

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES, TECHNOLOGIES

INSERM U 930 « IMAGERIE ET CERVEAU » ÉQUIPE 2 « GÉNÉTIQUE »

THÈSE présentée par :

Julien PRALINE

soutenue le : 16 décembre 2009

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé / Génétique

**Génétique des formes sporadiques de
sclérose latérale amyotrophique**

THÈSE dirigée par :

Mr ANDRÉS Christian

Professeur des Universités, Université François-Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Mr DESNUELLE Claude

Professeur des Universités, Université Sophia Antipolis, Nice

Mr LOEFFLER Jean-Philippe

Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

JURY :

Mr MEININGER Vincent

Professeur des Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Mr CORCIA Philippe

HDR, Praticien Hospitalier, Université François-Rabelais, Tours

Remerciements

Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une atteinte des neurones moteurs spinaux et corticaux. Le handicap moteur d'aggravation progressive est associé à une dénutrition et une insuffisance respiratoire conduisant au décès en quelques années. Les formes familiales représentent 10% des cas avec le plus souvent un mode de transmission autosomique dominant. Dans les formes sporadiques (SLAS), l'étiologie demeure inconnue et en raison des similitudes phénotypiques avec les formes familiales, l'hypothèse d'une participation génétique dans le cadre d'un modèle de maladie complexe est envisagée. Ainsi, différents gènes de susceptibilité ont été proposés dans la SLAS, avec des polymorphismes pouvant influencer sur le risque de SLA ou sur des paramètres cliniques comme la durée d'évolution, la forme clinique ou l'âge de début.

Notre travail porte sur deux gènes de susceptibilité dans la SLA sporadique : le gène de l'Apolipoprotéine E (APOE) et le gène impliqué dans l'hémochromatose familiale de type 1 (HFE). Les données récentes sur les modifications du métabolisme énergétique et en particulier du métabolisme des lipides font porter un regard nouveau sur le gène APOE déjà suspecté comme gène de susceptibilité. Notre étude confirme sur une population de 1482 patients atteints de SLA sporadique le lien entre allèle $\epsilon 4$ et la forme bulbaire de la maladie. De plus, les résultats apportent un élément nouveau puisque ce lien dépend du sexe car il n'est démontré que chez les hommes. Nous proposons une explication physiopathologique faisant intervenir le récepteur aux androgènes, particulièrement exprimé au niveau des motoneurones bulbaires.

Des données expérimentales et de recherche clinique font suspecter l'implication du fer dans la physiopathologie de la SLA. Le gène HFE, impliqué dans l'hémochromatose familiale de type 1, constitue donc un gène candidat. Notre étude sur 244 patients et 302 contrôles ne retrouve pas l'association entre le polymorphisme H63D et le risque de SLA sporadique notée dans d'autres populations. La présence de l'allèle D est plus fréquente chez les patients ayant l'âge de début le plus tardif. En revanche, dans notre cohorte, l'allèle Y du polymorphisme C282Y semble exercer un effet protecteur vis-à-vis de la SLA. Ces données sont discutées dans le contexte de l'hypothèse physiopathologique du stress oxydant.

Nos résultats, grâce à l'étude d'une grande cohorte et à la prise en compte de facteurs cliniques et démographiques multiples, apportent des éléments sur les facteurs de risque ou de modification de la SLAS. Ces données seront utiles pour stratifier les patients dans des essais thérapeutiques et apportent des informations sur la physiopathologie de cette maladie d'évolution toujours fatale.

Mots-clés : Sclérose Latérale Amyotrophique, Apolipoprotéine E, Hémochromatose familiale, HFE, Génétique, Biologie Moléculaire

Résumé en anglais

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease which involves spinal and cortical motor neurons. Motor disability is associated with malnutrition and respiratory insufficiency. After progressive worsening, this disease leads to death within few years. Familial forms concerns 10% of cases, with usually a dominant autosomic transmission. The cause of sporadic cases (SALS) remains unknown but the similarities between familial and sporadic phenotypes lead to suggest a genetic participation in a model of complex disease. Thus, several susceptibility genes have been studied in SALS and their polymorphisms can be at risk of ALS or modulate clinical parameters such as disease course, clinical form or age at onset.

Our work concerns two susceptibility genes for SALS : Apolipoprotein E gene (APOE) and the gene involved in familial hemochromatosis (HFE). Recent data on the modifications of energetic metabolism and particularly the lipid metabolism, led to a reappraisal of the APOE gene as a susceptibility factor for SALS. Our study including 1482 patients with SALS confirms a link between $\epsilon 4$ allele and bulbar-onset of the disease. Moreover, our results provide a new finding, as we show that this link is gender-dependent only present in men. We suggest a pathophysiological explanation with a role for the androgen receptor which is particularly abundant in motor neurons of the brainstem.

Experimental and clinical data support the role of iron in the pathophysiology of ALS. Consequently, the HFE gene, involved in familial hereditary hemochromatosis, is a candidate gene for SALS. Our study about 244 patients and 302 controls did not find any association between the H63D polymorphism and SLAS, which has previously been showed. The D allele is more frequently present in patients who have an older age at onset. However, the Y allele of the C282Y polymorphism seems to exert a protective effect against SALS. We discuss these data within the pathophysiological hypothesis of oxidative stress in ALS.

Considering a large sample of ALS patients and taking into account several clinical and demographic features, our results provide some precisions on genetic risk and modulating factors of SALS. These data could be useful to understand the pathophysiology of this fatal disease and to stratify patients in clinical trials.

Key-words : Amyotrophic lateral sclerosis, Apolipoprotein E, Hereditary hemochromatosis, HFE, Genetics

Table des matières

Remerciements.....	3
Résumé.....	4
Résumé en anglais.....	6
Table des matières.....	8
Liste des tableaux.....	12
Liste des figures	13
Introduction.....	14
Première partie La Sclérose Latérale Amyotrophique.....	16
Aspects cliniques	17
Signes cliniques caractéristiques.....	17
Atteinte du neurone moteur central.....	17
Atteinte du neurone moteur périphérique.....	17
Signes cliniques inhabituels.....	18
Formes cliniques	20
Forme à début spinal.....	20
Formes à début bulbaire.....	20
Autres formes cliniques	21
Évolution et pronostic	23
Critères diagnostiques consensuels.....	24
Épidémiologie	26
Incidence	26
Prévalence	27
Mortalité.....	28
Facteurs de risque	28
Anatomopathologie.....	34
Neurone moteur central – Cortex moteur	34
Neurone moteur périphérique	35
Autres lésions du système nerveux central	39
Muscle.....	41
Physiopathologie.....	43
Hypothèses étiopathogéniques.....	43
Hypothèse infectieuse.....	43

Hypothèse immunologique	44
Hypothèse toxique	44
Hypothèse génétique	45
Mécanismes physiopathologiques	46
Radicaux libres oxygénés et stress oxydant.....	48
Excitotoxicité et glutamate.	48
Altération du cytosquelette et du transport axonal, agrégation protéique.	50
Atteinte mitochondriale.	51
Phénomènes inflammatoires et activation microgliale.	51
Apoptose.	52
Facteurs de croissance et hypoxie.....	53
Deuxième partie Génétique de la sclérose latérale amyotrophique	56
Les études génétiques	57
Étude de liaison.....	57
Étude d'association.	58
Cas particulier des études d'association génome entier (genome-wide association studies GWAS).	59
Génétique des formes familiales.....	60
Gène de la SOD1 (ALS1)	60
Gène de l'Alsine (ALS 2)	62
Gène de la senataxine (ALS 4)	63
ALS 5.....	63
Gène FUS (ALS 6).....	63
Gène VAPB (ALS 8)	64
Gène ANG (ALS 9)	64
Gène TARDBP (ALS 10).....	64
Gène FIG4 (ALS 11)	65
Autres gènes dans les formes familiales	65
Cas particulier des SLA avec démence frontotemporale.	65
Génétique des formes sporadiques.....	68
Gènes impliqués dans des pathologies neurodégénératives.....	68
Gène SOD1	68
Gène APOE.....	69
Gène SMN	69

Autres gènes.....	70
Gènes intervenant dans des mécanismes physiopathologiques	70
Hypoxie- Gènes VEGF et ANG	70
Transport axonal - Gènes des neurofilaments.....	71
Hypothèse toxique - Gène PON.....	72
Stress oxydant – Fer - Gène HFE	72
Autres gènes de susceptibilité.....	72
Études génome-entier.....	73
Troisième partie Systèmes candidats étudiés.....	74
HFE et métabolisme du fer	75
Métabolisme physiologique.....	75
Facteurs de régulation dans l’homéostasie du fer.....	78
HFE.....	78
IRP (iron regulatory proteins).....	79
Hepcidine.....	79
Métabolisme du fer dans la SLA.....	80
Métabolisme des lipides et SLA	82
Métabolisme physiologique	82
Classification des lipides.....	82
Transport des lipides, rôle des lipoprotéines.....	83
Les apolipoprotéines.....	86
L’apolipoprotéine E : une apolipoprotéine particulière.....	89
Métabolisme des lipides dans la SLA.....	93
Quatrième partie Étude des gènes de susceptibilité dans les formes sporadiques de sclérose latérale amyotrophique.....	94
Introduction.....	95
APOE ε4 increases the risk of bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis in men.	97
Subjects and methods.....	100
Subjects.....	100
Genotyping.....	101
APOE alleles as susceptibility factors for SALS.....	101
APOE alleles as modifying factors of the disease.....	101
Statistical analysis.....	101
Review of previously published studies.....	102

Results.....	102
APOE alleles as susceptibility factors for SALS.....	102
APOE alleles as modifying factors of the disease	104
Review of previously published studies.	109
Discussion.....	112
Gène HFE et SLA sporadique.....	115
Patients et Méthode.....	116
Population.	116
Genotypage.	116
Analyse statistique.	117
Résultats.....	117
Discussion.....	120
Cinquième partie Discussion	122
Conclusion	127
Résumé.....	164
Résumé en anglais.....	164

Liste des tableaux

Tableau 1. Critères diagnostiques de SLA (critères d'El Escorial révisés).....	25
Tableau 2. Facteurs de risque suspectés ou identifiés pour la SLA.....	31
Tableau 3. Inclusions en anatomopathologie.....	42
Tableau 4. Répertoire des gènes et loci identifiés dans les SLA familiales.	61
Tableau 5. Répertoire des gènes et loci identifiés dans les SLA familiales avec démence frontotemporale.....	67
Tableau 6. Classification et caractéristiques des lipoprotéines plasmatiques.....	84
Tableau 7. Les différentes apolipoprotéines et leur fonction.....	88
Tableau 8. Genotypes and alleles frequencies of the <i>APOE</i> gene in SALS and control groups.....	103
Tableau 9. Alleles frequencies of the <i>APOE</i> gene in SALS sub-groups defined by the number of SMN1 gene copies.....	104
Tableau 10. Modifying factors for site-of-onset: results of univariate and multivariate analyses (N=1482).	105
Tableau 11. Modifying factors for site-of-onset: results of univariate and multivariate analyses in each gender group (N=1482).	106
Tableau 12. Results of previously published studies about $\epsilon 4$ allele as susceptibility factor for SALS.	110
Tableau 13. Results of previously published studies about $\epsilon 4$ allele as site of onset modifying factor in SALS.....	111
Tableau 14. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles C et Y du polymorphisme C282Y du gène HFE pour patients et contrôles.....	118
Tableau 15. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles H et D du polymorphisme H63D du gène HFE pour patients et contrôles.	118
Tableau 16. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles C et Y du polymorphisme C282Y du gène HFE comparés selon la forme clinique.....	118
Tableau 17. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles H et D du polymorphisme H63D du gène HFE comparés selon la forme clinique.....	119
Tableau 18. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles C et Y du polymorphisme C282Y du gène HFE comparés selon l'âge de début de la maladie.	119
Tableau 19. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles H et D du polymorphisme H63D du gène HFE comparés selon l'âge de début.	120

Liste des figures

Figure 1. Coupe de moelle épinière, patient SLA.....	35
Figure 2. Inclusion skein-like.	36
Figure 3. Corps de Bunina.	37
Figure 4. Corps de Lewy.....	38
Figure 5. Gonflement axonal.	39
Figure 6. Conglomérat hyalinique.	39
Figure 7. Mécanismes physiopathologiques.	47
Figure 8. Transport du fer et sa régulation.....	77
Figure 9. Gène HFE et place des mutations étudiées.....	78
Figure 10. Réaction de Fenton.	80
Figure 11. Composition d'une lipoprotéine.	83
Figure 12. Distribution et fonction des lipoprotéines.	85
Figure 13. Gène de l'apolipoprotéine E et les trois isoformes.....	90
Figure 14. Structure de la protéine ApoE.	91
Figure 15. Distribution of $\epsilon 4$ carriers between bulbar and limb onset in male and female ALS patients.....	107
Figure 16. Kaplan-Meier curves used to compare duration of disease in several groups of patients.	108
Figure 17. Action inhibitrice de APOE4 sur le récepteur aux androgènes des neurones moteurs bulbaires chez les hommes.....	125

Introduction

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une atteinte quasi-sélective des neurones moteurs spinaux et corticaux. Décrite pour la première fois par JM Charcot en 1869, cette maladie reste aujourd'hui incurable et d'évolution toujours fatale. Elle cause une faiblesse musculaire progressive qui conduit à un handicap moteur majeur et une insuffisance respiratoire.

Le diagnostic de SLA est posé sur des critères cliniques et il n'existe pas de marqueur diagnostique spécifique de cette maladie. Dans environ 10% des cas, la maladie est familiale (SLAF) avec un mode de transmission le plus souvent autosomique dominant. La découverte de mutations du gène SOD1 (codant la superoxyde dismutase 1) en 1993, a donné un élan considérable dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques qui conduisent à la dégénérescence des neurones moteurs. Ces mutations expliquent 15 à 20% des formes familiales autosomiques dominantes. Des mutations sur plusieurs autres gènes ont été rapportées depuis.

Les formes sporadiques représentent 90% des cas de SLA. Les similitudes phénotypiques et évolutives entre SLAF et SLA sporadique (SLAS) ont étayé l'hypothèse d'une participation génétique dans les formes sporadiques, dans le cadre d'un modèle de maladie complexe. Ainsi, différents gènes de susceptibilité ont été identifiés dans la SLAS, avec des allèles de risque de SLA ou associés à des paramètres cliniques comme la durée d'évolution, la forme clinique ou la durée de survie.

Après une présentation générale de la SLA, nous décrivons les systèmes candidats étudiés dans le cadre de ce travail avant d'exposer les résultats de nos études. La mise en évidence de modifications du métabolisme lipidique dans la SLA suggère naturellement un regain d'intérêt pour le gène APOE, suspecté initialement en raison de ses liens avec d'autres maladies neurodégénératives. D'autre part, quelques études montrent une altération du métabolisme du fer et l'identification du gène HFE (impliqué dans l'hémochromatose familiale de type 1) comme gène de susceptibilité par certaines équipes nous a incité à examiner ce lien dans la population française de SLA.

Première partie

La Sclérose Latérale Amyotrophique

Aspects cliniques

Nous exposerons ici succinctement la présentation clinique habituelle de la SLA qui a conduit à l'élaboration de critères diagnostiques. Le mode de début et les caractéristiques évolutives diffèrent selon les patients, amenant à distinguer plusieurs formes cliniques. Enfin, des signes inhabituels peuvent se rencontrer et illustrent l'hétérogénéité clinique de cette maladie.

Signes cliniques caractéristiques

La maladie de Charcot se définit par une atteinte diffuse du neurone moteur central (NMC) et du neurone moteur périphérique (NMP) lentement évolutive. La diffusion des signes est établie sur la présence de signes dans 4 régions distinctes : bulbaire, cervicale, thoracique et lombosacrée.

Atteinte du neurone moteur central.

L'atteinte du NMc se manifeste par une raideur, une malhabileté à réaliser des gestes fins ou par une lenteur dans la réalisation de mouvements répétés. Cliniquement, elle se caractérise par une exagération des réflexes ostéo-tendineux (ROT), une augmentation du tonus musculaire mise en évidence par un accroissement du réflexe d'étirement, par un signe de Babinski et / ou de Hoffmann ou d'une exagération du réflexe massétéрин. L'atteinte du NMc est rarement un motif de consultation. La raideur est le symptôme initial dans 1,3 à 6% des cas seulement (Jokelainen, 1977; Gubbay et al., 1985).

Atteinte du neurone moteur périphérique.

L'atteinte du NMP est caractérisée cliniquement par la triade : déficit moteur-amyotrophie-fasciculations. La perte motoneuronale est responsable d'une réduction du nombre des unités motrices. Ceci conduit à une diminution de la force musculaire et à une amyotrophie témoin de la dénervation des fibres musculaires.

Le déficit musculaire témoigne habituellement d'une perte de plus de 50% des unités motrices. C'est un signe cardinal et l'un des signes d'appel le plus fréquent dans la SLA (58-63% des cas) (Jokelainen, 1977; Gubbay et al., 1985; Li et al., 1990). Il siège le plus souvent en distal aux membres supérieurs ou inférieurs. Il est volontiers asymétrique voire unilatéral au début aux membres supérieurs, répondant à une distribution plus segmentaire que tronculaire. Un début proximal est plus rare mais présent dans 10% des cas (Gubbay et al., 1985; Carosco et al., 1987).

Les fasciculations définissent des contractions musculaires involontaires sans déplacement, visibles sous la peau ressemblant à un frémissement de fibres musculaires de survenue anarchique, non rythmées. Elles sont l'un des éléments cliniques déterminants. Les fasciculations sont présentes dans plus de 90% des cas et tendent à diminuer avec l'évolution quand la fonte musculaire est importante (Ringel et al., 1993). Elles sont rarement douloureuses et ne reflètent pas l'évolutivité de la maladie. Les fasciculations témoignent d'une hyperexcitabilité des terminaisons des axones moteurs. Elles concernent les fibres musculaires issues de la même unité motrice. Elles sont favorisées par le froid et la percussion musculaire. Les fasciculations ne sont pas pathognomoniques de la SLA.

L'atrophie musculaire se caractérise dans la SLA par une fonte musculaire dans les territoires déficitaires. L'atteinte des loges thénariennes est responsable d'un aplatissement des mains tel que décrit par Aran et Duchenne. L'amyotrophie peut également toucher les muscles proximaux.

Les crampes font aussi partie des signes diagnostiques positifs dans la SLA. Comme les fasciculations, elles semblent résulter d'une hyperexcitabilité des axones moteurs en distalité. Elles sont rarement un symptôme initial isolé mais concernent plus de 50% des patients dont la maladie est installée avec, comme pour les fasciculations, une tendance à la diminution avec l'évolution de la maladie (Carosco et al., 1987).

Signes cliniques inhabituels

L'absence de troubles sensitifs, sphinctériens, oculomoteurs, cérébelleux et cognitifs fait théoriquement partie intégrante de la définition classique de la SLA. Néanmoins, il est possible de noter de tels signes neurologiques chez des patients atteints d'un tableau de SLA cliniquement indiscutable.

Ainsi, des troubles sensitifs subjectifs peuvent parfois être rapportés. Il s'agit alors de paresthésies ou de douleurs (Gregory et al., 1993). L'existence de troubles sensitifs objectifs reste exceptionnelle dans la SLA sporadique à la différence des formes familiales où l'existence de troubles sensitifs est admise.

Les muscles oculo-moteurs et des paupières sont habituellement épargnés dans la SLA. Des observations d'ophtalmoplégie plus ou moins complète chez des patients présentant une forme bulbaire ont été rapportées (Harvey et al., 1979; Mizutani et al., 1990). Le tableau peut être celui d'une paralysie supranucléaire (Hayashi et al., 1987). L'étude fine des saccades ou des mouvements de poursuite peut s'avérer anormale dans près de la moitié des cas (Leveille et al., 1982).

