



Faculté de Médecine et de Pharmacie

2022-2023

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 8 avril 2013)**

présentée et soutenue publiquement
le 28 septembre 2023 à POITIERS
par **Monsieur THEBEAUD Romain**

Stratégies thérapeutiques dans la sclérose latérale amyotrophique :
adaptation de l'environnement expérimental
d'un modèle de souris transgéniques

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur SARROUILHE Denis

Membres : Madame la Docteur KHAIRALLAH Maya
Monsieur le Docteur PREHAUD Christophe

Directeur de thèse : Madame la Professeur PAGE Guylène



LISTE DES ENSEIGNANTS

Année universitaire 2022 – 2023

SECTION PHARMACIE

Professeurs des universités-praticiens hospitaliers

- COUET William, pharmacie clinique
- DUPUIS Antoine, pharmacie clinique – **Assesseur pédagogique pharmacie**
- FOUCHER Yohann, santé publique, biostatistiques et épidémiologie
- MARCHAND Sandrine, pharmacologie, pharmacocinétique
- RAGOT Stéphanie, santé publique

Professeurs des universités

- BODET Charles, microbiologie
- CARATO Pascal, chimie thérapeutique
- FAUCONNEAU Bernard, toxicologie
- GUILLARD Jérôme, pharmacochimie
- IMBERT Christine, parasitologie et mycologie médicale
- OLIVIER Jean-Christophe, pharmacie galénique, biopharmacie et pharmacie industrielle
- PAGE Guylène, biologie cellulaire, biothérapeutiques
- RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique
- SARROUILHE Denis, physiologie humaine – **Directeur de la section pharmacie**

Maîtres de conférences des universités-praticiens hospitaliers

- BARRA Anne, immuno-hématologie
- BINSON Guillaume, pharmacie clinique
- THEVENOT Sarah, hygiène, hydrologie et environnement

Maîtres de conférences

- BARRIER Laurence, biochimie générale et clinique
- BON Delphine, biophysique
- BRILLAULT Julien, pharmacocinétique, biopharmacie
- BUYCK Julien, microbiologie
- CHAUZY Alexia, pharmacologie fondamentale et thérapeutique
- DEBORDE-DELAGE Marie, chimie analytique
- DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique
- FAVOT-LAFORGE Laure, biologie cellulaire et moléculaire (HDR)
- GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie
- GREGOIRE Nicolas, pharmacologie et pharmacométrie (HDR)
- HUSSAIN Didja, pharmacie galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile, pharmacochimie
- PAIN Stéphanie, toxicologie (HDR)
- PINET Caroline, physiologie, anatomie humaine
- RIOUX-BILAN Agnès, biochimie – **Référente CNAES – Responsable du dispositif COME'in**
- TEWES Frédéric, chimie et pharmacotechnie
- THOREAU Vincent, biologie cellulaire et moléculaire
- WAHL Anne, phytothérapie, herborisation, aromathérapie

Maîtres de conférences associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- ELIOT Guillaume, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

ENSEIGNEMENT DE L'ANGLAIS

- DEBAIL Didier, professeur certifié

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude au Professeur Denis Sarrouilhe et à l'ensemble de l'équipe pédagogique de la Faculté de Pharmacie de Poitiers pour leur enseignement attentif, leurs conseils avisés et leur soutien constant essentiel pour mon développement en tant qu'étudiant en pharmacie.

Je remercie le Professeur Guylène Page pour son influence déterminante sur mon parcours de recherche. La création de la filière Recherche de Pharmacie a ouvert la voie à de nombreuses opportunités d'apprentissage et d'exploration dans le domaine de la recherche scientifique. Son dévouement et son soutien inconditionnel ont été d'une grande aide pour la poursuite de nos objectifs respectifs. En tant que directrice de ma thèse, son expertise, ses conseils et ses relectures m'ont permis d'avancer dans la rédaction, mais aussi dans l'apprentissage de nouvelles connaissances.

J'exprime ma profonde gratitude envers Monique Lafon et Pascal Voisin pour avoir sélectionné ma candidature pour l'année en alternance et les quelques mois qui ont suivi servant de support à la partie expérimentale de cette thèse. Je souhaite également adresser mes remerciements à l'équipe de NeuroPhoenix pour son accueil chaleureux et son accompagnement tout au long de cette période.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers l'Institut Pasteur qui m'a accueilli dans ses locaux, ainsi qu'envers toute l'unité de Neuro-Immunologie Virale de l'Institut Pasteur. Je souhaite tout particulièrement remercier Christophe Préhaud pour le partage de son expertise scientifique précieuse et pour ses conseils éclairés. Mes remerciements vont également à Marie-Christine Cumont pour son assistance précieuse dans la réalisation de certaines expériences et le partage de ses compétences techniques.

J'ai une reconnaissance toute particulière envers Anthony Deust, mon compagnon de route tout au long de cette année d'alternance. Son engagement à suivre les expériences en mon absence a été essentiel, et je suis reconnaissant d'avoir eu la chance de réaliser l'ensemble de mes missions à ses côtés. Je le remercie également d'avoir pris le temps de me former et de partager ses connaissances théoriques et pratiques dans notre domaine.

Enfin, je souhaite remercier mes parents qui m'ont donné la curiosité et le goût des études et m'ont permis de les réaliser confortablement.

SOMMAIRE

1	Introduction.....	1
2	Sclérose latérale amyotrophique	2
2.1	Histoire et présentation générale	2
2.2	Épidémiologie	2
2.3	Étiologie	3
2.3.1	Facteurs génétiques	3
2.3.2	Facteurs environnementaux.....	7
2.4	Physiopathologie	8
2.4.1	Stress oxydatif.....	9
2.4.2	Excitotoxicité	10
2.4.3	Dysfonctionnement mitochondrial.....	10
2.4.4	Altération de l'homéostasie des protéines.....	11
2.4.5	Neuro-inflammation	12
2.4.6	Dommmages et réparation de l'ADN.....	14
2.4.7	Dérégulation du métabolisme et du transport nucléocytoplasmique de l'ARN... 14	
2.4.8	Altération du trafic intracellulaire	15
2.4.9	Altération du transport et de l'intégrité axonal	15
2.4.10	Microbiote intestinal	15
2.5	Clinique	16
2.6	Diagnostic.....	18
2.7	Prise en charge	19
2.7.1	Rééducation, réadaptation, dispositifs médicaux et autres éléments de compensation des déficiences motrices	21
2.7.2	Suppléance des fonctions vitales.....	22
3	Prise en charge médicamenteuse	24
3.1	Traitements à visée symptomatique	24
3.2	Traitements de fond.....	25
3.2.1	Approches pharmacologiques	25

3.2.2	Approches de thérapies innovantes	34
4	Modèles de sclérose latérale amyotrophique	41
4.1	<i>In vitro</i>	41
4.2	<i>In vivo</i>	41
4.2.1	Modèles de souris	41
4.2.2	Autres espèces animales	48
5	Caractérisation d'un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique, le modèle SOD1-G93A	50
5.1	Introduction	51
5.2	Matériels et méthodes	51
5.2.1	Animaux	51
5.2.2	Tests de motricité	52
5.2.3	Perfusion intracardiaque et prélèvement des organes/tissus	52
5.2.4	Cytométrie en flux	53
5.2.5	Analyses statistiques	54
5.3	Résultats	54
5.3.1	Amélioration du bien-être animal	54
5.3.2	Suivi de la morbidité	55
5.3.3	Influence de la donnée de génotypage sur la symptomatologie	58
5.3.4	Profil immunologique de la ME au stade tardif de la pathologie (score neurologique 3 tardif et score 4)	59
6	Discussion	62
7	Conclusion	69
	BIBLIOGRAPHIE	70
	WEBOGRAPHIE	93
	ANNEXE 1	95
	ANNEXE 2	96
	ANNEXE 3	97
	ANNEXE 4	98

ABRÉVIATIONS

AAV : Virus adéno-associé

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALAT : Alanine aminotransférase

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANR : Agence nationale pour la recherche

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARSLA : Association de la recherche pour la sclérose latérale amyotrophique

ASO : Oligonucléotide antisens

ATP : Adénosine triphosphate

BAC : Chromosome artificiel bactérien

CETEA : Comité d'éthique pour l'expérimentation animale

CRP : Protéine C réactive

DDR : Réponse aux dommages de l'ADN

DRP : Protéine dipéptidique répétée

DFT : Démence fronto-temporale

EMA : Agence européenne des médicaments

ENU : N-éthyl-N-nitrosourée

FDA : Food and Drug Administration

FUS : Protéine de fusion du sarcome

GWAS : Étude d'association à l'échelle du génome

iPS : Cellules souches pluripotentes induites

ISR : Réponse intégrée au stress

JNM : Jonction neuro-musculaires

LT : Lymphocyte T

ME : Moelle épinière

miARN : MicroARN

MSC : Cellules souches mésenchymateuses

NEFH : Chaîne lourde des neurofilaments

NTF : Facteur neurotrophique

NLS : Signal de localisation nucléaire

NIV : Neuro-immunologie virale

NPX : Neurophoenix

NV : Polypeptide NPX ou Neurovita

PBS : Phosphate buffer saline

PKC : Protéine kinase C

PRCE : Projet de recherche collaborative-entreprise

PrP : Protéine prion

ROS : Espèce réactive de l'oxygène

Rpm : Rotations par minute

SBEA : Structure de bien-être animal

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SNC : Système nerveux central

SOD1 : Cuivre/Zinc superoxyde dismutase 1

Tg : Transgénique

Tregs : Lymphocyte T régulateur

WES : Séquençage de l'exome entier

WGS : Séquençage du génome entier

WT : Wild-type

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Options de traitement et de gestion des symptômes dans la SLA. [7].	24
Tableau 2: Thérapies pharmacologiques approuvées dans le traitement de la SLA par la FDA.	26
Tableau 3: Âges moyens de survenue des scores neurologiques (en jours \pm SEM). 	57

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Chronologie de découverte des gènes causatifs de la SLA depuis 1990. (Gregory et al., 2020).	4
Figure 2: Prévalence des causes génétiques les plus connues de la SLA en Europe et au Japon. (Suzuki et al., 2023).	5
Figure 3: Mécanismes pathogéniques de la SLA et les gènes impliqués. (Mead et al., 2023).	7
Figure 4: La dégénérescence neuronale dans la SLA. [2].	17
Figure 5: Carte d'urgence « Maladies du neurone moteur ». [6].	21
Figure 6: Médicaments en développement dans la SLA début 2023 en fonction de leur cible thérapeutique. (Mead et al., 2023).	25
Figure 7: Avantages et inconvénients des modèles in vitro et in vivo pour l'étude de la SLA. (Gois et al., 2020)	49
Figure 8: Gestion des souris Tg SOD1-G93A et amélioration du bien-être animal.	55
Figure 9: Poids des souris Tg SOD1-G93A et des souris WT.	56
Figure 10: Âges de survenue des scores neurologiques chez des souris Tg SOD1-G93A.	57
Figure 11: Comparaison des capacités motrices des souris Tg SOD1-G93A et des souris WT (test du RotaRod).	58
Figure 12: Corrélacion entre le nombre de copies du transgène SOD1 et l'évolution des symptômes.	59
Figure 13: Comparaison des leucocytes extraits de la ME de souris WT et de souris Tg SOD1-G93A à un stade tardif (score 3-4).	60
Figure 14: Comparaison des lymphocytes migrants extraits de la ME de souris WT et de souris Tg SOD1-G93A à un stade tardif (score 3-4).	61

1 Introduction

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), maladie de Charcot ou encore maladie de Lou Gehrig est la maladie du motoneurone la plus fréquente chez l'Homme. Elle est caractérisée par une dégénération des motoneurons du système nerveux central (SNC) à l'origine d'une atrophie musculaire évoluant vers une paralysie puis la mort dans les 2 à 3 ans qui suivent le diagnostic.

La maladie existe sous deux formes, une familiale impliquant des facteurs génétiques, mais également une forme sporadique associant des facteurs génétiques à des facteurs environnementaux. La SLA se caractérise par une physiopathologie complexe mettant en jeu de multiples mécanismes biologiques différents correspondant à autant de cibles thérapeutiques potentielles.

Cependant, à l'heure actuelle, cette maladie orpheline ne présente pas de traitements curatifs et les traitements autorisés dans le monde sont encore limités. En Europe, un seul médicament dispose d'une autorisation de mise sur le marché, le riluzole. Cet anti-excitotoxique permet la prolongation de l'espérance de vie de quelques mois seulement. Cela induit une nécessité de poursuivre le développement de nouvelles thérapies pharmacologiques, mais aussi de thérapies innovantes ouvrant de nouvelles perspectives pour traiter cette maladie.

De nombreux candidats-médicaments ont dû arrêter leur développement au cours des phases cliniques précoces en l'absence de résultats concluants. Ces échecs indiquent une difficulté de translation entre les modèles animaux utilisés en préclinique et le passage à l'Homme. Il est possible de pallier à cela en choisissant un modèle animal adapté et en le caractérisant convenablement.

Dans une partie expérimentale, le modèle murin transgénique SOD1-G93A a été choisi pour le développement d'une biomolécule indiquée dans la SLA. Ce choix repose sur le fait que le modèle développe une forme agressive de la maladie et partage des caractéristiques cliniques avec la SLA. L'objectif du projet était de caractériser le modèle de souris Tg SOD1-G93A afin d'établir par la suite la preuve de concept *in vivo* de la capacité d'une molécule à retarder l'évolution de la maladie dans ce modèle.

2 Sclérose latérale amyotrophique

2.1 Histoire et présentation générale

La SLA est aussi appelée maladie de Charcot d'après le nom du neurologue l'ayant décrit en 1865, Jean-Michel Charcot. Elle est également connue sous le nom de maladie de Lou Gehrig, un joueur américain de base-ball mort de cette maladie.

Il s'agit de la maladie du motoneurone la plus fréquente chez l'adulte et celle dont la létalité est la plus forte [1]. Elle est caractérisée par une dégénérescence des motoneurons supérieurs et inférieurs du SNC, composé du cortex cérébral, du tronc cérébral et de la moelle épinière (ME) (Rowland & Shneider, 2001).

Les motoneurons sont à l'origine de la transmission d'informations entre le cerveau et les muscles volontaires, par conséquent, leur mort ou leur dysfonctionnement induit la survenue de maladies neurodégénératives et neuromusculaires (Zuccaro et al., 2021). Leur dégénérescence est ainsi à l'origine d'une perte de la transmission d'informations entre le cerveau et les muscles volontaires qui ne sont donc plus sollicités, ne se contractent pas et s'atrophient. Cela mène dans un premier temps à une faiblesse puis à une paralysie progressive et à la mort dans les 2 à 3 ans, lorsque les muscles respiratoires sont atteints (Hardiman et al., 2017; Masrori & Van Damme, 2020).

2.2 Épidémiologie

Selon l'association pour la recherche sur la SLA (ARSLA), la prévalence de la SLA est de 5 000 à 7 000 patients en France avec une incidence annuelle proche de 2,72 pour 100 000 habitants (Kab et al., 2017). Sur le plan clinique, la SLA débute en moyenne à l'âge de 55-60 ans avec une faible prépondérance masculine avec un sexe *ratio* homme/femme en France estimé à 1,53. Cependant, le nombre de femmes affectées augmente avec l'âge.

Au niveau mondial, 150 000 personnes vivent avec la maladie et 1 200 personnes en meurent chaque année [2]. L'incidence mondiale est approximativement de 2 pour 100 000 personnes par an et la prévalence est de 6 à 9 sur 100 000 personnes (Mead et al., 2023). Les cas de SLA juvéniles (avant 25 ans) et précoces (avant 45 ans) comptent respectivement pour 1 et 10% des cas. Après 80 ans, l'incidence diminue fortement. Le temps de survie médian est d'environ 2 à 3 ans, environ 20% des patients survivent plus de 5 ans et un petit pourcentage plus de 10 ans.

Les principaux facteurs péjoratifs identifiés statistiquement sont un âge avancé, une atteinte bulbaire initiale, l'absence de signes cliniques pyramidaux, une altération précoce de l'état

nutritionnel et une pente rapide de dégradation des fonctions motrices des membres ou respiratoire [3].

Les données épidémiologiques actuelles indiquent un risque de SLA différent selon les continents et les ethnies. Selon le consortium européen de la sclérose latérale amyotrophique (EURALS), se basant sur les données d'environ 24 millions de personnes à travers l'Europe, l'incidence estimée était de 2,2 pour 100 000 personnes par an. Cependant, des incidences plus faibles ont été retrouvées dans d'autres zones géographiques, 0,89 pour 100 000 en Asie de l'Est et 0,79 pour 100 000 en Asie du Sud. Tandis que d'autres régions comme l'Afrique ou l'Amérique latine ne disposent pas d'études populationnelles. Ces différences pourraient notamment être la conséquence des facteurs environnementaux.

2.3 Étiologie

À ce jour, chez la majorité des patients, la cause de la SLA est inconnue, même si certains patients ont une forme familiale de la maladie associée à des mutations génétiques. La SLA est ainsi subdivisée en deux formes, une forme familiale comptant pour 5 à 10% des cas qui ont généralement un mode de transmission mendélienne autosomique dominant, et les formes sporadiques. La cause initiale des formes sporadiques est inconnue, mais probablement multifactorielle, associant des facteurs environnementaux et des facteurs de susceptibilités génétiques [2].

2.3.1 Facteurs génétiques

Les formes génétiques peuvent être monogéniques lorsqu'un gène unique est impliqué, ou multigéniques lorsque la maladie est causée par la présence d'anomalie au niveau de plusieurs gènes. La SLA a une cause monogénique dans 10 à 21% des patients, mais dans la majorité des cas, il s'agit de l'interaction entre différents facteurs génétiques et environnementaux [2] (Mead et al., 2023).

La cause génétique des formes familiales de la maladie est identifiée dans 60 à 70% des cas (Ranganathan et al., 2020). Bien que les cas sporadiques n'aient pas de causes identifiées, de larges études génomiques ont suggéré que les cas sporadiques de SLA se basaient essentiellement sur de rares variants génétiques (Hardiman et al., 2017; van Rheenen et al., 2016). L'héritabilité est estimée approximativement à 50% (Ryan et al., 2019). Dans les populations d'origine européenne, jusqu'à 20% des individus atteints de SLA ont un historique familial soit de SLA soit de démence fronto-temporale (DFT).

Le premier gène à avoir été identifié est celui de la cuivre/zinc superoxyde dismutase 1 (SOD1) en 1993 par Rosen (Rosen et al., 1993). Désormais, avec la multiplication des études et des stratégies d'analyse du génome, plus de 40 gènes ont été incriminés dans la SLA

(Gregory et al., 2020) (Figure 1). Parmi ces derniers, 4 gènes comptent pour la moitié de l'ensemble des cas de SLA familiale : *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9orf72*. Des différences ethniques dans l'analyse génétique ont été trouvées. Des mutations de ces gènes ont été identifiées chez 55,5% des Européens atteints de SLA familiale et 43,6% des Japonais atteints de SLA familiale. La différence entre les cas européens et japonais est principalement due à la différence de fréquence de mutations de *C9orf72*. De plus, les mutations de *SOD1* et *FUS* sont plus courantes chez les Japonais, tandis que celles de *TARDBP* sont plus courantes chez les Européens (Suzuki et al., 2023) (Figure 2).

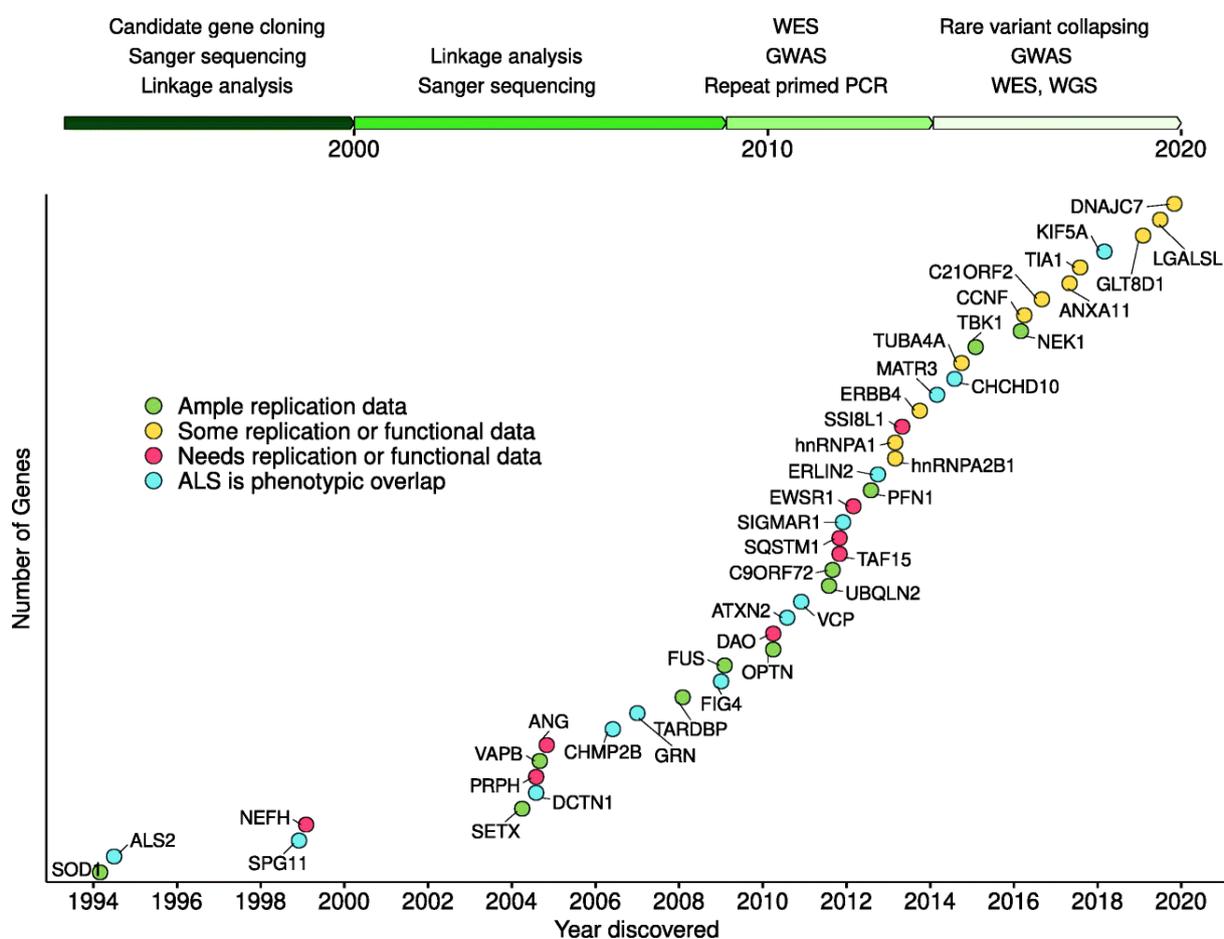


Figure 1: Chronologie de découverte des gènes causatifs de la SLA depuis 1990. Depuis la découverte de *SOD1*, plus de 40 gènes ont été identifiés en utilisant différentes stratégies d'analyse comme l'étude d'association à l'échelle du génome (GWAS), le séquençage de l'exome entier (WES) ou le séquençage du génome entier (WGS) (Gregory et al., 2020).

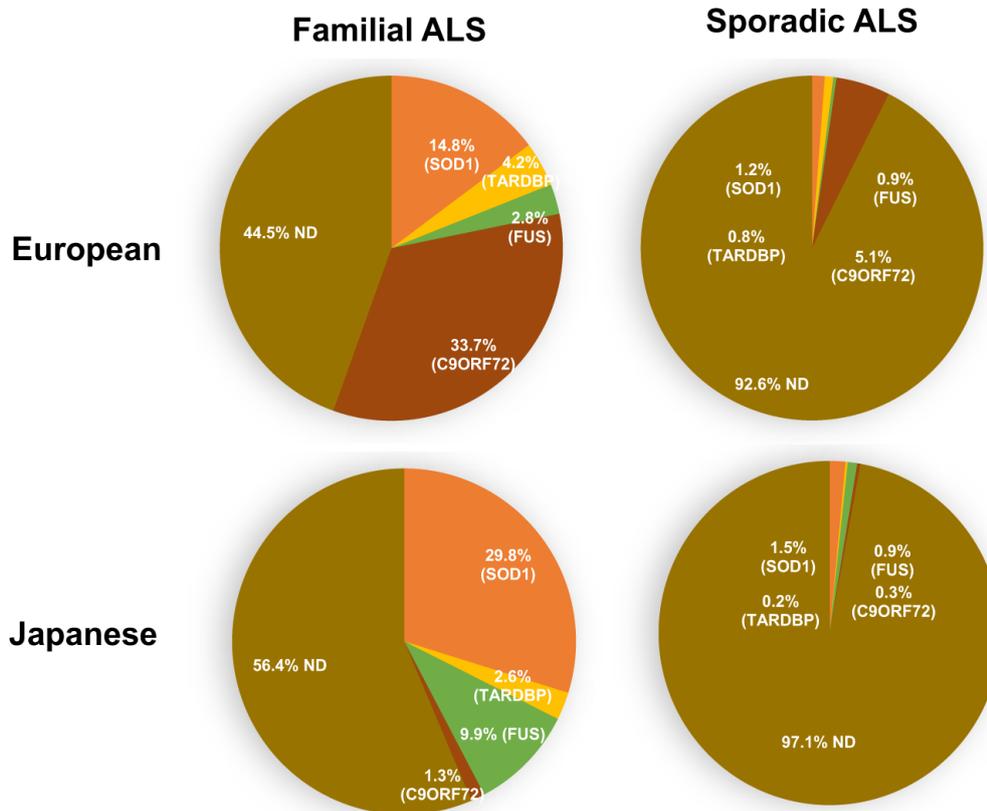


Figure 2: Prévalence des causes génétiques les plus connues de la SLA en Europe et au Japon. Des mutations des 4 gènes principaux ont été décelées chez 55,5% des Européens atteints de SLA familiale et chez 43,6% des Japonais touchés par cette forme familiale. En ce qui concerne la SLA sporadique, les mutations de ces gènes ne représentent que 7,4% en Europe et 2,9% au Japon (Suzuki et al., 2023).

La protéine SOD1 est une métallo-enzyme cytosolique qui participe à l'élimination des radicaux libres en catalysant la conversion des anions superoxydes en oxygène et peroxyde d'hydrogène (Rosen et al., 1993). Les mutations du gène codant pour cette enzyme (chromosome 21) peuvent causer la mort des motoneurones par l'acquisition de propriétés toxiques en raison de protéines mal formées, d'agrégats de protéines et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Ciryam et al., 2017; Ezzi et al., 2007; Grad & Cashman, 2014). Toutefois, il y a une variation considérable dans l'activité enzymatique de ces protéines mutées (Ezzi et al., 2007).

Les mutations de ce gène comptent pour 14,8% des formes familiales en Europe, pour environ 29,8% des formes familiales au Japon, et pour 1 à 2% des formes sporadiques. En plus de cela, des disparités existent dans la prévalence des mutations du gène *SOD1* entre l'Europe, l'Amérique du Nord et le Japon (Suzuki et al., 2023) (Figure 2).

Le gène *TARDBP* (chromosome 1) est un des gènes principaux retrouvés mutés dans la SLA, identifié comme causatif en 2006. Il code pour la protéine de liaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN) TAR 43 (TDP-43) qui participe à la régulation du traitement et l'épissage de l'acide ribonucléique (ARN). Cette protéine est essentielle au fonctionnement et

à la survie des neurones (Archbold et al., 2018). Il s'agit de la protéine retrouvée la plus fréquemment dans les agrégats protéiques au niveau du cytoplasme des neurones dans les cas de SLA et de DFT (Suk & Rousseaux, 2020). Ce phénomène pathologique est considéré comme caractéristique de la SLA, étant donné qu'il est retrouvé dans 97% de l'ensemble des cas de SLA, à l'exception des formes familiales causées par des mutations de *SOD1* et *FUS*. L'agrégation pourrait être la conséquence d'un défaut de recyclage des déchets à l'intérieur des cellules (Mead et al., 2023). Sa perte de fonction altère le transport axonal et est associée à la neurodégénérescence (Alami et al., 2014).

Les mutations de cette protéine comptent pour 4,2% des formes familiales en Europe et 2,6% au Japon. Elles représentent également 0,8% des formes sporadiques en Europe et 0,2% au Japon (Suzuki et al., 2023) (Figure 2).

Des altérations génétiques du gène *FUS*, qui code pour une protéine de liaison à l'ARN, la protéine de fusion du sarcome (FUS), ont également été impliquées dans la pathogenèse de la maladie. Ce gène a été identifié comme causatif de la SLA en 2009. À l'état physiologique, la protéine est impliquée à différentes étapes de l'expression génique. Normalement localisée dans le noyau cellulaire, lorsque cette protéine est mutée, elle s'accumule dans le cytoplasme des cellules nerveuses, formant des agrégats qui mènent à la mort des motoneurones dans la SLA (Ciryam et al., 2017; C. Huang et al., 2011; Kwiatkowski et al., 2009; Naumann et al., 2018; Vance et al., 2009).

Au Japon, les mutations de *FUS* sont les deuxièmes plus fréquentes parmi les cas familiaux avec près de 10% des cas. En Europe, les mutations de *FUS* ne représentent que 2,8% des cas familiaux. Dans les deux populations, les mutations de ce gène comptent pour 0,9% des formes sporadiques (Suzuki et al., 2023) (Figure 2).

L'expression répétée de l'hexanucléotide « GGGGCC » dans la région non codante du gène *C9orf72* a été associée à plusieurs formes de SLA et est responsable d'une neurodégénérescence (DeJesus-Hernandez et al., 2011; McGoldrick et al., 2018; Renton et al., 2011). Les fonctions de *C9orf72* ne sont pas encore élucidées, mais semblent impliquées dans le trafic des protéines.

Alors que la fréquence de la mutation *C9orf72* est estimée à 40% en Europe et aux États-Unis, elle est moins fréquente au Japon, autour de 1 à 2% dans la SLA familiale et 0,2% dans la SLA sporadique (Suzuki et al., 2023) (Figure 2).

D'autres mutations génétiques moins fréquentes, sont également mises en cause dans certains cas de SLA, telles que VABP, OPTN, VCP, UBQLN2, MATR3, TBK1, NEK1, C21ORF2,

entre autres (Chia et al., 2018; Leblond et al., 2014). De nouveaux locus à risque génétique continuent d'être identifiés (van Rheenen et al., 2021).

Ces mutations sont impliquées dans un ensemble de mécanismes biologiques essentiels comme le stress oxydatif, l'excitotoxicité, la dérégulation des fonctions mitochondriales, l'homéostasie protéique, la neuro-inflammation, le métabolisme des ARN ou encore le trafic intracellulaire (Figure 3).

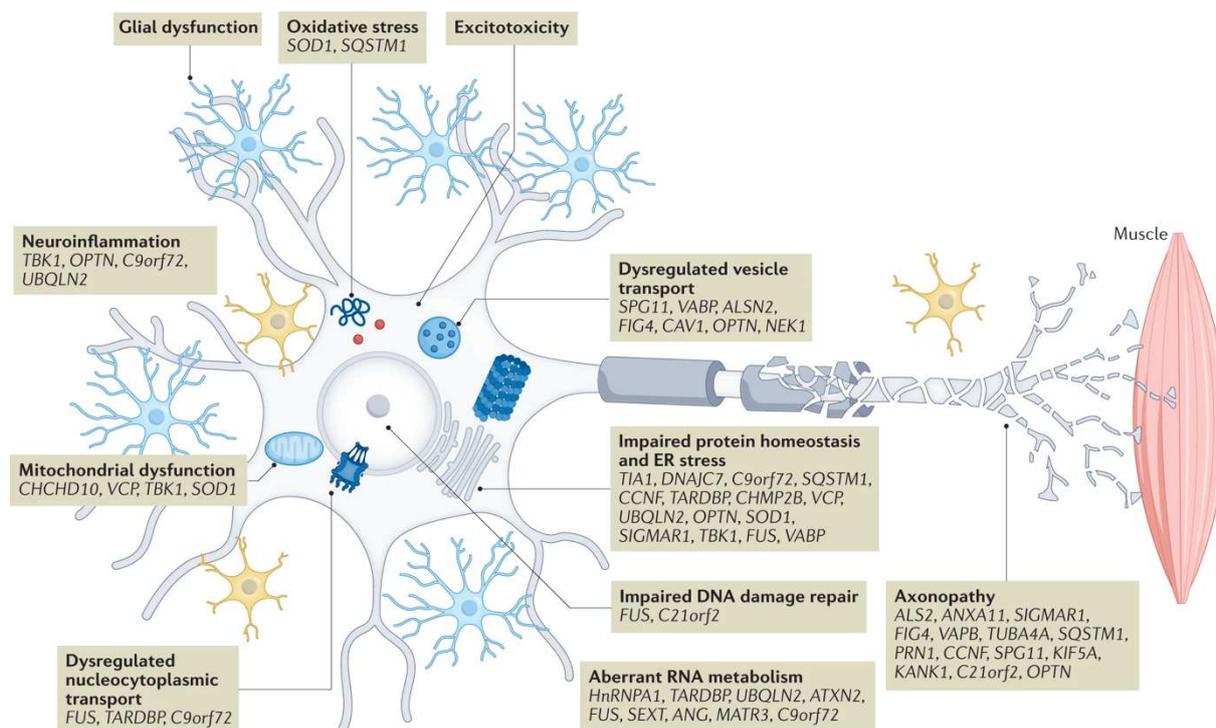


Figure 3: Mécanismes pathogéniques de la SLA et les gènes impliqués. (Mead et al., 2023).

