvent ou non affecter l'expression de l'AMPK α 2 et ce, sur des astrocytes WT et hSOD1^{G93A}.

3. Impact de la délétion de l'AMPK dans le modèle de souris de SLA familiale

L'ensemble résultats présentés dans ce mémoire suggère que la suppression de l'AMPK α 2 est bénéfique pour les souris atteintes de SLA familiale. Toutefois, l'une des limites principales de nos expériences est l'absence de l'utilisation de souris AMPK α 2^{-/-}. En effet, sans la caractérisation de ces souris par les différents tests comportementaux, il est difficile d'attribuer les différences comportementales observées à l'impact de la délétion sur le cours de la SLA, ou à l'opposé, à l'effet de la délétion elle-même.

L'impact de la suppression de l'AMPK α 2 sur le comportement des souris a fait l'objet de plusieurs analyses. À première vue, il semble que les souris AMPK α 2^{-/-} soient similaires aux souris contrôles. En effet, aucune différence au niveau de la constitution corporelle, du contenu en graisse et de leur prise alimentaire n'a pu être constatée. Cependant, il a été mis en évidence que la suppression de l'isoforme α 1 n'entraînait pas d'effets métaboliques détectables alors que la suppression de l'AMPK α 2 conduit à une résistance à l'insuline moyenne et une tolérance au glucose, deux phénomènes caractéristiques du diabète de type II. Toutefois, les souris dont l'AMPK α 2 a été délétée ne montrent pas les caractéristiques pathologiques cellulaires observées en cas de diabète. (Viollet et al., 2003a).

Lors d'un exercice physique, l'AMPK est activée par l'augmentation du rapport AMP/ATP et exerce alors ses activités régulatrices assez pléiotropiques. Lorsqu'on utilise des souris dont l'AMPK α 2 a été invalidée, celles-ci voient leur activité sollicitée diminuer ; on parle de « lazy mice ». Par contre, l'effort physique spontanée de souris AMPK α 2^{-/-} est identique à celui des souris WT. En effet, on remarque que ces deux génotypes peuvent parcourir la même distance avec une vitesse maximale identique lorsqu'elles sont sollicitées. La seule différence est que la longueur de l'enjambée est diminuée chez les souris AMPK α 2^{-/-}. Ainsi, elles augmentent le nombre de pas par tour effectué. (Viollet et al., 2009b; Mu et al., 2001). La réduction de l'activité volontaire a également été mise en évidence sur les souris LKB1^{-/-} (Thomson et al., 2010). LKB1 est une AMPKK dont la cible principale est l'isoforme α 2. Ceci signifie qu'en supprimant cette enzyme, l'activité de l'AMPK α 2 est absente (Viollet et al., 2009b). Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle les souris AMPK α 2^{-/-} sont presque identiques aux souris WT et que la suppression de l'AMPK α 2 n'affecterait pas la démarche des souris. Malgré que ces études tendent à affirmer que la démarche des souris AMPK α 2^{-/-} n'est pas altérée, il est nécessaire de confirmer ces observations via le catwalk.

Par ailleurs, malgré l'amélioration de la démarche, les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} ne voient pas leur taux de survie augmenter par rapport aux souris hSOD1^{G93A}. Le modèle utilisé dans le cadre de cette étude comporte une invalidation ubiquitaire de l'AMPK α 2 et malgré que cette délétion semble bénéfique pour le SNC d'animaux hSOD1^{G93A}, elle pourrait être délétère dans d'autres tissus lorsqu'elle est associée à la SLA. On pourrait supposer que