A l'image de la préservation anatomopathologique du noyau d'Onuf, il n'y a habituellement pas de troubles sphinctériens dans la SLA. Toutefois, quelques rares cas d'incontinence ont pu être observés (Jokelainen, 1977; Gubbay et al., 1985). Une impériosité mictionnelle liée à l'atteinte du NMC peut être alléguée par certains patients.

La présence de signes extra-pyramidaux a également été rapportée dans la SLA (Desai et Swash, 1999; Pradat et al., 2009). En dehors des observations de SLA-Parkinsonisme des îles de Guam, l'existence de signes parkinsoniens a été signalée chez des patients présentant un tableau de SLA typique (Desai et Swash, 1999). Les données anatomo-pathologiques confirment la possibilité d'une atteinte des noyaux gris centraux au cours d'une sclérose latérale amyotrophique cliniquement typique, avec ou sans manifestation extra-pyramidale associée. Ces lésions peuvent exister au niveau du striatum ou de la substantia nigra avec une atteinte des neurones dopaminergiques (Bertrand et Van Bogaert, 1925). Ces constatations ressortent renforcées par les études d'imagerie fonctionnelle en tomographie par émission de positons ou tomographie par émission monophotonique qui montrent une atteinte pré et post synaptique de la transmission dopaminergique cérébrale (Takahashi et al., 1993; Borasio et al., 1998; Vogels et al., 1999).

La prévalence des troubles cognitifs dans la SLA reste difficile à évaluer car elle varie en fonction des populations étudiées et des outils diagnostiques utilisés. Certains auteurs considèrent que 1/3 à 1/2 des patients atteints d'une forme sporadique de SLA auraient un déficit cognitif touchant essentiellement les fonctions exécutives (Massman et al., 1996; Lomen-Hoerth et al., 2003). Ces troubles restent discrets et essentiellement

identifiés lors d'utilisation de tests neuropsychologiques adaptés : Wisconsin Card Sorting Test, Trail Making Test, Tour de Londres, Test de Stroop (Massman et al., 1996; Frank et al., 1997; Abrahams et al., 2005). Le stade de démence est rarement atteint, sauf dans certains cas regroupés dans une forme particulière de SLA que nous détaillerons dans un paragraphe spécifique.

Formes cliniques

La présentation clinique habituelle de la SLA comporte deux principales formes de début : la forme bulbaire, débutant par l'atteinte des muscles glosso-pharyngiens et la forme spinale, qui commence par un déficit moteur d'un membre. Nous décrirons rapidement les autres formes cliniques, plus rares, qui peuvent constituer de véritables pièges cliniques.

Forme à début spinal

Elle est la plus fréquente, correspondant à 2/3 des cas de SLA. Au début, elle affecte le membre supérieur ou inférieur avec une fréquence identique. L'atteinte prédomine en distalité par une atteinte de la pince pouce-index aux membres supérieurs. Ce déficit s'accompagne rapidement d'une amyotrophie qui ne respecte aucune systématisation tronculaire et radiculaire. Cette amyotrophie prédomine ainsi sur la portion externe de la main touchant les muscles de la loge thénar et les interosseux et respectant, tout au moins au début, l'abducteur du V. Aux membres inférieurs, le déficit initialement correspond le plus souvent à un steppage compliqué d'une amyotrophie de la loge antéro-externe de la jambe responsable d'une proéminence du tibia.

Cette forme touche plus les hommes que les femmes et sa durée d'évolution est volontiers plus longue que celle de la forme bulbaire, 3,1 ans [intervalle de confiance 95% : 2,9-3,3] versus 2,4 ans [intervalle de confiance 95% : 2,1-2,6] (Testa et al., 2004).

Formes à début bulbaire.

Un début bulbaire est constaté dans environ 1/3 des cas (Argyriou et al., 2005). Les formes bulbaires sont plus fréquentes chez la femme, 45% contre 28% chez l'homme (Traynor et al., 2000). La présentation associe dysarthrie et dysphagie liées à une atteinte combinée du NMc et du NMp dans des proportions variables. L'absence de signes cliniques dans d'autres territoires est très rare.

Le pronostic est plus sombre que celui des formes spinales puisque la médiane de survie est de 22 contre 38 mois dans les formes spinales (Tysnes et al., 1994; Magnus et al., 2002; del Aguila et al., 2003).

Autres formes cliniques

Formes avec démence.

Une démence de type fronto-temporal est présente dans 3% des cas de SLA sporadique et 15% des SLA familiales (Lomen-Hoerth et Strong, 2006). Elle semble plus fréquente chez des sujets plus âgés et la présentation clinique est volontiers à prédominance bulbaire (Portet et al., 2001; Portet et al., 2001).

Ces formes avec démence initiale sont de plus mauvais pronostic. La médiane de survie de 1 à 2 ans est beaucoup plus courte que celle d'autres démences frontotemporales (Hodges et al., 2003).

Formes familiales

La présentation clinique des formes familiales a surtout été étudiée pour les SLAF liées à une mutation du gène SOD1. Même si elle est globalement similaire à celle des SLA sporadiques, quelques caractéristiques ont pu être notées. L'âge de début est plus précoce que pour les SLA sporadiques (46,9 ans en moyenne au lieu de 60 ans) ; les formes familiales à début bulbaire commencent plus tardivement que les formes spinales ; les patients ayant une mutation A4V (environ 50 % des familles en Amérique du Nord) ont une durée d'évolution beaucoup plus courte (médiane de survie : $1,4 \pm 0,9$ ans) (Cudkowicz et al., 1997). Cette mutation se caractérise aussi cliniquement par l'absence de signes d'atteinte du NMC (Cudkowicz et al., 1998). Enfin, d'autres mutations sont associées à une évolution particulièrement courte (A4T, H43R) ou longue (E100G, G37R, H46R).

Forme pseudo-polynévritique ou forme de Patrikios.

Cette forme trompeuse se caractérise par la présence de symptômes sensitifs subjectifs à type d'engourdissements ou de fourmillements qui précéderont l'installation d'un déficit moteur distal des membres inférieurs responsable d'un steppage. L'atteinte unilatérale au début va devenir bilatérale après avoir affecté la loge postérieure de la jambe

puis la cuisse. Il n'y a pas habituellement de signes cliniques en faveur d'une atteinte du neurone moteur central et l'évolution est classiquement plus lente.

Forme à début respiratoire.

Bien que l'atteinte respiratoire soit habituelle dans la SLA, ce mode de présentation inaugurale est rare, représentant moins de 3% des formes cliniques (Argyriou et al., 2005). Les symptômes respiratoires peuvent être soit des signes chroniques d'hypoventilation alvéolaire soit des signes de détresse aiguë amenant rapidement à l'utilisation d'une ventilation artificielle non invasive ou invasive.

Flail arm syndrome - Diplégie brachiale amyotrophiante - Forme spinale de Vulpian.

Le flail-arm syndrome (littéralement « bras qui battent dans tous les sens ») représenterait jusqu'à 10% des patients atteints d'une affection du motoneurone. L'atteinte du NMP se situe aux membres supérieurs où elle est responsable d'un déficit moteur et d'une amyotrophie de topographie proximale et symétrique. Un début aux membres inférieurs et la présence de signes bulbaires sont rares. L'atteinte du NMc est plus discrète et est présente dans la majorité des cas aux membres inférieurs (Hu et al., 1998). Cette affection se rencontre préférentiellement chez l'homme (sex ratio à 9:1 contre 1.5:1 pour la forme classique de SLA). L'âge de début est similaire à celui de la SLA mais son évolution a tendance à être plus longue que celle de la SLA (55 mois en moyenne contre 38 mois dans la SLA).

Atrophie musculaire progressive ou atteinte isolée du NMP

Le début est volontiers focal et asymétrique. L'extension se fait par des muscles contigus jusqu'à un tableau d'atteinte du NMP dans les territoires spinal et bulbaire. Cette forme se caractérise par une évolution variable. Certains patients ont une évolution rapide et fatale dans les deux ans. Dans ces cas, l'atteinte du NMc non visible cliniquement est prouvée anatomopathologiquement et l'affection de ce sous-groupe de patients est très proche de la SLA. Pour les patients ayant cette même présentation clinique mais avec une évolution très longue (> 10ans), aucune lésion anatomopathologique du NMc n'est retrouvé et l'utilisation du terme de SLA pour désigner ce type d'affection est débattue (Ince et al., 2003; Tsuchiya et al., 2004).

Forme hémiparalysique de Mills.

Ce mode de présentation est extrêmement trompeur. Elle se caractérise par un déficit moteur limité à un hémicorps affectant les deux neurones moteurs.

Évolution et pronostic

La SLA reste une affection au pronostic effrayable en raison d'une évolution toujours fatale. La médiane de survie est classiquement estimée à 3 ans (23 à 43 mois). Les différentes études ayant évalué l'histoire naturelle et la durée d'évolution de la maladie rapportent des résultats très variables en lien avec des méthodologies différentes notamment concernant les critères d'inclusion.

L'évolution du déficit moteur varie d'un sujet à l'autre tant au niveau de sa diffusion qu'au rythme de progression. Cependant, des caractéristiques constantes ont été notées ; par exemple, l'apparition de signes bulbaires est plus rapide chez les patients ayant une forme spinale qui a débuté aux membres supérieurs par rapport à ceux dont le début se situait aux membres inférieurs. D'autre part, en cas de début au membre inférieur, l'atteinte gagne le membre inférieur controlatéral puis le membre supérieur ipsilatéral pour diffuser ensuite au membre supérieur controlatéral et enfin au territoire bulbaire (Murray, 2006). Il existe tout de même des formes d'évolution lente. Vingt-cinq pour cent des SLA évoluent sur au moins 5 ans et environ 9,4% des SLA évoluent sur 10 ans au moins (Norris et al., 1993; Haverkamp et al., 1995) avec un exemple d'évolution sur plus de 44 ans (Grohme et al., 2001).

Nous avons déjà décrit les différences dans le mode évolutif selon la forme clinique. La présence d'une atteinte respiratoire restrictive, authentifiée par une réduction de la capacité vitale forcée est le meilleur indicateur prédictif en terme de survie (Ringel et al., 1993; Haverkamp et al., 1995; Chio et al., 2002). D'autres facteurs pronostiques ont été identifiés. L'âge de début est inversement corrélé à la survie (Chio et al., 2002; Forbes et al., 2004). Le sexe féminin a été associé à un mauvais pronostic (del Aguila et al., 2003) avec un risque plus élevé de forme bulbaire mais d'autres études rapportent des résultats contradictoires (Norris et al., 1993; Lee et al., 1995; Turner et al., 2003). La dénutrition multiplie le risque de décès par 7,4 et reste indépendante de la forme clinique (Desport et al., 1999). Un délai diagnostique court (quelques mois), reflétant l'évolution rapide d'une

présentation facilement identifiable, est lié à un mauvais pronostic (Tysnes et al., 1994; Haverkamp et al., 1995; Turner et Al-Chalabi, 2002; del Aguila et al., 2003).

Critères diagnostiques consensuels

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

Ces critères reposent sur la mise en évidence d'une atteinte du NMc et du NMp, d'évolution progressive dans une ou plusieurs des 4 régions anatomiques suivantes : bulbaire, cervicale, thoracique et lombaire. Ils comportent aussi des éléments négatifs afin d'exclure d'autres pathologies pouvant expliquer le tableau clinique. Enfin, en raison du caractère évolutif de la pathologie et afin de faciliter un diagnostic précoce à l'aide des critères consensuels, plusieurs niveaux de certitude diagnostique ont été définis. L'ensemble de ces critères est résumé dans le Tableau 1.

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

Signes présents	Signes absents
<ul style="list-style-type: none"> • Atteinte du NMp clinique, EMG ou anatomopathologique • Atteinte clinique du NMc 	<ul style="list-style-type: none"> • Signes cliniques ou EMG évoquant d'autres maladies qui peuvent expliquer les signes d'atteinte du NMc ou du NMp ou des deux
<ul style="list-style-type: none"> • Diffusion progressive des signes au sein d'une région ou extension à d'autres régions 	<ul style="list-style-type: none"> • Examens de neuro-imagerie mettant en évidence des anomalies susceptibles d'expliquer les signes cliniques et EMG
Niveaux de certitude	Caractéristiques
SLA définie	Signes d'atteinte du NMc et du NMp dans 3 régions spinales ou 2 régions spinales et la région bulbaire
SLA familiale définie (étayée par des examens paracliniques)	Signes d'atteinte du NMc et/ou du NMp dans au moins une région et une mutation SOD1 causale chez le patient index ou histoire familiale avec un individu présentant une mutation SOD1 causale
SLA probable	Signes d'atteinte du NMc et du NMp dans 2 régions au moins avec atteinte du NMc rostrale par rapport à celle du NMp
SLA probable étayée par des examens paracliniques	Signes d'atteinte du NMc et du NMp dans 1 région ou du NMc dans 1 région et NMp par ENMG dans au moins 2 membres
SLA possible	Signes d'atteinte du NMc et du NMp dans 1 région ou du NMc dans 2 régions ou du NMp rostrale par rapport à celle du NMc

Épidémiologie

L'Épidémiologie est une discipline scientifique qui étudie ce qui est relatif à la santé d'une population : maladies, conséquences des maladies, causes de mortalité et éléments de "bonne santé". Elle est utilisée pour agir sur la santé des populations, dans un souci d'évaluation des risques, de prévention et d'intervention.

Nous exposerons ici les caractéristiques épidémiologiques de la SLA (incidence, prévalence, sex ratio, mortalité) et les facteurs de risque que l'analyse de la population malade a permis de suspecter ou d'identifier.

Grâce aux études épidémiologiques, trois formes de SLA ont été identifiées : la forme sporadique, la forme familiale ou héréditaire et la forme du Pacifique Ouest ou complexe SLA-syndrome parkinsonien-démence.

Incidence

L'incidence d'une affection correspond au nombre de nouveaux cas diagnostiqués pendant un période donnée pour une population donnée. Le plus souvent, elle exprime le nombre de nouveaux cas diagnostiqués sur une année pour 100 000 habitants.

Les études sur l'incidence de la SLA sporadique apportent des chiffres allant de 0,86/100 000 à 2,4/100 000 habitants par an (Traynor et al., 1999; Preux et al., 2000; Mandrioli et al., 2003). L'incidence moyenne mondiale est estimée à 1,5/100 000 habitants par an. Les formes familiales représentent seulement 5 à 10% des SLA. L'incidence de la SLA est 20% à 60% plus élevée chez l'homme que chez la femme (Traynor et al., 1999; McGuire et Nelson, 2005; McGuire et Nelson, 2006). Le sex ratio peut donc être estimé à 1,5/1. Il varie avec l'âge: il tend de 1,7/1 chez les sujets jeunes à 1/1 à partir de 70 ans (Caroscio et al., 1987; Haverkamp et al., 1995). Dans les formes familiales, le sex ratio est de 1/1. L'incidence de la SLA augmente avec l'âge avec un pic entre 65 et 74 ans dans les études de population (McGuire et Nelson, 2006). Parmi les sujets de plus de 80 ans, l'incidence de la SLA s'élève à 7,5/100 000 habitants (Forbes et al., 2004). Les études épidémiologiques dans la SLA sporadique concernent essentiellement des populations de

caucasiens. Aussi, les données pour les autres groupes ethniques sont très éparées. Il semble que le taux d'incidence dans la population non caucasienne aux États-unis soit plus faible que dans la population caucasienne (McGuire et Nelson, 2006).

Il existe des zones où l'incidence est anormalement plus élevée. En effet, dans les îles de Guam et la péninsule de Kii au Japon, l'incidence de la SLA fut jusqu'à 50 fois supérieure à celle des régions occidentales avec des taux compris entre 50 et 100 pour 100 000 habitants par an (Kurland et Mulder, 1954; Kurland et Mulder, 1955; Yoshida et al., 1998). Cette forme de SLA, dite du Pacifique Ouest associée à l'atteinte du neurone moteur, un syndrome parkinsonien et une démence, formant ainsi le complexe de Guam. Ce nom a pour origine la première île où fut identifiée dans les années 1950 cette forme de maladie. Néanmoins, deux autres foyers ont été par la suite identifiés dans deux villages de la péninsule de Kii au Japon et dans une petite région de l'ouest de la Nouvelle Guinée.

De plus, deux études ont rapporté une incidence plus élevée que la moyenne dans la population de militaires de retour de la guerre du Golfe persique (Haley, 2003; Horner et al., 2003). Le risque de développer une SLA pour un vétéran de cette guerre serait deux fois supérieur à celui de la population générale.

Par ailleurs, l'augmentation globale de l'incidence constatée depuis ces trente dernières années pose question. Depuis les années 1960, l'incidence de la SLA a augmenté passant d'environ 1,3/100 000 habitants pour atteindre maintenant 2,5/100 000 en France (Preux et al., 2000). Plusieurs explications sont plausibles : reflet d'une meilleure détection des cas ou bien reflet d'une augmentation effective du nombre de cas liée en particulier au vieillissement de la population, le pic maximal d'incidence étant situé entre 55 et 75 ans (Norris et al., 1993), l'incidence augmentant avec le vieillissement de la population et les comorbidités actuellement mieux traitées ou troisième explication une vraie augmentation. Cette augmentation d'incidence pourrait être alors liée au développement de l'industrialisation au cours de cette période et ainsi plaide pour l'intervention de facteurs environnementaux.

Prévalence

L'autre marqueur épidémiologique important pour une maladie est la prévalence. La prévalence correspond au nombre de cas malades (nouveaux et anciens) à un instant donné.

La SLA ayant une durée d'évolution moyenne de 3 ans, la prévalence peut être estimée à trois fois le taux d'incidence dans une population. La prévalence moyenne est donc évaluée à 6/100 000 habitants (McGuire et Nelson, 2006) avec des variations selon les études allant de 2,6 (Bettoni et al., 1994) à 6,4/100 000 habitants (Murros et Fogelholm, 1983).

Mortalité

Le taux de mortalité correspond au nombre total de décès survenus pendant une période donnée dans une population définie. Le taux de mortalité dans la SLA est théoriquement similaire à l'incidence si on tient compte d'une durée d'évolution courte d'environ 3 ans. Les études rapportent globalement des chiffres plus faibles, en partie expliqués par une sous déclaration de la maladie sur les certificats de décès. Il oscille entre 0,5 à 2/100000 habitants (Scarpa et al., 1988; Gunnarsson et al., 1996). Le risque de mourir d'une SLA aux Etats-Unis pour un adulte est d'environ 1 pour 1000 décès (McGuire et Nelson, 2006).

Facteurs de risque

Un facteur de risque est un facteur qui augmente la probabilité de survenue d'une maladie. De très nombreuses études se sont intéressées à identifier les facteurs qui favoriseraient la survenue d'une SLA. Cependant, la plupart des études cas-témoins ont d'importantes limites méthodologiques. L'inclusion est rétrospective et concerne des patients décédés pour les quels le recueil de l'information est délicat. Lorsque des cas prévalents sont inclus, il est souvent difficile de clairement distinguer facteur de risque et facteur pronostique (c'est-à-dire influant sur la survie). Ces études posent aussi la question de la représentativité des cas inclus par rapport à la population générale de patients SLA. Enfin, le plus souvent, le nombre de cas inclus est faible, ne dépassant pas 100. Ainsi, les études de facteurs de risque dans la SLA ont très souvent rapporté des résultats contradictoires qu'il faut interpréter avec prudence.