La distinction entre les formes familiales et sporadiques tend à disparaître en faveur d'une standardisation du profilage génétique des patients. La maladie pourra être classée en fonction des mutations génétiques associées.

De nombreuses mutations génétiques sont présentes de nombreuses années avant la survenue de la maladie. L'âge tardif de survenue de la maladie suggérerait un processus complexe impliquant les facteurs de risques génétiques, mais également le mode de vie et des facteurs de risques environnementaux (Al-Chalabi et al., 2014).

2.3.2 Facteurs environnementaux

Il est supposé qu'un grand nombre de facteurs environnementaux accroissent le risque de développer la SLA, en altérant les fonctions des cellules nerveuses. Cependant, la majorité de ces facteurs n'ont pas été identifiés comme une cause certaine de la maladie, avec la présence de résultats contradictoires souvent causés par la présence de facteurs de confusion au sein

des études épidémiologiques. À l'heure actuelle, les seuls facteurs de risques confirmés sont l'âge et le sexe masculin (Longinetti & Fang, 2019).

Les facteurs les plus retrouvés dans les études sont la cyanotoxine β -méthylamino-L-alanine (L-BMAA), le formaldéhyde, le sélénium et les métaux lourds comme le manganèse, le mercure, le zinc et le cuivre (Newell et al., 2022; Spencer et al., 2019). Les engrais, les pesticides, les radiations, les polluants atmosphériques et les solvants aromatiques sont des facteurs pouvant également être associés à la maladie (Malek et al., 2015; Yu et al., 2014).

Le tabagisme semble être un facteur de risque important de SLA, soutenu par des données épidémiologiques et génétiques (Armon, 2019; Bandres-Ciga et al., 2019). Plusieurs études ont montré que les personnes fumeuses ont un risque accru de développer la SLA par rapport aux non-fumeurs. La précocité, la durée et l'intensité du tabagisme jouent également un rôle (Vasta et al., 2022). Cependant, toutes les études n'ont pas soutenu cette hypothèse (Alonso et al., 2010). Fumer pourrait augmenter le stress oxydatif par la production de ROS.

Concernant l'activité physique excessive, la littérature souligne son rôle délétère dans la survenue de la SLA (Al-Chalabi & Hardiman, 2013). Une étude de randomisation mendélienne récente a mis en évidence un lien direct entre l'activité sportive et le risque de SLA, suggérant une relation causale (Julian et al., 2021). Un exercice intensif pourrait exercer une pression accrue sur le système moteur, notamment par le stress oxydatif (Vasta et al., 2022). Les données obtenues sont souvent contradictoires et le niveau d'exercice nécessaire pour augmenter le risque n'est pas défini (M.-D. Wang et al., 2017). Il a d'ailleurs été montré qu'une activité sportive chez des patients atteints de SLA entraînait un changement métabolique cérébral qui suggérerait une meilleure capacité de résistance au processus neurodégénératif (Canosa et al., 2020).

La lipidémie est également un des facteurs étudiés ces dernières années. Une étude de randomisation mendélienne récente a montré que l'augmentation des lipoprotéines de basse densité (LDL) plasmatique est directement corrélée avec le risque de développer la SLA (Bandres-Ciga et al., 2019). Les données épidémiologiques n'ont pas toujours été en faveur de ce résultat avec une nouvelle fois des résultats contradictoires. Une large étude a montré qu'un grand nombre de médicaments hypolipémiants ont été associés à un risque plus faible de SLA (Pfeiffer et al., 2020).

2.4 Physiopathologie

Les mécanismes à l'origine de la dégénérescence des motoneurones au cours de la SLA sont encore mal compris. Ils sont considérés comme résultant de l'interaction entre différents mécanismes physiopathologiques distincts. La SLA est une maladie hétérogène dans laquelle

chaque individu a des mécanismes différents plus ou moins impliqués dans la survenue de la maladie.

2.4.1 Stress oxydatif

Le stress oxydatif intervient lors d'un déséquilibre entre les radicaux libres pro-oxydants et les antioxydants ou quand la cellule est incapable de réparer ou éliminer les dommages causés par ce stress. Cela va être à l'origine d'une production excessive de ROS qui ont un rôle important à la fois en conditions physiologique et pathologique, pouvant exercer des fonctions opposées sur le métabolisme cellulaire (Maldonado et al., 2020).

Le processus de stress oxydatif est à l'origine de dommages neuronaux et favoriserait le vieillissement du SNC en altérant la structure et la fonction de protéines, lipides, ADN et ARN. Les ROS peuvent provoquer des mutations de l'ADN mitochondrial, influencer sur la perméabilité membranaire et l'homéostasie du calcium, ainsi que renforcer l'oxydation des lipides et la carbonylation des protéines, tout ceci participant à la physiopathologie de diverses maladies neurodégénératives (Singh et al., 2019). Des preuves croissantes suggèrent que les dommages oxydatifs jouent un rôle clé dans la physiopathologie de la SLA (Barber & Shaw, 2010; Ferraiuolo et al., 2011).

Des études ont montré que les patients atteints de SLA présentent des niveaux élevés de biomarqueurs de stress oxydatif, tels que les ROS et les produits de peroxydation lipidique, dans le liquide céphalo-rachidien et le plasma sanguin (Park & Yang, 2021). Les modèles de SLA sont également associés à l'altération du système de défense antioxydant comme la dérégulation de l'homéostasie du glutathion et de la voie Nrf2-ARE (Mead et al., 2023). Nrf2 est un régulateur de multiples réponses cytoprotectrices, qui participe à la transcription de gènes impliqués notamment dans la régulation du glutathion. L'altération de la voie Nrf2-ARE est associée à la pathologie de la SLA et entraîne un stress oxydatif (Arslanbaeva & Bisaglia, 2022).

Le stress oxydatif est un processus complexe associé à d'autres mécanismes comme l'agrégation protéique et le dysfonctionnement mitochondrial qui contribuent à l'élévation des ROS. Des études biochimiques et cellulaires ont déterminé que le stress oxydatif favoriserait la mauvaise localisation, la phosphorylation et la formation d'agrégats de TDP-43 ressemblant à ceux retrouvés dans le SNC de patients atteints de la SLA. À l'inverse, l'agrégation de TDP-43 enferme des microARN (miARN) et des protéines, notamment des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire, à l'origine d'une dérégulation des fonctions mitochondriales entraînant une intensification du stress oxydatif (Mead et al., 2023).

Le stress oxydatif est aussi impliqué dans les interactions entre motoneurones, microglie et astrocytes (Deora et al., 2020; Kazama et al., 2020).

2.4.2 Excitotoxicité

L'excitotoxicité est une transmission excessive du neurotransmetteur glutamate, qui entraîne une augmentation du calcium dans les neurones récepteurs du signal entraînant des effets neurotoxiques. L'excitotoxicité entraîne des changements pathologiques à l'origine d'autres mécanismes biologiques comme le stress du réticulum endoplasmique ou encore une surcharge en calcium de la mitochondrie. Une exposition excessive au glutamate entraîne également une diminution intracellulaire de l'antioxydant glutathion et augmente par conséquent les signes de stress oxydatif (Mead et al., 2023).

L'excitotoxicité est impliquée dans les maladies neurodégénératives, dont la SLA en raison d'une sensibilité accrue des motoneurones à ce phénomène. Ils possèdent une faible expression en protéines tampon du calcium (parvalbumine et calbindine) ainsi que des récepteurs à l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) plus perméables au calcium que les autres sous-types neuronaux. Le transporteur d'acides aminés excitateurs 2 (GLT1-EAAT2), est une protéine astrogliale responsable en grande partie de la recapture synaptique en glutamate. Cette protéine est altérée ou diminuée dans la SLA, ce qui entraîne une accumulation synaptique de glutamate à l'origine de la toxicité envers les motoneurones. L'excitotoxicité est un mécanisme considéré comme commun à l'ensemble des formes de SLA (Mead et al., 2023).

2.4.3 Dysfonctionnement mitochondrial

Les mitochondries sont des organites présents dans les cellules eucaryotes, essentiels pour la production de bioénergie ou adénosine triphosphate (ATP), le métabolisme cellulaire, la transduction du signal, l'homéostasie du calcium, les réponses immunitaires et l'apoptose. La stabilité de leurs fonctions joue ainsi un rôle crucial dans les neurones (Zhao et al., 2022).

Des anomalies mitochondriales sont au cœur de la physiopathologie de différentes maladies neurodégénératives (Obrador et al., 2021). Ces anomalies sont retrouvées au sein des motoneurones, elles peuvent être structurelles ou fonctionnelles et sont à l'origine d'un ensemble de phénomènes. Les phénomènes observés dans les cas de SLA sont variés et incluent des altérations de la structure des mitochondries (qui deviennent gonflées ou vacuolées), des perturbations dans la production d'énergie, une surproduction de ROS, des altérations de la perméabilité et du transport mitochondrial, des dysfonctionnements dans la mitophagie et le tamponnage calcique, ainsi que le déclenchement de l'apoptose (Hardiman et al., 2017; Mead et al., 2023).

Les mutations de gènes comme *FUS* et *SOD1*, et la présence de protéines anormales retrouvées chez les patients atteints de SLA mènent à des dommages mitochondriaux. TDP-43 a un rôle dans le maintien de l'homéostasie de la mitochondrie en régulant la traduction des ARNs mitochondriaux. En cas de SLA, les mutations du gène *TARDBP* sont à l'origine de l'agrégation de TDP-43 ainsi que d'une augmentation de sa localisation mitochondriale. Les agrégats séquestrent des miARN et des protéines mitochondriales encodées par le génome nucléaire. Un niveau anormal d'expression de TDP-43 cause aussi une dérégulation des fonctions mitochondriales qui augmente le stress oxydatif et mène notamment à une altération de la fonction de la chaîne respiratoire (Mead et al., 2023). Dans des modèles de *C9orf72*, les protéines dipeptidiques répétées (DRP) altèrent également les fonctions mitochondriales, causent du stress oxydatif et des dommages de l'ADN (Lopez-Gonzalez et al., 2016).

2.4.4 Altération de l'homéostasie des protéines

L'homéostasie des protéines est un équilibre crucial entre la production et la dégradation des protéines, assurant la régulation interne des processus cellulaires tels que la synthèse, le repliement, le trafic et la dégradation des protéines, ainsi que le maintien du protéome. La perturbation de cet équilibre a des répercussions sur la durée de vie des organismes, entraînant un vieillissement cellulaire et des maladies liées à l'âge [4]. L'altération de l'homéostasie des protéines joue notamment un rôle central dans la pathogenèse de maladies neurodégénératives, dont la SLA.

La présence de protéines mal repliées est identifiée par les différents compartiments cellulaires (cytoplasme, réticulum endoplasmique, mitochondries) et provoque un stress cellulaire. Dans le contexte des maladies neurodégénératives, la réponse intégrée au stress (ISR) joue un rôle crucial pour tenter de maintenir la santé cellulaire et atténuer les dommages potentiels. Elle se compose de quatre kinases et remodèle la traduction et la transcription pour restaurer l'homéostasie dans la cellule. Cependant, en cas de stress chronique ou excessif, l'ISR peut également favoriser la mort cellulaire. Elle est activée dans la SLA et peut favoriser davantage la neurotoxicité après induction par le stress (Marlin et al., 2022).

D'autres mécanismes entrent en jeu comme les granules de stress composées d'ARNm et de protéines de liaison de l'ARN qui permettent à la cellule de répondre au stress en interrompant la traduction de la majorité des ARNm et en privilégiant celle des protéines cytoprotectrices. De nombreux gènes de la SLA codent pour des protéines qui interfèrent avec la dynamique des granules de stress par des mutations de leur domaine de faible complexité (*TARDBP*, *FUS*, *ATXN2*). La perturbation des granules de stress dans la SLA peut

potentiellement contribuer à la formation d'agrégats protéiques de TDP-43 et à d'autres altérations cellulaires associées à la maladie (Mead et al., 2023; Ratti et al., 2020).

Les motoneurones sont particulièrement vulnérables au stress protéomique en raison de leur taille, de leurs terminaisons axonales, de leur incapacité à réagir efficacement aux chocs thermiques et de leur faible expression des gènes du système ubiquitine-protéasome qui est essentiel à la régulation fine de la composition protéique de la cellule, au contrôle de la signalisation et à l'adaptation aux conditions cellulaires changeantes.

Les protéines codées par des gènes associés à la SLA interviennent à différents niveaux dans la régulation de la protéostase. La présence de mutations du gène *SOD1* est associée à une réduction de l'expression des composants du système ubiquitine-protéasome (Urushitani et al., 2002). Des anomalies des protéines chaperons ont été identifiées en cas de mutations des gènes *SOD1* et *TARDBP*. Ces protéines ont pour fonction d'assister d'autres protéines dans leur maturation en évitant la formation d'agrégats (Hardiman et al., 2017). La délocalisation de TDP-43 entraîne des altérations dans la régulation de l'épissage, une sensibilité accrue au stress cellulaire, des dommages à l'ADN, des changements dans le transcriptome et une perturbation du transport des ARNm des protéines ribosomiques (Mead et al., 2023).

C9orf72 participe à l'initiation de l'autophagie, tandis que d'autres protéines contrôlent la maturation des autophagosomes ou entravent la livraison des substrats à l'autophagosome (Mead et al., 2023). *SOD1* et TDP-43 sont, quant à eux, connus pour être des substrats de l'autophagie, ce qui suggère qu'un dysfonctionnement de ce processus contribue à l'accumulation toxique de ces protéines dans la SLA. L'accumulation de ces protéines contribue au déclenchement d'autres mécanismes pathologiques impliqués (Hardiman et al., 2017).

2.4.5 Neuro-inflammation

La neuro-inflammation est une condition délétère commune à de nombreuses pathologies du SNC. Elle résulte non seulement des réponses immunitaires innées locales intrinsèques au SNC (microglie activée), mais aussi de la migration de cellules immunitaires activées en périphérie (lymphocytes et macrophages).

L'ensemble des mécanismes toxiques pour les motoneurones au cours de la SLA va aboutir à leur mort et ainsi induire puis amplifier une inflammation du SNC qui va elle-même conduire à la neurodégénérescence (Béland et al., 2020). En plus de cela, certaines mutations de gènes comme *TARDBP* ou *C9orf72* sont impliquées dans le déclenchement de l'inflammation (Mead et al., 2023).

Au cours de la maladie, une réponse inflammatoire toxique implique les lymphocytes T (LT) CD4 Th1 et Th17, ainsi que les macrophages, la microglie (Chiot et al., 2019). Cette neuro-inflammation semble accentuée par la déficience d'une sous-population de LT, les LT régulateurs (Tregs), dont la fonction est de bloquer, entre autres, l'activité des lymphocytes Th1 et Th17 impliqués dans des mécanismes pro-inflammatoires (Beers & Appel, 2019; Henkel et al., 2013; Sheean et al., 2018).

La dysfonction des Tregs est notamment contrôlée par une sous-population de macrophages, les macrophages pro-inflammatoires M1. Les macrophages sont habituellement séparés en deux catégories selon leur activité. Les macrophages M1 sont pro-inflammatoires tandis que les M2 sont immunosuppresseurs. Ces phénotypes étant les deux extrêmes d'un spectre d'état d'activation bien plus complexe des macrophages *in vivo* (Lyon et al., 2019).

Les cellules de la microglie forment la seule population résidente de macrophage dans le SNC (Li & Barres, 2018). Elles régulent le micro-environnement et participent à l'homéostasie neuronale, notamment par la sécrétion de facteurs neurotrophiques (Davalos et al., 2005; Kettenmann et al., 2013; Nimmerjahn et al., 2005). La microglie est le premier répondeur en cas de dommages du SNC, grâce à la présence de récepteurs et senseur à sa surface. En conditions physiologiques, la microglie est maintenue dans un état de repos par l'expression de molécules et chimiokines de costimulation négative (Ban et al., 2019). En présence de signaux de dangers, la microglie passera de l'état de repos à un état activé, correspondant à la microgliose.

Chez un patient atteint de la SLA, au cours des stades précoces de la maladie, les macrophages M2 ainsi que les astrocytes vont produire des facteurs anti-inflammatoires (IL4, IL10, TGF-beta) qui, avec les LT CD4 Th2 et les Tregs, vont venir inhiber le développement des LT pro-inflammatoires Th1 et Th17. La réponse initiale du système immunitaire est donc neuroprotectrice.

Au cours des stades plus tardifs, lorsque les dommages ne peuvent plus être éliminés ou contenus, les macrophages vont majoritairement adopter un phénotype M1 entraînant le dysfonctionnement des Tregs. Les Tregs deviennent alors incapables d'empêcher le développement des LT Th1 et Th17, induisant ainsi la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires. Ces facteurs vont induire une infiltration lymphocytaire et monocyttaire dans le SNC. Cela est à l'origine d'une neuro-inflammation excessive et d'une neurotoxicité menant à une exacerbation des dommages initiaux (Béland et al., 2020).

2.4.6 Dommages et réparation de l'ADN

Les cellules post-mitotiques comme les neurones sont plus sensibles aux dommages de l'ADN qui peuvent mener à la mort cellulaire en l'absence de réparation. Des dommages de l'ADN ainsi qu'une activation de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) sont retrouvés dans les cas de SLA (Mead et al., 2023).

Certains gènes retrouvés mutés dans la SLA ont été associés à l'augmentation des dommages de l'ADN et jouent également un rôle dans sa réparation. *C9orf72* entraîne notamment une élévation d'un régulateur de la DDR (Mead et al., 2023). Les expansions d'hexanucléotides *C9orf72* sont susceptibles de former des structures d'ADN G-quadruplex qui favorisent la formation de boucles R, des structures hybrides ADN-ARN qui augmentent la susceptibilité aux dommages de l'ADN et à l'instabilité du génome. Les boucles R sont des substrats pour les ruptures de brins d'ADN et constituent un des éléments principaux des dommages neuronaux causés par la répétition d'expansion dans *C9orf72* (Hardiman et al., 2017).

TDP-43 joue un rôle dans la signalisation de la DDR en s'associant avec des protéines. La perte de TDP-43 au niveau nucléaire est corrélée avec la rupture des brins d'ADN et l'activation de la DDR. TDP-43 semble aussi impliqué dans la réparation par jonction d'extrémité non homologues, ainsi la mutation de *TARDBP* empêche ce mécanisme et mène à des dommages de l'ADN qui eux-mêmes peuvent être à l'origine de la délocalisation de TDP-43. La perte de TDP-43, tout comme la mutation de *TARDBP*, augmente la formation de boucles-R et l'instabilité du génome. Les mutations de *FUS* sont aussi impliquées dans l'altération des mécanismes de réparation de l'ADN (Hardiman et al., 2017; Mead et al., 2023).

2.4.7 Dérégulation du métabolisme et du transport nucléocytoplasmique de l'ARN

Le métabolisme des ARN est un mécanisme cellulaire nécessaire à la survie. L'ARN subit un traitement complexe du noyau jusqu'au cytoplasme, où il sera finalement traduit. Dans le cas des motoneurones, les ARN messagers (ARNm) peuvent être transportés pour une traduction protéique locale au niveau du compartiment axonal.

La dérégulation du métabolisme de l'ARN est centrale dans la physiopathologie de la SLA. *FUS* et TDP-43 sont des protéines de liaison de l'ARN impliquées dans de nombreux mécanismes comme l'épissage, la transcription, la stabilité, l'export et la biogenèse des miARN. La délocalisation de TDP-43 et de *FUS*, du noyau au cytoplasme résulte de l'altération du traitement de leurs ARN (Amlie-Wolf et al., 2015; Y. Zhou et al., 2014). Cette délocalisation participe à la perturbation de transport nucléocytoplasmique par la séquestration de composants du mécanisme (Mead et al., 2023).

Les structures G-quadruplex rencontrées dans les cas SLA causés par *C9orf72* interagissent avec les facteurs de traitement de l'ARN. En supplément, les répétitions d'hexanucléotides dans le gène *C9orf72* mènent à la formation et l'accumulation d'espèces anormales d'ARN dans le noyau qui séquestrent de nombreuses protéines de liaisons de l'ARN causant une toxicité directe de l'ARN.

2.4.8 Altération du trafic intracellulaire

La répétition de l'expansion GGGGCC dans *C9orf72* affecte également la localisation intracellulaire de l'ARNm de *C9orf72* et peut mener à la production de DRP. Ces DRP interfèrent avec le transport nucléocytoplasmique normal et mènent à une neurotoxicité par plusieurs mécanismes (Hardiman et al., 2017).

TDP43 a un rôle dans la régulation du trafic endosomal et une perte de sa fonction mène à une altération de la santé neuronale.

2.4.9 Altération du transport et de l'intégrité axonal

En raison de leur polarisation extrême, les motoneurones sont particulièrement dépendants du transport rétrograde et antérograde des cargos pour maintenir l'intégrité de leurs axones. Des anomalies dans le transport axonal ont été observées dans divers modèles de SLA ainsi que dans la maladie humaine.

Cela se manifeste par des accumulations pathologiques d'organites et de neurofilaments phosphorylés dans les axones des motoneurones, ainsi que par l'identification de mutations associées à la SLA dans des gènes impliqués dans le transport cytosquelettique et axonal. Des modèles *in vivo* ont mis en évidence un rôle prépondérant du mutant TDP-43 dans la médiation des défauts de transport axonal (Mead et al., 2023).

2.4.10 Microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est l'ensemble des micro-organismes vivant dans le tractus gastro-intestinal. Ils assurent des fonctions métaboliques, physiologiques et immunitaires et peuvent être considérés comme un autre organe humain (Baquero & Nombela, 2012). Récemment, des études approfondies ont révélé que l'axe microbiote-intestin-cerveau est étroitement impliqué dans la physiopathologie des maladies neurologiques (Khatoon et al., 2023).

Des recherches récentes menées sur des modèles murins présentant des mutations des gènes *SOD1* et *C9orf72* ont mis une évidence une influence du microbiote intestinal sur le développement de la maladie, associant la gravité de la maladie à des populations spécifiques de micro-organismes intestinaux (Blacher et al., 2019; Burberry et al., 2020). La composition du microbiote intestinal chez la souris avait été altérée avant l'émergence du

dysfonctionnement des motoneurones, ce qui suggère que la dysbiose intestinale pourrait agir comme l'un des mécanismes possibles de l'apparition de la SLA (Blacher et al., 2019).

Des différences ont été identifiées entre le microbiome intestinal des patients atteints de SLA et de patients contrôles. Ces expériences ont permis également l'identification de biomarqueurs potentiels pour une étude plus approfondie de l'apparition et du développement de la SLA (Zeng et al., 2020). Cependant, beaucoup de résultats sont encore discordants avec l'utilisation de cohortes relativement petites pouvant empêcher l'identification de caractéristiques précises du microbiome (Boddy et al., 2021). La réduction du nombre d'agents pathogènes et la favorisation de la croissance des probiotiques sont des pistes thérapeutiques à explorer.

2.5 Clinique

La clinique découle d'une atteinte sélective des motoneurones commandant les muscles volontaires. Les premiers symptômes de la SLA sont associés à des dysfonctions motrices telles que la faiblesse musculaire, la spasticité et la dysphagie [1] (Hardiman et al., 2017). Cependant, plus de 35% des cas sont associés à des troubles cognitifs ou comportementaux d'intensité variable, et dans 10 à 15% à des signes de DFT (Brent et al., 2020). L'atteinte cognitive se manifeste par un syndrome dysexécutif avec diminution de la fluence verbale et de l'attention plus ou moins associée à des troubles mnésiques. Elle peut également entraîner une labilité émotionnelle marquée, des troubles du comportement de type activités obsessionnelles stéréotypées, une désinhibition et une apathie [3].

Deux formes de SLA existent en fonction du site d'initiation de l'atteinte (Figure 4). La forme spinale correspond à l'atteinte initiale des motoneurones de la ME, associée à des troubles de la motricité des membres. Dans 25 à 30% des cas, il s'agit d'une forme bulbaire qui correspond, quant à elle, à l'atteinte initiale du tronc cérébral, à l'origine de troubles de la parole et de la déglutition (dysphagie) et des troubles de l'élocution (dysarthrie motrice) (Masrori & Van Damme, 2020). Cette forme est retrouvée plus fréquemment chez les femmes avec une initiation à un âge plus tardif [2] (Hardiman et al., 2017). Environ 3% des cas auraient une initiation respiratoire. En territoire thoracique, la déficience motrice est objectivée par un trouble ventilatoire restrictif pouvant aboutir à une hypoventilation.

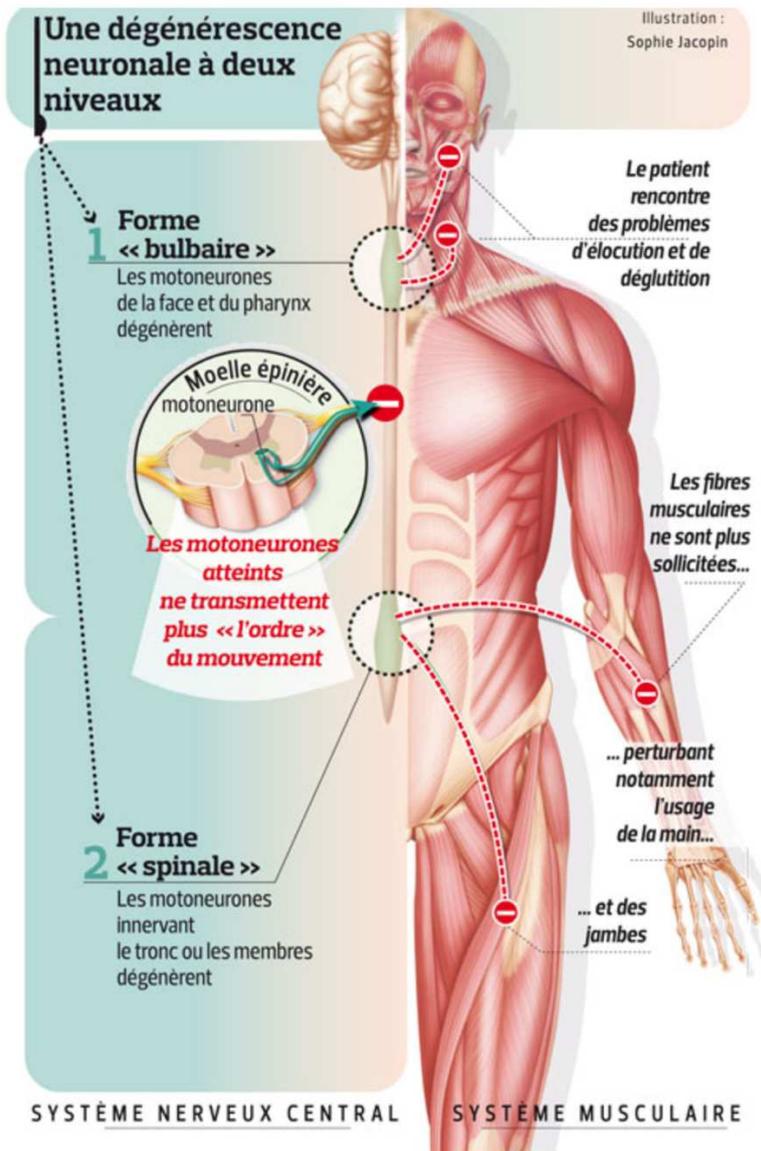


Figure 4: La dégénérescence neuronale dans la SLA. [2].

Dans tous les cas, l'oculomotricité et les sphincters sont respectés de même que la sensibilité objective [3].

Dans le cas des formes familiales, le tableau clinique retrouvé dépend du gène retrouvé muté.

Les patients porteurs d'une mutation de *SOD1* ont majoritairement une initiation de la pathologie au niveau des membres inférieurs (Bernard et al., 2020). Ces patients ne présentent pas de troubles cognitifs.

Les mutations du gène *TARDBP* sont associées à une initiation au niveau des membres supérieurs dans 2/3 des cas. L'âge d'apparition de la pathologie est assez large et l'évolution de la maladie est plus longue avec 5 ans en moyenne [5] (Harms & Baloh, 2013).

Les mutations du gène *FUS* s'accompagnent d'un début précoce entre 30 et 40 ans avec initiation aux niveaux des muscles cervicaux ou des épaules, et à une évolution rapide de la maladie d'environ 2 ans (Suzuki et al., 2023)

Le gène *C9orf72* est associé à un début plus tardif que les formes sporadiques. 40% des cas sont associés à une initiation bulbaire et 45% avec des troubles cognitifs. L'évolution est assez rapide avec une moyenne de 33 mois [5] (Hübers et al., 2014).

2.6 Diagnostic

Le diagnostic de la SLA a pour objectif d'identifier la pathologie et de mettre en place une prise en charge adaptée du patient. Pour cela, il faut identifier la gravité initiale ainsi que les facteurs pronostiques (nutritionnel et respiratoire), et rechercher les complications éventuelles.

Puisque la majorité des cas sont sporadiques, le diagnostic ne peut pas être effectué par test génétique. Le diagnostic se base ainsi sur des critères cliniques et est encore compliqué en l'absence de dépistage exclusif de la SLA. Les symptômes précoces de la pathologie sont semblables à ceux d'autres maladies et peuvent passer inaperçus.

Le diagnostic clinique de la SLA doit être évoqué à la suite d'un examen neurologique reposant sur la recherche de signes d'atteinte du motoneurone central et périphérique, associée à une diffusion progressive des symptômes.

L'atteinte du motoneurone central repose essentiellement sur la présence d'un syndrome pyramidal avec spasticité, clonus, signe de Hoffman ou de Babinski. Celle du motoneurone périphérique correspond à des symptômes différents en fonction des zones concernées. Une atteinte bulbaire est associée à des troubles de la déglutition et de l'élocution. L'atteinte des membres se traduit par un déficit moteur avec amyotrophie, fasciculations et crampes, s'étendant de façon progressive. Enfin, une atteinte thoracique est associée à des troubles ventilatoires restrictifs.

Les troubles cognitifs ou psycho-comportementaux sont fréquents, mais le plus souvent infracliniques. Il n'existe pas d'évaluation neuropsychologique standardisée pour ces troubles dans la SLA, la batterie rapide d'évaluation des fonctions frontales (BREF) étant la plus souvent utilisée [3]. À l'échelle internationale, le dépistage cognitif et comportemental de la SLA d'Édimbourg (ECAS) est recommandé à cette fin.

L'examen paraclinique indispensable est l'électroneuromyographie effectuée selon un protocole standardisé pour affirmer la dénervation des muscles et en apprécier l'étendue (recherche des anomalies électriques de souffrance du motoneurone périphérique et précision de leur extension par la réalisation d'un électromyogramme). Il n'objective pas d'anomalie en

stimulodétection motrice, ni de trouble de la jonction neuromusculaire, ni d'atteinte des potentiels sensitifs.

L'hémogramme, la vitesse de sédimentation, la protéine réactive C (CRP) et l'examen du liquide céphalo-rachidien (cellules, protéinorachie et bilan inflammatoire) sont retrouvés normaux. Il y a une absence de syndrome inflammatoire et une immunofixation normale (peuvent être présents : CRP augmentée, pic d'immunoglobuline, taux d'anticorps anti-glycoprotéine associé à la myéline (MAG) élevé sans spécificité démontrée ni de fréquence significative).

Une imagerie du cerveau et de la ME (imagerie par résonance magnétique : absence d'éléments expliquant l'ensemble des signes neurologiques) ainsi qu'une stimulation magnétique peuvent être effectuées pour exclure les maladies qui peuvent présenter des symptômes similaires et qui sont potentiellement traitables.

En cas de doute, le bilan exploratoire initiale doit être réévalué entre 3 et 6 mois. L'aggravation des symptômes au cours de ce délai est un élément de confirmation du diagnostic [2].

Le diagnostic et le suivi de la SLA reposent sur des critères et échelles variés, sans recommandation précise sur leur utilisation en dehors des essais cliniques. Un consensus d'experts réalisé en France en 2023 a déterminé la pertinence des échelles. Les critères simplifiés de Gold Coast (Annexe 1) sont ceux utilisés pour établir un diagnostic, tandis que les critères d'El Escorial révisés permettent l'inclusion de patients dans les essais cliniques. Les critères utilisés dans les essais ne sont pas complètement transposables en pratique quotidienne (Verschueren et al., 2023).

L'ALSFRS-R utilisée en routine mesure l'atteinte fonctionnelle (en points ou pente évolutive, non en pourcentage). Un score $\leq 38/48$ témoigne d'un déficit fonctionnel significatif (Annexe 2).

Une étude génétique moléculaire doit être effectuée en cas de forme familiale (deux cas ou plus dans la généalogie) ou en cas d'antécédent familial de démence et plus spécifiquement de DFT. Elle se fait après l'obtention du consentement signé du patient par le praticien. L'interprétation doit prendre en compte le tableau clinique

2.7 Prise en charge

Le neurologue assure le diagnostic de la SLA, ainsi que la prescription initiale du traitement de fond. L'annonce de ce diagnostic et de ses étapes évolutives peut justifier l'intervention d'un psychologue clinicien pour prendre en charge les traumatismes psychologiques pouvant

être engendrés. Cette annonce est effectuée par un centre spécialisé lorsque suffisamment d'éléments diagnostics ont été rassemblés. Lors d'un deuxième rendez-vous, la compréhension du patient et de son entourage est évaluée.

À la suite du diagnostic, les patients sont accompagnés et font notamment l'objet d'une prise en charge multidisciplinaire impliquant différents intervenants afin de diminuer et soulager les symptômes.

Cette prise en charge doit être coordonnée, évolutive et adaptée au patient en impliquant, en plus du neurologue, des médecins de spécialités complémentaires (pneumologue, gastro-entérologue, nutritionniste, oto-rhino-laryngologiste, médecin de médecine physique et réadaptation, médecin de soins palliatifs), médecin généraliste, kinésithérapeute, infirmier, ergothérapeute, orthophoniste, diététicien, assistante sociale, psychologue ou encore auxiliaire de vie [2]. Cela est facilité par la constitution de centres experts et de réseaux de soin. Ces différents acteurs interviennent dans l'éducation thérapeutique et doivent s'assurer de l'implication active du patient.