la suppression de l'AMPK α 2 ralentisse la mort des motoneurones sans modifier la progression de la maladie de la partie lombaire vers la partie cervicale de la moelle épinière. Dès lors, l'atteinte des motoneurones supérieurs conduirait à l'événement ultime de la maladie qu'est la dépression respiratoire liée à la paralysie des muscles respiratoires. Une étude approfondie de l'innervation des muscles des pattes postérieures et également des muscles respiratoires des souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} comparées aux souris hSOD1^{G93A} pourrait permettre d'en apprendre plus sur le mécanisme sous-jacent de la suppression de l'AMPK α 2 dans le modèle de souris de SLA familiale. L'étude des muscles des pattes postérieures serait effectivement une alternative au grip strength dont les résultats n'étaient pas concluants. En effet, les souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} semblaient incapables de saisir la grille de par la paralysie localisée au niveau des extrémités des pattes. De façon complémentaire, il faudrait déterminer d'une part si la survie des motoneurones est améliorée et d'autre part si la rétraction du motoneurones de la jonction neuromusculaire est réduite dans les muscles des pattes postérieures des souris hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} par rapport aux souris hSOD1^{G93A}. Ceci permettrait d'en savoir plus sur les bénéfices conférés par la suppression de l'AMPK α 2 dans la SLA familiale.

Enfin, on peut se demander si la suppression ubiquitaire est réellement la meilleure approche pour étudier l'impact de la délétion de l'AMPK α 2 sur le cours de la SLA. En effet, la délétion ubiquitaire rend l'analyse plus compliquée puisqu'il est alors plus difficile d'attribuer les bénéfices de l'inactivation de l'AMPK α 2 à un ou plusieurs types cellulaires particuliers. On pourrait effectivement imaginer que la délétion de l'AMPK α 2 ne soit bénéfique qu'aux cellules musculaires et non aux motoneurones. Pour tenter de déterminer les types cellulaires touchés par la suppression de l'AMPK α 2, il faudrait se rediriger vers un modèle où seul un type cellulaire particulier serait la cible de la suppression de l'AMPK α 2, tels que les motoneurones, ou les astrocytes, ou bien les cellules microgliales ou encore les cellules musculaires.

Il a été montré que la suppression de l'AMPK α 2 entraîne une surexpression de l'AMPK α 1 dans les muscles {Jørgensen} alors que la surexpression d'un dominant négatif ne modifie pas l'expression de l'AMPK α 1. On pourrait se demander si la suppression de l'AMPK α 2 dans le SNC entraîne également une surexpression de la sous-unité α 1 et si c'est le cas, dans quelle mesure la surexpression de cette sous-unité pourrait influencer le cours de la SLA. En effet, il se pourrait qu'en absence de la surexpression de l'AMPK α 1, l'animal se porte moins bien (Viollet et al., 2009a).

4. Conclusion générale

Les résultats préliminaires présentés dans le cadre de ce mémoire sont très encourageants et, malgré qu'ils doivent être consolidés par la répétition des expériences déjà réalisées, ils

tendent tout de même à démontrer que la suppression de l'AMPK α 2 serait bénéfique pour le cours de la SLA. Une étude récente réalisée sur *C. Elegans*, a également montré les bénéfices de la suppression de l'AMPK α 2 dans le cadre de la SLA (Lim et al., 2012) et conforte donc l'hypothèse selon laquelle la protection rencontrée dans le modèle hSOD1^{G93A} AMPK α 2^{-/-} pourrait signifier une suractivation délétère de l'AMPK α 2 chez les souris hSOD1^{G93A}. D'autres études plus approfondies doivent encore être menées pour compléter les résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire et déterminer si l'inhibition de l'AMPK α 2 pourrait être utilisée comme approche thérapeutique afin de réduire la progression de la SLA qu'elle soit familiale ou non chez l'humain.

Bibliographie

Reference List

1. Alexander GM, Erwin KL, Byers N, Deitch JS, Augelli BJ, Blankenhorn EP, Heiman-Patterson TD (2004) Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Brain Res Mol Brain Res* 130: 7-15.
2. Amato S, Man HY (2011) Bioenergy sensing in the brain: the role of AMP-activated protein kinase in neuronal metabolism, development and neurological diseases. *Cell Cycle* 10: 3452-3460.
3. Appel SH, Zhao W, Beers DR, Henkel JS (2011) The microglial-motoneuron dialogue in ALS. *Acta Myol* 30: 4-8.
4. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob FW, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513: 532-541.
5. Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH (2006) Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16021-16026.
6. 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: 15558-15563.
7. Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14: 724-738.
8. Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Saez JC (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci* 26: 610-617.
9. Boillee S, Vande VC, Cleveland DW (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52: 39-59.
10. Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998a) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281: 1851-1854.
11. Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998b) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281: 1851-1854.
12. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22: 183-192.