Les principaux facteurs de risque reconnus à ce jour sont l'âge et le sexe masculin pour les formes sporadiques. Bien évidemment, la présence d'une histoire familiale augmente le risque de survenue d'une SLA, alors familiale. De même, l'appartenance à un foyer reconnu inscrit le sujet dans un risque et un contexte particulier (Tableau 2).

Les traumatismes physiques, plus spécifiquement les traumatismes osseux des membres semblent plus fréquents chez les patients SLA que dans la population générale avec un odds ratio variant de 1,3 à 10,0 (Kondo et Tsubaki, 1981; Gallagher et Sanders, 1987). L'association vaut surtout pour les fractures récentes (moins de 5 ans) et non pour une histoire polytraumatique ancienne (Chancellor et al., 1993; Cruz et al., 1999) tout en sachant que les patients non encore diagnostiqués peuvent être à risque de chute en raison d'un déficit moteur sub-clinique.

L'association entre exposition électromagnétique ou électrique professionnelle et la SLA a fait l'objet de plusieurs études et reste débattue (Li et Sung, 2003). Certaines rapportent un risque relatif de 2 à 3 (Johansen et Olsen, 1998; Savitz et al., 1998) alors que les autres ne trouvent pas d'association significative (Noonan et al., 2002; Feychting et al., 2003). Ces recherches ont fait suite à la publication d'études cas-témoins rapportant un risque élevé de SLA après choc électrique sévère (Gawel et al., 1983; Savettieri et al., 1991).

Pour certaines études, l'activité physique intense au cours du métier ou des loisirs est associée à un risque environ deux fois plus élevé de développer une SLA (Gunnarsson et Palm, 1984; Granieri et al., 1988). D'autres sont négatives (Armon et al., 1991; Longstreth et al., 1998). Plus récemment, un risque élevé de SLA a été suspecté chez des sportifs de haut niveau (Beghi et Mennini, 2004; Chio et al., 2005). Sur une série de 7325 footballeurs professionnels, Chio et coll. ont identifiés 5 cas de SLA et ce nombre est élevé au regard des taux d'incidence de la population générale (Chio et al., 2005). Néanmoins, une revue de la littérature conclut que la pratique du sport n'est probablement pas un facteur de risque de SLA, l'excès de cas rapportés dans les différentes études reposant essentiellement sur une mauvaise estimation du nombre de cas attendus dans la population générale (Armon, 2007). Une revue plus récente pointe aussi les insuffisances méthodologiques des études publiées et arrive à la même conclusion négative au sujet de l'activité physique comme facteur de risque de SLA (Harwood et al., 2009). Le risque observé et confirmé chez les footballeurs italiens serait donc limité à ce sport (Chio et al., 2009).

Parmi les facteurs toxiques, les métaux lourds, les solvants et les pesticides sont largement suspectés dans les maladies neurodégénératives.

L'exposition aux métaux lourds semble être un facteur de risque dans la SLA. Une maladie du motoneurone peut aussi survenir après une exposition au mercure comme le

soulignent quelques observations isolées associant SLA et exposition au mercure (Schwarz et al., 1996; Praline et al., 2007) et une étude en milieu professionnel (Currier et Haerer, 1968). La mesure des taux sériques apporte des résultats divergents selon les études (Pamphlett et al., 2001). Chez l'animal, plusieurs expériences ont montré la toxicité du mercure pour les motoneurones que ce soit après injection (Pamphlett et Waley, 1996) ou exposition à des vapeurs de mercure (Pamphlett et Coote, 1998).

Tableau 2. Facteurs de risque suspectés ou identifiés pour la SLA.

<i>Facteurs de risque identifiés</i>	
• Age	
• Mutations causales sur gènes identifiées avec transmission mendélienne	
• Sexe masculin	OR 1,2-1,4
• Histoire familiale de SLA	OR 3,0-4,0
• Foyers (Vétérans de la Guerre du Golfe, forme du Pacifique Ouest)	OR 2.0-50+
<i>Facteurs de risque possibles</i>	
• Exposition à des neurotoxiques	
Plomb	
Mercure	
Pesticides	
Solvants	
• Exposition professionnelle	
Electriciens	
Agriculteurs	
Ouvriers industriels	
• Traumatismes	
Traumatismes du squelette, fractures	
Choc électrique sévère (avec perte de connaissance)	
• Activité physique intense	
Travail manuel important	
Athlétisme	
• Habitudes de vie	
Tabagisme	
Mesures anthropométriques : poids et index de masse corporelle élevés	
• Régime alimentaire	
Consommation élevée de graisse (acides gras saturés > monoinsaturés)	
Consommation élevée de glutamate	
Faible consommation de fibres	

Selon McGuire et Nelson, 2006, OR : odds ratio

Habituellement, l'intoxication au plomb est responsable d'une atteinte neurogène périphérique mais d'anecdotiques observations ont fait état d'une atteinte du neurone moteur central dans des cas d'intoxications (Wilson, 1907). Il a été montré par certains auteurs que le risque de développer une SLA serait multiplié par 5,7 (Intervalle de confiance : 1,6-30) en cas d'exposition au plomb (Chancellor et al., 1993) et ce risque serait proportionnel au temps d'exposition (odds ratio à 1,9 (intervalle de confiance : 1.1-3.3) (Kamel et al., 2002). Néanmoins, des études plus récentes apportent des données contradictoires. Le plomb serait associé à une augmentation de la durée de survie chez des patients SLA et des souris transgéniques surexprimant SOD1 probablement par le biais d'une activation microgliale (Kamel et al., 2008).

Bar-Sela et al ont rapporté en 2001 un cas de SLA apparue chez un homme de 44 ans exposé pendant 9 ans dans un cadre professionnel au cadmium (Bar-Sela et al., 2001). La toxicité du cadmium serait liée à sa propriété de réduire la concentration de la superoxyde dismutase et de majorer ainsi l'excitotoxicité induite par le glutamate.

L'aluminium a également été suspecté dans la mesure où l'injection péri-neurale dans le nerf sciatique de lapins provoque des modifications structurelles dans la corne antérieure (Kihira et al., 1995), l'injection intrathécale chez le rat provoque une perte des motoneurons dose dépendante et l'apparition d'une dégénérescence neurofibrillaire dans la corne antérieure (Tanridag et al., 1999). Le manganèse pourrait également être incriminé ; la teneur en manganèse est augmentée dans la corne antérieure et le cordon latéral sur des prélèvements de moelles épinières de patients décédés d'une SLA (Miyata et al., 1983; Kihira et al., 1990). L'ensemble de ces données ponctuelles laisse cependant supposer au mieux un rôle anecdotique pour les métaux lourds dans les cas de SLA.

Les résultats des études épidémiologiques sur les solvants sont discordants. Certaines rapportent une multiplication du risque de SLA par 2 ou 3 en cas d'exposition aux solvants (Granieri et al., 1988; Savettieri et al., 1991; Chancellor et al., 1993) alors que d'autres sont négatives (Kondo et Tsubaki, 1981; Gunnarsson et al., 1991; Strickland et al., 1996).

L'observation d'une augmentation du risque de SLA chez les agriculteurs a conduit à l'hypothèse que les produits chimiques utilisés, entre autres les pesticides, pouvaient jouer un rôle dans la survenue de la maladie. Deux études trouvent une association statistiquement

significative (McGuire et al., 1997; Burns et al., 2001) alors que les résultats de deux autres études, moins précises quant au niveau d'exposition des sujets, sont négatifs (Deapen et Henderson, 1986; Savettieri et al., 1991).

Mc Guire et al. ont trouvé une association significative pour les hommes exposés aux produits chimiques agricoles avec un odds ratio de 2,5 (95% CI 1,2-5,1) (McGuire et al., 1997). Le risque était augmenté pour les niveaux d'exposition les plus élevés et pour l'exposition aux insecticides surtout. Le risque était également plus élevé pour une exposition aux produits chimiques agricoles remontant à 15-20 ans et pour une exposition supérieure à 3 ans. Avec une méthodologie totalement différente, l'étude de mortalité de Burns et al. portait sur 1500 employés entre 1945 et 1994 dans une entreprise fabriquant le 2,4-D ou agent orange, un herbicide (Burns et al., 2001). Alors que les auteurs recherchaient une association finalement négative avec le lymphome malin non Hodgkinien, ils ont trouvé 3 décès par SLA sur les 330 décès avec un risque relatif augmenté à 3,45 (intervalle de confiance à 95% : 1,1-11,1). Le petit nombre de cas exposés et le biais éventuel lié à l'interaction avec le travail physique intense des agriculteurs font interpréter les résultats avec prudence. Les pesticides dont la neurotoxicité est reconnue pourraient induire des lésions des neurones moteurs longtemps avant le déclenchement de la maladie et possiblement par l'intermédiaire d'un stress oxydatif. En effet, le paraquat, un herbicide, est utilisé comme inducteur de stress oxydatif dans des modèles SOD de SLA. Les souris transgéniques SOD traitées par le paraquat ont une détérioration motrice plus sévère que les souris SOD non traitées, démontrant le rôle pathologique des radicaux libres oxygénés (Peled-Kamar et al., 1997).

Les habitudes de vie ont peu été étudiées dans la SLA. Quelques études ont trouvé un risque augmenté chez les fumeurs de cigarette avec des odds ratio allant de 1,6 à 3,5 (Kamel et al., 1999; Nelson et al., 2000; Weisskopf et al., 2004). Les constituants chimiques toxiques des cigarettes et la formation de radicaux libres lors du métabolisme de ces constituants seraient deux possibles mécanismes explicatifs. La consommation excessive de graisse ou de glutamate ainsi qu'une alimentation pauvre en fibres ont été identifiés comme facteur de risque dans une étude analysant les apports détaillés en nutriments (Nelson et al., 2000). Une consommation importante de fruits et légumes est associée à un risque moindre de développer une SLA (Okamoto et al., 2009).

Anatomopathologie

L'analyse autopsique des premiers cas décrits permet de confirmer l'atteinte quasi-exclusive des neurones moteurs en mettant en évidence une perte neuronale. Depuis, la découverte d'inclusions intraneuronales caractéristiques a ouvert la voie dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques conduisant à la mort neuronale.

Une des difficultés d'interprétation des lésions anatomopathologiques réside dans le fait que les autopsies concernent des patients en stade avancé voire terminal de la maladie et il est difficile d'établir clairement la chronologie des anomalies observées (Kato, 2008).

Les formes sporadiques et familiales de SLA ont des anomalies anatomopathologiques similaires. Cependant, la nature des inclusions permet de distinguer deux types anatomopathologiques de formes familiales. Dans le premier cas, les anomalies observées sont identiques à celles présentes dans les formes sporadiques, dans l'autre, des inclusions spécifiques sont présentes et les cordons postérieurs sont atteints. Dans ce cas, les formes familiales sont généralement liées à une mutation du gène SOD1 (Kato, 2008).

Neurone moteur central – Cortex moteur

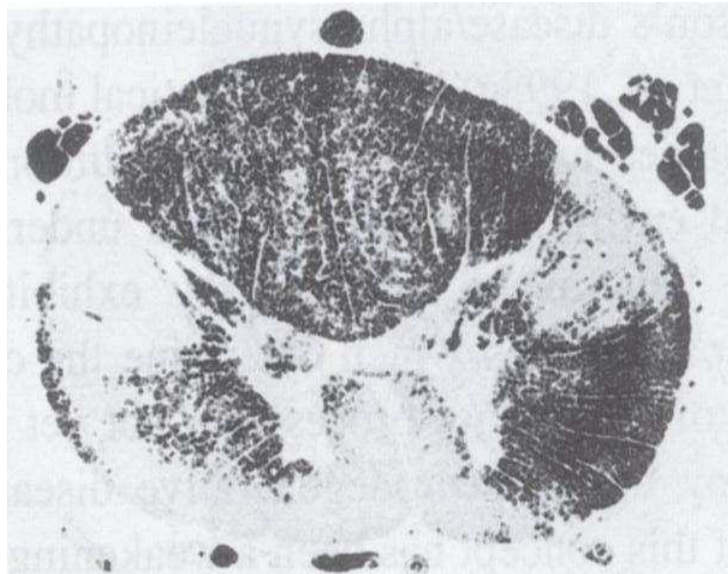
La perte des cellules pyramidales de Betz dans la couche 4 du cortex moteur est peu marquée (Brownell et al., 1970), le cortex moteur apparaît souvent normal. Ceci peut être dû à l'absence de marqueur spécifique des cellules de Betz permettant de les distinguer des autres neurones du cortex moteur. De plus, les inclusions marquées à l'ubiquitine sont rares dans les neurones moteurs de l'aire 4 principalement présents dans les formes avec démence (Leigh et al., 1991; Ince et Wharton, 2004).

La gliose astrocytaire est le second aspect pathologique retrouvé dans l'aire 4 et les substances blanche et grise environnantes (Ince et Wharton, 2004). Elle s'étend en effet aux 2/3 inférieurs du ruban cortical et à la substance blanche sous-corticale, régions particulièrement concernées par l'activation microgliale démontrée grâce à l'utilisation du marqueur lysosomal CD68 (Ince et Wharton, 2004).

Enfin, ces anomalies supratentorielles sont associées à une dégénérescence du faisceau corticospinal visible sous la forme d'une pâleur, principalement au niveau du bulbe et de la moelle (Brownell et al., 1970). Ces changements correspondent à une démyélinisation et une perte axonale (Figure 1).

Figure 1. Coupe de moelle épinière, patient SLA.

Perte myélinique dans les faisceaux corticaux spinaux ventro-latéraux et préservation de colonnes dorsales (Ince et Wharton, 2004).



Neurone moteur périphérique

Les lésions touchent tous les neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière à l'exception des noyaux du deuxième segment sacré ou noyau d'Onufrowicz dont le respect explique la préservation clinique des muscles périanaux. Les motoneurons du tronc cérébral sont eux aussi touchés, en particulier les noyaux des Ve, VIIe et Xe nerfs crâniens. En revanche, les noyaux des IIIe, IVe et VIe paires crâniennes sont respectés (Harvey et al., 1979).

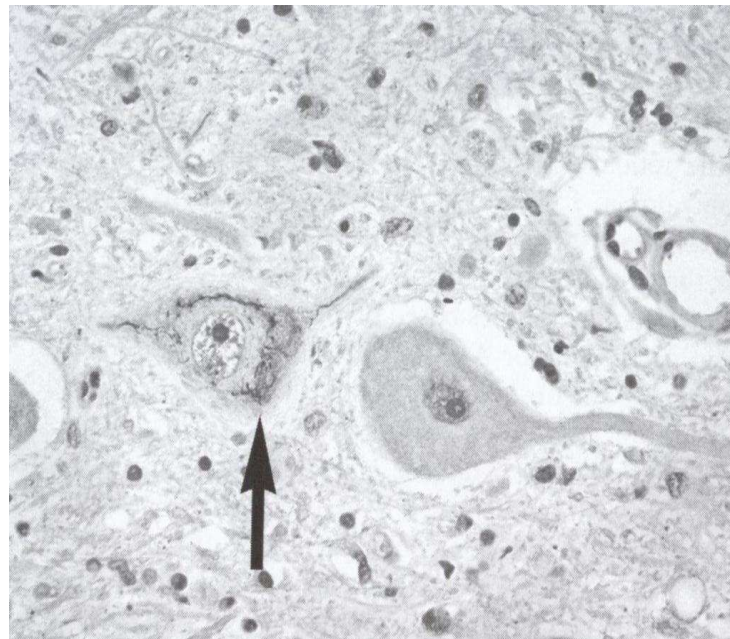
A l'image de l'hétérogénéité clinique, la perte en motoneurons est variable selon les études autopsiques ; elle est estimée à 50% dans la moelle lombaire (Ince et Wharton, 2004).

La plupart des motoneurones restants comportent des modifications structurales macroscopiques et microscopiques. Ils deviennent basophiles et atrophiques, aspects qui peuvent témoigner d'une apoptose (Martin, 1999). Quoique rarement observée, la chromatolyse vraie semble plutôt liée au vieillissement naturel (Leigh et al., 1991). Plus fréquent, l'aspect d'achromasie qui correspond à une pauvreté ou une absence des corps de Nissl s'en rapproche.

Les anomalies microscopiques sont des inclusions intracellulaires (Tableau 3). Les inclusions marquées à l'ubiquitine sont les plus fréquentes et surtout un marqueur de SLA sporadique (Ince et al., 1998; Ince et al., 2003; Piao et al., 2003). Le terme d'inclusion marquée à l'ubiquitine regroupe divers éléments allant d'un simple réseau de filaments jusqu'à des formes sphériques plus compactes de 5 à 25 μm de diamètre (Leigh et al., 1991; Ince et al., 1998). Parmi ces inclusions marquées à l'ubiquitine, le type « skein-like » (en écheveau) est le plus fréquent (Figure 2) et peut s'étendre aux dendrites (Leigh et al., 1991). Ces inclusions ne sont pas révélées par les marquages de neurofilaments ou de SOD1 (Kato, 2008).

Figure 2. Inclusion skein-like.

Coloration hématoxyline éosine (HE) (Hays, 2006).

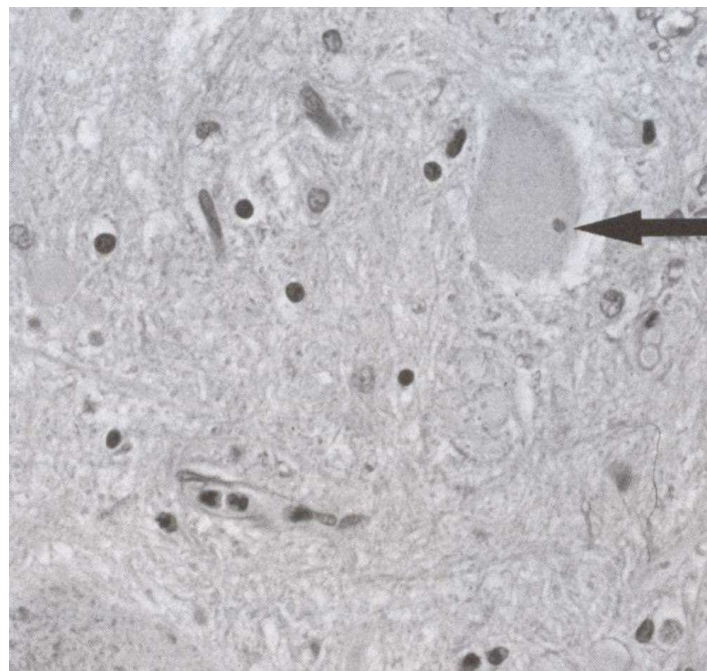


Les corps de Bunina sont des inclusions cytoplasmiques plus petites (1-5 μm de diamètre), éosinophiles et présents dans environ 70% des formes familiales et sporadiques

(Figure 3). Moins fréquentes que les inclusions marquées à l'ubiquitine, ces inclusions restent des éléments spécifiques (Leigh et al., 1991; Piao et al., 2003). Les marquages immunohistochimiques révèlent la présence de deux protéines : la cystatine C et la transferrine (Okamoto et al., 2008). Ils ne sont habituellement pas révélés par les marquages à l'ubiquitine ou les anticorps dirigés contre les neurofilaments (Leigh et al., 1989) et sont TDP-43 négatifs (Okamoto et al., 2008). Les corps de Bunina semblent être plus fréquents et plus gros chez des patients présentant une SLA avec démence (Okamoto et al., 2008). Ils sont présents dans les formes familiales non liées à une mutation du gène SOD1 (Kato, 2008).

Figure 3. Corps de Bunina.

Noter le halo pâle dans un neurone de la corne antérieure de la moelle (coloration HE)
(Hays, 2006).