Cette éducation comprend la gestion de la fatigue, du stress et de la vie quotidienne, des conseils sur les gestes à effectuer et à éviter, les aides techniques et les solutions de compensation des déficiences. Elle inclut également l'éducation nutritionnelle pour l'adaptation aux difficultés de déglutition et de mastication. Les équipes de soins palliatifs peuvent fournir des conseils pour soulager les symptômes douloureux et inconfortables, ainsi que pour aider à la délibération sur les orientations thérapeutiques et l'élaboration des directives anticipées. Les associations de patients peuvent également fournir un soutien utile.

Le suivi clinique de la SLA est trimestriel et comprend une évaluation de divers aspects tels que les déficiences neurologiques, la douleur, l'évaluation orthopédique, le bilan de kinésithérapie, les signes respiratoires et la qualité du sommeil. Les bilans orthophoniques et ergothérapeutiques sont également évalués. Le suivi nutritionnel est important pour contrôler la prise de poids, les apports caloriques, protéiques et hydriques, les fausses routes et les facteurs limitant la prise alimentaire. Les examens biologiques sont effectués pour surveiller les effets du traitement par riluzole et la détection de l'insuffisance respiratoire. Les évaluations respiratoires comprennent des épreuves fonctionnelles respiratoires et des oxymétries nocturnes. Les polysomnographies sont effectuées en cas de suspicion de syndrome d'apnées du sommeil. Les résultats de tous ces examens sont transmis au médecin traitant et aux médecins spécialisés impliqués avec des indications pour les soins et les actions à mettre en place.

L'équipe projet de la filière nationale de santé maladies rares : Sclérose Latérale Amyotrophique et maladies du neurone moteur (FILSLAN) en concertation avec les responsables des centres a conçu une carte d'urgence « Maladies du neurone moteur » qui peut être obtenue dans les centres SLA et autres maladies rares du neurone moteur (Figure 5).

PERSONNE(S) À PRÉVENIR EN PRIORITÉ

Mme/M. : Tél :
 Pers. de confiance : Tél :
 Médecin traitant : Tél :

SUIVI(E) PAR LE CENTRE DE :

Ville : Hôpital :
 Médecin référent : Tél :



Voir Orphanet urgences, fiche
 « Bonnes pratiques en cas d'urgence - SLA »
 Sites www.orpha.net et www.portail-sla.fr



Toute décision de réanimation ou d'intubation doit se prendre en accord avec le malade, son entourage et si possible avec le médecin traitant et le centre spécialisé de suivi (directives anticipées écrites, personne de confiance).

Insuffisance respiratoire aigüe

- Rechercher une cause curable avant d'incriminer une défaillance des muscles respiratoires liée à la maladie (fausse route, embolie pulmonaire, infection, cause abdominale aggravante ...)
- Mettre en route une ventilation non-invasive (VNI) d'attente si elle est possible
- Chez un patient déjà sous VNI au domicile, elle doit être maintenue si un transport est nécessaire
- L'oxygénothérapie entraîne un risque majeur d'induire une hypercapnie (débit adapté, contrôle de la gazométrie ou de la saturation en oxygène SpO2)

Encombrement

- Procéder au désencombrement bronchique par des manœuvres d'aide à la toux
- Utiliser un dispositif d'insufflation/exsufflation mécanique
- Utiliser une antibiothérapie à large spectre. Eviter les fluidifiants bronchiques
- Aspirer les mucosités en cas d'encombrement laryngé



Maladie du neurone moteur :
 Prénom / Nom :
 Date de naissance :



Les maladies du neurone moteur ont en commun une perte de la fonction motrice. Certaines peuvent entraîner une insuffisance respiratoire restrictive avec encombrement bronchique, une altération de l'état nutritionnel, un risque de fausse route, des difficultés d'expression orale et écrite, ou encore une atteinte des fonctions cognitives.

Chute de sonde de gastrostomie

- Mettre d'urgence une sonde vésicale dans l'orifice
- Prendre contact avec le centre de suivi

Autres situations

- **Fracture osseuse** : privilégier la chirurgie, éviter l'immobilisation
- **Hospitalisation** : adapter le dispositif d'appel aux possibilités verbales et motrices, veiller aux capacités de déglutition (sonde nasogastrique d'attente si nécessaire)
- **Immobilisation/alitement prolongé** : mobilisation articulaire quotidienne pour éviter les rétractions, prévention de thrombose et de surinfection
- **Douleurs** : protocoles habituels de prise en charge avec les précautions liées à l'état, y compris morphiniques (en fonction de la capacité vitale respiratoire)
- **Anesthésie** : adapter les précautions à l'état ventilatoire, ne pas utiliser de curarisants, précautions pour les déprimeurs respiratoires
- **Hypersalivation** : Scopolamine s/c à faible dose, aérosols, humidification et aspiration buccale

Figure 5: Carte d'urgence « Maladies du neurone moteur ». [6].

2.7.1 Rééducation, réadaptation, dispositifs médicaux et autres éléments de compensation des déficiences motrices

La kinésithérapie doit être prescrite rapidement pour éviter les complications musculaires, sans chercher à renforcer les muscles. La prise en charge peut se faire à domicile, en cabinet libéral ou déjà en centre spécialisé. La kinésithérapie comprend deux volets : la prise en charge musculo-squelettique, qui implique des exercices de mobilisation passive, d'étirements musculaires, de massages antalgiques et décontractants, et la kinésithérapie respiratoire, qui implique la prévention et le traitement de l'encombrement bronchique et l'aide à la ventilation. Les principes validés incluent l'absence de mécanothérapie, de travail en charge ou en excentrique, d'électrostimulation excito-motrice et des pauses fréquentes de récupération.

La rééducation orthophonique est recommandée dès l'apparition des troubles pour maintenir la communication et les capacités de déglutition. La prise en charge comprend une évaluation motrice et fonctionnelle suivie d'une rééducation qui implique des exercices musculaires passifs et actifs et de coordination pneumo-phonique. Si la communication orale n'est plus possible, l'orthophoniste aidera le patient à définir le mode de communication le plus approprié en collaboration avec l'ergothérapeute.

L'ergothérapie est nécessaire dès qu'il y a une gêne fonctionnelle pour évaluer les handicaps et l'environnement, aider à l'autonomie quotidienne et à la réalisation d'appareillages adaptés. Elle aide également à choisir les aides techniques et forme les équipes de proximité. Des visites à domicile peuvent être effectuées pour évaluer les contraintes et les recommandations sont consignées dans un compte rendu.

Différentes aides et différents dispositifs médicaux peuvent être proposés aux patients souffrant d'une atteinte motrice, de troubles de la communication, de la déglutition, de la nutrition ou de troubles respiratoires dans le cadre d'une prise en charge de la SLA. Pour les atteintes motrices, des orthèses, des aides techniques et des adaptations diverses peuvent être proposées. La prescription d'un fauteuil roulant peut être envisagée dès l'apparition des difficultés de déambulation pour éviter la fatigue et les chutes. En cas d'incapacité fonctionnelle, d'autres dispositifs tels que le lève-personne, le lit médicalisé ou les coussins de positionnement peuvent être proposés. Pour les troubles de la communication, des systèmes d'aide à la communication, tels que des tableaux de désignation, des synthèses vocales ou des logiciels, peuvent être utilisés. En cas de troubles de la déglutition, l'adaptation des textures, les techniques facilitatrices et posturales, les compléments nutritionnels oraux, ou la perfusion sous-cutanée de soluté salé isotonique peuvent être utilisés. Pour la nutrition entérale, une gastrostomie d'alimentation peut être proposée tandis que pour les troubles respiratoires, la kinésithérapie, les aides instrumentales, la ventilation mécanique non invasive ou l'oxygénothérapie peuvent être envisagées.

2.7.2 Suppléance des fonctions vitales

La démarche décisionnelle pour les patients atteints de maladies évolutives doit être anticipée en collaboration avec le patient et sa famille. Les droits du patient à donner des directives anticipées, à désigner une personne de confiance et à recevoir des soins palliatifs, doivent être informés. Une rencontre avec une équipe de soins palliatifs et d'accompagnement peut être proposée pour délibérer sur les orientations de traitements et les scénarios de fin de vie possibles.

Les traitements de suppléances des fonctions vitales (nutrition et respiration) doivent être expliqués aux patients et à leur famille, notamment la possibilité de sédation en cas de persistance de syndromes réfractaires ou en cas d'arrêt de traitements.

La nutrition entérale est indiquée pour prévenir ou corriger la dénutrition et ses complications et améliorer le confort du patient. L'indication de la nutrition entérale doit être confirmée après contrôle des fonctions ventilatoires assurant sa bonne tolérance, et sa mise en place se

fait dans un contexte médical spécialisé. La nutrition parentérale doit être discutée pour chaque cas.

L'assistance respiratoire est proposée en présence de symptômes d'hypoventilation alvéolaire ou de syndrome d'apnées du sommeil. La ventilation non invasive a un effet significatif sur l'amélioration de l'espérance de vie et de la qualité de vie, mais elle n'empêche pas l'évolution neurologique de la maladie (Bourke et al., 2003; Lechtzin et al., 2007). L'augmentation progressive de la dépendance doit être connue du patient et de son entourage. La mise en place de l'assistance respiratoire est sous contrôle pneumologique, avec possibilité d'arrêt dans le cadre du refus de l'obstination déraisonnable encadré par le dispositif législatif.

3 Prise en charge médicamenteuse

3.1 Traitements à visée symptomatique

Il existe de nombreux traitements disponibles selon les différents symptômes ciblés. Les symptômes pris en charge le plus souvent au cours de la SLA sont les douleurs, les troubles de l'humeur, les troubles du sommeil, la spasticité, les troubles salivaires, les infections, les troubles génito-sphinctériens, les troubles nutritionnels, la fatigue ainsi que la stase veineuse et les œdèmes distaux (Tableau 1). L'ensemble de ces traitements est non spécifique à la SLA et suit pour la plupart des recommandations d'utilisation propres à chacune des indications.

Tableau 1: Options de traitement et de gestion des symptômes dans la SLA. [7]

Indication	Common Treatment Options
ALS Treatment/ Disease-Modifying Agent	riluzole (Rilutek, Tiglutik): 50 mg by mouth twice a day edaravone (Radicava): initial cycle: 60 mg given IV once daily for 14 days, followed by 14-day drug-free period; subsequent cycles: 60 mg IV once daily for 10 days within a 14-day period, followed by a 14-day drug-free period
Immunizations ^a	Annual seasonal influenza and pneumococcal vaccine
Anxiety	Bupropion ^b , diazepam, lorazepam
Depression	Amitriptyline, mirtazapine, SSRIs
Dyspnea	Opioids, benzodiazepines (anxiety), chlorpromazine ^b (terminal restlessness and confusion secondary to hypercapnia)
Fatigue	Modafinil, glucocorticoids ^b , megestrol acetate ^b
Insomnia	Amitriptyline ^b , mirtazapine ^b , zolpidem, chloral hydrate, diphenhydramine, flurazepam
Mucus/secretions	mucolytics (acetylcysteine 200-400 mg 3X per day), propranolol ^b , metoprolol ^b , anticholinergic bronchodilators ^b (ipratropium, theophylline), furosemide ^b
Muscle spasms/cramps	mexiletine ^b , levetiracetam ^b
Pain	Neuropathic pain: gabapentin ^b , pregabalin, tricyclic antidepressants ^b Pain from inability to move: NSAIDs, acetaminophen, opioids, cannabis ^b Shoulder and articular pain: intra-articular steroid (with or without lidocaine)
Pseudobulbar effect	Dextromethorphan/quinidine, amitriptyline ^b , fluvoxamine ^b , citalopram ^b
Sialorrhea	Amitriptyline ^b 10 to 25 mg po once daily at bedtime (max 100 mg/day) Transdermal hyoscine ^b (scopolamine) 1-2 patches applied as directed every 3 days Atropine ^b 0.4 mg every 4-6 h, glycopyrrolate 1 mg 3X per day, botulinum toxin injections (parotid/submandibular gland)
Spasticity	Baclofen, tizanidine, memantine ^b , diazepam ^b , dantrolene, gabapentin ^b

^a CDC immunization schedules.
^b Off-label use.
ALS: amyotrophic Lateral Sclerosis; NSAIDs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs; SSRIs: selective serotonin reuptake inhibitors.
Source: References 2, 6, 15, 26, 27.

Certaines précautions sont tout de même nécessaires, certaines molécules pourraient avoir un effet aggravant sur l'évolution de la maladie. L'utilisation des benzodiazépines est à éviter en raison de leur effet dépresseur respiratoire sauf si le patient dispose déjà d'une ventilation assistée. Le maniement des opiacés malgré leur effet dépresseur respiratoire reste possible sous surveillance même en cas d'insuffisance respiratoire. La prescription des anabolisants, statines, corticoïdes au long cours, anticholinestérasiques reste cependant déconseillée ou à réévaluer chez les patients atteints de SLA [3].

3.2 Traitements de fond

D'après les revues de JingSi Jiang et de Mead datant de fin 2022 et 2023, 53 programmes de développement de médicaments étaient en cours (Jiang et al., 2022; Mead et al., 2023) (Figure 6). Parmi ces derniers, les deux tiers se concentraient sur de nouveaux agents thérapeutiques, tandis que les autres étaient des repositionnements ou reformulations.

Différents mécanismes cibles sont étudiés, mais certaines tendances s'en dégagent. La neuro-inflammation est la cible thérapeutique la plus étudiée avec des approches variées. La thérapie génique a également une place importante dans les programmes de développement clinique avec l'arrivée de nombreux oligonucléotides antisens (ASO). D'autres domaines importants incluent la protéostase et la thérapie cellulaire. Compte tenu des connaissances les plus récentes sur les mécanismes pathogéniques et la génétique, de nombreux domaines méritent des recherches approfondies sur la SLA sporadique, notamment le métabolisme de l'ARN et l'axonopathie.

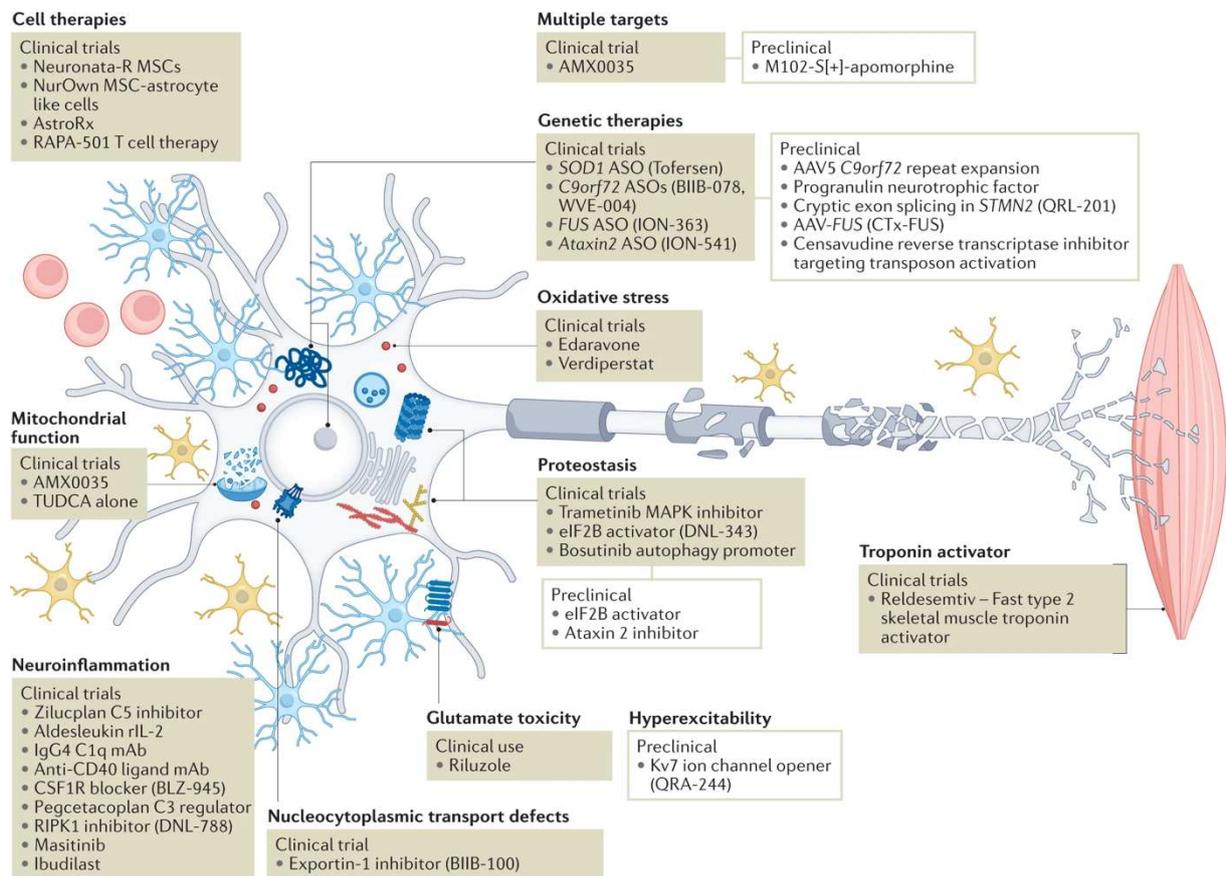


Figure 6: Médicaments en développement dans la SLA début 2023 en fonction de leur cible thérapeutique. (Mead et al., 2023).

3.2.1 Approches pharmacologiques

Plus de 60 composés avec différents mécanismes d'action ont déjà été évalués dans des essais cliniques dans la SLA (Petrov et al., 2017). Parmi ces derniers, seuls trois médicaments ont été autorisés par la *Food and Drug Administration* (FDA) : le riluzole, l'edaravone et

l'AMX0035 (Relyvrio). Lors d'essais cliniques, il a été prouvé que ces médicaments ralentissaient la progression de la SLA, permettant aux patients de maintenir leurs capacités fonctionnelles plus longtemps. Ils ont également amélioré les taux de survie à la SLA. Pour certaines de ces thérapies, plusieurs formulations sont disponibles (Tableau 1).

En France, seul le riluzole a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans la SLA.

Tableau 2: Thérapies pharmacologiques approuvées dans le traitement de la SLA par la FDA.

Médicament	Méthode d'administration	Mécanisme d'action
Riluzole	Orale (comprimé, suspension liquide ou film oral)	Diminue les signaux qui surstimulent et endommagent les cellules nerveuses
Edaravone	Intraveineuse ou orale (suspension liquide)	Diminue un type de dommage cellulaire appelé stress oxydatif
Relyvrio (taurursodiol et de phénylbutyrate de sodium)	Orale (sachet dissous dans l'eau)	Bloque les signaux de stress dans des compartiments cellulaires spécifiques

3.2.1.1 Thérapies autorisées sur le marché

Riluzole : Anti-excitotoxique

Le riluzole a été développé par Sanofi et il est le seul médicament approuvé en France pour son action sur l'évolution de la SLA après l'approbation de l'Agence européenne des médicaments (EMA) en 1996. C'était également le premier médicament approuvé par la FDA dans la SLA en 1995. Il est indiqué pour prolonger la durée de vie ou pour retarder le recours à la ventilation mécanique assistée chez les patients atteints de SLA.

Le riluzole est un agent anti-glutamate inhibant la libération présynaptique de glutamate ainsi que la signalisation post-synaptique des récepteurs au glutamate. Il est également admis qu'il inhibe les canaux sodiques voltage-dépendant impliqués dans le mécanisme d'excitotoxicité responsable de la mort des neurones moteurs (Benoit & Escande, 1991; Hubert et al., 1994; Martin et al., 1993).

D'autres mécanismes neuroprotecteurs sont évoqués comme la suppression de l'astrocytose ou encore l'inhibition de la protéine kinase C (PKC) en se liant à son domaine catalytique (Carbone et al., 2012; Kawano et al., 2021). Les PKC sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation qui contrôlent la prolifération, la différenciation, la survie, la migration et l'apoptose des cellules, et sont retrouvés activés dans la SLA (Kawano et al., 2021).

Les études cliniques initiales ont montré une légère augmentation de la survie d'environ trois mois (Bensimon et al., 1994). Cependant, des études populationnelles ont montré une augmentation supérieure de la survie de 6 à 19 mois (Andrews et al., 2020). Aucune action thérapeutique sur les fonctions motrices, la fonction respiratoire, les fasciculations, la force musculaire et les symptômes moteurs n'a été mise en évidence. Le riluzole n'a pas non plus montré d'effet bénéfique aux stades avancés de la SLA.

Le principe actif riluzole est retrouvé sous deux formes en France : en comprimés pelliculés de 50mg sous le nom de **rilutek** ou en forme buvable à 5mg/mL sous le nom de **teglutik**. Aux États-Unis, il existe également **exservan** sous forme de film oral qui se dissout sur le bout de la langue pour les patients présentant des difficultés de déglutition.

En France, le traitement doit être instauré par un médecin spécialiste et expérimenté dans la prise en charge des maladies du motoneurone. C'est un médicament à prescription annuelle réservée aux spécialistes en neurologie. La dose recommandée est de 100mg par jour (administrée sous la forme d'un comprimé de 50mg toutes les 12 heures). Aucun bénéfice supplémentaire significatif ne peut être attendu à une posologie supérieure.

Les effets indésirables les plus couramment observés sous riluzole (chez plus d'un patient sur 10) sont les suivants : nausées (sensation de malaise), asthénie (faiblesse) et élévation des paramètres biologiques hépatiques. Plus rarement, des réactions anaphylactiques, des œdèmes angioneurotiques et des pancréatites ont été rapportés.

L'utilisation du riluzole n'est pas recommandée chez certaines catégories de populations à risque comme les enfants (en l'absence d'étude d'efficacité et de sécurité), les insuffisants rénaux (en l'absence d'étude à doses répétées chez ce type de patient), les personnes âgées et les insuffisants hépatiques. Le riluzole ne doit pas être utilisé chez les patients atteints d'une maladie du foie ou présentant des taux anormalement élevés d'enzymes hépatiques. Il ne doit pas non plus être administré aux femmes enceintes ou allaitantes [8].

Le métabolisme du riluzole dépend du cytochrome CYP1A2 et interagit probablement avec les substrats, inhibiteurs et inducteurs de ce cytochrome.

Du fait du risque hépatique, le taux de transaminases sérique, dont les alanines aminotransférases (ALAT), doit être contrôlé avant la mise sous traitement et pendant la durée du traitement. Les ALAT doivent être dosées tous les mois pendant les 3 premiers mois, puis tous les 3 mois pendant la première année et périodiquement ensuite. Le traitement par le riluzole devra être interrompu si les taux d'ALAT s'élèvent jusqu'à 5 fois la limite supérieure de la normale ou au-delà. Outre le risque hépatique, la surveillance doit prendre en compte le

risque de neutropénie et celui de pneumopathie interstitielle. Devant une suspicion de ces derniers, le traitement doit être arrêté.

Edaravone : *Antioxydant*

L'edaravone a été approuvée dans un premier temps au Japon en 2015 puis par la FDA en 2017 (Commissioner, 2020) avec une indication dans le traitement de la SLA chez l'adulte. L'EMA, quant à elle, a refusé d'approuver l'edaravone, invoquant un manque de confiance dans le fait que les données japonaises se traduiraient par un bénéfice clinique pour l'ensemble de la population de patients européens [9].

Il s'agit d'un piègeur de radicaux libres à l'action antioxydante, limitant ainsi le phénomène de stress oxydatif impliqué dans la mort des motoneurons dans la SLA (Ito et al., 2008). Son mécanisme exact de fonctionnement n'a cependant pas encore été élucidé.

Une étude clinique japonaise de phase 3 s'est focalisée sur les patients traités tôt après le diagnostic de la maladie et avec une évolution rapide de la maladie, étant considérés comme plus susceptibles de rencontrer des effets bénéfiques. Au cours de cet essai de 6 mois, l'edaravone a ralenti significativement le déclin des scores de l'ALSFRS-R. Il n'y avait aucune différence dans les événements indésirables entre l'edaravone et le placebo, et aucun décès. Il n'y a eu aucun effet positif sur les résultats secondaires de la capacité pulmonaire, du mouvement et de la survie (Writing Group & Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group, 2017).

Cependant, des résultats contradictoires sur l'efficacité de l'edaravone ont été retrouvés. En supplément de l'étude japonaise, Brooks et al. ont conclu sur une prolongation de l'espérance de vie de 6 mois en Amérique (Brooks et al., 2022). À l'inverse, des études européennes ont conclu sur une absence de bénéfices (Lunetta et al., 2020; Witzel et al., 2022). Ces résultats pourraient s'expliquer par des différences ethniques dans la réponse au médicament, justifiant la décision de l'EMA (Jayasinghe et al., 2022).

Il existe le **radicava** en forme injectable administré en intraveineuse 14 jours par mois, ainsi qu'une forme buvable, **radicava ORS** récemment approuvée par la FDA qui devrait progressivement remplacer la forme injectable (Dorst & Genge, 2022).

La posologie recommandée du radicava est une perfusion intraveineuse de 60mg administrée en 60 minutes selon un schéma reposant sur des cycles de traitement. Le premier cycle consiste en 14 jours de traitement consécutif suivis d'une période sans médicament de 2 semaines, tous les cycles suivants consistant en 10 jours de traitement sur 2 semaines suivis d'une période sans médicament de 2 semaines.

Son usage est contre-indiqué en cas d'hypersensibilité à la molécule ou aux excipients présents, comme les sulfites. Il peut provoquer de l'urticaire, un gonflement et un essoufflement chez certaines personnes, en raison de réactions anaphylactiques aux composants de perfusion contenant du sulfite. Sinon, il est bien toléré. Les effets secondaires courants sont les ecchymoses, les problèmes de marche et les maux de tête.

Relyvrio (AMX0035) : *anti-apoptotique et dysfonction mitochondriale*

Le relyvrio, développé par Amylyx, est le dernier médicament approuvé par la FDA en 2022 dans le traitement de la SLA. Il est également approuvé sous conditions au Canada sous le nom Albriozza. Cependant, l'AMX0035 est un médicament expérimental dont l'utilisation n'est pas approuvée par l'EMA. Pour l'instant, le Comité des produits à usage humain s'est opposé à son approbation conditionnelle. Il s'agit d'une association à dose fixe de taurursodiol (acide tauroursodésoxycholique ou ursodoxicoltaurine) et de phénylbutyrate de sodium.

Cette association de molécules est considérée comme atténuant les dysfonctions mitochondriales et le stress du réticulum endoplasmique. Le phénylbutyrate de sodium agit sur le stress du réticulum endoplasmique en régulant positivement les protéines chaperons (W. Zhou et al., 2011), tandis que le taurursodiol inhibe l'apoptose associée aux mitochondries (Rodrigues et al., 2003).

Au cours de l'essai de phase 2 CENTAUR, AMX0035 était associé à un ralentissement significatif du déclin des scores de l'ALSFRS. L'analyse à long terme a montré qu'un traitement précoce continu avec AMX0035 réduisait le risque de décès de 44% et prolongeait la survie sans trachéotomie (Paganoni et al., 2022). L'étude extensive des données soutient une extension de la survie de 10 mois en cas d'initiation précoce du traitement. L'essai clinique de phase 3 PHOENIX (NCT05021536) est encore en cours pour confirmer l'innocuité et l'efficacité d'AMX0035 chez 664 patients atteints de SLA sur des sites aux États-Unis et en Europe, et les résultats sont attendus pour 2024.

L'AMX0035 est formulé sous forme de poudre pour suspension orale, contenant 3g de phénylbutyrate de sodium et 1g de taurursodiol, sous le nom de **relyvrio**. Il doit être administré avant la prise des repas. La dose initiale est d'un sachet par jour pendant 21 jours, suivie d'une dose de maintenance constituée d'un sachet matin et soir chaque jour.

3.2.1.2 Thérapies en cours de développement

Le développement des thérapies passe par différentes étapes de la preuve de concept *in vitro* puis *in vivo*, au préclinique et enfin aux essais cliniques. Ces derniers essais se divisent en quatre phases : une première focalisée sur la toxicité du traitement chez des sujets sains, une

deuxième pour démontrer l'efficacité et définir la dose optimale du traitement chez des sujets malades, une troisième pour comparer l'efficacité au placebo ou à un médicament de référence. La dernière phase fait suite à l'obtention d'AMM et concerne le suivi du traitement à long terme.

Parmi les thérapies en développement dans la SLA, seule une vingtaine sont en phases 2/3 ou phase 3. Ce sont ainsi les thérapies dont le développement est le plus avancé et s'approchant le plus d'une potentielle mise sur le marché.

Ces traitements agissent sur les principaux mécanismes physiopathologiques de la SLA comme l'excitotoxicité, le stress cellulaire, l'altération de l'homéostasie des protéines, la neuro-inflammation et comportent des fonctions neuroprotectrices. On peut tout de même noter le candidat-médicament CNM-Au8 qui se distingue en créant une nouvelle piste thérapeutique en catalysant efficacement le métabolisme énergétique et en présentant des résultats prometteurs dans le traitement de la SLA.

Mémantine : *anti-excitotoxique*

La mémantine est un antagoniste non compétitif du récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) qui est un récepteur ionotrope important du glutamate. L'inhibition de ces récepteurs devrait réduire l'excitotoxicité causée par le glutamate. Les études précliniques ont conclu à un ralentissement de la progression de la maladie ainsi qu'un prolongement de l'espérance de vie dans un modèle murin SOD1-G931 (R. Wang & Zhang, 2005).

Les premières études cliniques de phase 2/3 et 2b n'ont pas rencontré leurs objectifs principaux. La mémantine n'a pas mené à un ralentissement significatif de la progression de la maladie ni à l'amélioration de l'état neurocognitif ou comportemental des patients malgré une bonne tolérance du médicament (de Carvalho et al., 2010) [10].

La molécule est en cours d'étude dans l'étude clinique de phase 2/3 MND-SMART (NCT04302870) dont l'objectif principal est de constater un changement du score ALSFRS-R et de la survie avec une administration quotidienne de la mémantine en comparaison à un placebo pendant 18 mois (C. Wong et al., 2022).

Trazodone : *inhibiteur de la réponse intégrée au stress*

Le trazodone est une molécule inhibant la protéine kinase PERK, ce qui induit une réduction de la toxicité de TDP-43 dans des modèles précliniques de SLA. La molécule réduit également la formation des granules de stress (C. Wong et al., 2022).

La molécule est actuellement testée dans le même essai clinique de phase 2/3 que la mémantine (C. Wong et al., 2022) (NCT04302870).

ABBV-CLS-7262 et DNL343 : *inhibiteur de la réponse intégrée au stress*

ABBV-CLS-7262 est une petite molécule pénétrant le SNC. Elle est activatrice de eIF2B qui est le facteur d'échange de nucléotide guanine pour le facteur 2 d'initiation de la traduction eucaryote. En activant ce dernier, ABBV-CLS-7262 peut atténuer l'ISR et restaurer la traduction des protéines (Cho et al., 2023).

L'efficacité et la sécurité de la molécule sont actuellement étudiées dans un essai clinique de phase 2/3 de la plateforme HEALEY (NCT05740813).

DNL343 est aussi une molécule activatrice de eIF2B testée dans un essai de phase 2/3 de la plateforme HEALEY (NCT05842941).

SLS-005 (Tréhalose) : *anti-agrégation*

Le tréhalose est un disaccharide passant la barrière hémato-encéphalique qui stimule l'expression de gènes liés à l'autophagie indépendante de mTOR. Des études précliniques montrent que l'administration de la molécule prolonge la vie et réduit les symptômes de la maladie en diminuant notamment l'accumulation d'agrégats de SOD1. Les neurones moteurs sont mieux préservés grâce à une augmentation de l'autophagie (Castillo et al., 2013).

Une étude de phase 2/3 est en cours afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité du SLS-005 dans la SLA (NCT05136885).

Masitinib : *anti-inflammatoire*

Le masitinib est un inhibiteur sélectif de tyrosine kinase administré par voie orale développé par AB Sciences. Il a une fonction neuroprotectrice en inhibant l'activité de la microglie, des macrophages et des cellules mastocytaires dans le système nerveux et en limitant ainsi la neuro-inflammation (Mora et al., 2020). Le candidat-médicament agit en inhibant les formes sauvages de c-KIT, Fyn, Lyn et les récepteurs alpha et bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes. Il inhibe sélectivement le facteur 1R de stimulation des colonies du récepteur de la tyrosine kinase (CSF-1R) pour empêcher la prolifération de la microglie.

Une étude clinique de phase 2/3 soutient que la molécule à une dose de 4,5mg/kg associée avec du riluzole retarde la détérioration clinique de 27% par l'étude du score ALSFRS-R (Mora et al., 2020). L'analyse de la survie globale à long terme a indiqué que le masitinib par voie orale, s'il était administré tôt, pourrait prolonger la survie de 2 ans (25 mois) et réduire le taux de mortalité de 44% (Mora et al., 2021).

Un essai de phase 3 (NCT03127267) va être réalisé pour attester de l'efficacité par la mesure du score ALSFRS-R et de l'innocuité du médicament. Les participants recevront deux doses (4,5 et 6mg/kg/j) en association avec du riluzole. L'essai est encore en phase de recrutement aux États-Unis et en Europe.

MN-166 (Ibudilast) : *anti-inflammatoire*

L'ibudilast est une petite molécule anti-inflammatoire administrée par voie orale. Elle inhibe plusieurs phosphodiésterases (PDE 3, 4, 10 et 11), le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ce qui supprime la neuro-inflammation et l'activation microgliale. Elle favorise également la production de cytokines anti-inflammatoires et de facteurs neurotrophiques (Babu et al., 2021; Oskarsson et al., 2021). D'autres recherches ont montré que l'ibudilast affecte potentiellement plusieurs autres voies dans le processus de la maladie.