13. Cai Z, Schools GP, Kimelberg HK (2000) Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression. *Glia* 29: 70-80.
14. Carling D (2004) The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29: 18-24.
15. Cheroni C, Marino M, Tortarolo M, Veglianese P, De Biasi S, Fontana E, Zuccarello LV, Maynard CJ, Dantuma NP, Bendotti C (2009) Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 18: 82-96.
16. Choi CI, Lee YD, Gwag BJ, Cho SI, Kim SS, Suh-Kim H (2008) Effects of estrogen on lifespan and motor functions in female hSOD1 G93A transgenic mice. *J Neurol Sci* 268: 40-47.
17. Culmsee C, Monnig J, Kemp BE, Mattson MP (2001) AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci* 17: 45-58.
18. de Jong S, Huisman M, Sutedja N, van der KA, de Visser M, Schelhaas J, van der SY, Veldink J, van den BL (2012) Endogenous female reproductive hormones and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*.
19. Ermilova IP, Ermilov VB, Levy M, Ho E, Pereira C, Beckman JS (2005) Protection by dietary zinc in ALS mutant G93A SOD transgenic mice. *Neurosci Lett* 379: 42-46.
20. Ferraiuolo L, Higginbottom A, Heath PR, Barber S, Greenald D, Kirby J, Shaw PJ (2011a) Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134: 2627-2641.
21. Ferraiuolo L, Higginbottom A, Heath PR, Barber S, Greenald D, Kirby J, Shaw PJ (2011b) Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134: 2627-2641.
22. Ferraiuolo L, Higginbottom A, Heath PR, Barber S, Greenald D, Kirby J, Shaw PJ (2011c) Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134: 2627-2641.
23. Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ (2011d) Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 7: 616-630.
24. Field LS, Furukawa Y, O'Halloran TV, Culotta VC (2003c) Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem* 278: 28052-28059.

25. Field LS, Furukawa Y, O'Halloran TV, Culotta VC (2003b) Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem* 278: 28052-28059.
26. Field LS, Furukawa Y, O'Halloran TV, Culotta VC (2003a) Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem* 278: 28052-28059.
27. Fukada K, Zhang F, Vien A, Cashman NR, Zhu H (2004b) Mitochondrial proteomic analysis of a cell line model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Proteomics* 3: 1211-1223.
28. Fukada K, Zhang F, Vien A, Cashman NR, Zhu H (2004a) Mitochondrial proteomic analysis of a cell line model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Proteomics* 3: 1211-1223.
29. Gao G, Fernandez CS, Stapleton D, Auster AS, Widmer J, Dyck JR, Kemp BE, Witters LA (1996b) Non-catalytic beta- and gamma-subunit isoforms of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271: 8675-8681.
30. Gao G, Fernandez CS, Stapleton D, Auster AS, Widmer J, Dyck JR, Kemp BE, Witters LA (1996a) Non-catalytic beta- and gamma-subunit isoforms of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271: 8675-8681.
31. Gao G, Widmer J, Stapleton D, Teh T, Cox T, Kemp BE, Witters LA (1995c) Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase are members of the SNF1 protein kinase family. *Biochim Biophys Acta* 1266: 73-82.
32. Gao G, Widmer J, Stapleton D, Teh T, Cox T, Kemp BE, Witters LA (1995b) Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase are members of the SNF1 protein kinase family. *Biochim Biophys Acta* 1266: 73-82.
33. Gao G, Widmer J, Stapleton D, Teh T, Cox T, Kemp BE, Witters LA (1995a) Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase are members of the SNF1 protein kinase family. *Biochim Biophys Acta* 1266: 73-82.
34. Gerber YN, Sabourin JC, Rabano M, Vivanco M, Perrin FE (2012a) Early functional deficit and microglial disturbances in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7: e36000.
35. Gerber YN, Sabourin JC, Rabano M, Vivanco M, Perrin FE (2012b) Early functional deficit and microglial disturbances in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7: e36000.
36. 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.
37. Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, Singh I (2004) 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* 24: 479-487.

38. Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL (2000a) Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 20: 660-665.
39. Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL (2000b) Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 20: 660-665.
40. Graf M, Ecker D, Horowski R, Kramer B, Riederer P, Gerlach M, Hager C, Ludolph AC, Becker G, Osterhage J, Jost WH, Schrank B, Stein C, Kostopulos P, Lubik S, Wekwerth K, Dengler R, Troeger M, Wuerz A, Hoge A, Schrader C, Schimke N, Krampfl K, Petri S, Zierz S, Eger K, Neudecker S, Traufeller K, Sievert M, Neundorfer B, Hecht M (2005) High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study. *J Neural Transm* 112: 649-660.
41. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, . (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264: 1772-1775.
42. Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK (2011b) Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* 29: 824-828.
43. Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK (2011a) Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* 29: 824-828.
44. Hardie DG (2003) Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144: 5179-5183.
45. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 546: 113-120.
46. Helmuth L (2001) Neuroscience. Glia tell neurons to build synapses. *Science* 291: 569-570.
47. Hensley K, Floyd RA, Gordon B, Mou S, Pye QN, Stewart C, West M, Williamson K (2002) Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 82: 365-374.
48. Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED, Holstege JC (2001) CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated

- mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol* 102: 293-305.**
49. **Julien JP (2007a) ALS: astrocytes move in as deadly neighbors. *Nat Neurosci* 10: 535-537.**
 50. **Julien JP (2007b) ALS: astrocytes move in as deadly neighbors. *Nat Neurosci* 10: 535-537.**
 51. **Klein SM, Behrstock S, McHugh J, Hoffmann K, Wallace K, Suzuki M, Aebischer P, Svendsen CN (2005) GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gene Ther* 16: 509-521.**
 52. **Kuramoto N, Ito M, Saito Y, Niihara H, Tanaka N, Yamada KI, Yamamura Y, Iwasaki K, Onishi Y, Ogita K (2012) Dephosphorylation of endogenous GABA(B) receptor R2 subunit and AMPK alpha subunits which were measured by in vitro method using transfer membrane. *Neurochem Int*.**
 53. **Lewis CA, Manning J, Rossi F, Krieger C (2012) The Neuroinflammatory Response in ALS: The Roles of Microglia and T Cells. *Neurol Res Int* 2012: 803701.**
 54. **Lim MA, Selak MA, Xiang Z, Krainc D, Neve RL, Kraemer BC, Watts JL, Kalb RG (2012) Reduced activity of AMP-activated protein kinase protects against genetic models of motor neuron disease. *J Neurosci* 32: 1123-1141.**
 55. **McCullough LD, Zeng Z, Li H, Landree LE, McFadden J, Ronnett GV (2005) Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *J Biol Chem* 280: 20493-20502.**
 56. **Milanese M, Zappettini S, Jacchetti E, Bonifacino T, Cervetto C, Usai C, Bonanno G (2010) In vitro activation of GAT1 transporters expressed in spinal cord gliosomes stimulates glutamate release that is abnormally elevated in the SOD1/G93A(+) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 113: 489-501.**
 57. **Mu J, Brozinick JT, Jr., Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ (2001) A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7: 1085-1094.**
 58. **Ozdinler PH, Benn S, Yamamoto TH, Guzel M, Brown RH, Jr., Macklis JD (2011) Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *J Neurosci* 31: 4166-4177.**
 59. **Qin H, Benveniste EN (2012) ELISA methodology to quantify astrocyte production of cytokines/chemokines in vitro. *Methods Mol Biol* 814: 235-249.**
 60. **Rizzardini M, Mangolini A, Lupi M, Ubezio P, Bendotti C, Cantoni L (2005) Low levels of ALS-linked Cu/Zn superoxide dismutase increase the production of reactive oxygen species and cause mitochondrial damage and death in motor neuron-like cells. *J Neurol Sci* 232: 95-103.**