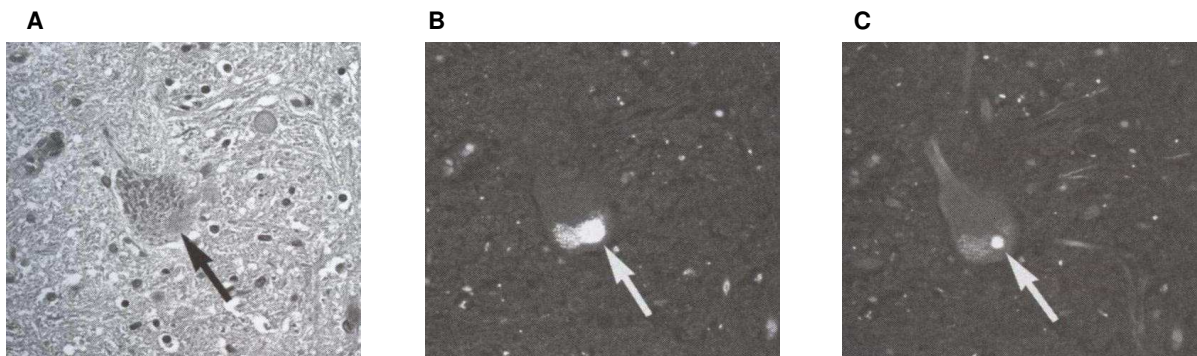


D'autres inclusions sont appelées corps de Lewy-like en raison de leur similitude avec les corps de Lewy observés dans les pathologies parkinsoniennes. Il s'agit d'inclusions vésiculaires de 10-25 μm de diamètre, légèrement basophiles ou achromasiques entourées d'un halo irrégulier (Leigh et al., 1991). Elles sont révélées par les anticorps dirigés contre l'ubiquitine (Figure 4) mais ne peuvent pas être révélées par les anticorps habituellement utilisés dans les autres pathologies neurodégénératives : maladies d'Alzheimer, de Parkinson, tauopathies, α -synucléinopathies et maladies caractérisées par une répétition de

triplets CAG (Sasaki et al., 1989; Ince et Wharton, 2004). Ces différences les rendent plus proches des corps de Lewy corticaux que de ceux observés dans la substance noire (Lennox et al., 1989). Ces inclusions sont présentes uniquement dans les formes familiales liées à des mutations du gène SOD1 et sont révélées par un marquage SOD1 (Kato, 2008).

Figure 4. Corps de Lewy.

Halo pâle en coloration HE (A), révélation en immunofluorescence après fixation d'anticorps dirigés contre l'ubiquitine (B), ou la périphérine (C): noter la fixation centrale pour la périphérine avec respect du halo (Hays, 2006).



Une fragmentation de l'appareil de Golgi a été mise en évidence chez quelques patients (Gonatas et al., 1992; Fujita et Okamoto, 2005). Il précède l'apparition des signes cliniques chez la souris transgénique SOD1 (Fujita et Okamoto, 2005).

L'accumulation de neurofilaments est responsable d'un gonflement axonal proximal (Sasaki et al., 1989) (Figure 5). Cet aspect est spécifique et précoce (Hirano, 1996). D'autre part, des conglomérats hyaliniques (Figure 6) ont été observés dans les formes familiales liées aux mutations SOD1 surtout I113T (Rouleau et al., 1996; Shaw et al., 1997; Kato, 2008). Ces inclusions sont plus grandes que celles marquées à l'ubiquitine. Elles sont révélées par les anticorps dirigés contre les chaînes lourde et intermédiaire des neurofilaments et correspondent ainsi à une accumulation de neurofilaments.

Figure 5. Gonflement axonal.

Structure basophile avec composant fibrillaire (coloration HE) (Hays, 2006).



Figure 6. Conglomérat hyalinique.

Structure basophile et hyaline en coloration HE présente dans le cytoplasme et extension dans une dendrite (A), révélation en immunofluorescence après fixation d'anticorps dirigés contre la chaîne lourde des neurofilaments (B), ou la périphérine (C) (Hays, 2006).



Autres lésions du système nerveux central

L'atteinte des cordons médullaires postérieurs est classiquement décrite à la fois dans les formes sporadiques et familiales (Ince et al., 2003). Elle est visible sous la forme d'une

pâleur traduisant une perte myélinique et axonale en macroscopie. D'autres parties du système sensitif sont aussi touchées. Le thalamus est le siège d'une gliose (Brownell et al., 1970) et il existe une perte neuronale dans les ganglions rachidiens postérieures associées à des modifications structurales des axones des nerfs sensitifs (Dyck et al., 1975; Kawamura et al., 1981).

La démyélinisation qui touche les faisceaux cortico-spinaux déborde sur le cordon antérolatéral et plus discrètement sur les faisceaux rubro-, vestibulo-, et tecto-spinaux. Le faisceau spinothalamique et les voies cérébelleuses sont elles aussi touchées (Swash et al., 1988).

Dans les formes avec démence, une atrophie frontale et temporale antérieure est observée (Yoshida, 2004). En microscopie, il existe une perte neuronale associée à une gliose et une spongieuse qui touche les couches corticales II et III et avant tout le cortex frontotemporal. Ces lésions s'étendent aussi au cortex temporal dorsomédial et insulaire, à l'amygdale, l'hippocampe et la substance noire. Des inclusions marquées à l'ubiquitine, identiques à celles observées dans le neurone moteur périphérique sont présentes dans toutes ces régions ainsi que dans le striatum et le noyau accumbens. La présence d'inclusions dans le cortex temporal et le striatum a aussi été notée dans les formes bulbaires (Piao et al., 2003). Le marquage de l'ubiquitine révèle aussi des neurites dystrophiques chargés d'ubiquitine et présents dans le cortex frontotemporal, le putamen, le noyau caudé, le striatum et les cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe (Piao et al., 2003; Yoshida, 2004).

Les formes familiales ont des lésions similaires aux formes sporadiques hormis les congglomérats hyaliniques qui sont retrouvés dans quelques mutations SOD1 : A4V (Rouleau et al., 1996), I113T (Ince et al., 1998) et H48Q (Shaw et al., 1997). Dans certaines formes d'évolution rapide, le faisceau corticospinal semble relativement préservé (Cudkovicz et al., 1998). Les analyses chez l'animal transgénique ont montré que la SOD1 mutée s'accumulait dans les tissus (Bruijn et al., 1998). Chez l'homme, les anticorps dirigés contre la SOD1 révèlent la présence de SOD dans les corps de Lewy-like hyaliniques (et non fibrillaires comme observés le plus souvent) dans les formes familiales liées aux mutations SOD1 (Chou et al., 1996; Sasaki et Iwata, 1998; Shibata et al., 1998; Watanabe et al., 2001). Des inclusions hyaliniques sont aussi présentes dans les astrocytes (Bruijn et al., 1997).

Muscle.

Les anomalies observées résultent des processus chroniques de dénervation et dans une moindre mesure de réinnervation. Elles ne sont pas spécifiques de la SLA (Ince et Wharton, 2004).

La dénervation musculaire induit une amyotrophie qui se traduit macroscopiquement par des fibres musculaires de petite taille et angulées. La perte aléatoire des neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle entraîne une atrophie de fibres musculaires contingentes appelée phénomène de « grouping ». Au fur et à mesure que la maladie progresse, l'atrophie devient de plus en plus importante, le tissu musculaire est composé de nombreux adipocytes qui compensent la perte en fibres musculaires qui ne comportent plus qu'un noyau entouré d'un cytoplasme de très petite taille. Une hypertrophie des fibres musculaires de type II est aussi notée. Par ailleurs, la réinnervation collatérale et le phénomène de capture de fibres dénervées par les unités motrices encore fonctionnelles entraînent un élargissement des unités motrices (augmentation du nombre de fibres musculaires innervées par un seul motoneurone de la corne antérieure).

L'analyse microscopique montre une réduction du stock glycogénique, une augmentation de la densité en enzymes oxydatives en coloration et une perte en myophosphorylase (Ince et Wharton, 2004).

Tableau 3. Inclusions en anatomopathologie.

Inclusions	Caractéristiques
Corps de Bunina	Intracytoplasmique Eosinophile Marqué par cystatine C (inhibiteur de la cystéine protéase)
Inclusions ubiquitinyllées	Inclusions skein-like (« en écheveau ») ou sphériques Similaires à celles présentes dans la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer mais non marquées par les anticorps dirigés contre les neurofilaments ou la protéine tau
Corps de Lewy-like	Ressemblent aux corps de Lewy de la maladie de Parkinson Peuvent contenir des neurofilaments
Agrégats hyaliniques	Contiennent des neurofilaments Faiblement marqués à l'ubiquitine

Physiopathologie

La cause exacte de la SLA demeure inconnue. Différentes pistes étiopathogéniques ont été explorées ces quinze dernières années. Sans répondre à toutes les interrogations, la découverte de mutation de la SOD1 dans environ 10% des formes familiales et le développement de modèles animaux de SLA ont permis d'avancer dans la compréhension des divers mécanismes physiopathologiques conduisant à la mort motoneuronale.

Hypothèses étiopathogéniques

Beaucoup de pistes ont été étudiées et même si les mutations génétiques découvertes expliquent certaines formes familiales, l'étiologie de cette maladie neurodégénérative semble être multifactorielle (Cluskey et Ramsden, 2001).

Hypothèse infectieuse.

Une cause virale a été suspectée principalement par analogie avec la poliomyélite. Les recherches d'entérovirus montrent des résultats divergents (Berger et al., 2000; Walker et al., 2001). L'obtention de modèles animaux de maladie du motoneurone induits par une infection conjointe par deux virus non pathogènes isolément (Anderson et al., 1995) et la mise en évidence dans la moelle des patients atteints de syndrome post poliomyélitique de séquences nucléotidiques d'entérovirus (Leon-Monzon et Dalakas, 1995) sont les seuls arguments permettant de suspecter la responsabilité d'agents viraux. Par ailleurs, quelques cas ont été rattachés à une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Moulinier et al., 2001). Il s'agit d'atteintes quasi-exclusives du neurone moteur périphérique (Pearl et al., 2003) ou correspondant à une forme probable ou possible selon les critères consensuels (Sejvar et al., 2005). Elles se caractérisent par un âge de début plus précoce qu'une SLA sporadique, une évolution rapidement progressive (Moulinier et al., 2001) et surtout une réversibilité avec le traitement anti-rétroviral (MacGowan et al., 2007). Ces phénotypes restent toutefois exceptionnels, touchant 0,3% des patients infectés par le VIH (Moulinier et al., 2001) et ne peuvent témoigner d'une implication de facteurs rétroviraux dans la physiopathologie de la SLA.

Les agents transmissibles non conventionnels (prions) sont connus pour donner des atteintes neurologiques centrales. La présence de signes d'atteinte du neurone moteur périphérique dans 50 cas de maladies à prions prouvées a conduit à les suspecter (Worrall et al., 2000). Néanmoins, aucune transmission au singe n'a été mise en évidence après injection de broyat de tissu cérébral de patients présentant un tableau de SLA avec démence (Salazar et al., 1983).

Hypothèse immunologique

Elle repose sur l'existence de maladies du motoneurone d'origine dysimmunitaire (Appel et al., 1995), paranéoplasique (Forsyth et al., 1997) ou associées à une maladie lymphoproliférative (Gordon et al., 1997). Pourtant, aucun traitement anti-inflammatoire, immunomodulateur ou suppresseur n'a montré d'efficacité (Rowland et Shneider, 2001). Dans les syndromes paranéoplasiques, les anticorps spécifiques sont parfois trouvés (Hays et al., 1990; Verma et al., 1996; Khwaja et al., 1998; Ferracci et al., 1999) mais l'atteinte du neurone moteur est rarement pure pour pouvoir constituer un tableau de SLA selon les critères diagnostiques. L'amélioration par le traitement du cancer n'est pas évidente dans la plupart des publications faisant suspecter une association fortuite (Vigliani et al., 2000).

Hypothèse toxique

L'intervention de facteurs toxiques environnementaux a été fréquemment suspectée au travers de l'observation de foyers dans lesquels l'incidence de la SLA était anormalement élevée (cas des îles de Guam) (Mulder et Kurland, 1987), l'existence de formes conjugales (Corcia et al., 2003) et aussi de cas de lathyrisme et de konzo (Ludolph et al., 1987).

Les métaux lourds sont connus pour leur neurotoxicité et dans la SLA quelques données épidémiologiques et expérimentales confortent la suspicion. De même les produits chimiques notamment les pesticides ont été incriminés. L'ensemble de ces données a été exposé dans le chapitre « Epidémiologie-Facteurs de risque ».

Hypothèse génétique

Des mutations génétiques ont été trouvées dans les formes familiales de SLA et des gènes de susceptibilité ont été identifiés dans la SLA sporadique (cf. chapitre « Génétique de la Sclérose Latérale Amyotrophique »). Nous exposons ici les liens unissant les mutations génétiques découvertes (mutations SOD principalement) et les mécanismes physiopathologiques actuellement connus de la SLA.

Parmi les mutations génétiques décrites dans les SLA familiales, les mutations du gène de la superoxyde dismutase 1 sont considérées comme les plus fréquentes (Rosen et al., 1993). La superoxyde dismutase existe sous trois formes : cytosolique (SOD1), mitochondriale (SOD2) et extra-cellulaire (SOD3) codées par trois gènes différents. LA SOD1 est une métalloenzyme qui comporte un atome de cuivre nécessaire à son activité enzymatique et un atome de zinc qui assure la stabilité de sa structure protéique.

Le lien pathogène entre la mutation SOD1 et l'atteinte des motoneurones a été confirmé grâce à l'étude de modèles animaux transgéniques dont la présentation clinique et anatomopathologique est proche de la SLA humaine. Il résulte non pas d'une perte d'activité mais de l'acquisition de propriétés nouvelles dont la SOD naturelle est dépourvue (« gain de fonction »). En effet, les souris transgéniques knock out pour le gène de la SOD1 ne développent pas de SLA (Reaume et al., 1996). De plus, l'activité de la SOD1 mutée est très variable selon les mutations et il n'y a pas de corrélation entre le phénotype et les propriétés enzymatiques de la SOD mutée que ce soit chez l'homme (Ratovitski et al., 1999) ou chez l'animal (Wong et Borchelt, 1995).

Le gain de fonction semble lié à plusieurs modifications touchant à la fois les capacités enzymatiques de la SOD et sa structure protéique. Tout d'abord, les modifications conformationnelles pourraient accroître l'exposition de l'atome de cuivre aux substrats entraînant la formation de radicaux libres et notamment de peroxy-nitrite. Ces anomalies conformationnelles peuvent résulter d'une diminution de l'affinité pour le zinc (Crow et al., 1997; Estevez et al., 1999). La nitration par la SOD1 mutée des résidus tyrosine de protéines cellulaires à partir du peroxy-nitrite (ONOO-) est accrue. Toutes ces modifications entraînent des conséquences néfastes sur la vie cellulaire par l'intermédiaire d'un stress oxydant (Beckman et al., 1993; Estevez et al., 1999).

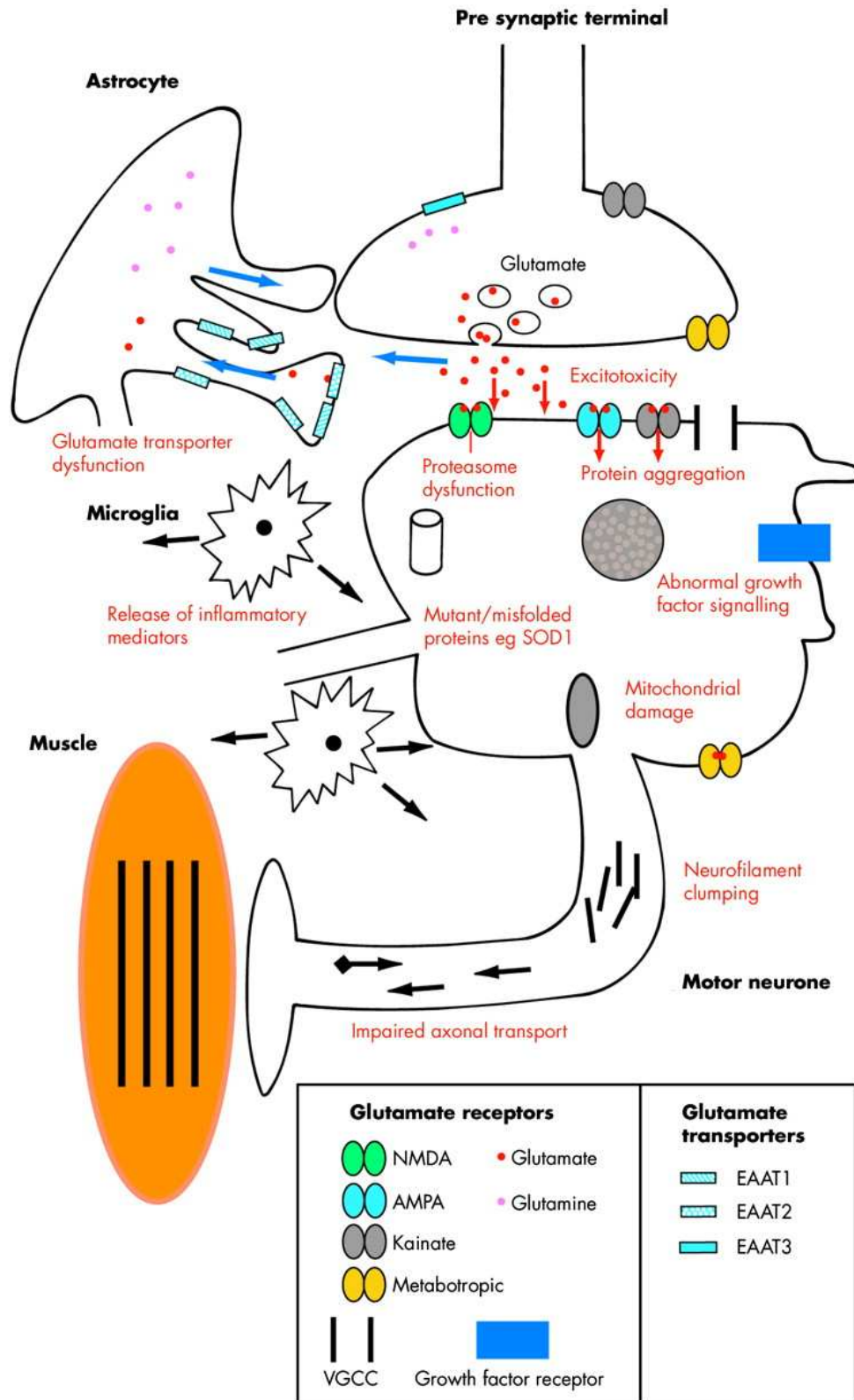
Les inclusions intraneuronales présentes dans les modèles animaux semblent liées à la capacité de la SOD à former des agrégats (Durham et al., 1997). Un défaut de conformation, peut-être lui-même en rapport avec une activité insuffisante ou inappropriée de protéines appelées chaperons moléculaires, serait en cause. Ces protéines servent à assurer la conformation normale des protéines normales en vue de préserver leur activité enzymatique ou leurs propriétés physiques, et ciblent d'autre part les protéines anormales en vue de leur dégradation (Bruening et al., 1999).