Au cours d'un essai de phase 2 où les patients prenaient 60mg d'ibudilast par jour avec du riluzole pendant 6 mois, le traitement a été montré comme sûr et bien toléré. Les résultats laissent supposer que le traitement peut ralentir la progression de la maladie et suggère un effet du traitement dans un sous-ensemble de participants ayant une courte histoire de SLA (Oskarsson et al., 2021).

L'essai de phase 2b/3 (NCT04057898) recrute actuellement des participants pour évaluer l'efficacité et l'innocuité de l'ibudilast pendant 12 mois suivis d'une phase d'extension en ouvert de 6 mois.

Triumeq : *neuroprotecteur*

Le triumeq est une thérapie antirétrovirale utilisée dans le traitement du virus de l'immunodéficience humaine associant abacavir, lamivudine, et dolutegravir. Il est suggéré que la neuro-inflammation et les rétrovirus endogènes humains contribuent au développement de la SLA. La thérapie dirigée contre les rétrovirus endogènes a démontré des effets positifs lors d'études *in vitro* et de biomarqueurs.

Une étude de phase 2 a indiqué que le traitement à long terme était sûr et bien toléré et suggérait une possible réponse biologique (Gold et al., 2019). Une étude de phase 3 est en cours de recrutement pour établir l'effet du traitement sur la progression de la maladie et sur la survie (NCT05193994).

Méthylcobalamine (Vitamine B12) : *neuroprotecteur*

La méthylcobalamine est la forme active de la vitamine B12 et la coenzyme de la méthionine synthase responsable de la régénération de méthionine à partir d'homocystéine. Elle peut ainsi aider à l'élimination de l'homocystéine neurotoxique et préserver les motoneurones (Zoccolella et al., 2010). Elle protège également de la neurotoxicité du glutamate (Akaike et al., 1993).

Une étude clinique de phase 3 a soutenu l'efficacité de la molécule à haute dose (50mg) à retarder la détérioration clinique par le suivi du score ALSFRS-R. Après 16 semaines de traitement, la détérioration clinique était réduite de 43% et le médicament était bien toléré (Oki et al., 2022).

CNM-Au8 : *neuroprotecteur*

Le CNM-Au8 est une suspension de nanocristaux d'or conçue pour améliorer la survie, la fonction et la communication des cellules nerveuses en soutenant leurs besoins énergétiques, tout en réduisant le stress oxydatif. En favorisant l'oxydation du NADH en NAD⁺ et la production d'ATP, il peut restaurer l'énergie dans les cellules cérébrales et atténuer la dérégulation énergétique, qui joue un rôle clé dans la progression de la SLA (X. Huang et al., 2005; Robinson et al., 2020; Vucic et al., 2021).

Des études précliniques ont montré que CNM-Au8 améliorait la survie des cellules nerveuses et la fonction des motoneurones dans des modèles de maladies du motoneurone. Son administration améliorait les scores cliniques et augmentait l'espérance de vie en comparaison à un placebo [11].

L'étude de phase 2 RESCUE-ALS a indiqué une réduction statistiquement significative de la progression de la SLA et du score ALSFR-S ainsi que des preuves d'un bénéfice potentiel de survie à long terme. Le CNM-Au8 a réduit le risque de décès de 70% par rapport à ceux initialement traités par placebo. Il a également ralenti la progression, diminué le pourcentage de patients présentant un déclin de 6 points du score ALSFRS-R et amélioré la qualité de vie (*CNM-Au8 Shows Continued Decreases in ALS Mortality, Updated Open-Label Findings Show*, 2022).

Une étude clinique plus large contrôlée par placebo de phase 2/3 est en cours pour examiner la sécurité et l'efficacité du traitement (NCT04414345).

Pridopidine : *neuroprotecteur*

La pridopidine, un agoniste du récepteur sigma-1 (S1R), présente des effets neuroprotecteurs potentiels en augmentant la sécrétion de facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau et de la lignée cellulaire gliale. Elle peut restaurer l'activité neuromusculaire, moduler les déficits moteurs et réduire la perte de neurones (Ionescu et al., 2019).

Une étude de phase 2/3 contrôlée par placebo est en cours aux États-Unis pour évaluer l'innocuité et l'efficacité chez 163 patients SLA. Le critère principal est le score ALSFRS-R après 24 semaines de traitement (NCT04615923). Le critère principal de cette étude est le score ALSFRS-R après 24 semaines de traitement.

ANX005 : *immunothérapie*

ANX005 est un anticorps monoclonal IgG4 humanisé en développement pour le traitement de maladies auto-immunes et neurodégénératives. Il est administré par voie intraveineuse et se fixe à la protéine du complément C1q et inhibe complètement la voie classique du complément. La protéine C1q a un rôle dans l'immunité innée mais aussi dans le neurodéveloppement. Une activité aberrante de C1q est associée à une perte synaptique potentielle et contribue à la démence et à la perte de fonctions. L'inhibition de C1q est supposée limiter la neurodégénérescence médiée par le complément et ainsi préserver les synapses.

Au cours des essais cliniques, l'anticorps était sûr et généralement bien toléré. Les événements indésirables les plus fréquents étaient des réactions liées à la perfusion à la première dose. Un essai clinique de phase 2 est en cours pour évaluer l'efficacité et l'innocuité du traitement (NCT04569435). Les critères principaux sont la sécurité, la pharmacocinétique et la concentration de C1q libre dans le sang. Les critères secondaires sont la concentration de neurofilaments légers dans le plasma, l'activité musculaire et l'évolution de l'ALSFRS-R [12 ;13].

3.2.2 Approches de thérapies innovantes

Si les traitements pharmacologiques actuellement en développement n'ont pas la prétention d'être curatifs, de nombreuses innovations thérapeutiques prometteuses sont en cours de développement. Ces thérapies reposent soit sur l'utilisation de cellules, soit sur des modifications génétiques.

Parmi les thérapies cellulaires en développement, plusieurs misent sur l'utilisation de cellules souches et notamment de cellules souches mésenchymateuses (MSC). Du côté des thérapies

géniques, on retrouve notamment la technologie des ASO qui permet de moduler l'expression de certaines protéines dans le SNC.

3.2.2.1 Thérapies autorisées sur le marché

Les traitements issus des biotechnologies ayant une indication dans la SLA sont encore en plein développement. Seuls deux traitements ont obtenu des AMM dans le monde. Aucun de ces traitements n'est encore approuvé en Europe, mais des essais cliniques sont en cours.

Thérapies cellulaires

Lenzumestrocel (ou NeuroNata-R) :

Le lenzumestrocel est le premier produit de thérapie cellulaire avec une indication dans la SLA ayant obtenu une AMM. Il s'agit de MSC autologues dérivées de la moelle osseuse développées par Corestem (Nam et al., 2022). Ces cellules régulent à la fois les cellules immunitaires innées et adaptatives, par la libération de facteurs solubles neurotrophiques, faisant passer l'environnement du patient d'un état pro-inflammatoire et toxique à un état anti-inflammatoire et neuroprotecteur (Kwon et al., 2014). Elle est conditionnellement approuvée pour la SLA en Corée du Sud depuis 2014.

Un cycle de traitement commence par un prélèvement de moelle osseuse pour collecter des MSC de la propre moelle osseuse du patient. Ces cellules sont ensuite manipulées par le procédé breveté de Corestem et réinjectées dans le liquide céphalo-rachidien du patient 4 semaines plus tard. Le processus est répété de sorte qu'un cycle de traitement se compose de deux prélèvements de moelle épinière et de deux injections de cellules souches. Le traitement est administré en concomitance avec 100mg de riluzole quotidien.

Un essai de phase 2 a montré qu'un cycle de deux administrations séparées de 26 jours était à l'origine d'un bénéfice thérapeutique pendant 6 mois (changements moyens du score ALSFR-S réduits par rapport au groupe témoin) avec une bonne sécurité chez les patients atteints de SLA. Le groupe traité avec le lenzumestrocel a également montré une diminution des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation des cytokines anti-inflammatoires (Oh et al., 2018).

Le traitement est actuellement testé dans un essai clinique de phase 3 (NCT04745299) afin d'attester de l'efficacité et de la sécurité à long terme après un cycle de deux injections intrathécales, cela pourrait déboucher sur une approbation potentielle aux États-Unis.

Thérapies géniques

Tofersen (Qalsody):

Le tofersen (**qalsody**) est un ASO développé par Ionis Pharmaceuticals et licencié par Biogen. Il s'agit du premier exemple de traitement personnalisé destiné uniquement aux patients atteints de SLA possédant une mutation confirmée du gène *SOD1*. Il a été approuvé par la FDA le 25 avril 2023 en se basant sur une réduction des neurofilaments légers dans le plasma, un biomarqueur de dommages axonaux et de neurodégénérescence (Research, 2023). L'EMA examine actuellement les données concernant tofersen.

Le tofersen se fixe aux ARNm de SOD1 et devrait réduire la synthèse de la protéine SOD1 et donc empêcher le gain de fonction toxique du mutant SOD1. Il est administré par injection intrathécale. La posologie recommandée est de 100mg (15mL) par administration. Les patients reçoivent trois doses initiales administrées à 14 jours d'intervalle, suivies d'une dose d'entretien tous les 28 jours.

Au cours des essais cliniques de phase 1 et 2, la quantité de SOD1 dans le liquide céphalo-rachidien a été réduite de 33% au bout d'environ 3 mois chez les patients recevant des doses de 100mg en comparaison au placebo. La concentration des neurofilaments lourds et légers dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien était également réduite chez les patients traités avec 100mg, indiquant un potentiel biomarqueur de l'efficacité thérapeutique. D'autres analyses suggèrent que le traitement ralentirait le déclin du score ALSFRS-R, de la fonction pulmonaire et de la force musculaire.

L'étude de phase 3 VALOR n'a pas abouti à une différence significative au niveau de l'objectif primaire, le score ALSFRS-R au bout de 6 mois. Cependant, d'autres effets positifs consistants ont été observés à travers les principales mesures de résultats cliniques secondaires et exploratoires, et ces effets deviennent plus apparents après une étude à plus long terme. Le tofersen résulte en un ralentissement du déclin chez les patients à évolution rapide et une stabilisation clinique des patients à évolution lente.

La réduction observée de neurofilaments légers était cohérente dans tous les sous-groupes en fonction du sexe, de la durée de la maladie depuis l'apparition des symptômes, du site d'apparition et de l'utilisation d'autres médicaments pour le traitement de la SLA.

Qalsody est approuvé dans le cadre de la voie d'approbation accélérée, en vertu de laquelle la FDA peut approuver des médicaments pour des affections graves lorsqu'il existe un besoin médical non satisfait et qu'un médicament s'avère avoir un effet sur un paramètre de substitution qui est raisonnablement susceptible de prédire un bénéfice clinique pour les

patients. Afin de confirmer le bénéfice clinique de qalsody, un essai de Phase 3 randomisé, en double-aveugle et contrôlé par placebo est en cours chez des personnes porteuses de la mutation génétique SOD1 qui ne présentent pas encore de symptômes. L'étude évaluera la proportion d'individus traités avec qalsody qui développent des symptômes de la SLA au cours de l'essai par rapport au placebo.

3.2.2.2 *Thérapies en cours de développement*

Thérapies cellulaires

Les thérapies cellulaires en développement se concentrent sur l'utilisation de MSC, de cellules gliales ou encore de cellules immunitaires afin de protéger les motoneurones notamment par des actions neuroprotectrices et anti-inflammatoires.

NurOwn :

Il s'agit d'une thérapie cellulaire à base de MSC sécrétant des facteurs neurotrophiques (MSC-NTF) développée par BrainStorm Cell Therapeutics (Berry et al., 2019).

Les MSC adultes étaient collectées dans la moelle osseuse des patients, puis mises en culture et manipulées pour sécréter des facteurs neurotrophiques (NTF) *ex vivo*. On obtient ainsi des cellules MSC-NTF qui étaient transplantées au patient par une injection intrathécale. Ces cellules sécrètent différents facteurs neurotrophiques, comme les NTF dérivés de cellules gliales (GDNF), les NTF dérivés du cerveau (BDNF), le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), et le facteur de croissance hépatocytaire (HGF), avec le potentiel de protéger les motoneurones. MSC-NTF stimulerait également la croissance des nouveaux motoneurones et favoriserait la réinnervation des jonctions neuromusculaires.

La principale différence de traitement entre Neuronata-R et NurOwn (indépendamment de l'efficacité potentielle du traitement) est que BrainStorm a développé un moyen de cryopréserver efficacement les MSC (soit avant ou après manipulation) afin qu'un seul prélèvement de moelle osseuse puisse fournir des cellules souches pour de nombreux traitements. Ce serait évidemment un énorme avantage pour NurOwn, car Neuronata-R nécessite actuellement un prélèvement de moelle osseuse 4 semaines avant chaque injection.

La phase 3 de l'essai clinique est toujours en cours. L'essai randomisé, en double-aveugle et multicentrique (NCT03280056) évalue la sécurité et l'efficacité de trois administrations intrathécales de NurOwn. Les buts primaires de l'étude seront mesurés en employant l'échelle ALSFRS-R et comparés au groupe placebo. Un but secondaire est d'évaluer comment des biomarqueurs, comme des facteurs neurotrophiques sécrétés par des cellules, des facteurs inflammatoires, et cytokines, changent dans le sang et dans le liquide céphalo-rachidien (le

liquide qui entoure le cerveau et la ME) après un traitement avec NurOwn. L'essai n'a pas montré de différences significatives pour le score ALSFRS. Cependant, des éléments positifs en sont ressortis comme l'amélioration des biomarqueurs de neuro-inflammation, neurodégénérescence et du support des NTF dans le liquide cébrospinal, en supplément d'une bonne tolérance au traitement.

Fin 2022, la FDA a refusé d'examiner une demande d'approbation de BrainStorm pour NurOwn, au motif de données actuellement insuffisantes. BrainStorm explore maintenant les prochaines étapes de la thérapie expérimentale.

AstroRx :

AstroRx est une thérapie développée par Kadimastem à base d'astrocytes conçues à partir de cellules souches embryonnaires humaines. Ces cellules gliales fournissent un soutien aux motoneurones en conditions physiologiques.

Les résultats d'une étude de phase 1/2 (NCT03482050) dans laquelle les patients avaient une injection unique intrathécale ont démontré un bon profil d'innocuité et une diminution cliniquement significative de la progression de la maladie au cours de la première période de suivi de 3 mois. Les résultats indiquent que des injections répétées d'AstroRx pourraient prolonger son effet bénéfique dans la SLA.

La société prévoit de lancer une étude clinique de phase 2a aux États-Unis pour examiner les effets des injections d'AstroRx administrées tous les trois mois [14].

RAPA-501 :

RAPA-501 est une thérapie cellulaire hybride Treg/Th2 autologue pour la SLA développée par Rapa Therapeutics. Cette thérapie est composée de cellules T extraites de volontaires sains par aphérèse puis reprogrammées *ex vivo* par dé-différenciation puis re-différenciation en cellules RAPA-501, avant injection en IV.

Le traitement est en cours d'essais cliniques de phases 2/3 avec jusqu'à 4 perfusions espacées de six semaines (injection au temps 0, puis après les semaines 6, 12 et 18) (NCT04220190).

Thérapies géniques

Le développement de thérapies géniques dans la SLA est dominé par l'utilisation d'ASO afin de réduire le niveau d'expression de certaines protéines que ce soit chez des patients avec des mutations spécifiques ou chez l'ensemble des patients. D'autres pistes thérapeutiques sont tout de même explorées comme l'apport de gènes permettant l'expression de facteurs de croissance.

ION-363 :

ION-363 est un ASO ciblant l'ARNm de FUS. En empêchant l'expression de FUS, ION-363 réduit les niveaux de FUS et empêché la perte de motoneurons (Korobeynikov et al., 2022).

Un essai de phase 3 est en cours pour déterminer la sécurité et l'efficacité de ION-363 (NCT04768972). Les principaux critères de jugement sont l'évolution du score ALSFRS-R et la survie sans assistance ventilatoire.

ION-541 (BIIB105) :

BIIB105 est un ASO ciblant l'ARNm de l'ataxine-2 (protéine codée par le gène *ATXN2*) et réduisant le niveau de la protéine. La diminution de l'ataxine-2 avait réduit l'agrégation de TDP-43 et augmenté la survie des souris transgéniques TDP-43 (Becker et al., 2017). La pathologie TDP-43 est impliquée dans la plupart des cas de SLA et est considérée comme un critère commun aux différentes formes de la maladie. Ainsi, la diminution de l'expression de l'ataxine-2 avec un ASO pourrait potentiellement profiter à la plupart des personnes atteintes de SLA (Biogen, 2023).

Un essai clinique de phase 1/2 est en cours de recrutement pour évaluer l'innocuité et la tolérance du BIIB105 (NCT04494256).

AMT-162 (APB-102) :

AMT-162 est un virus adéno-associé (AAV) AAVrh10 recombinant capable de produire un miARN anti-SOD1, administré par injection intrathécale unique, développé initialement par Apic Bio puis par UniQure. Ce miARN peut se lier à l'ARNm de SOD1 et mener à sa dégradation afin de réduire la production et l'accumulation de la protéine.

Un essai de phase 1/2 devrait démarrer au cours du second semestre 2023 pour évaluer son innocuité, sa tolérance et son efficacité [15].

Engensis (VM202) :

Engensis est une thérapie développée par Helixmith permettant de délivrer le gène du facteur de croissance des hépatocytes aux neurones et aux cellules de Schwann par l'intermédiaire d'un plasmide non viral d'ADN pour favoriser la régénérescence du système nerveux et induire la formation de vaisseaux sanguins microvasculaires. L'expression accrue du facteur réduisait la dégénérescence des motoneurons et augmentait l'espérance de vie dans des modèles murins de SLA (Sun et al., 2002).

L'étude de phase 1/2 suggérait une bonne tolérance du traitement composé de 4 injections intramusculaires par semaine (dose totale de 64mg) par les patients (Sufit et al., 2017). Les données préliminaires de l'étude de phase 2 REViVALS-1A ont montré que le traitement expérimental était généralement sûr et bien toléré. Les résultats finaux de cette étude ainsi que ceux de l'étude REViVALS-1B sont attendus.

L'ensemble de ces thérapies a pu se hisser à des phases plus ou moins avancées du développement clinique. Des critères de recrutements plus sélectifs comme la vitesse de progression de la pathologie permettent d'homogénéiser la population et offrent de meilleures chances d'observer une efficacité bien que les résultats ne s'appliqueraient pas forcément à une population plus générale (Jiang et al., 2022). La durée d'observation et les méthodes d'analyse sont également des points à prendre en compte.

Cependant, en moyenne sur 10 000 candidats, seul un médicament arrive jusqu'aux dernières phases cliniques. C'est lors des phases précliniques que la majorité des candidats-médicaments arrêtent leur développement. Ces phases reposent sur l'utilisation de modèles *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. La translation de ces modèles jusqu'à l'homme peut s'avérer compliquée, c'est pourquoi il est nécessaire d'opter pour le meilleur modèle, mais également d'adapter au mieux les conditions expérimentales.

4 Modèles de sclérose latérale amyotrophique

4.1 *In vitro*

Une grande partie des connaissances des mécanismes physiopathologiques de la SLA proviennent d'études sur des modèles de culture cellulaire simples, à savoir des monocultures. De nos jours, des co-cultures de plus en plus complexes incluant plusieurs acteurs cellulaires sont utilisées afin d'avoir une meilleure compréhension des processus. Par ailleurs, la maîtrise des cellules souches pluripotentes induites (iPS) permet aujourd'hui de développer des modèles *in vitro* directement à partir des cellules du patient. Une biopsie cutanée permet de mettre en culture des fibroblastes et de les transformer en cellules pluripotentes grâce aux 4 gènes suivants *c-MYC*, *KLF4*, *OCT4* et *SOX2*. Les cellules sont ensuite différenciées en cellules du SNC pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires dérégulés chez le patient.

L'utilisation de cellules souches pluripotentes est une nouvelle approche dans la création de modèles *in vitro*. Ces cellules ont déjà permis de développer des motoneurons porteurs des différentes mutations des gènes *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9orf72*.

Ces modèles ont été largement utilisés en raison de leurs avantages par rapport à ceux *in vivo*. Ils bénéficient d'un meilleur contrôle de l'environnement, de la possibilité d'avoir un système n'impliquant qu'un nombre limité de types cellulaires définis sur lesquels il est possible d'effectuer des modifications génétiques. En plus de cela, les cellules sont simples à cultiver, présentent une meilleure reproductibilité et limitent l'utilisation d'animaux. Cependant, ces modèles ne répliquent pas intégralement les conditions de l'organisme et les interactions avec les autres systèmes (Gois et al., 2020).

4.2 *In vivo*

L'utilisation de modèles plus complexes peut s'avérer nécessaire pour la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires ayant lieu dans un plus grand système biologique. Comme les tissus de patients ne sont disponibles qu'en *post mortem*, les modèles animaux de SLA sont largement utilisés que ce soit pour l'étude des mécanismes pathologiques sous-jacents à la maladie ou pour le développement de traitements (Lutz, 2018). Le nombre de modèles animaux est encore en augmentation et a déjà permis d'obtenir des informations capitales sur la maladie.

4.2.1 Modèles de souris

Les rongeurs sont particulièrement importants dans le domaine préclinique en raison de la taille et la complexité de leur système nerveux en comparaison aux autres modèles disponibles. Parmi ces derniers, les souris sont les animaux les plus utilisés pour modéliser la

SLA. Les modèles de souris ont déjà été utilisés pour mieux comprendre la pathogenèse de la maladie ainsi que pour cribler des thérapies avant le passage en clinique (Lutz, 2018; Philips & Rothstein, 2015a; Picher-Martel et al., 2016).

Plusieurs modèles de souris basés sur les gènes mutés des formes familiales de SLA ont vu le jour comme *SOD1*, *TDP43*, *FUS* et *C9orf72* parmi d'autres, principalement pour comprendre les mécanismes pathologiques conduisant à la mort neuronale et pour développer des stratégies thérapeutiques.

Différentes techniques sont employées afin de développer des modèles de souris transgéniques. La modification transgénique d'un modèle de souris correspond à l'apport d'un transgène porteur d'une mutation ou non, avec un régulateur ou un promoteur de l'expression. Le choix du promoteur est essentiel pour déterminer la cible d'expression. L'expression peut être spécifique aux neurones ou au SNC comme c'est le cas avec les promoteurs des gènes de la différenciation des thymocytes 1.2 (Thy1.2), de la protéine prion murine (PrP), de la chaîne lourde des neurofilaments (NEFH), ou ubiquitaire dans le cas du promoteur CAG, un promoteur synthétique fort. Cette technique est fréquemment associée à une surexpression du gène muté pouvant induire des caractéristiques non spécifiques de la mutation. Des méthodes d'insertion et de délétion génique spécifique comme Cre/Lox ou encore les chromosomes artificiels bactériens (BAC). Certains transgènes sont associés à l'élément de réponse à la tétracycline afin de contrôler l'expression du gène par l'administration de tétracycline ou de doxycycline. Enfin, il est possible de provoquer des mutations endogènes. Pour cela, il est possible de faire recours à de la mutagenèse à N-éthyl-N-nitrosourée (ENU) à l'origine de mutations aléatoires et non identifiées. Le système d'édition de l'ADN CRISPR/Cas9, quant à lui, permet de créer des mutations ciblées et est idéal pour créer des modèles ne surexprimant pas la protéine mutée.

Le fond génétique des modèles de souris transgéniques est connu pour altérer la présentation phénotypique de la SLA. Cela suggère également que le fond génétique de chaque patient peut avoir un impact sur son phénotype. L'analyse génomique et épigénomique permettrait d'aller vers des traitements plus personnalisés adaptés à chacun (Heiman-Patterson et al., 2011, 2015).

4.2.1.1 *SOD1*

En 1993, le gène codant pour la protéine SOD1 a été identifié par Rosen comme le premier gène responsable de la SLA (Rosen et al., 1993). Ce gène a permis de développer les premiers modèles de souris transgéniques (Tg) de SLA.

Le modèle de souris **knock-out SOD1** est uniquement un modèle de stress oxydatif chronique. Ces souris ont une durée de vie réduite et présentent une atrophie et dénervation des muscles à contraction rapide, mais aucune perte de motoneurone spinal ou d'axone moteur de la racine ventrale.

La majorité des modèles de souris SOD1 développés sont porteurs d'une mutation ponctuelle et expriment la protéine SOD1 humaine mutée sous le contrôle du promoteur du gène humain, à un niveau similaire d'expression comme pour **SOD1-G85R**, ou à un niveau accru comme pour **SOD1-G93A** ou **SOD1-G37R**, par rapport aux souris SOD1 endogène (Philips & Rothstein, 2015b).

La lignée de souris transgéniques **SOD1-G93A** surexprimant une forme mutante du gène humain SOD1 portant la mutation glycine-alanine de l'acide aminé 93 (G93A) est la première développée (Gurney et al., 1994). Le modèle est caractérisé par une perte progressive de poids et de force musculaire suivie d'une paralysie débutant au niveau des membres inférieurs avant de s'étendre au reste du corps (Gurney, 1997). Le développement de la maladie comporte également une dégénérescence des motoneurons à un stade avancé de la pathologie, l'activation de la microglie et des astrocytes ainsi qu'une infiltration du SNC par des cellules immunitaires (Picher-Martel et al., 2016). Il s'agit d'un modèle qui développe les symptômes rapidement et qui a une espérance de vie située entre 4 et 5 mois (Heiman-Patterson et al., 2005). La sévérité de la maladie va cependant dépendre du fond génétique des souris, mais également du nombre de copies du transgène. Le nombre de copies étant connu pour diminuer au cours des générations (Lutz, 2018).

Ce modèle de souris a permis de collecter de nombreuses données sur l'étiologie et la pathogenèse de la maladie et reste le plus utilisé au niveau préclinique en raison de sa forte ressemblance avec le phénotype de la SLA chez l'Homme. À ce jour, ce modèle a été utilisé pour la majorité des thérapies approuvées par la FDA dans le traitement de la SLA (Bj et al., 2006; Gurney et al., 1998; Ito et al., 2008). Cependant, en général les études cliniques basées sur le modèle de souris SOD1 n'ont pas réussi à se traduire par un effet positif chez l'homme.

De bonnes pratiques d'utilisation du modèle SOD1-G93A ont été établies et permettent la génération de données précliniques plus solides (Ludolph et al., 2010). Le modèle a fait l'objet d'une standardisation permettant de faciliter le suivi de la progression de la pathologie. Le score neurologique est un outil de suivi de la progression de la paralysie, depuis l'apparition de la parésie (paralysie légère ou partielle) jusqu'à la paralysie généralisée. Cet outil permet également de percevoir les changements cliniques induits par un traitement dans la progression de la maladie (Hatzipetros et al., 2015).

De nombreux autres modèles SOD1 ont été développés par la suite, incluant d'autres variants retrouvés dans des sous-populations de patients avec une SLA familiale, comme la mutation humaine **G37R** (P. C. Wong et al., 1995), la mutation humaine **G85R** (Bruijn et al., 1997) ou encore la mutation **G86R** de la souris (Ripps et al., 1995). Ces modèles, tout comme le modèle SOD1-G93A, expriment tous un niveau élevé de SOD1 altérée et partagent des caractéristiques communes incluant la perte importante de motoneurones, l'agrégation de protéines, la dénervation axonale, la paralysie progressive et l'espérance de vie réduite (Philips & Rothstein, 2015a).

Les souris **SOD1-D83G** ont été générées par exposition au mutagène ENU. Les souris homozygotes pour la mutation présentent une dégénérescence des motoneurones inférieurs qui s'arrête à l'âge adulte et ne deviennent donc pas paralysées. Ces souris permettent d'approfondir les connaissances sur la SLA en dissociant la dégénérescence des motoneurones et les effets périphériques de la mutation à un niveau d'expression endogène (Joyce et al., 2015).

4.2.1.2 TDP43

La protéine de liaison à l'ADN TAR 43 (TDP-43) a été identifiée comme la protéine pathologique principale des inclusions des motoneurones dans la SLA et la DFT, avec des inclusions ubiquitinées non retrouvées dans les formes familiales SOD1 de la SLA. La diminution en TDP-43 nucléaire et son agrégation considérée toxique dans le cytosol sont des marqueurs de la SLA. En 2008, il a été découvert que des mutations dans TDP-43 étaient responsables de formes sporadiques et familiales de SLA (Kabashi et al., 2008; Van Deerlin et al., 2008). La découverte de ces mutations a abouti au développement d'une vingtaine de modèles de souris.

Le **knock-out de TDP-43** chez les souris est létal au stade embryonnaire, les animaux hétérozygotes atteignent l'âge adulte, mais développent des troubles moteurs.

Les premiers modèles transgéniques **surexprimaient TDP-43** sauvage ou mutée (**A315T** et **M337V**, **G298S**) en utilisant le promoteur du gène de la **PrP** ou de **Thy1.2**. Le niveau d'expression de TDP-43 mutée est corrélé à la gravité du phénotype et à la précocité de la mort. La surexpression supérieure à deux fois la normale était mal tolérée avec un phénotype neurologique d'apparition précoce. Il y avait une accumulation d'agrégats pathologiques de protéines ubiquitinées dans des neurones conduisant à un phénotype moteur sévère. Le modèle de surexpression TDP-43A315T sous le contrôle du promoteur de PrP est actuellement le modèle TDP-43 optimal présentant les caractéristiques phénotypiques et physiopathologiques de la SLA (Stephenson & Amor, 2017).

Des souris transgéniques ont été créées pour exprimer la **forme sauvage de TDP-43** sous le contrôle du promoteur **Thy1.2** et ont été **croisées avec des souris knock-out ATXN2** pour démontrer que la réduction des niveaux d'*ATXN2* peut prolonger la durée de vie des souris atteintes de la forme sauvage de la maladie, faisant d'*ATXN2* une cible d'intérêt pour les thérapies géniques en développement.

Le promoteur du gène **PrP** a été utilisé pour d'autres lignées (**M337V**, **Q331K**, **wtTDP43**) en s'assurant d'une surexpression entre 1 et 1,5 fois la normale afin d'avoir des modèles moins agressifs. Ces souris transgéniques développent toutes des tremblements dès l'âge de 3 mois, suivis d'une paralysie des membres postérieurs. La lignée **Q331K** est celle présentant des déficits plus importants au niveau de la force de préhension et du RotaRod. Une neurodégénérescence était retrouvée même en l'absence de mauvaise localisation de TDP-43. Des déficits ont été retrouvés dans l'épissage et la régulation de l'ARN systémique (Arnold et al., 2013).

Des souris transgéniques ont été générées en utilisant des fragments de bibliothèques contenant des BAC génomiques humains pour incorporer des **mutations spécifiques** dans le gène TDP-43 (**A315T**, **G348C** et **sauvage**). Les souris présentent une neuro-inflammation, des déficits cognitifs et des inclusions de TDP-43 ubiquitinées dans le noyau et le cytoplasme. Cependant, ces souris ne développent pas de paralysie et ont une durée de vie normale.

Le modèle de souris **TDP-43 Δ NLS** a été créé pour exprimer une forme de TDP43 dépourvue du signal de localisation nucléaire (NLS) de manière régulée par administration de doxycycline. Sous un promoteur **NEFH**, cela a donné un phénotype de SLA neurodégénératif rapide, robuste et progressif, comprenant des déficits moteurs, une dénervation des jonctions neuromusculaires, une perte de motoneurone, une mauvaise localisation de TDP-43 et une mort prématurée. Lors de l'administration de doxycycline et de la réversion de l'allèle sauvage dit *wild-type* (WT), la pathologie TDP-43 et les déficits fonctionnels observés se sont révélés réversibles, même après le début de la neurodégénérescence (Walker et al., 2015).

Un modèle récent de TDP43 a été généré en utilisant CRISPR/Cas9 pour obtenir la mutation endogène **Q331K** sans surexpression de la protéine mutée. Ce modèle n'a cependant pas présenté de phénotype robuste ni de caractéristiques de la physiopathologie de la SLA (Stephenson & Amor, 2017).

4.2.1.3 *FUS*

Des mutations de la protéine de liaison à l'ARN, fusionnée dans le sarcome (**FUS**), ont été découvertes en 2009. Ces mutations sont essentiellement localisées au niveau C-terminal, ce qui perturbe le NLS. Elles sont responsables des formes précoces de la SLA (Kwiatkowski et

al., 2009; Vance et al., 2009). Sa localisation est intranucléaire et devient cytoplasmique en cas de stress protéique, où elle va former des granules en se liant aux ARNm. En condition physiologique, ces granules disparaissent avec la diminution du stress oxydatif. Cependant la mutation de FUS induit la persistance de ces granules qui s'agrègent et participent à la toxicité cellulaire. Plus d'une douzaine de modèles de souris FUS ont été créés, essentiellement avec insertion du gène humain *FUS* WT ou *knock-out* de *FUS*.

Les modèles de souris **knock-out FUS** présentent une instabilité chromosomique et une mort périnatale chez les souches consanguines, mais seulement une stérilité masculine et une sensibilité accrue aux radiations chez les souches non consanguines (Hicks et al., 2000; Kuroda et al., 2000). Elles ne développent pas de phénotypes associés à la SLA, ce qui suggère que les mutations liées à la SLA de FUS imposent un gain de fonction plutôt qu'une perte de fonction.