61. **Ronnett GV, Ramamurthy S, Kleman AM, Landree LE, Aja S (2009) AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. J Neurochem 109 Suppl 1: 17-23.**
62. **Rothstein JD (2009a) Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 65 Suppl 1: S3-S9.**
63. **Rothstein JD (2009b) Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 65 Suppl 1: S3-S9.**
64. **Salt IP, Palmer TM (2012) Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation. Expert Opin Investig Drugs 21: 1155-1167.**
65. **Shi P, Gal J, Kwinter DM, Liu X, Zhu H (2010a) Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. Biochim Biophys Acta 1802: 45-51.**
66. **Shi P, Wei Y, Zhang J, Gal J, Zhu H (2010b) Mitochondrial dysfunction is a converging point of multiple pathological pathways in amyotrophic lateral sclerosis. J Alzheimers Dis 20 Suppl 2: S311-S324.**
67. **Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE (1996) Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. J Biol Chem 271: 611-614.**
68. **Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, Andrikopoulos S, Proietto J, Gorgun CZ, Carling D, Hotamisligil GS, Febbraio MA, Kay TW, Kemp BE (2006) Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. Cell Metab 4: 465-474.**
69. **Thomson DM, Hancock CR, Evanson BG, Kenney SG, Malan BB, Mongillo AD, Brown JD, Hepworth S, Fillmore N, Parcell AC, Kooyman DL, Winder WW (2010) Skeletal muscle dysfunction in muscle-specific LKB1 knockout mice. J Appl Physiol 108: 1775-1785.**
70. **Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF (1999d) Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. J Neurochem 72: 1707-1716.**
71. **Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF (1999b) Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. J Neurochem 72: 1707-1716.**
72. **Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF (1999a) Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. J Neurochem 72: 1707-1716.**
73. **Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF (1999e) Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. J Neurochem 72: 1707-1716.**

74. Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF (1999c) Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem* 72: 1707-1716.
75. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S (2003b) The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* 111: 91-98.
76. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S (2003a) The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* 111: 91-98.
77. Viollet B, Athesa Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L (2009a) AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci* 14: 19-44.
78. Viollet B, Athesa Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L (2009b) AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci* 14: 19-44.
79. Viollet B, Horman S, Leclerc J, Lantier L, Foretz M, Billaud M, Giri S, Andreelli F (2010) AMPK inhibition in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: 276-295.
80. Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, Andreelli F (2009c) Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci* 14: 3380-3400.
81. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, Jing C, Walker PA, Eccleston JF, Haire LF, Saiu P, Howell SA, Aasland R, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ (2011b) Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472: 230-233.
82. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, Jing C, Walker PA, Eccleston JF, Haire LF, Saiu P, Howell SA, Aasland R, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ (2011a) Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472: 230-233.
83. Yang W, Hong YH, Shen XQ, Frankowski C, Camp HS, Leff T (2001) Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase: phosphorylation of p300 blocks its interaction with nuclear receptors. *J Biol Chem* 276: 38341-38344.
84. Yoo YE, Ko CP (2012) Dihydrotestosterone ameliorates degeneration in muscle, axons and motoneurons and improves motor function in amyotrophic lateral sclerosis model mice. *PLoS One* 7: e37258.

- 85. Zhang Y, Wang Y, Bao C, Xu Y, Shen H, Chen J, Yan J, Chen Y (2012)
Metformin interacts with AMPK through binding to gamma subunit. Mol Cell
Biochem 368: 69-76.**

Manuscripts consulté :

- Alain Longstaff, Neuroscience, BIOS Instant Notes, 2nd edition, Taylor and Francis Group, 2005, USA, pp. 72-73.

Sites internet visités :

- http://lecerveau.mcgill.ca/flash/i/i_06/i_06_cl/i_06_cl_mou/i_06_cl_mou.html
- www.ninds.nih.gov/disorders/amyotrophiclateralsclerosis.html
- www.als.org/aboutals.html
- <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SOD1>
- http://portail-sla.fr/popup/content/static%252Fpopups%252Fmal_def_17.htm
- <http://staff.um.edu.mt/ghun1/RESEARCH/research.html>
- Neuroscience: Glia — more than just brain glue