L'atteinte mitochondriale est un autre mécanisme physiopathologique décrit dans la SLA. Les premières anomalies observées dans les motoneurons des souris mutées SOD sont des inclusions vacuolaires périnucléaires et axonales proximales contemporaines du début clinique, mais précédant la mort neuronale et témoignant de modifications et d'une dégénérescence des mitochondries (Wong et al., 1995). Dans les modèles animaux, ces inclusions vacuolaires sont riches en SOD1 (Jaarsma et al., 2001), les composants mitochondriaux sont oxydés et le dysfonctionnement mitochondrial cause un déficit de synthèse d'ATP (Mattiuzzi et al., 2002). L'atteinte des mitochondries entraîne un déficit énergétique préjudiciable à la vie cellulaire (et notamment au transport axonal, gros consommateur d'énergie étant donné la taille de l'axone) ainsi qu'une libération de calcium par la mitochondrie qui est à l'origine d'une excitotoxicité secondaire. La SOD mutée augmente la sensibilité des neurones moteurs à la toxicité du glutamate (Kruman et al., 1999) et entraîne à la fois une modification de l'expression de la sous-unité du récepteur AMPA (Spalloni et al., 2004) et une diminution de l'expression du transporteur EAAT2 du glutamate (Howland et al., 2002). La SOD mutée déclenche aussi l'activation des voies de l'apoptose (Takeuchi et al., 2002).

Mécanismes physiopathologiques

Les phénomènes pathologiques conduisant à la dégénérescence progressive et extensive des neurones moteurs sont de mieux en mieux connus mais semblent considérablement intriqués (Shaw, 2005). Les liens qui unissent les différents mécanismes connus ne sont pas univoques et il est difficile de déterminer une « cascade » physiopathologique unique entraînant la mort neuronale, ce d'autant que la cause et le processus pathologique primitif restent inconnus dans la plupart des cas (Figure 7).

Figure 7. Mécanismes physiopathologiques.



Selon Shaw, 2005.

Radicaux libres oxygénés et stress oxydant.

Les radicaux libres oxygénés (RLO) sont des molécules contenant un atome d'oxygène portant sur une orbite extérieure un électron dit « célibataire ». Ils sont produits essentiellement dans les mitochondries par l'activité de la chaîne respiratoire. La présence de cet électron facilite l'action des RLO sur d'autres molécules. Le stress oxydant représente l'action des radicaux libres oxygénés (RLO) sur les protéines, les acides nucléiques et les lipides intra-cellulaires, causant leur dégradation et pouvant aboutir à la mort cellulaire. La protection contre le stress oxydant est assurée par des enzymes capables de catalyser la dégradation des RLO : la superoxyde dismutase ou SOD catalyse la réduction de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et en eau. L' H_2O_2 peut générer sous l'action du fer le radical hydroxyle $^{\circ}OH$, initiateur de la lipoperoxydation mais cette réaction est empêchée par la réduction du H_2O_2 en eau par la catalase ou la glutathion peroxydase.

Le rôle du stress oxydant a beaucoup été étudié depuis la découverte des mutations du gène de la SOD (cf. supra) et démontré dans la SLA grâce à des études *in vitro*. Plusieurs études montrent un métabolisme anormal dans le LCR consécutif à la formation de radicaux libres oxygénés (Shaw et al., 1995; Ferrante et al., 1997; Smith et al., 1998; Tohgi et al., 1999). Les taux de 3-nitrotyrosine, glutathione, prostaglandine E2, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine et nitrate, molécules marquant le stress oxydant, sont augmentés mais aucun biomarqueur spécifique de la SLA ne peut être dégagé (Sussmuth et al., 2008).

Excitotoxicité et glutamate.

Le phénomène d'excitotoxicité est dû à l'action excessive ou prolongée du glutamate sur la membrane cellulaire. La fixation de ce neurotransmetteur excitateur sur son récepteur membranaire entraîne dans ces conditions une dépolarisation post-synaptique et l'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule qui déclenche une cascade d'évènements conduisant à la mort cellulaire. L'excitotoxicité directe est la conséquence d'une augmentation du taux de glutamate extracellulaire. Par exemple, dans le lathyrisme, la consommation de graines de *Lathyrus sativus* qui contiennent de la bêta-oxalyl-amino-L-alanine (BOAA), un acide aminé excitateur agoniste des récepteurs glutamatergiques non-NMDA entraîne un excès de glutamate directement responsable du processus de mort neuronale. Dans la SLA,

l'excitotoxicité serait indirecte. Dans ce cas, alors que le taux de glutamate extracellulaire est normal, les cellules ont une fragilité accrue par défaillance énergétique ou une incapacité à maintenir le gradient glutamatergique par défaut de recapture.

Les neurones moteurs corticaux sont des cellules particulièrement sensibles au phénomène d'excitotoxicité par l'activation des récepteurs AMPA (a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) présents sur leur membrane cellulaire (Carriedo et al., 2000). La perméabilité au calcium de ces récepteurs n'est possible qu'en l'absence d'une sous-unité Glu R2. La vulnérabilité sélective des neurones moteurs dans la SLA trouve ici une de ses explications. L'expression de GluR2 est plus basse dans les neurones moteurs que dans les autres neurones (Williams et al., 1997) et il semble exister une moindre expression de l'ARNm du Glu R2 dans la SLA (Takuma et al., 1999). De plus, l'expression de GluR2 dans les neurones serait régulée par les astrocytes (Van Damme et al., 2007).

Des taux de glutamate élevés dans le LCR ont été trouvés chez certains patients par différentes équipes (Rothstein et al., 1990; Shaw et al., 1995; Spreux-Varoquaux et al., 2002) et des concentrations basses par d'autres (Niebroj-Dobosz et Janik, 1999). Ces résultats sont cependant dépendants des faibles effectifs de ces études. La diminution de la concentration en glutamate mesurée dans un broyat de moelle épinière traduit en revanche, une réduction du taux de glutamate intracellulaire et ainsi un défaut de recapture du glutamate (Maragakis et Rothstein, 2001). De plus, l'expression et la fonction du transporteur EAAT2 assurant la recapture du glutamate sont altérées (Rothstein et al., 1995; Fray et al., 1998). L'accumulation excessive ou prolongée du glutamate dans l'espace synaptique est attribuée à une diminution de 30 à 95% de l'expression protéique de EAAT2 objectivée dans le cortex moteur et la moelle épinière des patients atteints de SLA (Rothstein et al., 1995) mais aussi dans des modèles animaux (Fray et al., 1998; Howland et al., 2002). Cette diminution d'expression protéique est secondaire à des anomalies de l'épissage du gène EAAT2 (Lin et al., 1998). Toutefois, l'absence de diminution de l'expression de l'ARN messenger de EAAT2 témoigne d'une perturbation post-transcriptionnelle. Cela a conduit à rechercher l'existence de facteurs modulant l'expression du transcrit du gène EAAT2. Un travail récent a identifié des facteurs de stimulation et d'inhibition de l'expression de cet ARN messenger parmi lesquels on note les corticostéroïdes, le rétinol (Tian et al., 2007). Ceci montre l'interaction possible entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux dans le développement de la SLA. Des anomalies de l'expression de l'ARN messenger de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA

ont également été décrites dans la SLA. Il est possible que ceci participe à la mort neuronale dans la SLA (Kawahara et al., 2004).

Enfin, outre le glutamate, il semble exister un facteur excitotoxique intrinsèque puisque l'injection de LCR patients SLA tue des neurones corticaux de rat en culture (Couratier et al., 1993). De plus, la toxicité mitochondriale de la SOD1 mutée entraîne des modifications du métabolisme calcique intracellulaire pouvant conduire à un phénomène d'excitotoxicité (cf paragraphe « Hypothèses étiopathogéniques – hypothèse génétique »).

Enfin, l'effet du traitement par riluzole, un anti-glutamate, sur la survie plaide en faveur du rôle majeur de l'excitotoxicité dans la physiopathologie de la SLA (Shaw, 2005).

Altération du cytosquelette et du transport axonal, agrégation protéique.

Les neurofilaments sont les protéines les plus abondantes des motoneurones en raison de la longueur de l'axone et contribuent à la croissance radiale des axones et au transport axonal. Les neurofilaments sont formés de trois types de sous-unités suivant leur poids moléculaire : NF-L (65 kDa), NF-M (95 kDa) et NF-H (115 kDa). Les sous-unités des neurofilaments sont produites et assemblées dans le corps cellulaires puis phosphorylées au cours de leur transport dans l'axone. Dans la SLA, l'accumulation de neurofilaments notamment dans les inclusions est un marqueur anatomopathologique de la maladie (Hirano et al., 1984; Rouleau et al., 1996). L'atteinte des neurofilaments dans la SLA pourrait être un des facteurs de vulnérabilité sélective des motoneurones en raison de leur richesse en neurofilaments imposée par leur grande taille. Responsable d'un transport axonal défectueux, cette atteinte peut être interprétée comme la cause ou la conséquence de la neurodégénération (Julien et Beaulieu, 2000). Plusieurs mutations du gène de la chaîne lourde du neurofilament (NF-H) ont été trouvées (Figueroa et al., 1994; Tomkins et al., 1998; Al-Chalabi et al., 1999) mais elles ont aussi été décrites chez des témoins non atteints.

Les anomalies des neurofilaments peuvent aussi résulter d'effets toxiques des mutations SOD1. En effet, dans le modèle murin, l'élimination de l'expression de la chaîne légère des neurofilaments (Williamson et al., 1998) ou la surexpression de la chaîne lourde (Couillard-Despres et al., 1998) améliorent la survie du motoneurone. L'accumulation de neurofilaments serait alors une conséquence et un élément protecteur contre les effets de la SOD1 mutée en tamponnant le calcium intracellulaire grâce à des sites de fixation

spécifiques ou en diminuant la liaison du zinc (Rowland et Shneider, 2001). La périphérine est un neurofilament intermédiaire présent dans les inclusions des SLA sporadiques (Corbo et Hays, 1992) et les souris transgéniques SOD1 (Tu et al., 1997). La surexpression de l'isoforme la plus courante de la périphérine induit chez la souris une maladie du motoneurone tardive (Beaulieu et al., 1999). Des mutations du complexe dynéine-dynactine, composant majeur du microtubule assurant le transport axonal rétrograde, sont responsables d'une maladie du motoneurone chez la souris (LaMonte et al., 2002; Hafezparast et al., 2003).

Atteinte mitochondriale.

Il est admis que le fonctionnement de la mitochondrie s'altère avec l'âge, ce phénomène pouvant être mis en rapport avec la révélation tardive des maladies neurodégénératives (Cluskey et Ramsden, 2001). La mitochondrie joue un rôle important dans le métabolisme énergétique, la fabrication de radicaux libres oxygénés, la régulation de la concentration intracellulaire de calcium (voie de l'excitotoxicité) et l'initiation de l'apoptose. Ces différentes voies sont impliquées dans la physiopathologie de la SLA et de nombreuses études chez l'homme ou l'animal prouvent le dysfonctionnement mitochondrial dans la SLA (Manfredi et Xu, 2005). Le déficit énergétique qui découle de cette atteinte pourrait constituer un facteur de vulnérabilité sélective des motoneurons qui par leur grande taille ont des besoins énergétiques élevés (Cluskey et Ramsden, 2001). Des altérations morphologiques et fonctionnelles de la mitochondrie ont été mises en évidence dans les neurones moteurs périphériques (Siklos et al., 1996; Borthwick et al., 1999). La vacuolisation de la mitochondrie traduit son altération et constitue un marqueur anatomopathologique précoce survenant avant l'apparition du déficit musculaire dans les modèles animaux (Wong et al., 1995; Cluskey et Ramsden, 2001). Les mutations de l'ADN mitochondrial sont fréquentes dans le cortex moteur (Dhaliwal et Grewal, 2000), dans la moelle épinière ou le muscle (Wiedemann et al., 2002) et l'observation d'un patient porteur d'une délétion du gène de la sous-unité I de la cytochrome c oxydase a été rapportée (Comi et al., 1998).

Phénomènes inflammatoires et activation microgliale.

La microglie représente 12% des cellules du système nerveux central et constitue la principale ressource de cellules immunocompétentes du SNC. Elles correspondent

fonctionnellement aux macrophages présents dans les tissus périphériques et sont les premiers médiateurs de la neuro-inflammation (Kreutzberg, 1996). Au sein du SNC adulte, la microglie existe dans les conditions physiologiques sous la forme inactivée. Lors d'agressions du SNC, ces cellules deviennent rapidement actives avant d'aller stimuler les neurones et les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) en libérant des substances cytotoxiques et inflammatoires comme les radicaux libres, le NO, le glutamate, les cytokines et les prostaglandines (Kreutzberg, 1996; Hanisch, 2002).

Dans la SLA, la mise en évidence d'une activation microgliale repose notamment sur la révélation immuno-histochimique d'un infiltrat inflammatoire dans la moelle épinière (Engelhardt et Appel, 1990; Troost et al., 1990) et l'encéphale de patients (Kawamata et al., 1992). Dans les modèles de souris transgéniques SOD1, cette activation microgliale est intense et augmente au cours de l'évolution (Hall et al., 1998; Alexianu et al., 2001). L'atteinte motoneuronale serait conditionnée par la présence de cellules non-neuronales anormales : en effet, les neurones moteurs mutés SOD1 restent viables s'ils sont entourés de cellules saines mais des motoneurons sains dégénèrent s'ils sont entourés de cellules non-neuronales mutées SOD1 (Clement et al., 2003). L'activation microgliale peut être déclenchée dans la corne antérieure par l'injection intra-péritonéale d'IgG de patients SLA chez des souris (Obal et al., 2001). Chez l'homme, les études autoradiographiques montrent une activation microgliale importante dans le tractus cortico-spinal de la moelle épinière des patients atteints de SLA (Sitte et al., 2001). Une étude TEP avec le [11C](R)-PK11195, marqueur du récepteur périphérique des benzodiazépines (récemment renommé protéine de translocation) qui sont exprimés dans le SNC en cas d'activation microgliale, a objectivé une fixation intense dans le cortex moteur mais aussi dans la protubérance et plus discrètement dans le cortex préfrontal dorsolatéral et les thalami des SLA (Turner et al., 2004). La minocycline qui inhibe l'activation microgliale améliore l'atteinte neurologique des souris transgéniques SOD (Zhu et al., 2002). Par ailleurs, diverses cytokines et enzymes impliquées dans les processus inflammatoires sont retrouvées à des taux élevés et leur libération pourrait expliquer la propagation de l'atteinte motoneuronale dont le début est focal (Shaw, 2005).

Apoptose.

L'apoptose est un processus physiologique de mort programmée en réponse à des signaux intra- ou extracellulaires. Consommateur d'énergie et indépendant pour chaque

cellule, il se caractérise par des modifications membranaires et nucléaires évolutives différentes de la nécrose (Sathasivam et Shaw, 2005). Trois voies moléculaires distinctes peuvent conduire à l'apoptose lorsqu'elles sont activées : la voie mitochondriale (ou intrinsèque), la voie des récepteurs de mort (extrinsèque) et la voie du stress du réticulum endoplasmique (Guegan et Przedborski, 2003). Les protéases à cystéine ou caspases sont les effecteurs principaux de ce processus. Même si les critères anatomopathologiques des modifications apoptotiques ne sont pas constamment présents chez les patients décédés de SLA, il existe de plus en plus d'indices en faveur d'une mort programmée intervenant dans la dégénérescence des neurones moteurs (Sathasivam et Shaw, 2005).

Plusieurs composants moléculaires intervenant dans l'apoptose sont mis en jeu dans la SLA (Guegan et Przedborski, 2003). Les caspases sont activées (Martin, 1999) en réponse à des signaux intégrés par les protéines Bcl-2 qui peuvent jouer un rôle promoteur ou suppresseur de la mort cellulaire (Guegan et Przedborski, 2003). Cette activation est séquentielle sous l'action de la SOD1 mutée (Pasinelli et al., 1998). L'expression des protéines propapoptotiques est augmentée (Martin, 1999; Vukosavic et al., 1999). L'inhibition du processus apoptotique par la surexpression d'une protéine antiapoptotique Bcl-2 ou l'administration d'inhibiteurs de caspases augmente la survie de souris transgéniques SOD1 (Friedlander et al., 1997; Kostic et al., 1997). Par ailleurs des modifications morphologiques cellulaires témoins de l'apoptose sont observés. L'extériorisation de la phosphatidyl sérine, un des événements les plus précoces du processus, a été mise en évidence (Sathasivam et Shaw, 2005). La fragmentation de l'ADN internucléosomal est plus controversée (Guegan et Przedborski, 2003).

Facteurs de croissance et hypoxie.

Ces deux éléments sont des facteurs potentiels intervenant dans la physiopathologie de la SLA et dont la participation a été démontrée par des études génétiques (cf. chapitre « Génétique de la Sclérose Latérale Amyotrophique »).

Les facteurs neurotrophiques (FN) augmentent la survie, la différenciation, la croissance, la régénération et la réparation cellulaires. Six grandes familles de FN sont actuellement reconnues : les neurotrophines, les cytokines hémopoïétiques, la famille des GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), l'IGF (insulin-like growth factor), la famille du FGF (fibroblast growth factor) et l'hépatocyte growth factor (Mitsumoto et

Tsuzaka, 1999; Mitsumoto et Tsuzaka, 1999). Un même FN peut agir sur plusieurs types cellulaires et hormis le NGF (nerve growth factor) tous agissent sur les motoneurones. Les facteurs de croissance semblent donc constituer des candidats éventuels intervenant dans les mécanismes physiopathologiques conduisant à la mort du neurone moteur dans la SLA.

Chez l'homme (atteint de SLA), en post mortem, le taux de CNTF est significativement diminué dans la corne antérieure de la moelle et le faisceau latéral cortico-spinal (Anand et al., 1995; Ono et al., 1999). Le taux de récepteur de l'IGF et l'expression de l'ARNm du récepteur du CNTF et des récepteurs (TrkB et LNR) du BDNF sont augmentés dans la corne antérieure de la moelle des sujets atteints de SLA (Masu et al., 1993; Seeburger et al., 1993; Dore et al., 1997).

Chez l'animal, une réduction du nombre des neurones moteurs a été observée chez les souris knock-out pour le gène du CNTF, pour le récepteur TrkB du BDNF (brain derived neurotrophic factor) ou pour le gène du GDNF (Masu et al., 1993; Jones et al., 1994; Conover et al., 1995; Sanchez et al., 1996). De plus, l'inactivation de l'expression du gène CNTF chez la souris adulte entraîne une dégénérescence des motoneurones spinaux (Masu et al., 1993). L'administration de facteurs de croissance (CNTF, IGF1, BDNF) retarde l'évolution et augmente la force musculaire dans les modèles transgéniques de maladie du motoneurone (Mitsumoto et al., 1994; Sendtner et al., 1994; Hantai et al., 1995; Ikeda et al., 1995).

Le CNTF est le facteur de croissance qui a été le plus étudié dans la SLA. Même si les souris KO pour son gène développent une atteinte du motoneurone, une mutation homozygote chez l'homme à l'origine d'un déficit complet en CNTF touche 1-2 % de la population générale sans traduction clinique évidente (Takahashi et al., 1994; Shaw, 2005). Néanmoins, les mutations homozygotes du gène du CNTF associées à une mutation de SOD1 pathogène sont responsables d'un début plus précoce chez l'animal comme chez l'homme (Giess et al., 2002). Les divers résultats orientent donc actuellement plus vers un rôle des facteurs de croissance dans la survie du neurone moteur que dans le processus initial qui conduit à sa dégénérescence. Enfin, les études sur le VEGF (vascular endothelial growth factor) méritent attention (cf. chapitre « Génétique de la Sclérose Latérale Amyotrophique »). Ce facteur qui intervient dans l'angiogénèse en réponse à l'hypoxie tissulaire a aussi des propriétés neurotrophiques. Une délétion de l'élément HRE (hypoxia response element), promoteur du gène VEGF pour ce gène entraîne chez la souris une

atteinte de la corne antérieure de révélation tardive (Oosthuysen et al., 2001). L'expression du VEGF et de son récepteur sont diminués dans la corne antérieure de certains patients SLA (Brockington et al., 2006). L'administration de VEGF à des modèles animaux transgéniques retarde l'évolution et peut améliorer l'état moteur (Zheng et al., 2004; Storkebaum et al., 2005). Ces données sont à rapprocher des découvertes récentes sur le gène de l'angiogénine (Greenway et al., 2006) et sous-tendent l'intervention d'une réponse altérée à l'hypoxie dans la physiopathologie de la SLA. Elles peuvent aussi fournir une explication au lien statistique entre SLA et activité physique intense.