Un modèle de souris surexprimant **FUS Δ NLS** exogène (promoteur Thy1.2) a été créé et induisait un déficit moteur progressif et une perte neuronale dans le cortex moteur. La protéine était uniquement dans le cytoplasme des neurones et formait des agrégats positifs à l'ubiquitine et à P62. L'expression endogène du FUS, la localisation nucléaire et l'activité d'épissage n'étaient pas modifiées, ce qui indique que la mauvaise localisation de FUS est suffisante pour entraîner la protéinopathie (Shiihashi et al., 2016).

Un autre modèle **FUS Δ NLS** conduit à la suppression de l'exon 15 contenant le NLS, sauf en présence de Cre-recombinase. Les souris homozygotes **FUS Δ NLS/ Δ NLS** meurent peu de temps après la naissance, contrairement aux souris hétérozygotes **FUS Δ NLS/+**. FUS mutant était localisé dans le cytoplasme des motoneurones, tandis que FUS WT était principalement nucléaire. Ces souris ont présenté des anomalies motrices ainsi qu'une dégénérescence des motoneurones, mais pas de perte de poids et de paralysie (Scekic-Zahirovic et al., 2017).

Des lignées de souris transgéniques ont été générées en introduisant des mutants de la protéine FUS humaine (**P525L**, **R521C**) dans le gène de la protéine tau associée aux microtubules (*MAPT*). Un système de cassettes d'arrêt lox a été utilisé pour activer les mutations par la Cre-recombinase. Ces souris présentent des dénervations des jonctions neuromusculaires, une dégénérescence des motoneurones ainsi qu'une localisation anormale de la protéine associée à une formation d'agrégats. Cependant, ces souris n'atteignent pas le stade de paralysie ou de maladie terminale.

Un modèle knock-in **FUS Δ 14** a été développé, remplaçant l'exon 15 de la souris par la séquence humaine, à l'origine du saut de l'exon 14 et d'un décalage du cadre de lecture dans l'exon 15. Les souris hétérozygotes présentent une perte progressive des motoneurones à l'âge

adulte et une dénervation des jonctions neuromusculaires. FUS a une localisation cytoplasmique accrue mais ne forme pas d'agrégats, et est associée tout de même à une présence nucléaire (Devoy et al., 2017).

Diverses lignées de souris transgéniques surexprimant FUS sous différents promoteurs (PrP ou Thy1.2) révèlent des phénotypes sévères de SLA, avec des problèmes moteurs, des inclusions cytoplasmiques de FUS et une neuro-inflammation. Ces souris montrent une progression rapide vers le stade terminal de la maladie, avec des inclusions cytoplasmiques de FUS et une mort prématurée (Lutz, 2018).

4.2.1.4 *C9orf72*

Une expansion répétée d'hexanucléotides dans le cadre de lecture 72 du chromosome 9 a été identifiée comme étant une des mutations génétiques associée à la SLA familiale. Cette anomalie génétique est la plus courante associée à la SLA bien que la cause de la maladie soit encore compliquée à décrire.

Plusieurs groupes de recherche ont créé des modèles **knock-out** avec une perte de fonction de *C9orf72*. Ces souris présentent des signes de dysfonctionnement immunitaire avec une altération de la réponse immunitaire chez les macrophages et la microglie, mais aucun phénotype moteur ou autres caractéristiques propres à la SLA.

Des souris transgéniques ont été créées pour exprimer le gène *C9orf72* avec l'**expansion** de répétition hexanucléotidique (GGGGCC) qui est associée à la SLA chez l'homme. Les modèles de souris transgéniques ont montré des similitudes avec les symptômes de la SLA chez l'homme, tels que la formation de foyers d'ARN nucléaires et d'inclusions de traduction dans le cytoplasme. Ces souris transgéniques ont été créées à partir de plasmides BAC portant des séquences de répétitions d'expansion de différentes tailles, allant de quelques centaines à plus d'un millier de répétitions. Ces modèles étaient associés à des niveaux d'expression différents. Parmi ces modèles, seul le modèle FVB-*C9orf72* développé par Ranum lab réunit la paralysie, la réduction de l'espérance de vie et la pathologie TDP-43 (Lutz, 2018).

Les souris transgéniques *C9orf72* sont employées comme modèles précliniques pour évaluer de nouvelles thérapeutiques émergentes comme les ASO (Jiang et al., 2016). Ces souris pourraient également être utilisées pour démontrer l'efficacité de nouvelles petites molécules ciblant la structure secondaire de l'ARN contenant la répétition *C9orf72* ou de l'édition génomique Cas9 pour éliminer les répétitions d'expansion (Batra & Lee, 2017; Schludi & Edbauer, 2018).

4.2.1.5 Autres gènes

Il existe d'autres modèles se basant sur d'autres gènes plus rares impliqués dans la SLA. Parmi ces derniers, on peut citer celui de la profiline 1 (PNF1), une mutation plus rare comptant pour 1 à 2% des cas de SLA (Daoud et al., 2013; Ingre et al., 2013), impliquée dans l'architecture du cytosquelette.

On peut également mentionner les mutations du gène de l'ubiquiline 2 (UBQLN2) responsable de formes de SLA et DFT liées au X. Ce gène joue un rôle essentiel dans l'élimination de protéines agrégées poly-ubiquitinées.

Le gène de la NIMA-related kinase 1 (NEK1), découvert récemment, est retrouvé muté dans 2 à 3% des cas de SLA et serait responsable d'altérations de l'homéostasie des microtubules et de l'import nucléaire. Des modèles de souris se basant sur ce gène sont également en cours de développement.

4.2.2 Autres espèces animales

Les autres modèles animaux de SLA se basent sur les mêmes mutations génétiques et ont chacun des intérêts particuliers pour la recherche. En dehors des souris, d'autres modèles murins de SLA sont utilisés. Les rats, bien qu'utilisés moins fréquemment, sont particulièrement utiles pour évaluer les applications thérapeutiques trop lourdes pour les souris, comme l'administration intrathécale continue de composés potentiellement thérapeutiques par le biais de mini-pompes osmotiques.

Les nématodes, particulièrement *C. elegans* sont utilisés pour la simplicité de leur structure, ne mesurant qu'un millimètre à l'âge adulte avec seulement 959 cellules. Ils ont des gènes hautement conservés par rapport aux humains. De plus, leur comportement est déjà bien décrit. Leur durée de vie est d'environ trois semaines et leur cycle de vie court est de trois jours seulement. La transparence de leur corps permet également l'étude du développement de leurs motoneurons en détail au cours du temps. Leurs 302 neurones ont déjà été cartographiés et peuvent être visualisés au microscope avec des marqueurs fluorescents [16].

Les drosophiles partagent de nombreuses caractéristiques avec les nématodes. Leur système nerveux est plus complexe. Certaines mutations menant à des symptômes communs à la SLA ont été identifiées chez la mouche. L'intégration de gènes connus de la SLA chez la mouche induit des manifestations visibles comme des troubles de locomotion et un phénotype oculaire appelé « œil rugueux » caractéristique de la neurodégénérescence. Ce modèle peut être utilisé pour tester des candidats-médicaments afin d'améliorer ces manifestations et de potentiellement développer de nouveaux traitements pour la SLA.

Les poissons-zèbres font partie des modèles d'animaux vertébrés émergents dans l'étude des maladies neurodégénératives et notamment de la SLA (Babin et al., 2014). Ils présentent de nombreux avantages uniques par rapport aux vertébrés supérieurs, notamment la facilité de modification génétique, la conservation des gènes impliqués dans les maladies neurodégénératives, l'efficacité pour les études de dépistage des toxines et la transparence optique pendant la période embryonnaire. En contrepartie, pour la modélisation de la SLA, le modèle présente quelques limites comme l'absence de neurones moteurs supérieurs, le fait qu'il ne soit pas un mammifère et que la plupart des études se concentrent sur les embryons pour profiter de leur transparence (Morrice et al., 2018).

L'utilisation des différents modèles animaux présente toutefois leur lot d'inconvénients. La complexité de certains modèles peut en compliquer l'étude (Figure 7). Chaque modèle animal est associé à des conditions d'élevage définies ainsi que des contraintes éthiques.

L'association des modèles *in vitro* et *in vivo* est fondamentale pour étudier les mécanismes pathogéniques d'une maladie et faire progresser la connaissance des mécanismes impliqués.

						
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Controlled environment; ➢ Single system; ➢ Individual cell or tissue mechanisms; ➢ Genetic manipulation; ➢ Easy to culture; ➢ Few variables; ➢ Minimizes the use of animals. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Transparent body; ➢ Short life cycle; ➢ High fertility; ➢ Less complex nervous system; ➢ Fully sequenced genome; ➢ Human genes homology (~65%); ➢ Availability of transgenics; ➢ Low cost. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Short life cycle; ➢ High fertility; ➢ Less complex nervous system; ➢ Fully sequenced genome; ➢ Large chromosomes; ➢ Human genes homology (~75%); ➢ Molecular pathways similar to humans; ➢ Availability of mutagenic and transgenic techniques; ➢ Low cost. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Vertebrate; ➢ Long lifespan for chronic diseases; ➢ High fertility; ➢ Less complex nervous system; ➢ Fully sequenced genome; ➢ Human genes homology (~70%); ➢ Availability of mutagenic; ➢ Low cost. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Vertebrate mammal; ➢ Midsize; ➢ Long lifespan for chronic diseases; ➢ Fully sequenced genome; ➢ Human genes homology (~99%); ➢ Molecular pathways similar to humans; ➢ Availability of mutagenic techniques; 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Vertebrate mammal; ➢ Medium and large; ➢ Closer to human behavior; ➢ Long lifespan for chronic diseases; ➢ Fully sequenced genome; ➢ Human genes homology ~93% (<i>Rhesus Macaque</i>); ➢ Molecular pathways similar to humans
Disadvantages	<ul style="list-style-type: none"> ➢ No replicate the conditions of the organism; ➢ No interaction with other system. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Invertebrate; ➢ Small size; ➢ Short lifespan for chronic diseases; ➢ Few mutagenic techniques. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Invertebrate; ➢ Small size; ➢ Short lifespan for chronic diseases. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Small size; ➢ Long life cycle; ➢ Low availability of transgenics. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Low fertility; ➢ Long life cycle; ➢ Complex nervous system; ➢ Low availability of transgenics; ➢ Ethical concern; ➢ High cost. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Low fertility; ➢ Long life cycle; ➢ complex nervous system; ➢ Low availability of mutagenic and transgenic techniques; ➢ Ethical concern; ➢ High cost.

Figure 7: Avantages et inconvénients des modèles *in vitro* et *in vivo* pour l'étude de la SLA. (Gois et al., 2020)

5 Caractérisation d'un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique, le modèle SOD1-G93A

Les résultats présentés dans cette partie expérimentale ont été obtenus au cours de mon alternance puis de mon contrat de travail au sein de la start-up parisienne Neurophoenix (NPX), pour une période totale de 18 mois. NPX est une start-up parisienne de biotechnologies de stade préclinique créée en 2018. Elle est hébergée dans le laboratoire de neuro-immunologie virale (NIV) de l'Institut Pasteur, dans le cadre d'un contrat de collaboration scientifique. L'équipe de direction de l'entreprise est composée de Simon Baeriswyl, chief executive officer (CEO), Monique Lafon, co-fondatrice et chief scientific officer (CSO) et Pascal Voisin, co-fondateur et président.

NPX développe une molécule (polypeptide NPX) permettant de promouvoir la survie des neurones et la repousse de leurs nerfs lorsque ceux-ci ont été endommagés. Le polypeptide NPX (dit Neurovita ou NV) est un peptide de type interférant capable de réactiver les voies de signalisation contrôlant la survie neuronale et la repousse axonale, en levant l'action inhibitrice exercée sur cette voie par l'interaction d'une kinase (MAST2) et de son ligand (PTEN). NV a été développé en suivant une approche biomimétique à partir de la séquence d'une des protéines du virus de la rage, la protéine G (Khan et al., 2019). Celle-ci permet au virus de la rage de faciliter sa propagation dans le système nerveux en prolongeant la survie des neurones qu'il infecte.

Le choix de NPX a été de développer un traitement pour les neuropathies optiques, comme la neuropathie optique ischémique antérieure non-artéritique (NAION). NV est actuellement en phase préclinique et les preuves de concept obtenues dans cette pathologie, in vivo et in vitro, ont motivé l'entreprise à étendre leur « pipeline » à d'autres maladies neurodégénératives. NV ne traitant pas l'origine de la maladie, mais ses conséquences (la mort des neurones), son champ d'application peut être élargi à d'autres maladies neurodégénératives caractérisées par l'altération de la survie neuronale.

Dans le cadre de l'appel à projets générique 2019-2020 de l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR), NPX, en collaboration avec l'Institut Pasteur et l'Institut du Cerveau, a obtenu un financement de type « projet de recherche collaborative-entreprise » (PRCE) afin d'étudier les propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices de NV pour le traitement de la SLA. L'équipe de recherche dédiée à ce projet était composée de Monique Lafon, directrice du laboratoire de NIV de l'Institut Pasteur, Anthony Deust, postdoctorant de l'Institut Pasteur et moi-même, apprenti en recherche et développement chez NPX puis ingénieur de recherche junior au sein de l'Institut Pasteur les 6 derniers mois.

5.1 Introduction

L'objectif du projet est de caractériser le modèle de souris Tg SOD1-G93A, un modèle murin de SLA afin d'établir par la suite la preuve de concept *in vivo* de la capacité d'une molécule à retarder l'évolution de la maladie dans ce modèle.

Pour cela, nous avons installé pour la première fois au sein du laboratoire NIV le modèle de souris Tg SOD1-G93A, et nous nous sommes familiarisés avec l'évolution de la maladie en réalisant, le suivi du score neurologique (Hatzipetros et al., 2015), de la perte de poids, et de la perte de motricité (RotaRod) au cours du temps. En parallèle, nous avons mis au point l'extraction des cellules immunitaires à partir de la ME des souris et effectué le phénotypage de plusieurs populations de cellules immunitaires par cytométrie en flux, afin de suivre l'évolution des profils immunologiques rencontrés dans la ME à différents stades de la maladie.

5.2 Matériels et méthodes

5.2.1 Animaux

L'utilisation de souris C57BL/6 Tg SOD1-G93A et de souris C57BL/6 sauvages dites WT a été approuvée par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale (CETEA) numéro 89 le 16 avril 2021. Le projet a été autorisé par le ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation le 21 avril 2021 pour une durée de 5 ans (référence interne : dap 210036 ; autorisation APAFiS : #3106 ; référence du dossier : 2021041613339412) puis a connu un amendement avec une nouvelle autorisation le 5 janvier 2023 (référence interne : dap 22066 ; autorisation APAFiS : #31069 ; référence du dossier : 2022101815323799v4).

Des souris WT (Jackson Laboratory® JAX#000664) et Tg SOD1-G93A (Jackson Laboratory® JAX#004435) ont été utilisées pour ce projet. Les mâles et les femelles ont été utilisés et l'élevage a été maintenu au sein de l'Institut Pasteur. Chaque souris a été génotypée par la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel (TransnetYX®), les données étaient alors exprimées en nombre relatif de copies du gène (correspondant à la donnée de génotypage brute). Les souris ont été sorties de l'animalerie d'élevage à l'âge de 5 semaines et transférées à l'animalerie expérimentale Monod.

Les souris ont été hébergées par groupes de 1 à 7 souris dans des cages ventilées, au sein de l'animalerie Monod de l'Institut Pasteur de Paris. Les souris ont été laissées seules dans leur cage si elles avaient été isolées dès leur sevrage ou si leur isolement était considéré comme favorable. En cas d'isolement d'une souris, l'environnement de la cage a été enrichi avec un dôme en carton. Elles ont été soumises à un cycle jour nuit 12/12 heures, une température constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité de $55 \pm 5\%$.

Le suivi des souris a été assuré 3 fois par semaine avec une mesure du poids, une évaluation du score neurologique. Il s'agit d'un score entre 0 et 4 permettant de définir l'ampleur des troubles neurologiques (Hatzipetros et al., 2015) (Annexe 3). Le score 0-1 a été rajouté à l'évaluation du score neurologique, lorsqu'une faiblesse ou un étirement limité des membres inférieurs étaient constatés lors de la suspension de la souris par la queue.

Le suivi des souris a aussi été complété par la réalisation d'une grille de suivi du modèle, établie avec la structure de bien-être animal (SBEA), permettant de mieux définir la survenue des points limites, et les conduites à tenir en fonction de l'état de la souris à l'aide d'un score clinique composite (Annexe 4). Le degré de sévérité de certaines procédures du projet a dû être réévalué, au regard de l'état des souris dans les stades les plus tardifs. Ainsi cette dernière grille réalisée avec la SBEA s'est avérée essentielle dans l'évaluation des points limites dans le cadre de l'amendement au projet réalisé (élévation de la limite de pourcentage de poids perdu de 20 à 25%).

L'hébergement des souris Tg SOD1-G93A était différent. Lorsque les souris Tg SOD1-G93A ont montré les premiers signes cliniques (survenue du score neurologique 1), elles ont été séparées des souris WT (Figure 8.a). Un complément alimentaire riche en eau (DietGel[®] Recovery, ClearH2O[®] 72-06-5022) pour éviter la déshydratation ainsi que des croquettes étaient mis à disposition dans la litière de la cage (Figure 8.b). À partir du score 2, les souris ont été suivies de manière quotidienne.

5.2.2 Tests de motricité

Les tests de motricité ont été effectués sur le mouse RotaRod (Ugo basile[®], 47650). Dès l'âge de 5 semaines, les souris ont effectué trois séances d'habituation consistant chacune en 3 sessions de 1 minute à une vitesse constante de 10 rotations par minute (rpm).

Les tests ont débuté à l'âge de 6 semaines et été stoppés au score neurologique 2 lorsque les souris ne pouvaient pas se maintenir sur l'appareil.

Les séances de tests consistaient en 3 sessions effectuées à une vitesse croissante allant de 10 à 40 rpm en 170 secondes (s). Les souris étaient retirées de l'appareil au bout de 180s, si elles se laissaient suspendre pendant un tour ou si elles se retournaient sur la barre. Les scores de chaque session ont été renseignés pour chaque souris. Chaque session était séparée d'environ 3 minutes de la précédente. Trois séances de tests avaient lieu par semaine.

5.2.3 Perfusion intracardiaque et prélèvement des organes/tissus

Les souris ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale de kétamine et de xylazine (10% d'Imalgen[®] 1000, Boehringer ; 5% de Rompun[®] 2%, Bayer ; NaCl) avant d'être

perfusées en intracardiaque, dans le ventricule gauche, avec du phosphate buffer saline 1X sans calcium et magnésium (PBS^{-/-} 1X) (Gibco™, 14190-094) pendant 3 minutes. La ME, le cerveau et le foie ont été prélevés. Les échantillons destinés à être utilisés pour le western blot (WB) ont été directement congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C. Les échantillons dédiés à l'histologie ont été placés dans un premier temps dans une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) pendant 24 heures à 4°C puis dans une solution de PBS^{-/-} 1X - Sucrose 30% (Sigma-Aldrich®, S0389) pendant 24 heures. Par la suite, ces échantillons ont été congelés dans une résine d'enrobage Cryomatrix (EpreDia™, 6769006) après les avoir plongés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Les échantillons pour la cytométrie en flux ont été préparés sans délai pour l'extraction des cellules immunitaires présentes dans la ME (voir le protocole de cytométrie en flux).

5.2.4 Cytométrie en flux

Les tissus ont été écrasés sur un filtre 70µm rincé avec du PBS^{-/-}.

Les cellules immunitaires présentes dans la ME ont été séparées par gradient de Percoll (Cytiva, 17089101), constitué de 4 couches de solution à 70%, 37%, 30% et 0%. Après centrifugation sans frein (30 minutes à 1600rpm), les cellules localisées à l'interface entre les couches de Percoll à 70% et à 37% ont été récoltées. Les cellules ont été diluées, centrifugées et suspendues dans 1mL de PBS^{-/-} puis dénombrées sur cellule de KOVA (Kova international, 87144 E).

Avant le marquage, les cellules ont été traitées au FcR blocking reagent Mouse (Miltenyi Biotec, 130-092-575). Les cellules ont été par la suite incubées 1 heure avec les anticorps puis fixées.

Pour la cytométrie, deux panels d'anticorps ont été utilisés. Le premier panel permet d'identifier les cellules de la microglie/macrophages. Il est composé d'un marqueur de viabilité cellulaire (Fixable Viability Dye eFluor 450, 65-0863, Ebioscience™), d'anticorps dirigés contre CD45, CD11b et F4/80 (CD45 FITC : Ebioscience™, 11-0451-82 ; CD11b PE : Ebioscience™, 12-0112-82 ; F4/80 APC : Invitrogen™, MF48005). Le deuxième panel est destiné à identifier les lymphocytes, il est composé d'un marqueur de viabilité, et d'anticorps dirigés contre CD45, CD3, CD4, CD8, CD25 et Foxp3 (CD3 Alexa Fluor 700 : Ebioscience™, 56-0032-82 ; CD4 PerCP-Cyanine 5.5 : Ebioscience™, 45-0042-82 ; CD8 PE-Cyanine 7 : Ebioscience™, 25-0081-82 ; CD25 APC : Ebioscience™, 17-0251-82 ; Foxp3 PE : Ebioscience™, 12-5773-82). Selon le panel, la méthode de fixation cellulaire variait. Pour le panel « microglie/macrophages », les cellules étaient fixées avec du CellFix™ (Becton Dickinson Benelux, 340181), tandis que pour le panel « lymphocytes », les cellules

étaient fixées avec un kit de fixation et perméabilisation propre au marquage de Foxp3 (Ebioscience™, Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set 00-5523).

Pour chacun des panels, la première étape consistait à ne conserver que les singulets et les cellules vivantes.

Les cellules CD45⁺ correspondent aux leucocytes. Parmi ces derniers, le phénotype de la microglie activée est caractérisé par les marqueurs CD11b⁺ high et CD45⁺ high et celui des macrophages est CD11b⁺ low, CD45⁺ low et F4/80⁺.

Parmi les LT CD3⁺ et CD4⁺, les Tregs se caractérisent par l'expression des marqueurs CD25⁺ et Foxp3⁺.

5.2.5 Analyses statistiques

Le logiciel GraphPad Prism 8.0 a été utilisé pour les analyses statistiques. Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne ± SEM (erreur standard à la moyenne) apposée aux valeurs individuelles quand cela était approprié. Des tests t de Student ou des tests de Mann-Whitney (non paramétriques) ont été utilisés pour les valeurs non appariées. Des tests de corrélation de Spearman ont été utilisés. Les tests ont été effectués en fonction de la normalité de la distribution des données. Seuls les résultats avec un P < 0,05 ont été considérés comme statistiquement significatifs.

5.3 Résultats

5.3.1 Amélioration du bien-être animal

Les conditions d'hébergement ainsi que les méthodes de suivi ont été adaptées en collaboration avec la SBEA interne à l'Institut Pasteur sous la responsabilité de Myriam Mattei, afin d'assurer au mieux le bien-être des animaux.

Il a été constaté que les souris Tg SOD1-G93A pouvaient progressivement souffrir de la cohabitation avec les souris WT (« barbering » ou arrachage de poils important et blessures) en raison de leur affaiblissement progressif. La décision de séparer les souris Tg SOD1-G93A et WT dès la survenue du score 1 a donc été prise (Figure 8.a).

Dans un second temps, il a été constaté que le score neurologique 2 était associé à une perte de poids importante de l'animal. Cette perte de poids pouvait être expliquée par des difficultés à accéder à la nourriture et à l'eau. C'est pourquoi, dès la survenue du score 1, les souris ont été supplémentées avec du DietGel® Recovery, afin d'assurer des apports alimentaires et une hydratation suffisante lorsque la maladie progressait. Des croquettes étaient aussi mises à leur disposition dans la litière de la cage (Figure 8.a et 8.b).

L'évolution de la pathologie dans les scores tardifs pouvant être fulgurante, les souris d'un score neurologique supérieur ou égal à 2 étaient suivies 5 jours sur 7 pour contrôler au mieux l'évolution de la pathologie (contre 3 jours sur 7 pour les autres) et les euthanasier avant l'apparition des points limites.

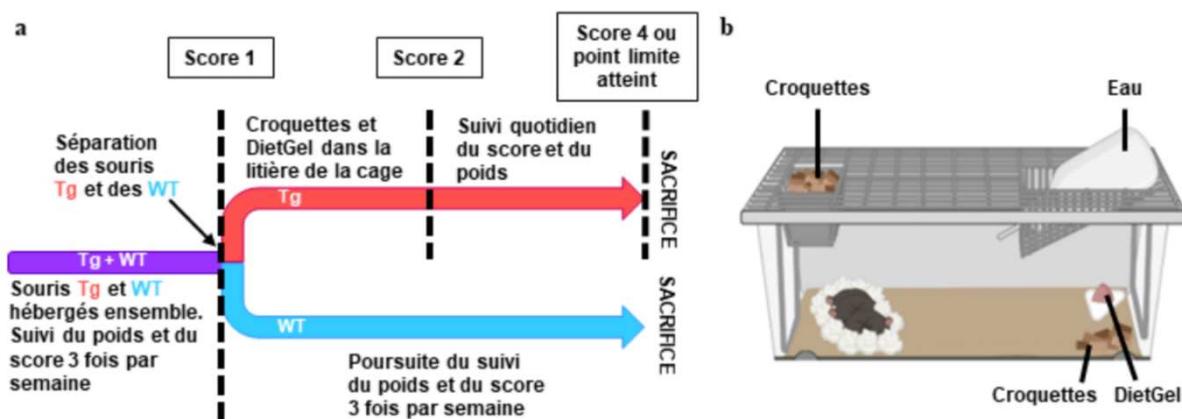


Figure 8: Gestion des souris Tg SOD1-G93A et amélioration du bien-être animal. (a) Prise en charge des souris Tg SOD1-G93A et WT en fonction de leur score neurologique. **(b)** Schéma de l'aménagement d'une cage de souris Tg SOD1-G93A d'un score neurologique supérieur ou égal à 1, avec mise à disposition de croquettes et de DietGel® dans la litière de la cage.

5.3.2 Suivi de la morbidité

Afin de caractériser le modèle de souris Tg SOD1-G93A, le poids et le score neurologique des souris Tg SOD1-G93A ont été suivis jusqu'à l'atteinte des points limites et leur sacrifice. Ces données ont été collectées sur un total de 167 souris WT (78 mâles et 89 femelles) et 95 souris Tg SOD1-G93A (43 mâles et 52 femelles).

5.3.2.1 Poids

À la différence des souris WT qui présentaient une augmentation constante de leurs poids entre l'âge de 6 et 24 semaines, les souris Tg SOD1-G93A voyaient leur poids commencer à diminuer entre l'âge de 15 et 16 semaines indépendamment du sexe des souris (Figure 9.a et 9.b).

La comparaison du poids des souris Tg SOD1-G93A et WT femelles révèle une différence significative dès l'âge de 11 semaines (t test non apparié, $P = 0,0084$; $t = 2,695$; $df = 92$; $n_{WT} = 53$ et $n_{SOD1-G93A} = 42$; Figure 9.a). Dans le cas des souris Tg SOD1-G93A et WT mâles, leurs poids sont significativement différents à compter de la 14ème semaine (t test non apparié, $P = 0,0433$; $t = 2,064$; $df = 61$; $n_{WT} = 50$ et $n_{SOD1-G93A} = 18$; Figure 9.b).

Pour mieux anticiper l'évolution de la pathologie, le pourcentage de poids perdu des souris Tg SOD1-G93A en fonction de l'âge a été étudié. Il s'agit du *ratio* de la différence du poids maximum de la souris et de son poids à l'instant t, sur le poids maximum de la souris ((poids

maximum – poids(t)) / poids maximum x 100). Les résultats obtenus avec les données des deux sexes étant similaires, l'analyse du pourcentage de poids perdu combine les données de 67 souris mâles et femelles. Cette analyse permet de nouveau de constater que le poids des souris Tg SOD1-G93A décroche à partir de l'âge de 15 - 16 semaines (Figure 9.c).

Le pourcentage de poids perdu évolue alors en trois temps, une première phase d'augmentation lente entre la semaine 15 et 18 (de 2,57% à 3,46% ; pente = 0,36), une phase d'augmentation rapide entre la semaine 18 et 21 (de 3,46% à 10,98% ; pente = 2,54), puis une dernière encore plus intense entre la semaine 21 et 24 (de 10,98% à 23,07% ; pente = 4,10 ; Figure 9.c). Les souris sont sacrifiées lorsque le pourcentage de perte de poids atteint 25%.

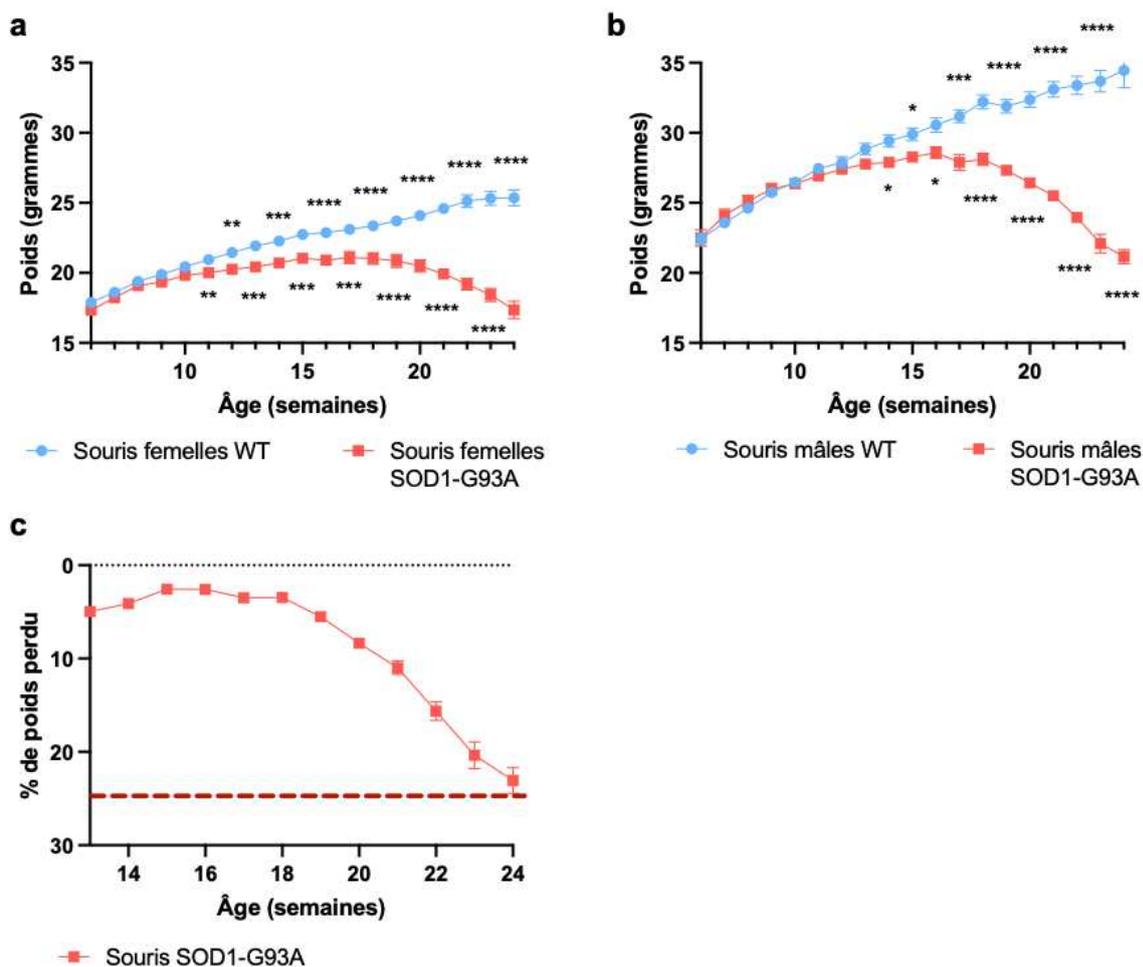


Figure 9: Poids des souris Tg SOD1-G93A et des souris WT. (a) Poids en grammes des souris femelles SOD1-G93A et WT en fonction de leur âge en semaine. Valeurs moyennes \pm SEM ($n_{WT} = 52$, $n_{SOD1-G93A} = 42$). **(b)** Poids en grammes des souris mâles SOD1-G93A et WT en fonction de leur âge en semaine. Valeurs moyennes \pm SEM ($n_{WT} = 50$, $n_{SOD1-G93A} = 18$). **(c)** Pourcentage de poids perdu par rapport au poids maximum relevé des souris Tg SOD1-G93A en fonction de leur âge en semaines. Valeurs moyennes \pm SEM ($n = 67$). Les résultats débutent à 13 semaines lors de l'apparition des premiers signes cliniques (score 0-1). Le point limite de 25% de poids perdu est représenté par les pointillés rouges.

5.3.2.2 Score neurologique

La cinétique d'apparition des scores neurologiques a été étudiée (Figure 10). Ainsi à l'âge de 95 jours (environ 14 semaines), les premiers signes de faiblesse musculaire, correspondant au score 0-1 étaient observés ; à 109 jours (environ 16 semaines) le score 1 s'installait ; à 149 jours (environ 21 semaines) le score 2 apparaissait, alors que les scores 3 et 4 étaient observés respectivement à 162 et 167 jours (23 et 24 semaines) (Figure 10 ; Tableau 2). Il n'y avait pas de différence significative entre l'âge de survenue du score 3 et du score 4 (t test non apparié, $P = 0,0885$, $t = 1,721$; $df = 96$; $n_{score3} = 41$, $n_{score4} = 57$). La comparaison des scores obtenus par les mâles et les femelles n'a pas permis d'établir de différences d'évolution de la maladie entre les deux sexes (Tableau 2).