Deuxième partie
Génétique de la sclérose latérale
amyotrophique

Les études génétiques

On sait aujourd'hui qu'un grand nombre de maladies a une composante génétique. Plusieurs cas de figure se présentent. La maladie est héréditaire monogénique à transmission mendélienne : la modification d'un gène est responsable à elle seule de l'apparition de la maladie. La maladie peut aussi être mitochondriale, de transmission maternelle ou génétique par aberration chromosomique. Enfin, lorsque la maladie résulte d'une interaction complexe entre facteurs génétiques et environnementaux, on parle de maladie d'origine multifactorielle ou d'étiologie complexe. Il est possible de parler de maladie polygénique, chacun des variants génétiques considéré isolément n'étant ni indispensable ni suffisant pour entraîner la maladie. Mais le seuil pathologique peut être atteint par l'action conjointe de facteurs génétiques (résultant de diverses combinaisons alléliques entre différents locus) et de facteurs environnementaux. Le mode de transmission correspond à l'échantillonnage multiple de loci plus ou moins indépendants avec augmentation du risque intrafamilial (maladie sporadique) et la coexistence d'effets combinés de facteurs génétiques et environnementaux rend difficile la prédiction de la maladie au regard d'un gène seul. On fera alors plutôt référence aux gènes impliqués en tant que gènes de prédisposition ou de susceptibilité.

L'identification des gènes, causal ou de susceptibilité, repose sur des méthodes statistiques différentes que nous allons brièvement présenter.

Étude de liaison.

Cette méthode s'applique aux maladies monogéniques et à une analyse familiale du gène suspecté. Elle vise à quantifier l'excès d'allèles identiques par descendance mendélienne que partagent des membres d'une même famille. Les études familiales traitent conjointement un certain nombre de familles de façon à détecter la transmission préférentielle d'allèles chez les personnes atteintes par la maladie considérée. Il est primordial de connaître le lien de transmission de la maladie. Ce type d'étude est basé sur la méthode de Lod-score. Il peut s'agir d'études de lignées familiales (pedigree) ou de familles nucléaires (les deux parents et au moins un enfant) ou enfin d'études de fratrie (paires de

germains ou sib-pairs). Les études de germains sont utiles lorsque le mode de transmission de la maladie est incertain. La liaison avec un marqueur peut être établie en montrant qu'il existe au sein des familles une transmission non aléatoire des allèles parentaux aux enfants atteints. Dans ce cas, les enfants atteints héritent des mêmes allèles du locus considéré plus souvent que ne le voudrait le hasard.

Étude d'association.

Cette approche permet de rechercher des facteurs génétiques de susceptibilité. Elle est basée sur une méthode cas-témoins qui cherche à déceler une différence de distribution des variants génétiques entre une population de cas, constituée d'individus diagnostiqués avec la maladie d'intérêt, et une population de témoins sélectionnés dans la population générale et qui ne sont a priori pas porteurs de la maladie. Il est important d'assurer l'homogénéité des deux groupes en prenant soin de les assortir sur des covariables telles que l'âge ou le sexe, qui peuvent avoir une influence sur le génotype observé et ainsi biaiser le facteur génétique que l'on cherche à détecter. De même, ces études doivent être répétées dans des échantillons issus de populations différentes notamment pour leur origine ethnique. Les études d'association cherchent donc à déceler une association entre un variant génétique et la maladie, à un niveau populationnel et non plus familial. L'association peut-être directe si le marqueur observé est un locus de susceptibilité, ou indirecte si celui-ci se trouve physiquement proche du locus de susceptibilité et que leurs allèles sont statistiquement associés en raison du déséquilibre de liaison. Le déséquilibre de liaison (linkage disequilibrium) décrit la relation entre deux allèles à deux locus dans une population et existe lorsque la probabilité d'observer un couple d'allèles sur un chromosome est supérieure au produit des probabilités d'observer ces allèles individuellement.

En raison de la difficulté liée à l'obtention de témoins appropriés, le recrutement de parents représente une source idéale de témoins et plusieurs méthodes d'analyse d'association utilisant des familles ont été développées. Le test de déséquilibre de transmission (Transmission Disequilibrium Test ou TDT) est l'exemple le plus connu : il teste la transmission d'un allèle d'un polymorphisme biallélique, entre les parents et leur enfant dans un échantillon formé de cas et de leurs deux parents (trios). Le génotype de chaque parent est considéré comme un couple de variables appariées - les allèles - dont l'un est transmis et l'autre non. L'hypothèse nulle est la transmission au hasard d'un des deux

allèles (Spielman et al., 1993). L'avantage du TDT est qu'il permet d'éviter le biais dans la sélection du groupe témoin, ce sont les allèles non transmis des parents qui jouent ce rôle. En toute rigueur ce test n'est utilisable que si une association a été préalablement observée. Néanmoins, lorsque la maladie se développe à un âge relativement avancé, il est quasiment impossible d'obtenir les génotypes parentaux. Une alternative raisonnable est alors d'utiliser des germains non affectés comme témoins (Spielman et Ewens, 1996).

Cas particulier des études d'association génome entier (genome-wide association studies GWAS).

L'approche la plus classique des études d'association est basée sur la sélection d'un ou plusieurs gènes candidats dont les fonctions pourraient intervenir dans l'étiopathogénie de la maladie étudiée. Cette démarche exclut tous les gènes inconnus ou dont le rôle est insoupçonné. Plus récemment, l'intérêt s'est porté sur les études génome entier auparavant utilisées pour des études de liaison dans les maladies monogéniques. Elles cherchent à analyser l'ensemble du génome sans aucun a priori sur l'identité des locus impliqués. La séquence des 3x10⁹ paires de bases qui compose le génome humain n'est pas identique d'un individu à l'autre. Il existe un grand nombre de variations, ou polymorphismes, (environ 1 toutes les 1000 paires de base) de fréquence variable dans la population. Les variations les plus courantes sont des substitutions d'un nucléotide par un autre (appelées SNP pour "single nucleotide polymorphism").

Grâce à la disponibilité récente de cartes de SNPs couvrant le génome entier, couplée au développement de puces de génotypage haute-densité permettant de tester simultanément des centaines de milliers de SNPs, il est maintenant possible de s'intéresser à la variabilité globale du génome sans aucune hypothèse biologique préalable. L'idée est que, s'il existe quelque part dans le génome des variants génétiques liés à la maladie, il devrait être possible de les détecter à condition que la carte des SNPs soit suffisamment dense.

Génétique des formes familiales

Même si la mutation du gène de la SOD1 est la plus fréquemment impliquée, elle ne représente que 20% des SLA familiales (Hand et Rouleau, 2002). A ce jour, 12 loci et 8 gènes ont été identifiés dans des formes familiales à transmission autosomique dominante, récessive ou liée à l’X. Ces gènes ou loci sont parfois trouvés dans une seule famille ou devant un tableau atypique de SLA (Tableau 4). Nous traiterons à part les formes familiales avec démence fronto-temporale.

Gène de la SOD1 (ALS1)

Situé en 21q22, il est composé de 5 exons et code une métalloenzyme (la superoxyde dismutase 1) qui comporte un atome de cuivre nécessaire à son activité enzymatique et un atome de zinc indispensable à la stabilité structurelle protéique. La superoxyde dismutase catalyse la réduction de l’anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ en peroxyde d’hydrogène H_2O_2 et en eau et participe ainsi avec d’autres enzymes à la dégradation des radicaux libres oxygénés. Elle assure donc la protection contre le stress oxydant, phénomène qui représente l’action des radicaux libres oxygénés sur les protéines, les acides nucléiques et les lipides intracellulaires, causant leur dégradation et pouvant aboutir à la mort cellulaire

A ce jour, près de 130 mutations de gène SOD1 ont été rapportées. Il s’agit de mutations ponctuelles faux-sens (qui introduisent un codon stop) ou non-sens (qui modifient un acide aminé) touchant principalement les exons 4 et 5. Certaines sont particulièrement fréquentes : A4V en Amérique du Nord, D90A pathogène à l’état homozygote et I113T fréquemment trouvée dans les formes sporadiques (Andersen et al., 1997; Andersen, 2001; Andersen et al., 2003). Elles ont toutes une transmission autosomique dominante sauf D90A et D96N, décrite plus récemment dans le cadre d’une hétérozygotie composite (Hand et al., 2001).

Tableau 4. Répertoire des gènes et loci identifiés dans les SLA familiales.

Nom	Gène	Locus	Transmission	Protéine	Epidémiologie	Particularités
ALS1	SOD1	21q22.1	AD	SOD1	20%	
ALS2	ALS2	2q33	AR	Alsine	Rare	SLA juvénile
ALS3		18q21	AD	Inconnue	1 famille	
ALS4	SETX	9q34	AD	Senataxine	Rare	Évolution lente avec signes sensitifs, pas d'atteinte bulbaire
ALS5		15q15.1-q21.1	AR	Inconnue	Rare	SLA juvénile
ALS6	FUS	16p11	AD ou AR	FUS	5% des SLAF	
ALS7		20ptel	AD	Inconnue	1 famille	
ALS8	VAPB	20q13	AD	Vesicle associated membrane protein (VAPB)	Rare (Brésil)	Amyotrophie spinale de type IV (Finkel) avec quelques signes d'atteinte du NMc, évolution rapide ou très lente
ALS9	ANG	14q11	AD	Angiogénine	Populations irlandaises et écossaises, rare par ailleurs	
ALS10	TARDBP	1p36	AD	TDP-43	Familles nord-américaines, françaises et anglaises	Début entre 50 et 80 ans avec évolution le plus souvent lente, rapide dans quelques familles
ALS11	FIG4	6q21	AD	FIG4	10 patients (ancêtres européens)	SLA ou SLP
XALS		Xp11-q12	Dominante liée à l'X	Inconnue	1 famille	

Les phénotypes et la pénétrance (probabilité de l'apparition de la maladie si le patient porte l'anomalie génétique) diffèrent selon les mutations. Le phénotype lié à la mutation A4V est parfaitement défini par une atteinte isolée, clinique et histologique, du motoneurone périphérique et une médiane de survie à $1,4 \pm 0,9$ ans (Rosen et al., 1993; Andersen et al., 1997; Cudkowicz et al., 1997; Hand et al., 2001). Cette mutation n'a, à ce jour, jamais été décrite dans des familles françaises. Pour la mutation D90A, le phénotype est caractérisé par une installation insidieuse des troubles moteurs qui débutent aux membres inférieurs en distalité pour suivre une progression ascendante et qui sont fréquemment associés à une atteinte sphinctérienne et sensitive. L'évolution est lente avec une durée de survie moyenne de 14 ans (Andersen et al., 1997). Cette mutation est la seule décrite actuellement à l'état homozygote et la plus fréquemment identifiée en France.

L'âge de début oscille entre 29 ans (G37R) et 55 ans (G85R) voire plus (D90A). La survie peut dépasser 10 ans pour les mutations G37R (18 ans), G93C (Regal et al., 2006). Pour toutes ces mutations, la grande variabilité intrafamiliale de la pénétrance et du phénotype fait suspecter l'intervention d'autres facteurs (génétiques ou environnementaux notamment).

La découverte de ce gène impliqué dans les SLAF a permis le développement et l'étude de modèles animaux transgéniques dont la présentation clinique et anatomopathologique est proche de la SLA humaine.

Gène de l'Alsine (ALS 2)

Le gène de l'Alsine (2q33) a deux transcrits : un long et un court. Trois tableaux ont été associés à des mutations du gène de l'alsine : les formes juvéniles de SLA de transmission récessive autosomique (SLAF2), la sclérose latérale primitive et la paraparésie spastique. Une corrélation génotype-phénotype avait été avancée : la délétion homozygote de la zone codant les deux transcrits entraîne une SLAF2 (Yang et al., 2001), la perte homozygote de la région codant le transcrit long était associée à un tableau de sclérose latérale primitive juvénile alors que les mutations ponctuelles du gène de l'Alsine étaient responsables d'une paraparésie spastique infantile (Eymard-Pierre et al., 2002). Néanmoins,

les mutations qui ont été rapportées ultérieurement n'ont pas confirmé l'hypothèse d'une telle corrélation (Gros-Louis et al., 2006).

Bien que la fonction précise de l'Alsine reste méconnue, la protéine est une GTPase qui semble impliquée dans le transport endosomal (Devon et al., 2006; Lai et al., 2006). Les modèles animaux KO ont une motricité plus lente mais ne développent pas d'atteinte motoneuronale clinique. Les analyses anatomopathologiques montrent une dégénérescence distale des axones du faisceau cortico-spinal et une préservation des MNp (Yamanaka et al., 2006).

Gène de la senataxine (ALS 4)

Le gène de la senataxine, situé sur le locus 9q34, code une hélicase ADN/ARN (Chen et al., 2004). Cette protéine semble impliquée dans la réparation de l'ADN et la production d'ARN. Certaines mutations, responsables d'un gain de fonction, sont associés à une forme juvénile autosomique dominante caractérisée par une amyotrophie distale très lente sans modification de la survie avec des signes d'irritation pyramidale et sensitifs (Chance et al., 1998; Rabin et al., 1999).

A l'inverse, les mutations homozygotes conduisent à une perte de fonction protéique, sont liées aux tableaux d'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (Moreira et al., 2004).

ALS 5

Cette liaison génétique a été décrite dans des familles nord africaines mais aussi européennes. Le phénotype correspond au type 1 des SLA juvéniles récessives autosomiques (Hentati et al., 1998). Les premiers symptômes apparaissent entre 8 et 18 ans. L'évolution est lente. Elles ne sont pas liées à une mutation du gène de l'alsine mais au locus 15q15.1-q21.1 (Hentati et al., 1998).

Gène FUS (ALS 6)

Plusieurs mutations du gène FUS/TLS (16p11) ont été mises en évidence dans des formes familiales (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Le phénotype n'est pas particulier ; aucune démence n'est notée. La protéine est impliquée dans la régulation de la transcription, l'épissage et le transport de l'ARN. Il semblerait que les mutations FUS soient

assez fréquentes (4-5%) dans les formes familiales et qu'elles puissent même être trouvées dans les SLAS (Belzil et al., 2009; Corrado et al., 2009). La mutation p.R521C semble être associée à une présentation proximale symétrique des membres supérieurs avec atteinte axiale (Corrado et al., 2009).

Gène VAPB (ALS 8)

Une mutation pathogène sur le gène VAPB (Vesicle trafficking protein B) a été découverte dans une famille dont la particularité clinique était l'existence d'un tremblement postural présent dès les stades précoces de la maladie. L'atteinte prédominait sur le motoneurone périphérique, un seul des 11 patients examinés présentant des signes cliniques en faveur d'une atteinte du motoneurone central (Nishimura et al., 2004). Des mutations du gène VAPB ont été décrites également dans des tableaux d'amyotrophie spinale (Marques et al., 2006).

Gène ANG (ALS 9)

Les mutations du gène ANG ont été identifiées dans des formes familiales et sporadiques (Greenway et al., 2006; Wu et al., 2007; Gellera et al., 2008; Paubel et al., 2008; Fernandez-Santiago et al., 2009). Le phénotype ne semble pas particulier même si certains ont noté une forte proportion de formes bulbaires (Greenway et al., 2006). L'angiogénine est une protéine exprimée en réponse à l'hypoxie pour déclencher une angiogénèse mais elle est aussi impliquée dans la transcription de l'ARN. Les mutations conduiraient par une modification conformationnelle à une perte de fonction de la protéine (Wu et al., 2007; Paubel et al., 2008).

Gène TARDBP (ALS 10)

L'identification de la protéine TDP-43 comme marqueur neuropathologique commun de la SLA et de la démence frontotemporale avec inclusions ubiquitine-positives (DFT-U) a conduit à la découverte de mutations du gène TARDBP (1p36) qui code cette protéine. Ainsi plusieurs équipes ont mis en évidence des mutations de ce gène chez des patients avec une SLA sporadique ou familiale (Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Van Deerlin et al., 2008) avec une fréquence relativement élevée (environ 5% des formes familiales non-SOD). Ces patients souffrent d'une SLA typique, sans trouble cognitif, et l'analyse

neuropathologique montre des inclusions neuronales contenant la protéine TDP-43 sous une forme anormale.

Gène FIG4 (ALS 11)

Les mutations du gène FIG4 (6p21) sont responsables d'une forme sévère et juvénile de maladie de Charcot-Marie-Tooth de début précoce et de transmission récessive (Chow et al., 2007). Dix mutations ont été trouvées chez 3 patients avec SLA familiale, 3 patients avec SLA d'allure sporadique et 2 patients ayant un phénotype de SLP (Chow et al., 2009). Les patients avaient tous des ancêtres européens. Il n'est pas précisé sur quels critères était fait le diagnostic de SLP.

Autres gènes dans les formes familiales

D'autres loci ont été identifiés dans une ou quelques familles. Trois sont de transmission autosomique dominante et reliés à un phénotype de SLAF classique (atteinte conjointe des motoneurones centraux et périphériques, début à l'âge adulte et évolution progressive) sur les chromosomes 18q21 (ALS3) 16q12 (ALS6) et 20p13 (ALS7) (Hand et Rouleau, 2002; Abalkhail et al., 2003; Ruddy et al., 2003; Sapp et al., 2003). Une forme familiale de transmission dominante liée à l'X a été rapportée et corrélée au locus Xp11-12 (Siddique et al., 1998). Une mutation sur le gène de la dynactine, une protéine impliquée dans le transport axonal rétrograde, a été trouvée dans une famille présentant un tableau d'atteinte progressive du neurone moteur périphérique (Puls et al., 2003) et une famille avec un tableau de SLA et démence fronto-temporale (Munch et al., 2005).

Cas particulier des SLA avec démence frontotemporale.

Les troubles cognitifs, longtemps considérés comme inhabituels, sont décrits de plus en plus dans la SLA pouvant toucher jusqu'à 50% des malades. Ces troubles sont responsables d'une perturbation de la personnalité, de troubles du comportement et du langage (Abrahams et al., 2005). Parallèlement, il existe dans environ 5% des cas un tableau démentiel de type démence fronto-temporale (Pradat et Bruneteau, 2006). Ces formes ont fait l'objet de recherches de mutations génétiques, en considérant notamment les gènes impliqués ou suspectés dans les démences fronto-temporales sans atteinte du neurone moteur (Tableau 5). Deux formes autosomiques dominantes associent SLA et démence

fronto-temporale avec des loci identifiés sur les chromosomes 9 et 17 (Hutton et al., 1998; Hosler et al., 2000; Wilhelmsen et al., 2004). Une étude récente a mis en évidence une liaison avec un autre locus du chromosome 9, le locus 9p13.2-21.3 (Vance et al., 2006). A la différence de ce qui est montré dans les DFT, les mutations du gène de la progranuline (PGRN) sont exceptionnelles dans les SLA-DFT (Schymick et al., 2007) mais semblent influencer le phénotype (début plus précoce et évolution plus courte (Sleegers et al., 2008). Une mutation du gène FUS a été trouvée dans seulement une famille (Ticozzi et al., 2009). Parmi les patients porteurs d'une mutation du gène ANG, quelques-uns ont un phénotype de SLA-DFT (Gellera et al., 2008; van Es et al., 2009). Enfin, comme dans les SLA familiales, des mutations du gène TARDBP ont été mises en évidence, chez deux patients d'une cohorte de 149 patients SLA-DFT (Benajiba et al., 2009).

Tableau 5. Répertoire des gènes et loci identifiés dans les SLA familiales avec démence frontotemporale.

Nom	Gène	Locus	Transmission	Protéine	Epidémiologie	Particularités
ALS/FTD1		9q21-q22	AD	Inconnue	Rare (< 1%)	
ALS/FTD2		9p21	AD	Inconnue	60% des SLA-DFT héréditaires	Inclusions TDP-43 positives et tau négatives
ALS/FTD3	CHMP2B	2p11	?	Protéine modifiant la chromatine	Quelques cas	
ALS/FTD	MAPT	17q21.1	AD	Microtubule associated protein tau	Rare	Syndrome parkinsonien

Génétique des formes sporadiques

Compte tenu des similitudes phénotypiques et évolutives entre SLAF et SLA sporadique (SLAS), la découverte de mutations dans la SLAF a étayé l'hypothèse génétique dans les formes sporadiques, renforcée ensuite par les résultats de plusieurs études d'association. Différents gènes de susceptibilité ont été suspectés dans la SLAS, avec des polymorphismes pouvant influencer sur le risque de SLA ou seulement des paramètres cliniques comme la durée d'évolution, la forme clinique ou la survie. Les études d'association sont basées sur l'étude de la fréquence des polymorphismes dans une population de patients SLA comparée à celle obtenue dans une population témoin.

Les gènes de susceptibilité sont suspectés en raison de leur implication dans des pathologies neurodégénératives (motrices ou non) ou de leur intervention potentielle dans des mécanismes physiopathologiques de la SLA.

Gènes impliqués dans des pathologies neurodégénératives

Gène SOD1

Étant donné la fréquence des mutations du gène SOD1 dans les SLA familiales, il était tout naturel de rechercher des mutations de ce même gène dans la SLA sporadique. Elles sont trouvées chez environ 3 à 5% des patients présentant une SLA apparemment sporadique (Andersen, 2001). Ceci peut s'expliquer par une censure de certaines informations en raison d'une méconnaissance des antécédents familiaux, d'un décès précoce des parents du sujet atteint masquant ainsi le caractère familial de la pathologie, d'une mutation de novo ou exceptionnellement d'une forme de transmission autosomique récessive (Siddique et Dellefave, 2006).

Gène APOE

Le gène de l'apolipoprotéine E a été suspecté dans la SLA en raison de son implication dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques et la maladie de Parkinson (Chapman et al., 2001; Huang et al., 2004). La présence d'un allèle $\epsilon 4$ augmente le risque et diminue l'âge de début de la maladie d'Alzheimer (Saunders et al., 1993). L'apolipoprotéine E intervient dans la croissance neuronale et l'inhibition de l'apoptose, en sachant que les allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 3$ semblent plus efficaces dans ce rôle que l'allèle $\epsilon 4$ (Nathan et al., 1994; DeKroon et al., 2003).

Dans la SLA, les résultats concernant l'allèle $\epsilon 4$ sont contradictoires. Quatre études n'ont pas montré d'association entre SLA et Apo $\epsilon 4$. (Mui et al., 1995; al-Chalabi et al., 1996; Smith et al., 1996; Bachus et al., 1997; Drory et al., 2001). Une seule étude a montré une association significative entre l'allèle $\epsilon 4$ et le risque de SLA mais sur un petit échantillon (al-Chalabi et al., 1996). Une association significative entre la présence d'un allèle $\epsilon 4$ et un début bulbaire a été démontré à deux reprises (al-Chalabi et al., 1996; Moulard et al., 1996). Ces données n'ont pas été confirmées sur une large série (Siddique et al., 1998) Enfin, une étude a montré un effet protecteur de l'allèle $\epsilon 2$ contre un début précoce (Li et al., 2004).

Les données plus détaillées concernant le gène APOE et la SLA seront développées dans l'étude du gène APOE comme facteur de susceptibilité dans la SLAS.

Gène SMN

Le gène SMN (survie du motoneurone) est présent dans le génome humain sous la forme de 2 copies ne différant que de quelques nucléotides : SMN1 en position télomérique et SMN2 en position centromérique. Une délétion homozygote du gène SMN1 est responsable de l'Amyotrophie Spinale Infantile (ASI) (Lefebvre et al., 1995). Cette similitude clinique entre ASI et SLA ont fait des gènes SMN des gènes de susceptibilité de la SLA. Les études se sont d'abord attachées à rechercher des délétions du gène SMN1 chez les patients SLA (Jackson et al., 1996; Orrell et al., 1997; Moulard et al., 1998; Parboosingh et al., 1999; Gamez et al., 2002). Avec le développement de la technique de PCR semi-quantitative permettant de quantifier le nombre de copies des gènes SMN1 et SMN2, plusieurs études ont été réalisées dans la SLA sporadique (Veldink et al., 2001; Corcia et al., 2002; Veldink et al., 2005; Corcia et al., 2006).

Un nombre anormal de copies de SMN1 (1 ou 3 copies) multiplie le risque de SLAS d'un facteur 2,8 (Corcia et al., 2006). Le nombre de copies de SMN2 n'est pas lié au risque de SLA et, contrairement à ce qui est constaté dans l'ASI, ne module pas le phénotype (Corcia et al., 2002; Corcia et al., 2006).

Autres gènes

Plusieurs gènes impliqués dans la survenue d'autres affections neurodégénératives ont fait l'objet d'études d'association dans la SLA. Ce fut le cas du gène de pré-séniline 1, de la MAO-B, de la lysyl oxidase (LOX), de la débrisoquine hydroxylase ou la SOD2.(Siddons et al., 1996; Orru et al., 1999; Van Landeghem et al., 1999; Panas et al., 2000; Chioza et al., 2001). Tous ces travaux reposent sur une méthodologie critiquable le plus souvent par le choix du groupe contrôle (nouveaux-nés par exemple pour l'étude concernant la SOD2) ou le faible effectif des études.

Gènes intervenant dans des mécanismes physiopathologiques

Hypoxie- Gènes VEGF et ANG

Gène VEGF

La délétion de HRE (élément de réponse à l'hypoxie) dans la partie promotrice du gène du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) chez la souris entraîne une maladie du motoneurone débutant à l'âge adulte et d'évolution progressive (Oosthuysen et al., 2001). Dans ce modèle, la réponse à l'hypoxie est altérée et le taux sanguin de VEGF est diminué. De plus, la surexpression du récepteur 2 du VEGF (Flk-1) atténue l'atteinte du motoneurone dans un modèle animal SOD alors que la surexpression d'un récepteur inhibiteur aggrave la dégénérescence des neurones moteurs (Lambrechts et al., 2003). Le lien entre le VEGF et le neurone moteur est soit indirect par son effet sur la vascularisation sur le tissu nerveux soit direct par un effet protecteur et trophique (Van Den Bosch et al., 2004).

Une étude d'association a montré que les haplotypes associés avec une faible expression du VEGF sont plus fréquemment rencontrés chez les patients SLA par rapport aux contrôles (Lambrechts et al., 2003). Trois études sur de plus grandes séries dans d'autres populations sont négatives (Van Vught et al., 2005; Chen et al., 2006; Del Bo et al., 2008),

ce qui semble indiquer que les polymorphismes étudiés jouent au mieux un rôle très accessoire dans la maladie.

Gène ANG

Autre facteur régulé par l'hypoxie, l'angiogénine a aussi été suspectée non seulement dans une hypothèse vasculaire de la SLA mais aussi en raison de son rôle neuroprotecteur (Lambrechts et al., 2006). Sept mutations différentes ont été identifiées sur le gène ANG chez 15 patients dans une population irlandaise et écossaise (Greenway et al., 2006). Parmi ces 15 patients, quatre sont des cas familiaux. Les études dans les cohortes allemande et italienne ont trouvé des mutations respectivement pour deux et six patients présentant une SLAS (Gellera et al., 2008; Fernandez-Santiago et al., 2009).

Transport axonal - Gènes des neurofilaments

Les neurofilaments sont les protéines les plus abondantes des motoneurones en raison de la longueur de l'axone et contribuent à la croissance radiale des axones et au transport axonal. Les neurofilaments de type IV sont formés de trois sous-unités classées selon leur poids moléculaire : NF-L (65 kDa), NF-M (95 kDa) et NF-H (115 kDa). Dans la SLA, l'accumulation de neurofilaments notamment dans les inclusions est un marqueur anatomopathologique de la maladie (Hirano et al., 1984; Rouleau et al., 1996). A ce jour, sept mutations différentes dans le domaine KSP du gène NEFH (codant NF-H) ont été identifiées dans la SLA sporadique (Figlewicz et al., 1994; Tomkins et al., 1998; Al-Chalabi et al., 1999). Dans des conditions physiologiques, la phosphorylation du domaine KSP permettrait de régler l'espace inter-filament et ainsi de réguler le calibre axonal.

Des mutations sur d'autres gènes des neurofilaments ont été décrites dans les maladies du motoneurones. En effet, des mutations du gène de la périphérine, un neurofilament de type III, ont été identifiées dans un cas familial et dans un cas sporadique de SLA (Robertson et al., 2003; Gros-Louis et al., 2004). Les modèles animaux conduisent à une perte axonale ou à une accumulation de neurofilaments, marqueur anatomopathologique de la maladie (Zhu et al., 1997).

Hypothèse toxique - Gène PON

Des études récentes ont recherché une association entre la SLAS et le gène de la paraoxonase. Cette enzyme joue un rôle détoxifiant notamment face aux organophosphorés et aux neurotoxines. Slowik et al. trouvent une association significative en comparant patients et population générale, avec un odds-ratio à 3,44 (IC 95% : 1,55-7,62, $p = 0,002$) (Slowik et al., 2006). Dans l'étude de Saeed et coll., seule l'analyse intrafamiliale montre un lien significatif entre SLAS et certains blocs haplotypiques (Saeed et al., 2006). Une étude menée sur trois populations (France, Suède, Québec) était négative mais un haplotype de la région terminale du gène *PON2* était associé significativement à la SLA dans les populations française et québécoise (Valdmanis et al., 2008). Une méta-analyse conclut à un lien significatif (Wills et al., 2009).

Stress oxydant – Fer - Gène HFE

Le polymorphisme C282Y de ce gène est impliqué dans l'hémochromatose familiale de type 1 (Feder et al., 1996). La fonction exacte de ce gène est inconnue mais son interaction avec le récepteur de la transferrine fait supposer un rôle dans le métabolisme du fer et le stress oxydatif. Des taux élevés de fer dans les neurones moteurs ont été rapportés dans la SLA et le stress oxydatif est un des mécanismes physiopathologiques supposés (Shaw, 2005). Après un résultat négatif dans la SLAS sur un petit effectif (Yen et al., 2004), deux autres études montrent une association significative avec l'allèle D de H63D (Wang et al., 2004; Goodall et al., 2005).

Les données concernant le gène HFE et la SLA seront développées dans l'étude sur le gène HFE comme facteur de susceptibilité de la SLAS.

Autres gènes de susceptibilité

L'excitotoxicité est un des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA. Dans une étude portant sur 200 patients SLAS, une mutation du gène codant EAAT2 a été trouvée chez un seul patient (Aoki et al., 1998). Elle perturberait la glycosylation de EAAT2 mais son rôle pathogène n'est pas clair. De plus, une autre étude, européenne, est négative (Jackson et al., 1999).

Suspectés en raison de données expérimentales, d'autres gènes tels que ceux du CNTF (Ciliary neurotrophic factor), de l'apex endonucléase ou du LIF (Leukemia inhibiting factor) ont été étudiés avec des résultats peu probants sur de petites populations ou négatifs (Giess et al., 2000; Tomkins et al., 2000; Tomkins et al., 2001; Al-Chalabi et al., 2003).

Études génome-entier

Ces études tentent d'identifier un locus avec des mutations ou un nombre anormal de copies de gènes associé au risque de SLA. Elles sont peu nombreuses et les résultats peu contributifs. Le plus souvent, l'association entre les loci identifiés par la technique « genome-wide » et la SLA sporadique n'est pas confirmée par une étude secondaire (Mougeot et al., 2009).

Deux études ont montré une augmentation du nombre de duplications ou délétions de gènes chez les patients avec SLA sporadique (Blauw et al., 2008; Cronin et al., 2008) sans qu'un locus particulier soit identifié. Deux études trouvent une trentaine de polymorphismes faiblement associés à la SLA mais sans significativité après correction de Bonferroni applicable aux tests multiples (Schymick et al., 2007; Cronin et al., 2009). Les autres études ont identifié différents loci: DPP6 (dipeptidyl-peptidase 6), FLJ10986 ou FGGY (FGGY carbohydrate kinase domain containing), ITPR2 (inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2), UNC13A (van Es et al., 2007; van Es et al., 2008; Cronin et al., 2009; Van Es et al., 2009; van Es et al., 2009). Il faut noter que seul DPP6 a été identifié par deux études menées sur des populations différentes. Enfin, trois polymorphismes possiblement associés à la SLA ont été détectés par une étude génome-entier avec analyse des polymorphismes deux à deux (Sha et al., 2009).

Troisième partie
Systèmes candidats étudiés

HFE et métabolisme du fer

Plusieurs données incitent à suspecter l'implication du fer dans la physiopathologie de la SLA. Avant d'exposer ces liens éventuels, nous allons rappeler quelques notions du métabolisme physiologique du fer et les facteurs intervenant dans sa régulation.

Métabolisme physiologique.

Le fer est un élément indispensable à l'érythropoïèse. Il est un des composants de l'hémoglobine et des protéines héminiques. La majeure partie du fer de l'organisme est localisée dans les hématies (70 à 90% selon le sexe).

Les apports en fer sont alimentaires mais l'organisme le stocke aussi dans des réserves, essentiellement hépatiques. De plus, lors de l'hémolyse physiologique, les macrophages récupèrent le fer pour une nouvelle utilisation.

Dans la nature le fer se trouve sous trois formes chimiques (ionique, organique, héminique). L'absorption intestinale du fer dépend de sa forme chimique. Le fer ionisé et le fer héminique (hémoglobine, myoglobine) sont très bien absorbés. En moyenne, seulement 10 % du fer total ingéré franchit la muqueuse intestinale. Les apports moyens par 24 h sont de 20 à 30 mg si l'alimentation est équilibrée (2 à 3 mg absorbés par la muqueuse digestive). Les pertes en fer sont de l'ordre de 1 mg chez l'homme (urine, bile, sueur, desquamations). Elles augmentent chez la femme non ménopausée (30 mg à chaque période cataméniale, 500 mg à chaque grossesse).

L'absorption intestinale du fer est maximale au niveau du duodénum et de la partie haute du jéjunum (Figure 8). Les protéines héminiques traversent les cellules muqueuses par diffusion et libèrent leur fer in situ (la xanthine oxydase en transformant la xanthine en acide urique produit du peroxyde d'hydrogène qui ouvre le cycle héminique, libère le fer).

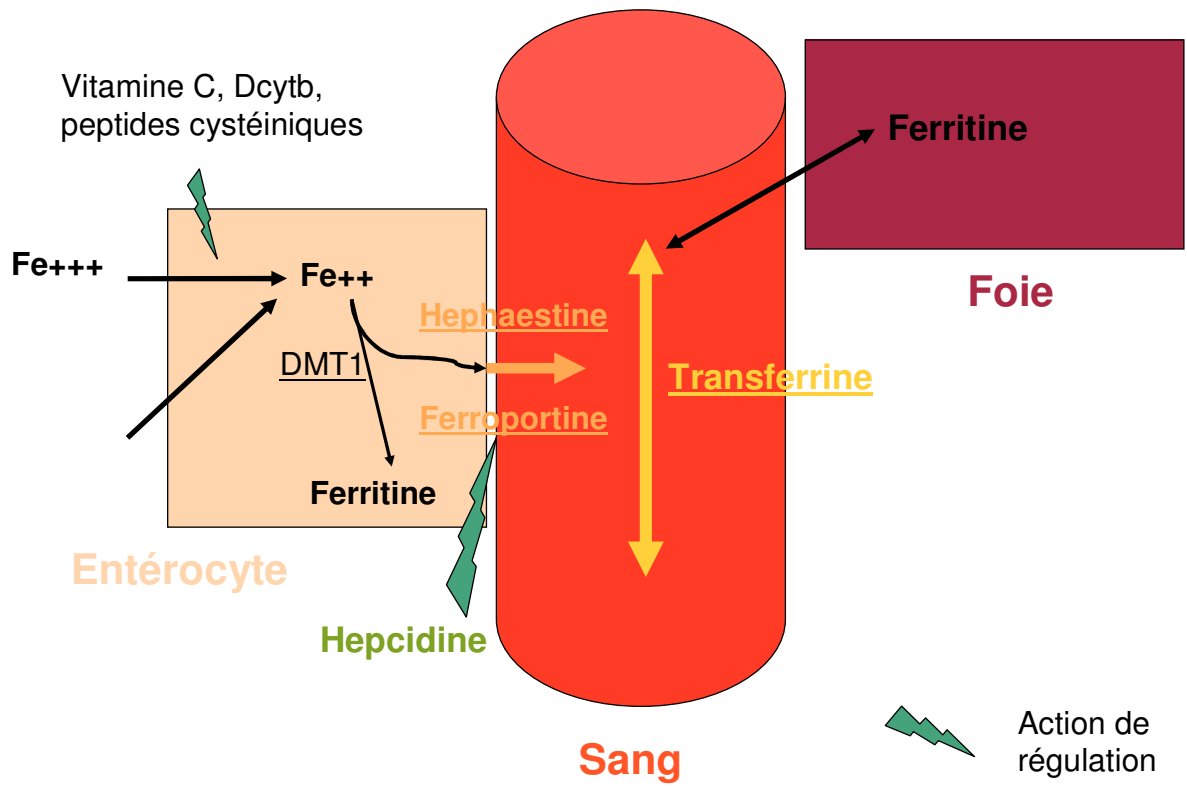
Pour traverser la barrière intestinale, le fer alimentaire non héminique doit être libéré des complexes alimentaires puis réduit à l'état ferreux (vitamine C, peptides cystéiniques, activité ferriréductase de Dcytb) (McKie et al., 2001). Le fer est alors transporté au sein du

cytoplasme de l'entérocyte grâce au transporteur transmembranaire des cations divalents DMT1 (divalent metal transporter 1) (Gunshin et al., 1997; Fleming et al., 1998). Les atomes de fer ainsi internalisés sont dirigés soit vers le pôle basal de l'entérocyte soit vers la ferritine. La sortie du fer de l'entérocyte par le pôle basal implique deux autres protéines : IREG1 (aussi appelée ferroportine) et hephaestine (Vulpe et al., 1999; McKie et al., 2000).

Plusieurs protéines ou acides aminés peuvent transporter le fer (lactoferrine des granulocytes, albumine, lysine, arginine) mais la transferrine est la seule capable de le délivrer aux érythroblastes. Chaque molécule de transferrine peut transporter deux molécules de fer à l'état ferrique. La transferrine plasmatique transporte le fer aux récepteurs érythroblastiques. Le fer est ensuite incorporé dans une molécule d'hème par l'hème synthétase.