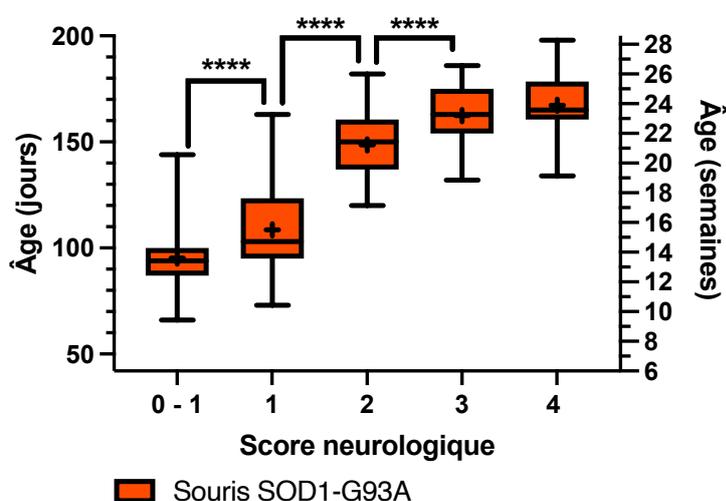


Figure 10: Âges de survenue des scores neurologiques chez des souris *Tg SOD1-G93A*. Âge de survenue des scores neurologiques en jours chez des souris *Tg SOD1-G93A*. Les extrémités correspondent au minimum et au maximum, et le symbole « + » à la moyenne ($n_{score0-1} = 63$, $n_{score1} = 80$, $n_{score2} = 73$, $n_{score3} = 41$, $n_{score4} = 57$). T tests non appariés ($P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$; $P < 0,0001 = ****$).

Tableau 3: Âges moyens de survenue des scores neurologiques (en jours \pm SEM). Pas de différences significatives entre les deux sexes pour la survenue de chacun des scores (t tests non appariés).

	Score 0 - 1	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
<i>Souris mâles</i>	97 (\pm 3)	109 (\pm 3)	150 (\pm 2)	163 (\pm 3)	169 (\pm 2)
<i>Souris femelles</i>	94 (\pm 3)	108 (\pm 3)	147 (\pm 3)	162 (\pm 3)	166 (\pm 3)
<i>Souris mâles et femelles</i>	95 (\pm 2)	109 (\pm 2)	149 (\pm 2)	162 (\pm 2)	167 (\pm 2)

5.3.2.3 Capacités motrices

Le test du RotaRod est un test de performance permettant d'évaluer les capacités motrices des souris, notamment la capacité d'endurance et la force de préhension. Les performances des

souris WT et Tg SOD1-G93A ont été comparées. Les observations réalisées les deux premières semaines (à l'âge de 6 et 7 semaines) montrent une augmentation progressive des scores obtenus pour les souris WT et Tg SOD1-G93A. En revanche, à partir de la semaine 9, les performances des souris Tg SOD1-G93A sont statistiquement plus faibles que celles des souris WT (t test non apparié, $P = 0,0043$, $t = 3,023$, $df = 42$; Figure 11). Ainsi, les souris WT maintiennent un score aux environs de 160s jusqu'au bout de la semaine 22 tandis que le score des souris Tg SOD1-G93A diminue progressivement jusqu'à la survenue du score 2, marquant la fin des passages des souris au RotaRod (Figure 11). Dans un premier temps, une diminution lente des résultats des souris Tg SOD1-G93A est observée, jusqu'à la semaine 16, après quoi les résultats chutent drastiquement.

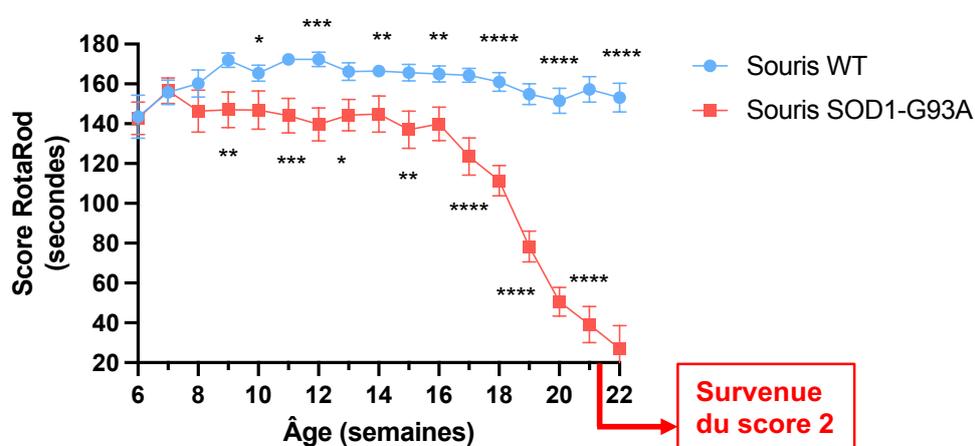


Figure 11: Comparaison des capacités motrices des souris Tg SOD1-G93A et des souris WT (test du RotaRod). Valeurs moyennes des scores maximums des souris de chaque groupe \pm SEM ($n_{WT} = 28$, $n_{SOD1-G93A} = 16$). T tests non appariés ($P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$; $P < 0,0001 = ****$).

5.3.3 Influence de la donnée de génotypage sur la symptomatologie

Afin d'homogénéiser les groupes de souris, une corrélation entre le nombre relatif de copies et la rapidité d'évolution de la pathologie a été recherchée. L'étude a révélé une corrélation négative entre la donnée de génotypage et l'âge de survenue de l'ensemble des scores neurologiques. Une donnée de génotypage élevée sera associée à un âge de survenue du score plus faible (Score 0-1 : $P = 0,0017$, $r = -0,3876$; Score 1 : $P = 0,0492$, $r = -0,2207$; Score 2 : $P < 0,0001$, $r = -0,5088$; score 3 : $P = 0,0013$, $r = -0,4853$; score 4 : $P = 0,0001$, $r = -0,4943$; Figures 12.a, 12.b, 12.c, 12.d et 12.e). Ainsi plus le nombre relatif de copies du gène *SOD1* est élevé, plus les symptômes des scores 0-1, 1, 2 et 3 se développent tôt.

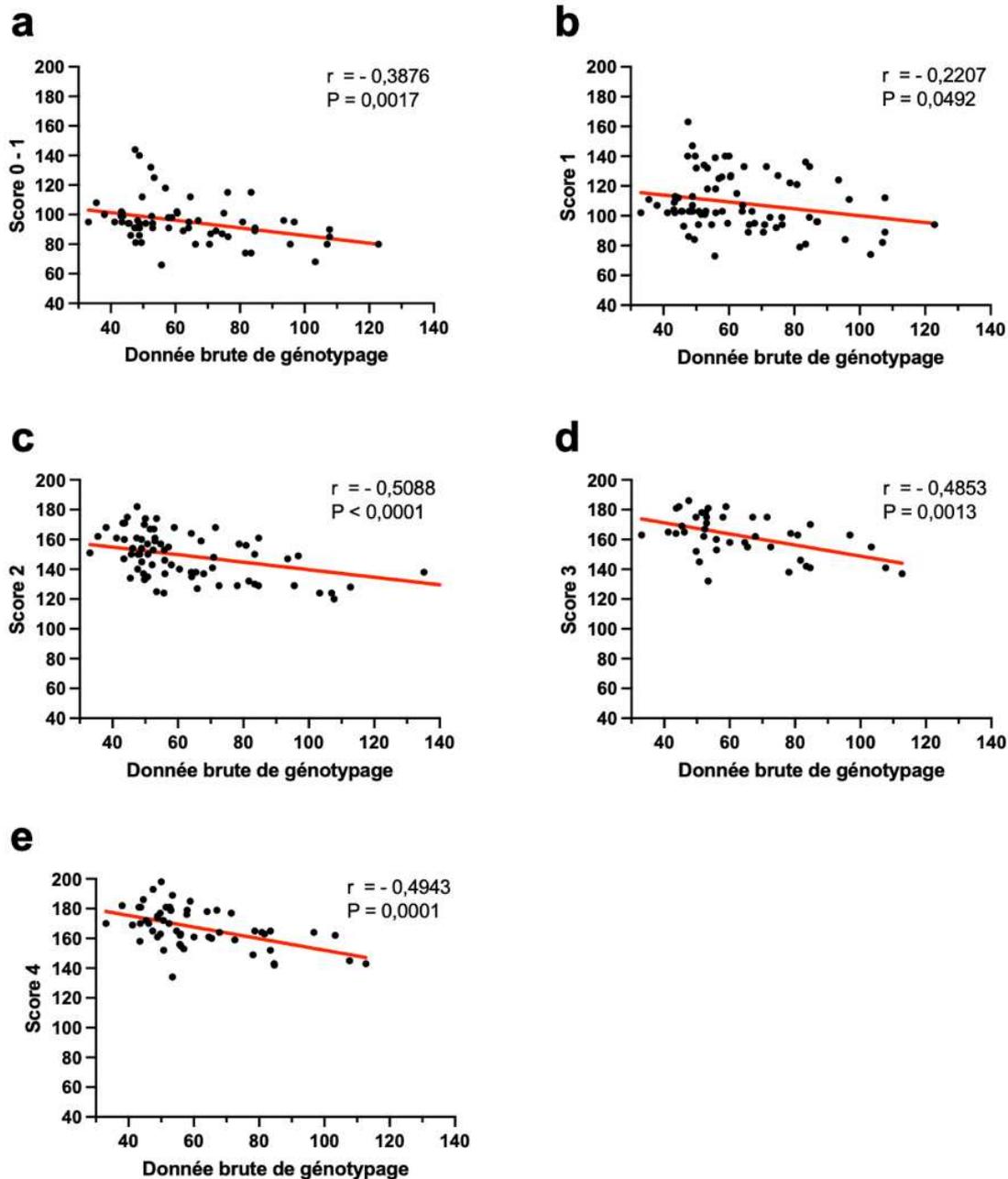


Figure 12: Corrélation entre le nombre de copies du transgène SOD1 et l'évolution des symptômes. (a) (b) (c) (d) (e) Âge de survenue des scores neurologiques en fonction de la donnée brute de génotypage (nombre relatif de copies du gène). Représentation de la droite de régression linéaire en rouge ($n_{score0-1} = 63$, $n_{score1} = 80$, $n_{score2} = 73$, $n_{score3} = 41$, $n_{score4} = 56$). Tests de corrélation de Spearman.

5.3.4 Profil immunologique de la ME au stade tardif de la pathologie (score neurologique 3 tardif et score 4)

Les souris Tg SOD1-G93A ont été sacrifiées au score neurologique 3 tardif ou au score de 4, à un âge moyen de 169 jours soit environ 24 semaines, et comparées à des souris WT de même âge. Les données présentées sont obtenues à partir d'échantillons de ME.

Les échantillons de ME de 16 souris WT et de 12 souris Tg SOD1-G93A ont été étudiés à l'aide du panel d'anticorps « microglie/macrophages ». Parmi les leucocytes (cellules CD45⁺), les cellules CD11b positives, high et low, étaient significativement plus nombreuses dans la

ME des souris Tg SOD1-G93A (test de Mann-Whitney, $P = 0,0069$, $U = 39$; t test non apparié, $P < 0,0001$, $t = 5,473$, $df = 26$; $n_{WT} = 16$, $n_{SOD1-G93A} = 12$; Figures 13.a et 13.b), indiquant qu'aux stades avancés de la maladie la microglie est activée dans la ME des souris Tg SOD1-G93A.

L'activation de la microglie s'accompagne aussi d'une migration de macrophages (cellules $CD11b^+ low / F4/80^+$; t test non apparié, $P = 0,0223$, $t = 2,430$, $df = 26$; $n_{WT} = 16$, $n_{SOD1-G93A} = 12$; Figures 13.c).

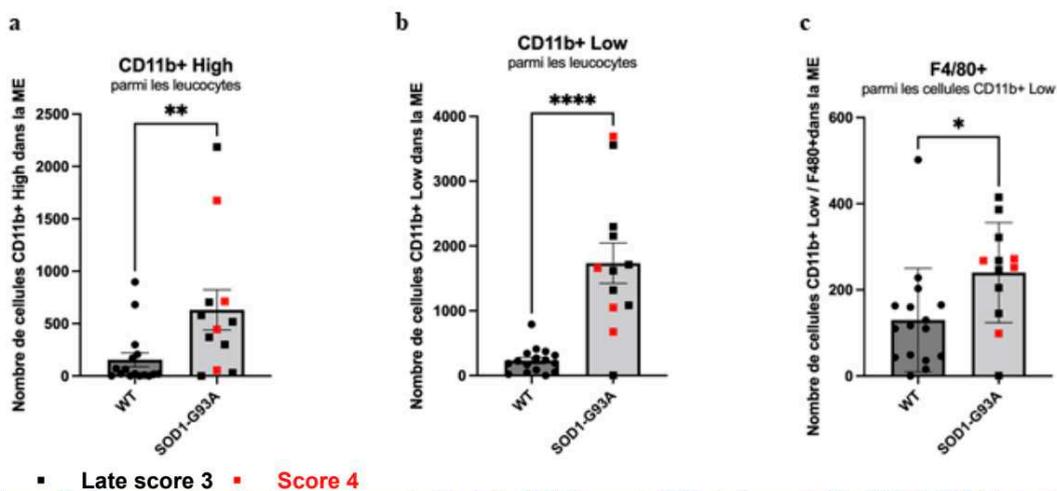


Figure 13: Comparaison des leucocytes extraits de la ME de souris WT et de souris Tg SOD1-G93A à un stade tardif (score 3-4). (a) Nombre de cellules $CD11b^+$ high parmi les leucocytes (cellules $CD45^+$). (b) Nombre de cellules $CD11b^+$ low parmi les leucocytes (cellules $CD45^+$). (c) Nombre de cellules $F4/80^+$ parmi les cellules $CD11b^+$ low (figure 12.b). Les résultats sont exprimés en nombre de cellules vivantes normalisées sur le nombre de cellules vivantes total \pm SEM ($n_{WT} = 16$, $n_{SOD1-G93A} = 12$). Tests statistiques de Mann-Whitney ou t tests non appariés ($P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$; $P < 0,0001 = ****$).

Ces mêmes échantillons ont été analysés avec le panel d'anticorps « lymphocytes » permettant de caractériser les lymphocytes migrants, dont les Tregs. Une infiltration importante de la ME des souris Tg SOD1-G93A par les lymphocytes $CD3^+$ a été observée (test de Mann-Whitney, $P = 0,0066$, $U = 120$; $n_{WT} = 23$, $n_{SOD1-G93A} = 20$; Figures 14.a). Parmi ces dernières, seules les cellules $CD8^+$ étaient augmentées significativement chez les souris Tg SOD1-G93A (test de Mann-Whitney, $P = 0,0016$, $U = 113$; $n_{WT} = 23$, $n_{SOD1-G93A} = 20$; Figures 14.b).

Pour les $CD4^+$, une grande variabilité a été observée et n'a pas permis d'obtenir de différence significative entre les échantillons des souris Tg SOD1-G93A et les souris WT (test de Mann-Whitney, $P = 0,1098$, $U = 164,5$; $n_{WT} = 23$, $n_{SOD1-G93A} = 20$; Figure 14.c).

Lorsque les Tregs ont été analysés, il a été observé que les Tregs $CD4^+$ étaient augmentés de manière significative dans la ME de souris Tg SOD1-G93A (test de Mann-Whitney, $P = 0,0135$, $U = 160,5$; $n_{WT} = 23$, $n_{SOD1-G93A} = 20$; Figures 14.e).

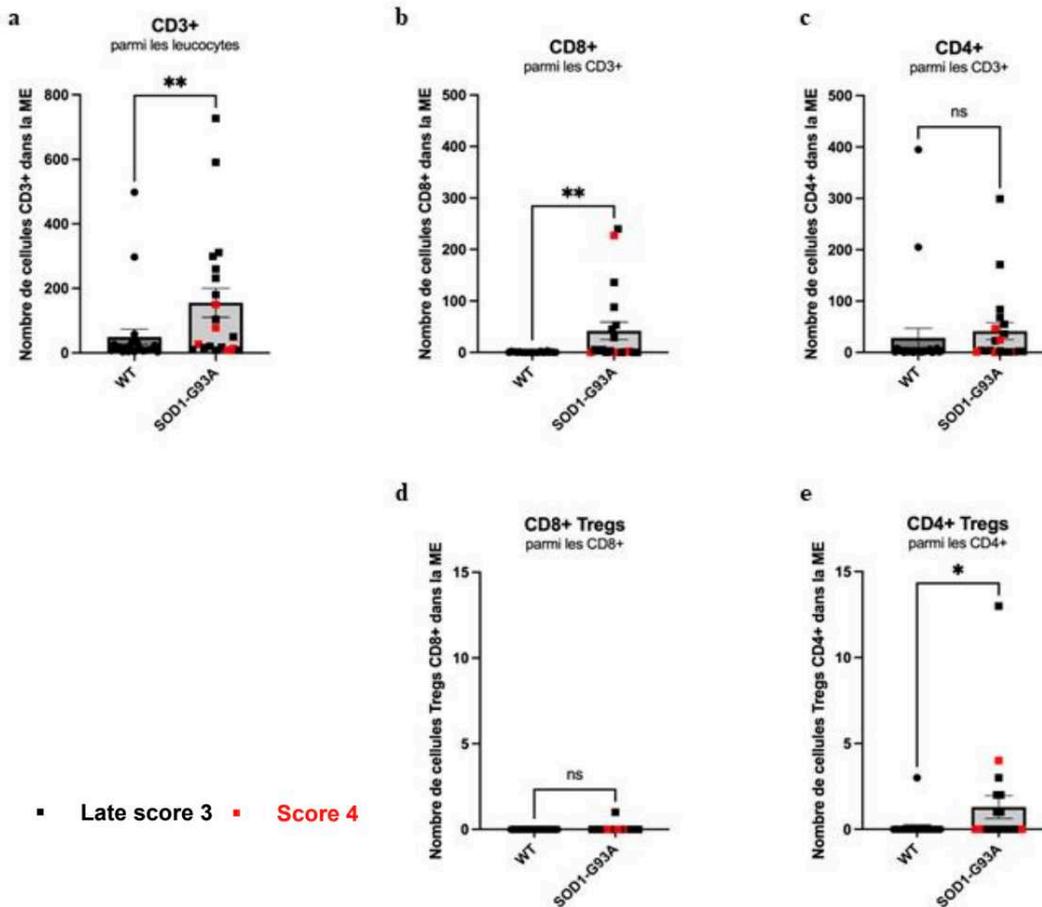


Figure 14: Comparaison des lymphocytes migrants extraits de la ME de souris WT et de souris Tg SOD1-G93A à un stade tardif (score 3-4). (a) Nombre de cellules CD3⁺ parmi les leucocytes (cellules CD45⁺). (b) Nombre de cellules CD8⁺ parmi les cellules CD3⁺ (figure 13.a). (c) Nombre de cellules CD4⁺ parmi les cellules CD3⁺ (figure 13.a). (d) Nombre de cellules CD25⁺ et Foxp3⁺ parmi les cellules CD8⁺ (figure 13.b). (e) Nombre de cellules CD25⁺ et Foxp3⁺ parmi les cellules CD4⁺ (figure 13.c). Les résultats sont exprimés en nombre de cellules vivantes normalisées sur le nombre de cellules vivantes total \pm SEM ($n_{WT} = 23$, $n_{SOD1-G93A} = 20$). Tests statistiques de Mann-Whitney ou t tests non appariés ($P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$; $P < 0,0001 = ****$).

6 Discussion

La SLA est la maladie du motoneurone la plus fréquente. Malgré l'identification de multiples facteurs génétiques et environnementaux, elle reste une pathologie complexe marquée par une grande variabilité individuelle. Cela se traduit également par une multitude de mécanismes biologiques impliqués dans la physiopathologie.

Compte tenu de la fréquence des mutations dans la SLA et des avancées thérapeutiques, l'analyse génétique moléculaire est recommandée pour tout patient atteint de SLA. Ceci a conduit à la rédaction d'un nouveau protocole national de diagnostic et de soins (**PNDS**) de la SLA dédié à la génétique de la maladie fin 2021. La recherche de la mutation identifiée dans la famille est maintenant recommandée chez un nombre croissant d'apparentés dans le cadre d'un dépistage présymptomatique voire, dans de rares cas, dans un cadre de diagnostic prénatal. Des **corrélations entre les mutations et l'évolution clinique** ont maintenant été identifiées. L'identification des mutations des patients permet désormais l'adaptation de leur prise en charge et donc une thérapie plus personnalisée. Lorsqu'une mutation SOD1 est identifiée chez un patient, le traitement par **Tofersen** devrait pouvoir être proposé à moyen terme [5].

Le développement de nouvelles thérapies dans la SLA se poursuit avec un nombre conséquent d'essais cliniques en cours et l'exploration de nouvelles pistes thérapeutiques. Les **thérapies innovantes** et notamment les thérapies géniques prennent une place essentielle dans le traitement de la SLA, permettant d'envisager une thérapie personnalisée et curative à l'avenir.

Les modèles animaux jouent un rôle important dans l'élucidation des mécanismes biologiques et le développement de ces thérapies. Les modèles actuels permettent essentiellement d'émuler des aspects spécifiques de la maladie, cependant aucun d'entre eux n'est capable de reproduire le spectre complet de la SLA, ce qui se traduit par un **manque de translation clinique**.

La **découverte de nouvelles mutations** offre l'opportunité d'en apprendre plus sur les mécanismes, les voies et la physiopathologie de la maladie. De nombreux modèles de SLA sont encore en développement et les derniers gènes identifiés constituent de nouvelles pistes. Les **techniques innovantes** comme l'édition génique par CRISPR/Cas9 ou la transgénése virale sont prometteuses pour modéliser fidèlement la maladie et sont applicables à l'ensemble des fonds génétiques. Les modèles générés permettront d'accélérer la recherche sur la SLA ainsi que le développement thérapeutique.

Cependant, une seule souche consanguine n'intègre pas l'une des principales sources de variation phénotypique dans les populations humaines : la diversité génétique. Le manque de diversité génétique limite l'utilité translationnelle des modèles de souris standard. Il est possible d'appliquer une **variabilité génétique** au moins égale à celle des populations humaines en utilisant des lignées recombinantes consanguines ou *Collaborative Cross* (Montagutelli, 2015).

L'existence de nombreux sous-groupes de patients indique qu'il faudrait tester les médicaments sur l'ensemble de ces derniers, ce qui nécessiterait l'utilisation d'un grand nombre de modèles. La combinaison de modèles de SLA avec notamment des cellules dérivées d'iPS de patients, ainsi que le suivi de directives d'utilisation communes de chaque modèle permettrait l'obtention de résultats robustes et d'une meilleure translation clinique.

Dans le cas de la SLA, le modèle Tg SOD1-G93A s'impose comme l'un des modèles les plus documentés et se rapprochant le plus de l'évolution clinique retrouvée chez les patients. Néanmoins, ce modèle présente aussi des limites, la mutation SOD1 ne représentant pas la majorité des patients avec moins de 5% de l'ensemble des cas de SLA. Il présente également une surexpression importante de SOD1 avec une évolution homogène de la maladie, ce qui est inhabituel chez les patients. De plus, il ne présente pas de pathologie à TDP-43 qui est pourtant présente dans 97% des patients (Mackenzie et al., 2007).

Dans le cas de NPX, le modèle Tg SOD1-G93A a été choisi et l'installation de ce modèle au sein du laboratoire nécessitait d'adapter les conditions d'élevage afin de garantir le maintien du bien-être animal, et d'identifier les marqueurs permettant de suivre l'évolution de la maladie afin de détecter les effets de l'injection de la biomolécule NV.

Bien-être animal

Des améliorations ont été apportées aux conditions d'élevage et d'expérimentation des souris Tg SOD1-G93A afin de garantir les meilleures conditions d'hébergement. Une vigilance particulière a été apportée au développement des symptômes. Une grille de suivi de la pathologie dans ce modèle a été rédigée avec la SBEA de l'Institut Pasteur. Cette grille a permis de réévaluer le degré de sévérité de certaines procédures du projet, mais aussi d'augmenter la valeur de la perte de poids (de 20 à 25%) au-delà de laquelle les animaux doivent être sacrifiés pour des raisons éthiques (point limite).

Cette réévaluation a permis de suivre l'évolution de la pathologie jusqu'au score 4. Les documents porteurs de ces modifications ont été soumis au CETEA pour validation.

Suivi de la morbidité

Le suivi de la morbidité nécessite une observation clinique régulière des souris. Ce suivi consistait à mesurer le poids de l'animal, à évaluer sa motricité et son endurance (test du RotaRod) et à observer le développement des troubles neurologiques (score neurologique).

L'évolution du poids est un bon marqueur de l'état de santé des souris. Chez les souris WT, le poids augmente régulièrement à partir du sevrage (semaine 5). Dans le cas des souris Tg SOD1-G93A, l'évolution diffère. Dès la semaine 11, les souris femelles Tg SOD1-G93A ont un poids significativement plus faible que celui des souris WT, avant même la survenue des premiers symptômes. Pour les mâles Tg SOD1-G93A, cette différence n'apparaît qu'après l'âge de 14 semaines.

Pour l'ensemble des souris Tg SOD1-G93A, la perte de poids commence en moyenne après l'âge de 16 semaines (score 1). La perte de poids s'accélère fortement alors que la pathologie progresse. Cette cinétique d'évolution du poids a déjà été caractérisée dans la littérature (Azzouz et al., 1997).

Cette perte de poids pourrait correspondre au début de l'atrophie musculaire comme l'a montré le groupe de Nagahara, qui a observé que les muscles gastrocnémiens étaient deux fois moins lourds chez les souris Tg SOD1-G93A que chez les souris WT à l'âge de 15 semaines (Nagahara et al., 2015). Ces pertes de poids seraient également associées à des altérations métaboliques (Dupuis et al., 2004).

Le test de motricité a permis de déceler une différence entre les souris Tg SOD1-G93A et les souris WT dès l'âge de 9 semaines, ce qui en fait le meilleur marqueur pour identifier la survenue des symptômes précoces de la pathologie. La performance des souris Tg SOD1-G93A diminue lentement jusqu'à l'âge de 16 semaines, puis une baisse importante de la performance est constatée jusqu'à l'atteinte du score 2. La baisse importante des capacités motrices, débutant après l'âge de 16 semaines, coïncide avec le début de la perte de poids. Cela indiquerait qu'à cet âge la maladie a des conséquences sur l'état physique de la souris. Cela pourrait notamment être expliqué par la perte musculaire abordée précédemment, mais aussi par le phénomène de dégénérescence des axones moteurs et de l'altération des Jonctions Neuro-Musculaires (JNM). Chez les souris Tg SOD1-G93A, une dénervation de 40% des plaques motrices est constatée dès le jour 47 (environ 7 semaines). Au jour 100 (environ 15 semaines), près de 70% de ces plaques motrices sont déjà dénervées (Fischer et al., 2004). L'étude de ces JNM est une piste pour mieux caractériser la progression de la maladie.

Les résultats des tests de RotaRod diffèrent d'un article à l'autre. La différence de performance entre les souris Tg SOD1-G93A et les souris WT a souvent été constatée de manière plus tardive, aux alentours de l'âge de 12 à 14 semaines (Alves et al., 2011; Evans et al., 2014; Mancuso et al., 2011). Ces différences constatées dépendent en grande partie du protocole suivi. Celui que nous avons suivi sollicitait davantage les souris, ce qui pourrait expliquer que les souris répondaient plus précocement au test.

Le score neurologique a permis dans un premier temps d'établir une chronologie de l'évolution des symptômes des souris Tg SOD1-G93A. Nous avons pu distinguer une première étape de développement lent avec l'apparition des premiers symptômes puis des symptômes intermédiaires (score 0-1 et 1) entre l'âge de 14 et 21 semaines. Cette première phase était suivie par une phase plus agressive avec les symptômes tardifs menant à la mort dans les 3 semaines suivantes (de l'âge de 21 à 24 semaines).

Le phénotype clinique de ce modèle animal est caractérisé dans la littérature par l'apparition de symptômes moteurs des membres postérieurs vers l'âge de 13 semaines, puis par une progression rapide jusqu'au stade final vers l'âge de 19 à 21 semaines (Dal Canto & Gurney, 1997). On peut supposer que la survenue plus tardive du stade final dans notre modèle est la conséquence des améliorations effectuées dans l'élevage de la lignée.

L'analyse du génotypage a révélé une corrélation négative entre le nombre de copies du gène *SOD1* et l'âge de survenue des scores pour les scores 0-1, 1, 2, 3 et 4. Cela indiquerait qu'un nombre important de copies du gène induirait des symptômes plus précoces.

Il s'agit donc d'un élément à prendre en compte lors de la constitution de cohorte d'animaux pour les expériences impliquant la biomolécule NV. La sélection des souris en fonction de leur nombre de copies, en éliminant les extrêmes, est une piste à explorer afin de limiter la variabilité dans la survenue des différents scores.

Le développement de ces outils de suivi a permis de déterminer que le RotaRod était l'outil permettant de déceler les symptômes les plus précoces. Le poids, quant à lui, sert essentiellement à suivre la progression de la maladie une fois le score 1 atteint, la perte de poids devenant fulgurante à partir du score 2. Le score neurologique reste l'outil permettant de suivre facilement la progression de la maladie de ses symptômes précoces jusqu'aux stades terminaux.

Il restera à explorer la dégénérescence des motoneurones. Pour cela, il faudra dénombrer les motoneurones de la partie lombaire de la ME à différents stades de la maladie afin de suivre leur dégénérescence au cours de la pathologie. Une diminution de moitié du nombre de

motoneurones dans des sections lombaires de la ME a été constatée dans les stades terminaux de la maladie (Zhu & Sheng, 2011). Ce sera également un paramètre important à suivre pour attester de l'efficacité de la neuroprotection de la biomolécule NV.

La dégénérescence des motoneurones se traduit aussi par une destruction des axones moteurs du nerf sciatique et l'atrophie des plaques de JNM (Nagahara et al., 2015). Ces paramètres se devront aussi d'être étudiés.

Profil immunologique

Au-delà de l'aspect clinique, nous avons cherché à déterminer quels étaient les effets de la maladie sur l'activation de la microglie et la migration des cellules immunitaires dans le SNC (en particulier dans la ME) des souris Tg SOD1-G93A.

Au score 3 tardif et score 4, une augmentation des cellules de la microglie activée (cellules CD11b⁺ high) a été constatée. Cette activation de la microglie au cours de la SLA a déjà été décrite (Ban et al., 2019; Béland et al., 2020).

Il serait intéressant de caractériser le phénotype de cette microglie. Pour cela, il serait nécessaire de réaliser une étude des différentes cytokines et chimiokines produites dans le tissu dans un premier temps (cytokine multiplex assay), et pour plus de précision, un séquençage des gènes impliqués dans les phénotypes pro-inflammatoires et immunosuppresseurs de la microglie.

L'infiltration des macrophages (cellules F4/80⁺ parmi les CD11b⁺ low), ainsi que celle des lymphocytes dans la ME ont été constatées, comme déjà décrites dans la ME au cours de la SLA (Graber et al., 2010; Sta et al., 2011).

Dans les stades tardifs de la pathologie (score 3 tardif et score 4), on peut supposer que l'activation de la microglie serait à l'origine d'une attraction dans la ME de macrophages, mais également de lymphocytes CD3 et principalement de CD8 parmi ces derniers. Il y aurait donc un phénomène inflammatoire à l'origine d'un recrutement de cellules immunitaires périphériques.

On observe également une augmentation des Tregs CD4⁺ (cellules CD25⁺ et Foxp3⁺ parmi les cellules CD4⁺) chez les souris Tg SOD1-G93A. *A priori*, l'évolution de la maladie devrait être accompagnée d'une diminution des Tregs. Cependant, en comparant à des souris WT, le contexte inflammatoire de la maladie justifie leur augmentation. On peut supposer que ces Tregs seraient dysfonctionnels en raison de l'activité pro-inflammatoire de la microglie et ne permettraient plus de réguler l'inflammation (Beers et al., 2017).

Le profil immunologique de la ME des souris Tg SOD1-G93A doit également être étudié à différents stades de la maladie : au début du score 1 (15 semaines) et au score 2 (20 semaines). Cela permettrait également de comparer nos résultats à ceux d'Angelini et al. (Angelini et al., 2020) qui n'observaient pas de différences significatives entre souris Tg SOD1-G93A et WT à l'âge de 8 semaines, mais seulement à l'âge de 16 semaines, il y avait une augmentation des lymphocytes, des cellules *natural killer* (NK), des macrophages et des monocytes dans la ME. Cela était donc en faveur d'une forte infiltration de cellules immunitaires.

Angelini et al. se sont également intéressés aux profils immunologiques périphériques (lymphocytes du sang périphérique) où ils ont observé à l'âge de 8 semaines une augmentation des monocytes et mastocytes circulant dans le sang, puis finalement un retour à la normale des monocytes et une diminution des mastocytes à l'âge de 16 semaines (Angelini et al., 2020). Il serait aussi intéressant de déterminer les profils immunologiques au niveau périphérique au cours des différents stades (score 1, 2 et 4) sur notre modèle de souris Tg SOD1-G93A.

Les données obtenues à partir de l'ensemble des techniques mises en place seront comparées avec celles obtenues pour des souris WT et Tg SOD1-G93A non traitées ou avec des souris Tg SOD1-G93A injectées avec un AAV contrôle permettant l'expression d'une molécule NV non active (Δ NV).

La pathologie des souris traitées avec l'AAV NV sera comparée à celle des souris traitées avec l'AAV Δ NV et celles non traitées. Il est attendu que la biomolécule NV retarde l'apparition des symptômes et par conséquent l'ensemble des facteurs de morbidité suivi (troubles neurologiques, perte de poids et diminution des capacités motrices), en protégeant les neurones de la mort, mais également en intervenant au niveau immunitaire, en stimulant l'activité des Tregs.

Si ces résultats sont obtenus, ils permettront de confirmer les propriétés neuroprotectrices établies *in vitro* en étudiant l'élongation des neurites de neuroblastomes humains (Khan et al., 2019; Prehaud et al., 2010), de statuer sur l'efficacité de la biomolécule NV, et d'en établir la preuve de concept pour les maladies neurodégénératives touchant les motoneurons. Ces travaux pourront par la suite être poursuivis par la réalisation d'études précliniques complémentaires.

Les modèles animaux sont essentiels au développement de nouvelles thérapies pour les preuves de concept préclinique. Cependant, bien qu'il existe de nombreuses similitudes entre ces modèles et les patients, les traitements efficaces chez la souris ne sont que rarement applicables chez l'homme. Il va de soi que les résultats obtenus dans ces modèles seront interprétés avec prudence (Picher-Martel et al., 2016; Rothstein, 2003).

7 Conclusion

La SLA est une maladie complexe dont l'ensemble des mécanismes ne sont pas encore élucidés. Les options thérapeutiques sont encore limitées et un besoin thérapeutique est toujours présent. Il est ainsi nécessaire de poursuivre la recherche et le développement de thérapies. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser des modèles animaux reproduisant au mieux les caractéristiques à étudier comme le phénotype clinique de la SLA ou des mécanismes biologiques précis. Aucun modèle ne mime parfaitement l'ensemble des caractéristiques de la SLA, il est donc nécessaire d'en optimiser l'utilisation pour en tirer les résultats les plus robustes et augmenter leur utilité translationnelle.

Les travaux réalisés correspondent au projet « Neurovita-SLA » répondant à l'appel à projets PRCE 2019-2020 financé par l'ANR. Le but de ce projet est d'étudier les propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires d'une biomolécule, NV, développée par la société de biotechnologie NPX, pour le traitement de la SLA.

Le choix du modèle animal permettant d'établir la preuve de concept de l'efficacité de NV à ralentir la progression de la maladie s'est porté sur le modèle de souris Tg SOD1-G93A. Ce modèle mime de manière fidèle le phénotype clinique retrouvé chez les patients porteurs de cette mutation. De plus, il implique les mécanismes de neuro-inflammation et de neurodégénérescence nécessaires pour tester NV.

Avant de pouvoir tester l'efficacité de la biomolécule dans ce modèle, il était nécessaire d'établir un élevage de la lignée, puis de caractériser au mieux l'évolution de la pathologie et d'acquérir l'expertise pour les méthodes permettant d'en effectuer le suivi. Notre connaissance du modèle nous a permis d'identifier les paramètres les plus adaptés pour mettre en évidence un potentiel effet thérapeutique de la molécule NV. Ces résultats permettent d'aborder la deuxième phase de l'étude qui consistera à établir la preuve de concept de l'efficacité de NV comme « drug modifying disease » dans la SLA.

BIBLIOGRAPHIE

Akaike, A., Tamura, Y., Sato, Y., & Yokota, T. (1993). Protective effects of a vitamin B12 analog, methylcobalamin, against glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *European Journal of Pharmacology*, *241*(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90925-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90925-8)

Alami, N. H., Smith, R. B., Carrasco, M. A., Williams, L. A., Winborn, C. S., Han, S. S. W., Kiskinis, E., Winborn, B., Freibaum, B. D., Kanagaraj, A., Clare, A. J., Badders, N. M., Bilican, B., Chaum, E., Chandran, S., Shaw, C. E., Eggen, K. C., Maniatis, T., & Taylor, J. P. (2014). Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron*, *81*(3), 536-543. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.018>

Al-Chalabi, A., Calvo, A., Chio, A., Colville, S., Ellis, C. M., Hardiman, O., Heverin, M., Howard, R. S., Huisman, M. H. B., Keren, N., Leigh, P. N., Mazzini, L., Mora, G., Orrell, R. W., Rooney, J., Scott, K. M., Scotton, W. J., Seelen, M., Shaw, C. E., ... Pearce, N. (2014). Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: A population-based modelling study. *The Lancet. Neurology*, *13*(11), 1108-1113. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70219-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70219-4)

Al-Chalabi, A., & Hardiman, O. (2013). The epidemiology of ALS: A conspiracy of genes, environment and time. *Nature Reviews. Neurology*, *9*(11), 617-628. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.203>

Alonso, A., Logroscino, G., & Hernán, M. A. (2010). Smoking and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *81*(11), 1249-1252. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.180232>

Alves, C. J., de Santana, L. P., dos Santos, A. J. D., de Oliveira, G. P., Duobles, T., Scorisa, J. M., Martins, R. S., Maximino, J. R., & Chadi, G. (2011). Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Research*, *1394*, 90-104. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.060>

Amlie-Wolf, A., Ryvkin, P., Tong, R., Dragomir, I., Suh, E., Xu, Y., Van Deerlin, V. M., Gregory, B. D., Kwong, L. K., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M.-Y., Wang, L.-S., & Lee, E. B. (2015). Transcriptomic Changes Due to Cytoplasmic TDP-43 Expression Reveal Dysregulation of Histone Transcripts and Nuclear Chromatin. *PloS One*, *10*(10), e0141836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141836>

Andrews, J. A., Jackson, C. E., Heiman-Patterson, T. D., Bettica, P., Brooks, B. R., & Pioro, E. P. (2020). Real-world evidence of riluzole effectiveness in treating amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, *21*(7-8), 509-518. <https://doi.org/10.1080/21678421.2020.1771734>

Angelini, D. F., De Angelis, F., Vacca, V., Piras, E., Parisi, C., Nutini, M., Spalloni, A., Pagano, F., Longone, P., Battistini, L., Pavone, F., & Marinelli, S. (2020). Very Early Involvement of Innate Immunity in Peripheral Nerve Degeneration in SOD1-G93A Mice. *Frontiers in Immunology*, *11*, 575792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575792>

Archbold, H. C., Jackson, K. L., Arora, A., Weskamp, K., Tank, E. M.-H., Li, X., Miguez, R., Dayton, R. D., Tamir, S., Klein, R. L., & Barmada, S. J. (2018). TDP43 nuclear export and neurodegeneration in models of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Scientific Reports*, *8*(1), 4606. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22858-w>

Armon, C. (2019). Smoking is a cause of ALS. High LDL-cholesterol levels? Unsure. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.25469>

Arnold, E. S., Ling, S.-C., Huelga, S. C., Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Ditsworth, D., Kordasiewicz, H. B., McAlonis-Downes, M., Platoshyn, O., Parone, P. A., Da Cruz, S., Clutario, K. M., Swing, D., Tessarollo, L., Marsala, M., Shaw, C. E., Yeo, G. W., & Cleveland, D. W. (2013). ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(8), E736-745. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222809110>

Arslanbaeva, L., & Bisaglia, M. (2022). Activation of the Nrf2 Pathway as a Therapeutic Strategy for ALS Treatment. *Molecules*, *27*(5), 1471. <https://doi.org/10.3390/molecules27051471>

Azzouz, M., Leclerc, N., Gurney, M., Warter, J. M., Poindron, P., & Borg, J. (1997). Progressive motor neuron impairment in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, *20*(1), 45-51. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199701\)20:1<45::aid-mus6>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199701)20:1<45::aid-mus6>3.0.co;2-h)

Babin, P. J., Goizet, C., & Raldúa, D. (2014). Zebrafish models of human motor neuron diseases: Advantages and limitations. *Progress in Neurobiology*, *118*, 36-58. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.03.001>

Babu, S., Hightower, B. G., Chan, J., Zürcher, N. R., Kivisäkk, P., Tseng, C.-E. J., Sanders, D. L., Robichaud, A., Banno, H., Evora, A., Ashokkumar, A., Pothier, L., Paganoni, S.,

Chew, S., Dojillo, J., Matsuda, K., Gudesblatt, M., Berry, J. D., Cudkowicz, M. E., ... Atassi, N. (2021). Ibutilast (MN-166) in amyotrophic lateral sclerosis- an open label, safety and pharmacodynamic trial. *NeuroImage. Clinical*, 30, 102672. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2021.102672>

Ban, J., Sámano, C., Mladinic, M., & Munitic, I. (2019). Glia in amyotrophic lateral sclerosis and spinal cord injury : Common therapeutic targets. *Croatian Medical Journal*, 60(2), 109-120. <https://doi.org/10.3325/cmj.2019.60.109>

Bandres-Ciga, S., Noyce, A. J., Hemani, G., Nicolas, A., Calvo, A., Mora, G., ITALSGEN Consortium, International ALS Genomics Consortium, Tienari, P. J., Stone, D. J., Nalls, M. A., Singleton, A. B., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2019). Shared polygenic risk and causal inferences in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 85(4), 470-481. <https://doi.org/10.1002/ana.25431>

Baquero, F., & Nombela, C. (2012). The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18 Suppl 4, 2-4. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x>

Barber, S. C., & Shaw, P. J. (2010). Oxidative stress in ALS : Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology & Medicine*, 48(5), 629-641. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018>

Batra, R., & Lee, C. W. (2017). Mouse Models of C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansion in Amyotrophic Lateral Sclerosis/ Frontotemporal Dementia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 196. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00196>

Becker, L. A., Huang, B., Bieri, G., Ma, R., Knowles, D. A., Jafar-Nejad, P., Messing, J., Kim, H. J., Soriano, A., Auburger, G., Pulst, S. M., Taylor, J. P., Rigo, F., & Gitler, A. D. (2017). Therapeutic reduction of ataxin-2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice. *Nature*, 544(7650), 367-371. <https://doi.org/10.1038/nature22038>

Beers, D. R., & Appel, S. H. (2019). Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis : Mechanisms and emerging therapies. *The Lancet. Neurology*, 18(2), 211-220. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30394-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30394-6)

Beers, D. R., Zhao, W., Wang, J., Zhang, X., Wen, S., Neal, D., Thonhoff, J. R., Alsuliman, A. S., Shpall, E. J., Rezvani, K., & Appel, S. H. (2017). ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight*, 2(5), e89530. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89530>

Béland, L.-C., Markovinovic, A., Jakovac, H., De Marchi, F., Bilic, E., Mazzini, L., Kriz, J., & Munitic, I. (2020). Immunity in amyotrophic lateral sclerosis: Blurred lines between excessive inflammation and inefficient immune responses. *Brain Communications*, 2(2), fcaa124. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa124>

Benoit, E., & Escande, D. (1991). Riluzole specifically blocks inactivated Na channels in myelinated nerve fibre. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 419(6), 603-609. <https://doi.org/10.1007/BF00370302>

Bensimon, G., Lacomblez, L., & Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 330(9), 585-591. <https://doi.org/10.1056/NEJM199403033300901>

Bernard, E., Pegat, A., Svahn, J., Bouhour, F., Leblanc, P., Millecamps, S., Thobois, S., Guissart, C., Lumbroso, S., & Mouzat, K. (2020). Clinical and Molecular Landscape of ALS Patients with SOD1 Mutations: Novel Pathogenic Variants and Novel Phenotypes. A Single ALS Center Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6807. <https://doi.org/10.3390/ijms21186807>

Berry, J. D., Cudkowicz, M. E., Windebank, A. J., Staff, N. P., Owegi, M., Nicholson, K., McKenna-Yasek, D., Levy, Y. S., Abramov, N., Kaspi, H., Mehra, M., Aricha, R., Gothelf, Y., & Brown, R. H. (2019). NurOwn, phase 2, randomized, clinical trial in patients with ALS: Safety, clinical, and biomarker results. *Neurology*, 93(24), e2294-e2305. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008620>

Biogen. (2023). *A Phase 1/2 Multiple-Ascending-Dose Study With a Long-Term Open-Label Extension to Assess the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Effect on Disease Progression of BIIB105 Administered Intrathecally to Adults With Amyotrophic Lateral Sclerosis With or Without Poly-CAG Expansion in the Ataxin-2 Gene* (Clinical trial registration NCT04494256). clinicaltrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04494256>

Bj, T., L, B., R, C., F, B., G, O., Sc, F., & Me, C. (2006). Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: A systematic assessment. *Neurology*, 67(1). <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000223353.34006.54>

Blacher, E., Bashiardes, S., Shapiro, H., Rothschild, D., Mor, U., Dori-Bachash, M., Kleimeyer, C., Moresi, C., Harnik, Y., Zur, M., Zabari, M., Brik, R. B.-Z., Kviatcovsky, D., Zmora, N., Cohen, Y., Bar, N., Levi, I., Amar, N., Mehlman, T., ... Elinav, E. (2019). Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature*,

572(7770), 474-480. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1443-5>

Boddy, S. L., Giovannelli, I., Sassani, M., Cooper-Knock, J., Snyder, M. P., Segal, E., Elinav, E., Barker, L. A., Shaw, P. J., & McDermott, C. J. (2021). The gut microbiome : A key player in the complexity of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *BMC Medicine*, *19*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01885-3>

Bourke, S. C., Bullock, R. E., Williams, T. L., Shaw, P. J., & Gibson, G. J. (2003). Noninvasive ventilation in ALS : Indications and effect on quality of life. *Neurology*, *61*(2), 171-177. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000076182.13137.38>

Brent, J. R., Franz, C. K., Coleman, J. M., & Ajroud-Driss, S. (2020). ALS : Management Problems. *Neurologic Clinics*, *38*(3), 565-575. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2020.03.013>

Brooks, B. R., Berry, J. D., Ciepielewska, M., Liu, Y., Zambrano, G. S., Zhang, J., & Hagan, M. (2022). Intravenous edaravone treatment in ALS and survival: An exploratory, retrospective, administrative claims analysis. *EClinicalMedicine*, *52*, 101590. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101590>

Bruijn, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Cleveland, D. W. (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, *18*(2), 327-338. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80272-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80272-x)

Burberry, A., Wells, M. F., Limone, F., Couto, A., Smith, K. S., Keaney, J., Gillet, G., van Gastel, N., Wang, J.-Y., Pietilainen, O., Qian, M., Eggan, P., Cantrell, C., Mok, J., Kadiu, I., Scadden, D. T., & Eggan, K. (2020). C9orf72 suppresses systemic and neural inflammation induced by gut bacteria. *Nature*, *582*(7810), 89-94. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2288-7>

Canosa, A., D'Ovidio, F., Calvo, A., Moglia, C., Manera, U., Torrieri, M. C., Vasta, R., Cistaro, A., Gallo, S., Iazzolino, B., Nobili, F. M., Casale, F., Chiò, A., & Pagani, M. (2020). Lifetime sport practice and brain metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *NeuroImage Clinical*, *27*, 102312. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2020.102312>

Carbone, M., Duty, S., & Rattray, M. (2012). Riluzole neuroprotection in a Parkinson's disease model involves suppression of reactive astrocytosis but not GLT-1 regulation. *BMC Neuroscience*, *13*, 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-38>

Castillo, K., Nassif, M., Valenzuela, V., Rojas, F., Matus, S., Mercado, G., Court, F. A.,

van Zundert, B., & Hetz, C. (2013). Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. *Autophagy*, 9(9), 1308-1320. <https://doi.org/10.4161/auto.25188>

Chia, R., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2018). Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: Diagnostic and clinical implications. *The Lancet. Neurology*, 17(1), 94-102. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30401-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30401-5)

Chiot, A., Lobsiger, C. S., & Boillée, S. (2019). New insights on the disease contribution of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Current Opinion in Neurology*, 32(5), 764-770. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000729>

Cho, W., Jeong, A., Malik, P., Boiser, J., Huang, X., & Rosebraugh, M. (2023). A Phase 1 First-in-human Study to Investigate the Safety, Tolerability and Food Effect of ABBV-CLS-7262 (P6-4.002). *Neurology*, 100(17 Supplement 2). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000203810>

Ciryam, P., Lambert-Smith, I. A., Bean, D. M., Freer, R., Cid, F., Tartaglia, G. G., Saunders, D. N., Wilson, M. R., Oliver, S. G., Morimoto, R. I., Dobson, C. M., Vendruscolo, M., Favrin, G., & Yerbury, J. J. (2017). Spinal motor neuron protein supersaturation patterns are associated with inclusion body formation in ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(20), E3935-E3943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613854114>

CNM-Au8 Shows Continued Decreases in ALS Mortality, Updated Open-Label Findings Show. (2022, juillet 21). Neurology Live. <https://www.neurologylive.com/view/cnm-au8-continued-decreases-als-mortality-updated-open-label-findings>

Commissioner, O. of the. (2020, mars 24). *FDA approves drug to treat ALS.* FDA; FDA. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-drug-treat-als>

Dal Canto, M. C., & Gurney, M. E. (1997). A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 93(6), 537-550. <https://doi.org/10.1007/s004010050650>

Daoud, H., Dobrzeniecka, S., Camu, W., Meininger, V., Dupré, N., Dion, P. A., & Rouleau, G. A. (2013). Mutation analysis of PFN1 in familial amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiology of Aging*, 34(4), 1311.e1-2. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.001>

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752-758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>

de Carvalho, M., Pinto, S., Costa, J., Evangelista, T., Ohana, B., & Pinto, A. (2010). A randomized, placebo-controlled trial of memantine for functional disability in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 11(5), 456-460. <https://doi.org/10.3109/17482968.2010.498521>

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.-Y. R., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., ... Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>

Deora, V., Lee, J. D., Albornoz, E. A., McAlary, L., Jagaraj, C. J., Robertson, A. A. B., Atkin, J. D., Cooper, M. A., Schroder, K., Yerbury, J. J., Gordon, R., & Woodruff, T. M. (2020). The microglial NLRP3 inflammasome is activated by amyotrophic lateral sclerosis proteins. *Glia*, 68(2), 407-421. <https://doi.org/10.1002/glia.23728>

Devoy, A., Kalmar, B., Stewart, M., Park, H., Burke, B., Noy, S. J., Redhead, Y., Humphrey, J., Lo, K., Jaeger, J., Mejia Maza, A., Sivakumar, P., Bertolin, C., Soraru, G., Plagnol, V., Greensmith, L., Acevedo Arozena, A., Isaacs, A. M., Davies, B., ... Fisher, E. M. C. (2017). Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in « FUSDelta14 » knockin mice. *Brain: A Journal of Neurology*, 140(11), 2797-2805. <https://doi.org/10.1093/brain/awx248>

Dorst, J., & Genge, A. (2022). Clinical studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Current Opinion in Neurology*, 35(5), 686-692. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000001099>

Dupuis, L., Oudart, H., René, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., & Loeffler, J.-P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis : Benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11159-11164. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402026101>

Edaravone in Amyotrophic Lateral Sclerosis—Lessons from the Clinical Development Program and the Importance of a Strategic Clinical Trial Design. (2018). *US Neurology*.

<https://touchneurology.com/neuromuscular-diseases/journal-articles/edaravone-in-amyotrophic-lateral-sclerosis-lessons-from-the-clinical-development-program-and-the-importance-of-a-strategic-clinical-trial-design/>

Evans, M. C., Serres, S., Khrapitchev, A. A., Stolp, H. B., Anthony, D. C., Talbot, K., Turner, M. R., & Sibson, N. R. (2014). T₂-weighted MRI detects presymptomatic pathology in the SOD1 mouse model of ALS. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34(5), 785-793. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.19>

Ezzi, S. A., Urushitani, M., & Julien, J.-P. (2007). Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *Journal of Neurochemistry*, 102(1), 170-178. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04531.x>

Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M., & Shaw, P. J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, 7(11), 616-630. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.152>

Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M. A., & Glass, J. D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: Evidence in mice and man. *Experimental Neurology*, 185(2), 232-240. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.10.004>

Gois, A. M., Mendonça, D. M. F., Freire, M. A. M., & Santos, J. R. (2020). IN VITRO AND IN VIVO MODELS OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: AN UPDATED OVERVIEW. *Brain Research Bulletin*, 159, 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.03.012>

Gold, J., Rowe, D. B., Kiernan, M. C., Vucic, S., Mathers, S., van Eijk, R. P. A., Nath, A., Garcia Montojo, M., Norato, G., Santamaria, U. A., Rogers, M.-L., Malaspina, A., Lombardi, V., Mehta, P. R., Westeneng, H.-J., van den Berg, L. H., & Al-Chalabi, A. (2019). Safety and tolerability of Triumeq in amyotrophic lateral sclerosis: The Lighthouse trial. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 20(7-8), 595-604. <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1632899>

Graber, D. J., Hickey, W. F., & Harris, B. T. (2010). Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-8>

Grad, L. I., & Cashman, N. R. (2014). Prion-like activity of Cu/Zn superoxide dismutase: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Prion*, 8(1), 33-41.

<https://doi.org/10.4161/pri.27602>

Gregory, J. M., Fagegaltier, D., Phatnani, H., & Harms, M. B. (2020). Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Genetic Medicine Reports*, 8(4), 121-131. <https://doi.org/10.1007/s40142-020-00194-8>

Gurney, M. E. (1997). The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *Journal of the Neurological Sciences*, 152 Suppl 1, S67-73. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(97\)00247-5](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(97)00247-5)

Gurney, M. E., Fleck, T. J., Himes, C. S., & Hall, E. D. (1998). Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 50(1), 62-66. <https://doi.org/10.1212/wnl.50.1.62>

Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., & Deng, H. X. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5166), 1772-1775. <https://doi.org/10.1126/science.8209258>

Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P. J., Simmons, Z., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17071. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>

Harms, M. B., & Baloh, R. H. (2013). Clinical Neurogenetics: Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurologic clinics*, 31(4), 10.1016/j.ncl.2013.05.003. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2013.05.003>

Hatzipetros, T., Kidd, J. D., Moreno, A. J., Thompson, K., Gill, A., & Vieira, F. G. (2015). A Quick Phenotypic Neurological Scoring System for Evaluating Disease Progression in the SOD1-G93A Mouse Model of ALS. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 104, 53257. <https://doi.org/10.3791/53257>

Heiman-Patterson, T. D., Blankenhorn, E. P., Sher, R. B., Jiang, J., Welsh, P., Dixon, M. C., Jeffrey, J. I., Wong, P., Cox, G. A., & Alexander, G. M. (2015). Genetic background effects on disease onset and lifespan of the mutant dynactin p150Glued mouse model of motor neuron disease. *PloS One*, 10(3), e0117848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117848>

Heiman-Patterson, T. D., Deitch, J. S., Blankenhorn, E. P., Erwin, K. L., Perreault, M. J., Alexander, B. K., Byers, N., Toman, I., & Alexander, G. M. (2005). Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS. *Journal of the Neurological Sciences*, 236(1-2), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.02.006>

Heiman-Patterson, T. D., Sher, R. B., Blankenhorn, E. A., Alexander, G., Deitch, J. S., Kunst, C. B., Maragakis, N., & Cox, G. (2011). Effect of genetic background on phenotype variability in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: A window of opportunity in the search for genetic modifiers. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 12(2), 79-86. <https://doi.org/10.3109/17482968.2010.550626>

Henkel, J. S., Beers, D. R., Wen, S., Rivera, A. L., Toennis, K. M., Appel, J. E., Zhao, W., Moore, D. H., Powell, S. Z., & Appel, S. H. (2013). Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Molecular Medicine*, 5(1), 64-79. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201544>

Hicks, G. G., Singh, N., Nashabi, A., Mai, S., Bozek, G., Klewes, L., Arapovic, D., White, E. K., Koury, M. J., Oltz, E. M., Van Kaer, L., & Ruley, H. E. (2000). Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nature Genetics*, 24(2), 175-179. <https://doi.org/10.1038/72842>

Huang, C., Zhou, H., Tong, J., Chen, H., Liu, Y.-J., Wang, D., Wei, X., & Xia, X.-G. (2011). FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *PLoS Genetics*, 7(3), e1002011. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002011>

Huang, X., El-Sayed, I. H., Yi, X., & El-Sayed, M. A. (2005). Gold nanoparticles: Catalyst for the oxidation of NADH to NAD(+). *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 81(2), 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.05.010>

Hübers, A., Marroquin, N., Schmolz, B., Vielhaber, S., Just, M., Mayer, B., Högel, J., Dorst, J., Mertens, T., Just, W., Aulitzky, A., Wais, V., Ludolph, A. C., Kubisch, C., Weishaupt, J. H., & Volk, A. E. (2014). Polymerase chain reaction and Southern blot-based analysis of the C9orf72 hexanucleotide repeat in different motor neuron diseases. *Neurobiology of Aging*, 35(5), 1214.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.034>

Hubert, J. P., Delumeau, J. C., Glowinski, J., Prémont, J., & Doble, A. (1994). Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: Evidence for a dual mechanism of action. *British Journal of Pharmacology*, 113(1), 261-267. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb16203.x>

Ingre, C., Landers, J. E., Rizik, N., Volk, A. E., Akimoto, C., Birve, A., Hübers, A., Keagle, P. J., Piotrowska, K., Press, R., Andersen, P. M., Ludolph, A. C., & Weishaupt, J. H. (2013).

A novel phosphorylation site mutation in profilin 1 revealed in a large screen of US, Nordic, and German amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia cohorts. *Neurobiology of Aging*, 34(6), 1708.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.009>

Ionescu, A., Gradus, T., Altman, T., Maimon, R., Saraf Avraham, N., Geva, M., Hayden, M., & Perlson, E. (2019). Targeting the Sigma-1 Receptor via Pridopidine Ameliorates Central Features of ALS Pathology in a SOD1G93A Model. *Cell Death & Disease*, 10(3), 210. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1451-2>

Ito, H., Wate, R., Zhang, J., Ohnishi, S., Kaneko, S., Ito, H., Nakano, S., & Kusaka, H. (2008). Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Experimental Neurology*, 213(2), 448-455. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.07.017>

Jayasinghe, M., Jena, R., Singhal, M., Jain, S., Karnakoti, S., Silva, M. S., & Kayani, A. M. A. (2022). Ethnical Disparities in Response to Edaravone in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cureus*, 14(6), e25960. <https://doi.org/10.7759/cureus.25960>

Jiang, J., Wang, Y., & Deng, M. (2022). New developments and opportunities in drugs being trialed for amyotrophic lateral sclerosis from 2020 to 2022. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1054006. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1054006>

Jiang, J., Zhu, Q., Gendron, T. F., Saberi, S., McAlonis-Downes, M., Seelman, A., Stauffer, J. E., Jafar-Nejad, P., Drenner, K., Schulte, D., Chun, S., Sun, S., Ling, S.-C., Myers, B., Engelhardt, J., Katz, M., Baughn, M., Platoshyn, O., Marsala, M., ... Lagier-Tourenne, C. (2016). Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron*, 90(3), 535-550. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.006>

Joyce, P. I., Mcgoldrick, P., Saccon, R. A., Weber, W., Fratta, P., West, S. J., Zhu, N., Carter, S., Phatak, V., Stewart, M., Simon, M., Kumar, S., Heise, I., Bros-Facer, V., Dick, J., Corrochano, S., Stanford, M. J., Luong, T. V., Nolan, P. M., ... Acevedo-Arozena, A. (2015). A novel SOD1-ALS mutation separates central and peripheral effects of mutant SOD1 toxicity. *Human Molecular Genetics*, 24(7), 1883-1897. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu605>

Julian, T. H., Glasgow, N., Barry, A. D. F., Moll, T., Harvey, C., Klimentidis, Y. C., Newell, M., Zhang, S., Snyder, M. P., Cooper-Knock, J., & Shaw, P. J. (2021). Physical exercise is a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: Convergent evidence from Mendelian randomisation, transcriptomics and risk genotypes. *EBioMedicine*, 68, 103397. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103397>

- Kab, S., Moisan, F., Preux, P.-M., Marin, B., & Elbaz, A. (2017). Nationwide incidence of motor neuron disease using the French health insurance information system database. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, *18*(5-6), 426-433. <https://doi.org/10.1080/21678421.2017.1306566>
- Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B. J., Vande Velde, C., Bouchard, J.-P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P.-F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N., & Rouleau, G. A. (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, *40*(5), 572-574. <https://doi.org/10.1038/ng.132>
- Kawano, T., Inokuchi, J., Eto, M., Murata, M., & Kang, J.-H. (2021). Activators and Inhibitors of Protein Kinase C (PKC): Their Applications in Clinical Trials. *Pharmaceutics*, *13*(11), 1748. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111748>
- Kazama, M., Kato, Y., Kakita, A., Noguchi, N., Urano, Y., Masui, K., Niida-Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Watabe, K., Kitagawa, K., & Shibata, N. (2020). Astrocytes release glutamate via cystine/glutamate antiporter upregulated in response to increased oxidative stress related to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, *40*(6), 587-598. <https://doi.org/10.1111/neup.12716>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New roles for the synaptic stripper. *Neuron*, *77*(1), 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Khan, Z., Terrien, E., Delhommel, F., Lefebvre-Omar, C., Bohl, D., Vitry, S., Bernard, C., Ramirez, J., Chaffotte, A., Ricquier, K., Vincentelli, R., Buc, H., Prehaud, C., Wolff, N., & Lafon, M. (2019). Structure-based optimization of a PDZ-binding motif within a viral peptide stimulates neurite outgrowth. *The Journal of Biological Chemistry*, *294*(37), 13755-13768. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008238>
- Khatoun, S., Kalam, N., Rashid, S., & Bano, G. (2023). Effects of gut microbiota on neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *15*, 1145241. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1145241>
- Korobeynikov, V. A., Lyashchenko, A. K., Blanco-Redondo, B., Jafar-Nejad, P., & Shneider, N. A. (2022). Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Medicine*, *28*(1), 104-116. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01615-z>
- Kuroda, M., Sok, J., Webb, L., Baechtold, H., Urano, F., Yin, Y., Chung, P., de Rooij, D. G., Akhmedov, A., Ashley, T., & Ron, D. (2000). Male sterility and enhanced radiation

- sensitivity in TLS(-/-) mice. *The EMBO Journal*, 19(3), 453-462. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.3.453>
- Kwiatkowski, T. J., Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E. J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G. A., Hosler, B. A., Cortelli, P., de Jong, P. J., Yoshinaga, Y., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Yan, J., ... Brown, R. H. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), 1205-1208. <https://doi.org/10.1126/science.1166066>
- Kwon, M.-S., Noh, M.-Y., Oh, K.-W., Cho, K.-A., Kang, B.-Y., Kim, K.-S., Kim, Y.-S., & Kim, S. H. (2014). The immunomodulatory effects of human mesenchymal stem cells on peripheral blood mononuclear cells in ALS patients. *Journal of Neurochemistry*, 131(2), 206-218. <https://doi.org/10.1111/jnc.12814>
- Leblond, C. S., Kaneb, H. M., Dion, P. A., & Rouleau, G. A. (2014). Dissection of genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 262 Pt B, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.013>
- Lechtzin, N., Scott, Y., Busse, A. M., Clawson, L. L., Kimball, R., & Wiener, C. M. (2007). Early use of non-invasive ventilation prolongs survival in subjects with ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 8(3), 185-188. <https://doi.org/10.1080/17482960701262392>
- Li, Q., & Barres, B. A. (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 18(4), 225-242. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>
- Longinetti, E., & Fang, F. (2019). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis : An update of recent literature. *Current Opinion in Neurology*, 32(5), 771-776. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000730>
- Lopez-Gonzalez, R., Lu, Y., Gendron, T. F., Karydas, A., Tran, H., Yang, D., Petrucelli, L., Miller, B. L., Almeida, S., & Gao, F.-B. (2016). Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron*, 92(2), 383-391. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.015>
- Ludolph, A. C., Bendotti, C., Blaugrund, E., Chio, A., Greensmith, L., Loeffler, J.-P., Mead, R., Niessen, H. G., Petri, S., Pradat, P.-F., Robberecht, W., Ruegg, M., Schwalenstöcker, B., Stiller, D., van den Berg, L., Vieira, F., & von Horsten, S. (2010). Guidelines for preclinical animal research in ALS/MND : A consensus meeting. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official*

- Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 11(1-2), 38-45. <https://doi.org/10.3109/17482960903545334>
- Lunetta, C., Moglia, C., Lizio, A., Caponnetto, C., Dubbioso, R., Giannini, F., Matà, S., Mazzini, L., Sabatelli, M., Siciliano, G., Simone, I. L., Sorarù, G., Toriello, A., Trojsi, F., Vedovello, M., D'Ovidio, F., Filippi, M., Calvo, A., & EDARAVALS Study Group. (2020). The Italian multicenter experience with edaravone in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 267(11), 3258-3267. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09993-z>
- Lutz, C. (2018). Mouse models of ALS : Past, present and future. *Brain Research*, 1693(Pt A), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.024>
- Lyon, M. S., Wosiski-Kuhn, M., Gillespie, R., Caress, J., & Milligan, C. (2019). Inflammation, Immunity, and amyotrophic lateral sclerosis : I. Etiology and pathology. *Muscle & Nerve*, 59(1), 10-22. <https://doi.org/10.1002/mus.26289>
- Mackenzie, I. R. A., Bigio, E. H., Ince, P. G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N. J., Kwong, L. K., Forman, M. S., Ravits, J., Stewart, H., Eisen, A., McClusky, L., Kretzschmar, H. A., Monoranu, C. M., Highley, J. R., Kirby, J., Siddique, T., Shaw, P. J., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of Neurology*, 61(5), 427-434. <https://doi.org/10.1002/ana.21147>
- Maldonado, E., Rojas, D. A., Morales, S., Miralles, V., & Solari, A. (2020). Dual and Opposite Roles of Reactive Oxygen Species (ROS) in Chagas Disease : Beneficial on the Pathogen and Harmful on the Host. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 8867701. <https://doi.org/10.1155/2020/8867701>
- Malek, A. M., Barchowsky, A., Bowser, R., Heiman-Patterson, T., Lacomis, D., Rana, S., Ada Youk, null, & Talbott, E. O. (2015). Exposure to hazardous air pollutants and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 197, 181-186. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.010>
- Mancuso, R., Oliván, S., Osta, R., & Navarro, X. (2011). Evolution of gait abnormalities in SOD1(G93A) transgenic mice. *Brain Research*, 1406, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.033>
- Marlin, E., Viu-Idocin, C., Arrasate, M., & Aragón, T. (2022). The Role and Therapeutic Potential of the Integrated Stress Response in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7823. <https://doi.org/10.3390/ijms23147823>

- Martin, D., Thompson, M. A., & Nadler, J. V. (1993). The neuroprotective agent riluzole inhibits release of glutamate and aspartate from slices of hippocampal area CA1. *European Journal of Pharmacology*, 250(3), 473-476. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90037-i](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90037-i)
- Masrori, P., & Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis : A clinical review. *European Journal of Neurology*, 27(10), 1918-1929. <https://doi.org/10.1111/ene.14393>
- McGoldrick, P., Zhang, M., van Blitterswijk, M., Sato, C., Moreno, D., Xiao, S., Zhang, A. B., McKeever, P. M., Weichert, A., Schneider, R., Keith, J., Petrucelli, L., Rademakers, R., Zinman, L., Robertson, J., & Rogaeva, E. (2018). Unaffected mosaic C9orf72 case : RNA foci, dipeptide proteins, but upregulated C9orf72 expression. *Neurology*, 90(4), e323-e331. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004865>
- Mead, R. J., Shan, N., Reiser, H. J., Marshall, F., & Shaw, P. J. (2023). Amyotrophic lateral sclerosis : A neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 22(3), 185-212. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00612-2>
- Montagutelli, X. (2015). Les populations génétiques de référence de souris de laboratoire : Une nouvelle génération de modèles animaux pour les maladies humaines. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 168(4), 320-328. <https://doi.org/10.4267/2042/58195>
- Mora, J. S., Bradley, W. G., Chaverri, D., Hernández-Barral, M., Mascias, J., Gamez, J., Gargiulo-Monachelli, G. M., Moussy, A., Mansfield, C. D., Hermine, O., & Ludolph, A. C. (2021). Long-term survival analysis of masitinib in amyotrophic lateral sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 14, 17562864211030364. <https://doi.org/10.1177/17562864211030365>
- Mora, J. S., Genge, A., Chio, A., Estol, C. J., Chaverri, D., Hernández, M., Marín, S., Mascias, J., Rodriguez, G. E., Povedano, M., Paipa, A., Dominguez, R., Gamez, J., Salvado, M., Lunetta, C., Ballario, C., Riva, N., Mandrioli, J., Moussy, A., ... AB10015 STUDY GROUP. (2020). Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis : A randomized clinical trial. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 21(1-2), 5-14. <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1632346>
- Morrice, J. R., Gregory-Evans, C. Y., & Shaw, C. A. (2018). Animal models of amyotrophic lateral sclerosis : A comparison of model validity. *Neural Regeneration Research*, 13(12), 2050-2054. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.241445>
- Nagahara, Y., Shimazawa, M., Tanaka, H., Ono, Y., Noda, Y., Ohuchi, K., Tsuruma, K., Katsuno, M., Sobue, G., & Hara, H. (2015). Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B

ameliorates skeletal muscle lesions in a SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 93(10), 1552-1566. <https://doi.org/10.1002/jnr.23619>

Nam, J.-Y., Lee, T. Y., Kim, K., Chun, S., Kim, M. S., Shin, J.-H., Sung, J.-J., Kim, B. J., Kim, B.-J., Oh, K.-W., Kim, K. S., & Kim, S. H. (2022). Efficacy and safety of Lenzumestrocel (Neuronata-R® inj.) in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALSUMMIT study): Study protocol for a multicentre, randomized, double-blind, parallel-group, sham procedure-controlled, phase III trial. *Trials*, 23(1), 415. <https://doi.org/10.1186/s13063-022-06327-4>

Naumann, M., Pal, A., Goswami, A., Lojewski, X., Japtok, J., Vehlow, A., Naujock, M., Günther, R., Jin, M., Stanslowsky, N., Reinhardt, P., Sternecker, J., Frickenhaus, M., Pan-Montojo, F., Storkebaum, E., Poser, I., Freischmidt, A., Weishaupt, J. H., Holzmann, K., ... Hermann, A. (2018). Impaired DNA damage response signaling by FUS-NLS mutations leads to neurodegeneration and FUS aggregate formation. *Nature Communications*, 9(1), 335. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02299-1>

Newell, M. E., Adhikari, S., & Halden, R. U. (2022). Systematic and state-of the science review of the role of environmental factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) or Lou Gehrig's Disease. *The Science of the Total Environment*, 817, 152504. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152504>

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5726), 1314-1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>

Obrador, E., Salvador-Palmer, R., López-Blanch, R., Jihad-Jebbar, A., Vallés, S. L., & Estrela, J. M. (2021). The Link between Oxidative Stress, Redox Status, Bioenergetics and Mitochondria in the Pathophysiology of ALS. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6352. <https://doi.org/10.3390/ijms22126352>

Oh, K., Noh, M., Kwon, M., Kim, H. Y., Oh, S., Park, J., Kim, H., Ki, C., & Kim, S. H. (2018). Repeated Intrathecal Mesenchymal Stem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology*, 84(3), 361-373. <https://doi.org/10.1002/ana.25302>

Oki, R., Izumi, Y., Fujita, K., Miyamoto, R., Nodera, H., Sato, Y., Sakaguchi, S., Nokihara, H., Kanai, K., Tsunemi, T., Hattori, N., Hatanaka, Y., Sonoo, M., Atsuta, N., Sobue, G., Shimizu, T., Shibuya, K., Ikeda, K., Kano, O., ... Japan Early-Stage Trial of Ultrahigh-Dose Methylcobalamin for ALS (JETALS) Collaborators. (2022). Efficacy and Safety of Ultrahigh-

Dose Methylcobalamin in Early-Stage Amyotrophic Lateral Sclerosis : A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, 79(6), 575-583. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2022.0901>

Oskarsson, B., Maragakis, N., Bedlack, R. S., Goyal, N., Meyer, J. A., Genge, A., Bodkin, C., Maiser, S., Staff, N., Zinman, L., Olney, N., Turnbull, J., Brooks, B. R., Klonowski, E., Makhay, M., Yasui, S., & Matsuda, K. (2021). MN-166 (ibudilast) in amyotrophic lateral sclerosis in a Phase IIb/III study : COMBAT-ALS study design. *Neurodegenerative Disease Management*, 11(6), 431-443. <https://doi.org/10.2217/nmt-2021-0042>

Paganoni, S., Watkins, C., Cawson, M., Hendrix, S., Dickson, S. P., Knowlton, N., Timmons, J., Manuel, M., & Cudkowicz, M. (2022). Survival analyses from the CENTAUR trial in amyotrophic lateral sclerosis : Evaluating the impact of treatment crossover on outcomes. *Muscle & Nerve*, 66(2), 136-141. <https://doi.org/10.1002/mus.27569>

Park, H. R., & Yang, E. J. (2021). Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Amyotrophic Lateral Sclerosis : Opportunities and Limitations. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1546. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11091546>

Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., & Hermine, O. (2017). ALS Clinical Trials Review : 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 68. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00068>

Pfeiffer, R. M., Mayer, B., Kuncl, R. W., Check, D. P., Cahoon, E. K., Rivera, D. R., & Freedman, D. M. (2020). Identifying potential targets for prevention and treatment of amyotrophic lateral sclerosis based on a screen of medicare prescription drugs. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 21(3-4), 235-245. <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1682613>

Philips, T., & Rothstein, J. D. (2015a). Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology*, 69, 5.67.1-5.67.21. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0567s69>

Philips, T., & Rothstein, J. D. (2015b). Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current protocols in pharmacology / editorial board, S.J. Enna (editor-in-chief) ... [et al.]*, 69, 5.67.1-5.67.21. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0567s69>

Picher-Martel, V., Valdmanis, P. N., Gould, P. V., Julien, J.-P., & Dupré, N. (2016). From animal models to human disease : A genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0340-5>

Prehaud, C., Lafon, M., & Schnell, M. J. (2010). *Neuron generation, regeneration and protection* (World Intellectual Property Organization Brevet WO2010116258A1). <https://patents.google.com/patent/WO2010116258A1/is>

Ranganathan, R., Haque, S., Coley, K., Shepherd, S., Cooper-Knock, J., & Kirby, J. (2020). Multifaceted Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis-Frontotemporal Dementia. *Frontiers in Neuroscience, 14*, 684. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00684>

Ratti, A., Gumina, V., Lenzi, P., Bossolasco, P., Fulceri, F., Volpe, C., Bardelli, D., Pregnotato, F., Maraschi, A., Fornai, F., Silani, V., & Colombrita, C. (2020). Chronic stress induces formation of stress granules and pathological TDP-43 aggregates in human ALS fibroblasts and iPSC-motoneurons. *Neurobiology of Disease, 145*, 105051. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105051>

Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A. M., Kaganovich, A., Scholz, S. W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D. W., ... Traynor, B. J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron, 72*(2), 257-268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010>

Research, C. for D. E. and. (2023). FDA approves treatment of amyotrophic lateral sclerosis associated with a mutation in the SOD1 gene. *FDA*. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-treatment-amyotrophic-lateral-sclerosis-associated-mutation-sod1-gene>

Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H., & Gordon, J. W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92*(3), 689-693. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.3.689>

Robinson, A. P., Zhang, J. Z., Titus, H. E., Karl, M., Merzliakov, M., Dorfman, A. R., Karlik, S., Stewart, M. G., Watt, R. K., Facer, B. D., Facer, J. D., Christian, N. D., Ho, K. S., Hotchkin, M. T., Mortenson, M. G., Miller, R. H., & Miller, S. D. (2020). Nanocatalytic activity of clean-surfaced, faceted nanocrystalline gold enhances remyelination in animal models of multiple sclerosis. *Scientific Reports, 10*(1), 1936. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58709-w>

Rodrigues, C. M. P., Solá, S., Sharpe, J. C., Moura, J. J. G., & Steer, C. J. (2003). Tauroursodeoxycholic acid prevents Bax-induced membrane perturbation and cytochrome C

release in isolated mitochondria. *Biochemistry*, 42(10), 3070-3080. <https://doi.org/10.1021/bi026979d>

Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., & Deng, H. X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59-62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>

Rothstein, J. D. (2003). Of mice and men : Reconciling preclinical ALS mouse studies and human clinical trials. *Annals of Neurology*, 53(4), 423-426. <https://doi.org/10.1002/ana.10561>

Rowland, L. P., & Shneider, N. A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 344(22), 1688-1700. <https://doi.org/10.1056/NEJM200105313442207>

Ryan, M., Heverin, M., McLaughlin, R. L., & Hardiman, O. (2019). Lifetime Risk and Heritability of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurology*, 76(11), 1367-1374. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.2044>

Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H. E., Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., Allmeroth, K., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., René, F., Dormann, D., Haass, C., Ludolph, A. C., Lagier-Tourenne, C., Storkebaum, E., & Dupuis, L. (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 133(6), 887-906. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1687-9>

Schludi, M. H., & Edbauer, D. (2018). Targeting RNA G-quadruplexes as new treatment strategy for C9orf72 ALS/FTD. *EMBO Molecular Medicine*, 10(1), 4-6. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708572>

Sheean, R. K., McKay, F. C., Cretney, E., Bye, C. R., Perera, N. D., Tomas, D., Weston, R. A., Scheller, K. J., Djouma, E., Menon, P., Schibeci, S. D., Marmash, N., Yerbury, J. J., Nutt, S. L., Booth, D. R., Stewart, G. J., Kiernan, M. C., Vucic, S., & Turner, B. J. (2018). Association of Regulatory T-Cell Expansion With Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis : A Study of Humans and a Transgenic Mouse Model. *JAMA Neurology*, 75(6), 681-689. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.0035>

Shihashi, G., Ito, D., Yagi, T., Nihei, Y., Ebine, T., & Suzuki, N. (2016). Mislocated FUS is sufficient for gain-of-toxic-function amyotrophic lateral sclerosis phenotypes in mice. *Brain*, 139(9), 2380-2394. <https://doi.org/10.1093/brain/aww161>

Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress : A Key Modulator in

- Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(8), 1583.
<https://doi.org/10.3390/molecules24081583>
- Spencer, P. S., Lagrange, E., & Camu, W. (2019). ALS and environment : Clues from spatial clustering? *Revue Neurologique*, 175(10), 652-663.
<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.04.007>
- Sta, M., Sylva-Steenland, R. M. R., Casula, M., de Jong, J. M. B. V., Troost, D., Aronica, E., & Baas, F. (2011). Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis : Evidence of complement activation. *Neurobiology of Disease*, 42(3), 211-220.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.002>
- Stephenson, J., & Amor, S. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 25-26, 35-44.
<https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.10.001>
- Sufit, R. L., Ajroud-Driss, S., Casey, P., & Kessler, J. A. (2017). Open label study to assess the safety of VM202 in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 18(3-4), 269-278.
<https://doi.org/10.1080/21678421.2016.1259334>
- Suk, T. R., & Rousseaux, M. W. C. (2020). The role of TDP-43 mislocalization in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 45.
<https://doi.org/10.1186/s13024-020-00397-1>
- Sun, W., Funakoshi, H., & Nakamura, T. (2002). Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6537-6548.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06537.2002>
- Suzuki, N., Nishiyama, A., Warita, H., & Aoki, M. (2023). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis : Seeking therapeutic targets in the era of gene therapy. *Journal of Human Genetics*, 68(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01055-8>
- Urushitani, M., Kurisu, J., Tsukita, K., & Takahashi, R. (2002). Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 83(5), 1030-1042.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01211.x>
- Van Deerlin, V. M., Leverenz, J. B., Bekris, L. M., Bird, T. D., Yuan, W., Elman, L. B., Clay, D., Wood, E. M., Chen-Plotkin, A. S., Martinez-Lage, M., Steinbart, E., McCluskey, L.,

Grossman, M., Neumann, M., Wu, I.-L., Yang, W.-S., Kalb, R., Galasko, D. R., Montine, T. J., ... Yu, C.-E. (2008). TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: A genetic and histopathological analysis. *The Lancet. Neurology*, 7(5), 409-416. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70071-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70071-1)

Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., de Belleruche, J., ... Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), 1208-1211. <https://doi.org/10.1126/science.1165942>

van Rheenen, W., Shatunov, A., Dekker, A. M., McLaughlin, R. L., Diekstra, F. P., Pulit, S. L., van der Spek, R. A. A., Vösa, U., de Jong, S., Robinson, M. R., Yang, J., Fogh, I., van Doormaal, P. T., Tazelaar, G. H. P., Koppers, M., Blokhuis, A. M., Sproviero, W., Jones, A. R., Kenna, K. P., ... Veldink, J. H. (2016). Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 48(9), 1043-1048. <https://doi.org/10.1038/ng.3622>

van Rheenen, W., van der Spek, R. A. A., Bakker, M. K., van Vugt, J. J. F. A., Hop, P. J., Zwamborn, R. A. J., de Klein, N., Westra, H.-J., Bakker, O. B., Deelen, P., Shireby, G., Hannon, E., Moisse, M., Baird, D., Restuadi, R., Dolzhenko, E., Dekker, A. M., Gawor, K., Westeneng, H.-J., ... Veldink, J. H. (2021). Common and rare variant association analyses in amyotrophic lateral sclerosis identify 15 risk loci with distinct genetic architectures and neuron-specific biology. *Nature Genetics*, 53(12), 1636-1648. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00973-1>

Vasta, R., Chia, R., Traynor, B. J., & Chiò, A. (2022). Unraveling the complex interplay between genes, environment, and climate in ALS. *EBioMedicine*, 75, 103795. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103795>

Verschueren, A., Bernard, E., Cassereau, J., Genestet, S., & Couratier, P. (2023). Consensus d'experts sur les échelles et critères utilisés en pratique pour le diagnostic et le suivi de la sclérose latérale amyotrophique en France. *Revue Neurologique*, 179, S141. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2023.01.648>

Vucic, S., Kiernan, M. C., Menon, P., Huynh, W., Rynders, A., Ho, K. S., Glanzman, R., & Hotchkin, M. T. (2021). Study protocol of RESCUE-ALS: A Phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study in early symptomatic amyotrophic lateral sclerosis patients to

- assess bioenergetic catalysis with CNM-Au8 as a mechanism to slow disease progression. *BMJ Open*, 11(1), e041479. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-041479>
- Walker, A. K., Spiller, K. J., Ge, G., Zheng, A., Xu, Y., Zhou, M., Tripathy, K., Kwong, L. K., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2015). Functional recovery in new mouse models of ALS/FTLD after clearance of pathological cytoplasmic TDP-43. *Acta Neuropathologica*, 130(5), 643-660. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1460-x>
- Wang, M.-D., Little, J., Gomes, J., Cashman, N. R., & Krewski, D. (2017). Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology*, 61, 101-130. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.06.015>
- Wang, R., & Zhang, D. (2005). Memantine prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *The European Journal of Neuroscience*, 22(9), 2376-2380. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04431.x>
- Witzel, S., Maier, A., Steinbach, R., Grosskreutz, J., Koch, J. C., Sarikidi, A., Petri, S., Günther, R., Wolf, J., Hermann, A., Prudlo, J., Cordts, I., Lingor, P., Löscher, W. N., Kohl, Z., Hagenacker, T., Ruckes, C., Koch, B., Spittel, S., ... German Motor Neuron Disease Network (MND-NET). (2022). Safety and Effectiveness of Long-term Intravenous Administration of Edaravone for Treatment of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurology*, 79(2), 121-130. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.4893>
- Wong, C., Dakin, R. S., Williamson, J., Newton, J., Steven, M., Colville, S., Stavrou, M., Gregory, J. M., Elliott, E., Mehta, A. R., Chataway, J., Swingler, R. J., Parker, R. A., Weir, C. J., Stallard, N., Parmar, M. K. B., Macleod, M. R., Pal, S., & Chandran, S. (2022). Motor Neuron Disease Systematic Multi-Arm Adaptive Randomised Trial (MND-SMART): A multi-arm, multi-stage, adaptive, platform, phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial of repurposed drugs in motor neuron disease. *BMJ Open*, 12(7), e064173. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-064173>
- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W., & Price, D. L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, 14(6), 1105-1116. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90259-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90259-7)
- Writing Group & Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group. (2017). Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis : A randomised, double-

- blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Neurology*, 16(7), 505-512. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30115-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30115-1)
- Yu, Y., Su, F.-C., Callaghan, B. C., Goutman, S. A., Batterman, S. A., & Feldman, E. L. (2014). Environmental risk factors and amyotrophic lateral sclerosis (ALS): A case-control study of ALS in Michigan. *PloS One*, 9(6), e101186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101186>
- Zeng, Q., Shen, J., Chen, K., Zhou, J., Liao, Q., Lu, K., Yuan, J., & Bi, F. (2020). The alteration of gut microbiome and metabolism in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69845-8>
- Zhao, J., Wang, X., Huo, Z., Chen, Y., Liu, J., Zhao, Z., Meng, F., Su, Q., Bao, W., Zhang, L., Wen, S., Wang, X., Liu, H., & Zhou, S. (2022). The Impact of Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, 11(13), 2049. <https://doi.org/10.3390/cells11132049>
- Zhou, W., Bercury, K., Cumiskey, J., Luong, N., Lebin, J., & Freed, C. R. (2011). Phenylbutyrate up-regulates the DJ-1 protein and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 14941-14951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211029>
- Zhou, Y., Liu, S., Oztürk, A., & Hicks, G. G. (2014). FUS-regulated RNA metabolism and DNA damage repair: Implications for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia pathogenesis. *Rare Diseases (Austin, Tex.)*, 2, e29515. <https://doi.org/10.4161/rdis.29515>
- Zhu, Y.-B., & Sheng, Z.-H. (2011). Increased axonal mitochondrial mobility does not slow amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease in mutant SOD1 mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 23432-23440. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237818>
- Zoccolella, S., Bendotti, C., Beghi, E., & Logroscino, G. (2010). Homocysteine levels and amyotrophic lateral sclerosis: A possible link. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 11(1-2), 140-147. <https://doi.org/10.3109/17482960902919360>
- Zuccaro, E., Piol, D., Basso, M., & Pennuto, M. (2021). Motor Neuron Diseases and Neuroprotective Peptides: A Closer Look to Neurons. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 723871. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.723871>

WEBOGRAPHIE

- [1] *Bienvenue à l'Institut du Cerveau.* (s. d.). Institut du Cerveau. Consulté 20 juillet 2023, à l'adresse <https://institutducerveau-icm.org/fr/>
- [2] *Association pour la recherche sur la SLA - ARSLA.* (s. d.). Association pour la recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique. Consulté 20 juillet 2023, à l'adresse <https://www.arsla.org/>
- [3] *PNDS SLA, HAS 2015.* (s. d.). Consulté 20 juillet 2023, à l'adresse https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-11/pnds-sclerose_laterale_amyotrophique_sla.pdf
- [4] *Dévoiler les mécanismes de l'homéostasie des protéines pour une durée de vie prolongée.* (s. d.). CORDIS | European Commission. Consulté 20 juillet 2023, à l'adresse <https://cordis.europa.eu/article/id/191023-unravelling-protein-homeostasis-mechanisms-for-increased-lifespan/fr>
- [5] *Pnds_genetique_sla_10_2021_final.pdf.* (s. d.). Consulté 16 août 2023, à l'adresse https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-12/pnds_genetique_sla_10_2021_final.pdf
- [6] *Situation d'urgence.* (s. d.). Portail SLA. Consulté 14 août 2023, à l'adresse <https://portail-sla.fr/situation-urgence-sla/>
- [7] Ohio, E. T., PharmD, BCPS, BCACP Assistant Professor of Pharmacy Practice University of Findlay College of Pharmacy Findlay. (s. d.). *Pharmacist Considerations for Treating Patients With ALS.* Consulté 11 août 2023, à l'adresse <https://www.uspharmacist.com/article/pharmacist-considerations-for-treating-patients-with-als>
- [8] *Rilutek, INN Riluzole.* (s. d.). Consulté 20 juillet 2023, à l'adresse https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/rilutek-epar-summary-public_fr.pdf
- [9] *Withdrawal-assessment-report-radicava_en.pdf.* (s. d.). Consulté 11 août 2023, à l'adresse https://www.ema.europa.eu/en/documents/withdrawal-report/withdrawal-assessment-report-radicava_en.pdf
- [10] *A 40-week Phase 2B Randomized, Multicenter, Double-blind, Placebo-controlled Study Evaluating the Safety and Efficacy of Memantine in Amyotrophic Lateral Sclerosis.* (s. d.). Consulté 8 août 2023, à l'adresse <https://www.aan.com/MSA/Public/Events/AbstractDetails/54463>

- [11] *KS H: Redox-enhancing nanocatalysis improves motor... - Google Scholar.* (s. d.). Consulté 9 août 2023, à l'adresse https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Redox-enhancing+nanocatalysis+improves+motor+neuron+survival+in+vitro+and+SOD1+mouse+motor+function+and+survival+in+vivo&publication_year=2019&
- [12] *ANX005 | ALZFORUM.* (s. d.). Consulté 6 septembre 2023, à l'adresse <https://www.alzforum.org/therapeutics/anx005>
- [13] *Pipeline—Annexon Biosciences.* (s. d.). Consulté 6 septembre 2023, à l'adresse <https://annexonbio.com/pipeline/>
- [14] *Pipeline | Kadimastem.* (s. d.). Kadimastem New. Consulté 10 août 2023, à l'adresse <https://www.kadimastem.com/pipe-line>
- [15] *uniQure.* (s. d.). *Research Programs | Programs & Pipeline.* UniQure. Consulté 10 août 2023, à l'adresse <https://www.uniquire.com/programs-pipeline/research-programs>
- [16] *The ALS Association : Dedicated to Finding a Cure for ALS.* (s. d.). The ALS Association. Consulté 21 juillet 2023, à l'adresse <https://www.als.org/>

ANNEXES

Annexe 1 : Critères de diagnostic de Gold Coast.

Criteria for diagnosis of ALS.

-
1. Progressive motor impairment documented by history or repeated clinical assessment, preceded by normal motor function, **and**
 2. Presence of **upper**¹ and **lower**² motor neuron dysfunction in at least 1 **body region**³, (with upper and lower motor neuron dysfunction noted in the same body region if only one body region is involved) or lower motor neuron dysfunction in at least 2 body regions, **and**
 3. **Investigations**⁴ excluding other disease processes
-

Footnotes:

¹Upper motor neuron dysfunction implies at least one of the following:

1. Increased deep tendon reflexes, including the presence of a reflex in a clinically weak and wasted muscle, or spread to adjacent muscles
 2. Presence of pathological reflexes, including Hoffman sign, Babinski sign, crossed adductor reflex, or snout reflex.
 3. Increase in velocity-dependent tone (spasticity)
 4. Slowed, poorly coordinated voluntary movement, not attributable to weakness of lower motor neuron origin or Parkinsonian features
-

²Lower motor neuron dysfunction in a given muscle requires **either**:

Clinical examination evidence of

Muscle weakness, **and**

Muscle wasting

or

EMG abnormalities that must include:

Both evidence of chronic neurogenic change, defined by large motor unit potentials of increased duration and/or increased amplitude, with polyphasia and motor unit instability regarded as supportive but not obligatory evidence.

And evidence of ongoing denervation including

Fibrillation potentials or positive sharp waves, or

fasciculation potentials

³Body regions are defined as bulbar, cervical, thoracic and lumbosacral. To be classified as an involved region with respect to lower motor neuron involvement, there must be abnormalities in two limb muscles innervated by different roots and nerves, or one bulbar muscle, or one thoracic muscle either by clinical examination or by EMG.

⁴The appropriate investigations depend on the clinical presentation, and may include nerve conduction studies and needle EMG, MRI or other imaging, fluid studies of blood or CSF, or other modalities as clinically necessary.

Annexe 2: ALSFRS-R - une échelle d'évaluation de la sclérose latérale amyotrophique fonctionnelle incorporant des évaluations de la fonction respiratoire (« Eदारavone in Amyotrophic Lateral Sclerosis—Lessons from the Clinical Development Program and the Importance of a Strategic Clinical Trial Design », 2018).

Item	Scoring criteria
1. Speech	4 Normal speech process 3 Detectable speech disturbance 2 Intelligible with repeating 1 Speech combined with non-vocal communication 0 Loss of useful speech
2. Salivation	4 Normal 3 Slight but definite excess of saliva in mouth; may have nighttime drooling 2 Moderately excessive saliva; may have minimal drooling (during the day) 1 Marked excess of saliva with some drooling 0 Marked drooling; requires constant tissue or handkerchief
3. Swallowing	4 Normal eating habits 3 Early eating problems – occasional choking 2 Dietary consistency changes 1 Needs supplement tube feeding 0 NPO (exclusively parenteral or enteral feeding)
4. Handwriting	4 Normal 3 Slow or sloppy, all words are legible 2 Not all words are legible 1 Able to grip pen, but unable to write 0 Unable to grip pen
5a. Cutting food and handling utensils*	4 Normal 3 Somewhat slow and clumsy, but no help needed 2 Can cut most foods (>50%), although slow and clumsy; some help needed 1 Food must be cut by someone, but can still feed slowly 0 Needs to be fed
5b. Cutting food and handling utensils	4 Normal 3 Clumsy, but able to perform all manipulation independently 2 Some help needed with closures and fasteners 1 Provides minimal assistance to caregiver 0 Unable to perform any aspect of task
6. Dressing and hygiene	4 Normal function 3 Independent and complete self-care with effort or decreased efficiency 2 Intermittent assistance or substitute methods 1 Needs attendant for self-care 0 Total dependence

Item	Scoring criteria
7. Turning in bed and adjusting bed clothes	4 Normal function 3 Somewhat slow and clumsy but no help needed 2 Can turn alone, or adjust sheets, but with great difficulty 1 Can initiate, but not turn or adjust sheets alone 0 Helpless
8. Walking	4 Normal 3 Early ambulation difficulties 2 Walks with assistance 1 Non-ambulatory functional movement 0 No purposeful leg movement
9. Climbing stairs	4 Normal 3 Slow 2 Mild unsteadiness or fatigue 1 Needs assistance 0 Cannot do
10. Dyspnea	4 None 3 Occurs when walking 2 Occurs with one or more of the following: eating, bathing, dressing 1 Occurs at rest: difficulty breathing when either sitting or lying 0 Significant difficulty: considering using mechanical respiratory support
11. Orthopnea	4 None 3 Some difficulty sleeping at night due to shortness of breath, does not routinely use more than two pillows 2 Needs extra pillows in order to sleep (more than two) 1 Can only sleep sitting up 0 Unable to sleep without mechanical assistance
12. Respiratory insufficiency	4 None 3 Intermittent use of BiPAP 2 Continuous use of BiPAP during the night 1 Continuous use of BiPAP during the day and night 0 Invasive mechanical ventilation by intubation or tracheotomy

*Patients without G-tube – use 5b if >50% is though G-tube.
 **Patients with G-tube – 5b is used if the patient has a G-tube and only if it is the primary method (>50%) of eating.
 ADL = activities of daily living; BiPAP = Bilevel Positive Airway Pressure;
 G-tube = gastrostomy tube; NPO = nothing by mouth.
 Reproduced with permission from Cedarbaum et al., 1999.²⁸

Annexe 3: Score neurologique.

Neurological Score

Regardless of which neurological scoring system is used, scores should be assessed for both hind legs. The example neurological scoring system below employs a scale of zero to four developed by ALSTDI. Example criteria used to assign each score under this system (see accompanying video for visual demonstration of scoring system) are:

Score Criteria

- Score of 0: Full extension of hind legs away from lateral midline when mouse is suspended by its tail, and mouse can hold this for two seconds, suspended two to three times.
- Score of 1: Collapse or partial collapse of leg extension towards lateral midline (weakness) or trembling of hind legs during tail suspension.
- Score of 2: Toes curl under at least twice during walking of 12 inches, or any part of foot is dragging along cage bottom/table*.
- Score of 3: Rigid paralysis or minimal joint movement, foot not being used for generating forward motion.
- Score of 4: Mouse cannot right itself within 30 seconds after being placed on either side.

*If one hind leg is scored as 2, food pellets are left on bedding. If both hind legs are scored as 2, Nutra-Gel® (Bio-Serve #S4798) is provided as food in addition to food pellets on bedding and a long sipper tube is placed on the water bottle.

Grille de suivi des modèles

Rédacteurs : Anthony Deust et Romain Thebeaud

Score clinique composite

Paralysie musculaire	Score
Normal	0
Parésie d'un ou des membres postérieurs	1
Paralysie d'un membre postérieur	2
Paralysie des deux membres postérieurs	3
Score paralysie musculaire	

Apparence	Score
Normal, perte de poids <5%	0
Perte de poids 5% - 10%	1
Perte de poids 11% - 15%	2
Perte de poids 16% - 20%	3
Perte de poids 21% - 25%	4
Perte de poids > 25%	Point Limite
Absence de toilettage	1
Pli cutané (déshydratation)	1
Tachypnée	1
Bossue (hunchback)	1
Abondance de mucus au niveau des yeux	1
Score apparence	

Comportement	Score
Mobilité normale	0
Mobilité altérée	1
Mobilité difficile	2
Immobilité persistante > 24h	Point limite
Score comportement	

SCORE TOTAL (= somme scores paralysie musculaire + apparence + comportement ; maximum 14)	
--	--

Annexe

Actions mises en place en fonction du score total

Score Total	Actions mises en place
0 – 1	Continuer la surveillance
2 – 3	Nourriture / gel humidifié dans la cage
4 – 7	Nourriture / gel humidifié dans la cage + augmentation de la fréquence de surveillance
8 – 9	Nourriture / gel humidifié dans la cage + augmentation de la fréquence de surveillance + discussion de la conduite à tenir avec un membre de la structure du bien-être animal
>9	Point limite (mise à mort)

RÉSUMÉ

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), également connue sous le nom de maladie de Charcot ou de maladie de Lou Gehrig, est une maladie neurodégénérative dévastatrice affectant les motoneurones du système nerveux central. Cette pathologie se manifeste par une atrophie musculaire progressive conduisant à la paralysie et finalement au décès dans les 2 à 3 ans suivant le diagnostic. Malheureusement, il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour la SLA, et les options thérapeutiques sont limitées.

Des efforts de recherche visant à développer de nouvelles thérapies pour la SLA sont encore nécessaires. Un défi majeur réside dans la traduction des résultats de modèles animaux en succès cliniques. Pour pallier ce manque de translation, des modèles sont encore en développement et des conditions optimales d'utilisation doivent être définies.

Le modèle murin transgénique SOD1-G93A a été sélectionné pour développer une biomolécule potentiellement efficace contre la SLA. Ce modèle a été choisi en raison de sa similitude avec la forme agressive de la maladie observée chez les patients atteints de SLA. Des expériences ont été menées pour mettre en place un plan expérimental robuste. Ces efforts ont permis de valider l'utilité de ce modèle pour des études précliniques visant à évaluer l'efficacité d'une biomolécule dans le traitement de la SLA.

En conclusion, la SLA demeure une maladie complexe nécessitant une recherche continue pour développer de nouvelles thérapies. L'utilisation de modèles animaux appropriés peut contribuer à la compréhension des mécanismes de la maladie et à l'optimisation des approches thérapeutiques. Le projet « Neurovita-SLA » s'inscrit dans cette perspective, visant à évaluer les propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires d'une biomolécule dans l'espoir de ralentir la progression de la SLA.

Mots-clés : Sclérose latérale amyotrophique ; Maladie neurodégénérative ; Modèle préclinique ; Développement thérapeutique ; SOD1-G93A ; Plan expérimental



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens,

De coopérer avec les autres professionnels de santé.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

Signature de l'étudiant

Nom :

Prénom :

du Président du jury

Nom :

Prénom :