Les réserves en fer sont parenchymateuses et macrophagiques. Le foie est le principal organe de réserve (hépatocytes et cellules de Kupffer). Il existe deux molécules de réserve : la ferritine et l'hémosidérine. Le fer de la ferritine est disponible à la différence du fer de l'hémosidérine. L'hémosidérine est de la ferritine dégradée (complexée à différents pigments cellulaires). Le fer parenchymateux vient de la transferrine. Le fer macrophagique vient de l'hémolyse. La ferritine est une métalloprotéine (la partie protéique se nomme apoferritine). L'apoferritine possède 24 sous unités protéiques de 2 types : les sous-unités H (pour *heart* et *high*) et L (pour *liver* et *light*). Ces sous-unités, lorsqu'elles sont associées forment une véritable coque protéique au sein de laquelle peuvent venir se nicher jusqu'à 4 500 atomes de fer sous une forme biochimiquement inactive. La sous-unité H possède une activité oxydase qui permettrait l'internalisation du fer cytoplasmique dans la coque protéique. La sous-unité L participerait au phénomène de nucléation des atomes de fer (Andrews, 1999).

Figure 8. Transport du fer et sa régulation.



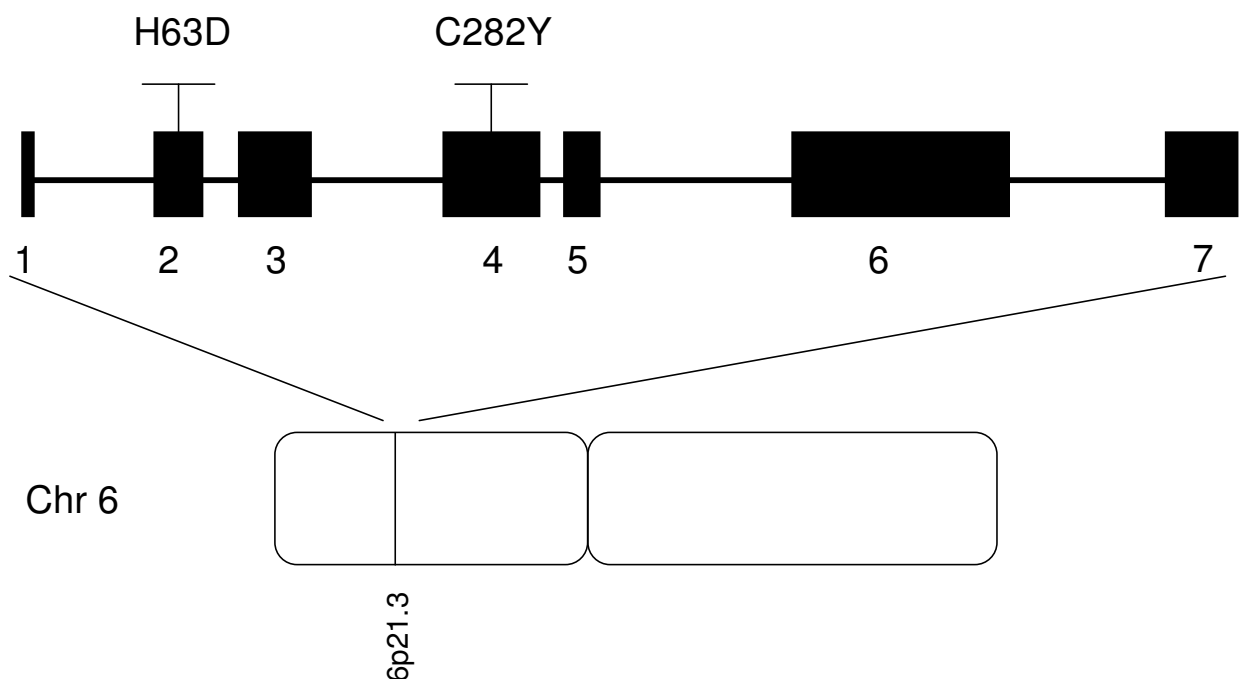
Les protéines dont le nom est souligné sont les protéines qui assurent le transport du fer.

Facteurs de régulation dans l'homéostasie du fer.

HFE.

La molécule HFE a été la première identifiée parmi les effecteurs impliqués dans le contrôle du niveau d'absorption du fer. En effet, une mutation du gène qui code HFE entraîne une hémochromatose génétique dite « classique » par hyperabsorption du fer (Feder et al., 1996). Il s'agit d'une protéine de la famille HLA de classe I-like qui s'exprime, en association avec la bêta-2-microglobuline, à la surface des cellules. La protéine HFE possède un domaine transmembranaire et 3 domaines globulaires extracellulaires. Chez l'homme, elle a été détectée par immunolocalisation tout au long du tube digestif, et au niveau des macrophages notamment les cellules de Kupffer (Parkkila et al., 1997). Le gène HFE situé sur le chromosome 6 comporte 7 exons (Figure 9).

Figure 9. Gène HFE et place des mutations étudiées.



Différentes mutations du gène HFE ont été identifiées (cf. chapitre « Génétique de la Sclérose Latérale Amyotrophique »). La mutation C282Y entraîne la rupture d'un pont disulfure qui participe à la conformation globulaire de la partie extracellulaire, entravant l'association avec la bêta-2-microglobuline et perturbant ainsi l'expression de la protéine sur

la membrane des cellules (Feder et al., 1997). Les mutations H63D et S65C n'entraînent *a priori* pas de modifications importantes de la zone d'interaction avec la bêta-2-microglobuline et ne gêneraient donc pas l'expression membranaire. L'hypothèse du rôle de la protéine HFE dans le métabolisme du fer a été confirmée par l'obtention, par plusieurs équipes, de souris knock-out pour le gène HFE et qui développaient une surcharge en fer comparable à celle observée au cours de l'hémochromatose génétique (Zhou et al., 1998; Bahram et al., 1999; Levy et al., 1999). La molécule HFE forme avec la bêta-2-microglobuline un complexe qui se lie au récepteur de la transferrine (TfR1). Le rôle de la molécule HFE n'est pas clairement déterminé. Il semblerait que le complexe HFE-TfR n'ait pas de rôle régulateur à proprement parler mais que TfR pourrait séquestrer HFE pour l'empêcher d'agir ailleurs (Andrews et Schmidt, 2007). Le rôle de la molécule HFE dans l'évaluation du pool ferrique de l'organisme est établi mais les mécanismes exacts demeurent inconnus (Goswami et Andrews, 2006).

IRP (iron regulatory proteins).

Les IRP sont des protéines qui, par leur liaison aux IRE (iron regulatory elements) présents dans les régions non transcrites des ARNm des protéines intervenant dans le transport et le stockage du fer, régulent la transcription de ces mêmes protéines (Meyron-Holtz et al., 2004).

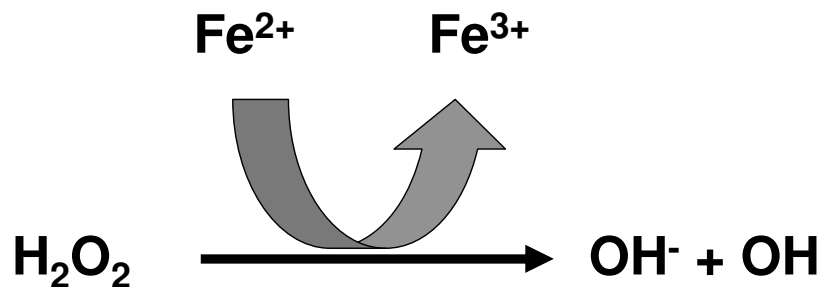
Hepcidine.

L'hepcidine est un polypeptide de 25 acides aminés produite en majorité par les hépatocytes mais aussi dans le cœur, le pancréas et les cellules hématopoïétiques (Park et al., 2001; Ilyin et al., 2003). Le lien entre hepcidine et surcharge en fer a été démontré chez l'animal (Nicolas et al., 2001; Pigeon et al., 2001). L'augmentation de l'expression de l'hepcidine entraîne une anémie par interruption de l'absorption intestinale et rétention au sein des macrophages du fer (Nicolas et al., 2002). Ainsi, l'hepcidine régule le relargage cellulaire du fer dans l'épithélium intestinal et les macrophages tissulaires en contrôlant l'activité de la ferroportine à laquelle elle se lie (Nemeth et al., 2004; Andrews et Schmidt, 2007). L'hepcidine est contrôlée par les autres protéines intervenant dans l'homéostasie du fer (HFE, TfR2) par l'intermédiaire d'une régulation de son expression génétique (Andrews et Schmidt, 2007).

Métabolisme du fer dans la SLA.

Une accumulation et des taux élevés de fer ont été observés dans le système nerveux central des patients SLA (Oba et al., 1993; Imon et al., 1995; Kasarskis et al., 1995). Le lien entre ces observations et la pathogénie de la maladie reste obscur. Néanmoins, le fer peut contribuer à la formation de radicaux libres oxygénés par l'intermédiaire de la réaction de Fenton (Figure 10) et ainsi participer au stress oxydatif, un des mécanismes physiopathologiques de la SLA (Shaw, 2005). Des modifications du métabolisme du fer sont aussi supposés depuis l'observation de taux élevés de ferritine dans le sérum de patients SLA (Goodall et al., 2008; Qureshi et al., 2008).

Figure 10. Réaction de Fenton.



Au cours de la réaction, le peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée) oxyde le fer ferreux en fer ferrique et en produisant le radical hydroxyle très toxique selon la réaction d'oxydo-réduction :

Les études sur des modèles animaux transgéniques SOD1 apportent des éléments explicatifs intéressants. L'accumulation de fer est observée à la fois dans les neurones et les cellules gliales mais le mécanisme conduisant à cette accumulation semble être différent dans ces deux types cellulaires (Jeong et al., 2009). Dans les cellules gliales, l'afflux de fer semble résulter d'une augmentation de TfR1 faisant suite à une augmentation de la fixation d'IRP1. IRP1 devrait conduire à une diminution de l'expression de la ferritine mais les taux de ferritine sont augmentés dans la microglie probablement par l'action de cytokines

proinflammatoires. Cette augmentation majore les capacités de stockage de fer et peut ainsi conduire à une toxicité cellulaire (Jeong et David, 2006).

En revanche, dans les neurones, de tels phénomènes ne sont pas observés. L'expression de DMT1 est augmentée et probablement régulée par les cytokines proinflammatoires. Cette piste reste insuffisante pour expliquer l'accumulation intracellulaire de fer. L'hypothèse d'une conséquence de l'altération du transport axonal est plus consistante. Des dépôts de fer sont observés dans le corps cellulaires des neurones moteurs périphériques après la réalisation d'un blocage artificiel du transport axonal par ligature du tronc nerveux par exemple (Wu et al., 2004; Zhang et al., 2005). Par ailleurs, l'atteinte mitochondriale peut aussi expliquer l'accumulation du fer car la mitochondrie est le lieu d'incorporation du fer dans différentes protéines ou enzymes pour lesquelles le fer joue un rôle de cofacteur (Jeong et al., 2009).

L'hypothèse d'une accumulation du fer toxique secondaire à une dysrégulation de son métabolisme repose aussi sur l'observation d'une amélioration de la survie de souris transgéniques SOD1 après traitement chélateur du fer (Jeong et al., 2009).

Métabolisme des lipides et SLA

L'observation d'un hypermétabolisme dans la SLA expliquant en partie la dénutrition a conduit à analyser le métabolisme lipidique des patients et des modèles animaux. Après de brefs rappels sur le métabolisme des lipides et plus particulièrement sur leur transport, nous exposerons les liens entre apolipoprotéine E et SLA et les données sur l'altération du métabolisme lipidique.

Métabolisme physiologique

Les lipides sont des éléments essentiels au fonctionnement de l'organisme et donc des constituants indispensables du régime alimentaire. En effet, ils ont une forte valeur énergétique et s'associent aux vitamines liposolubles (A, D, E, K) et aux acides gras essentiels.

Classification des lipides.

Ils jouent des rôles métaboliques variés et sont ainsi classés en lipides de réserve, lipides de structure et lipides à activité métabolique.

La quantité de lipides de réserve varie selon l'état nutritionnel. Constitués à plus de 95% de triglycérides et présents dans presque toutes les cellules, ils sont abondants dans les adipocytes.

Les lipides de structure représentent environ 10% du poids de l'organisme et cette proportion est stable quelque soit l'état nutritionnel. Ils font partie intégrante des structures cellulaires et sont localisés principalement dans les membranes. Ces lipides « complexes » ont une composition chimique variable (phospholipides, esters de cholestérol).

Les lipides à activité métabolique sont les éléments de base de la fabrication des eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes), des diacylglycérols et inositol-phosphate (messagers hormonaux) et des hormones stéroïdes.

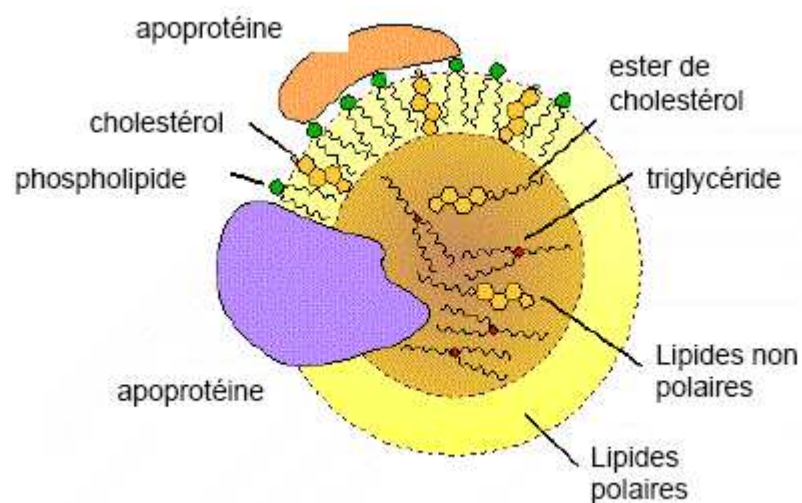
Pour former ces trois groupes, les lipides circulent dans l'organisme et en raison de leur insolubilité dans l'eau, ils doivent former des associations avec des protéines sous forme de complexes solubles appelées lipoprotéines.

Transport des lipides, rôle des lipoprotéines.

Les lipoprotéines, isolées pour la première fois en 1929 par Michel Macheboeuf, sont des particules circulantes constituées d'un noyau hydrophobe et d'un manteau hydrophile (Olson, 1998). Le noyau hydrophobe est composé des triglycérides et des cholestérylesters, tandis que le manteau est composé de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Figure 11). Ces dernières confèrent à chaque édifice lipoprotéique ses propriétés fonctionnelles et son devenir métabolique. Les lipoprotéines ne constituent pas *in vivo* des entités stables mais elles subissent des remaniements constants durant leur transit dans le sang.

Le métabolisme des lipoprotéines s'articule en trois voies : (1) la voie entéro-hépatique, permettant le transport des lipides exogènes de l'intestin vers le foie ; (2) la voie d'apport que représente le transport centrifuge des lipides du foie vers les tissus périphériques ; et (3) la voie de retour, permettant le transport centripète du cholestérol des tissus périphériques vers le foie et son excrétion biliaire.

Figure 11. Composition d'une lipoprotéine.



Les lipoprotéines majeures sont :

- les chylomicrons synthétisés dans les entérocytes: forme de transport des triglycérides alimentaires vers les tissus utilisateurs et le tissu adipeux ;
- les VLDL (very low density lipoproteins) synthétisées dans le foie ;
- les LDL (low density lipoproteins);
- les HDL (high density lipoproteins) synthétisés dans le sang.

L'amélioration des techniques de centrifugation sanguine a permis d'identifier d'autres lipoprotéines plasmatiques (Tableau 6).

Tableau 6. Classification et caractéristiques des lipoprotéines plasmatiques.

Type de lipoprotéine	Densité (g/ml)	Principales apolipoprotéines
Chylomicrons	0,93	B48, E, C
VLDL	0,93-1,006	B100, E, C
IDL	1,006-1,019	B100, E
LDL	1,019-1,063	B100
HDL2	1,063-1,125	AI, AII, C
HDL3	1,125-1,210	AI, AII, C
préβHDL	1,210-1,250	AI
Lp(a)	1,040-1,115	B 100, (a)

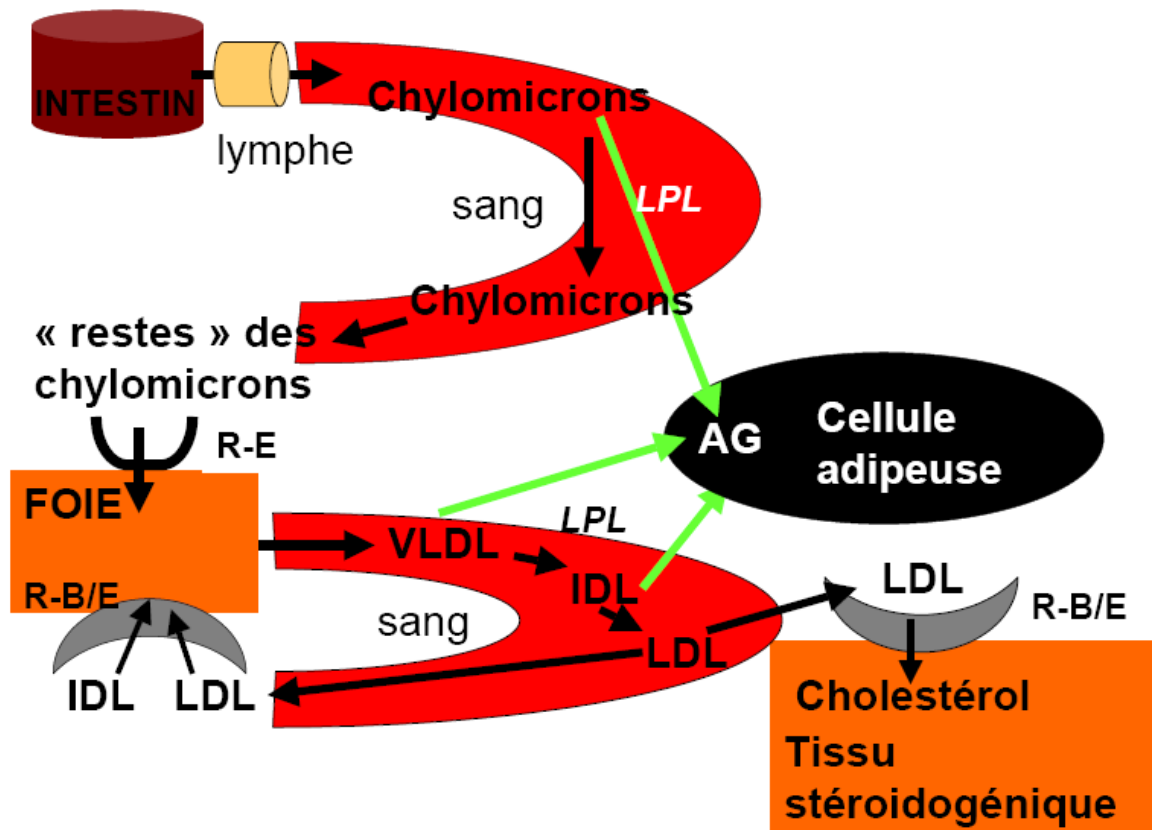
Légende : IDL : intermediate density lipoprotein

L'intestin permet l'absorption des lipides alimentaires et leur intégration dans des lipoprotéines de grande taille, néosynthétisées au sein de l'entérocyte et riches en triglycérides : les chylomicrons (Figure 12). Ces chylomicrons vont contribuer au transport entéro-hépatique des lipides, voie métabolique au cours de laquelle leurs triglycérides seront hydrolysés et captés par les tissus périphériques pour y être stockés (tissu adipeux), ou

dégradés à des fins énergétiques (muscle strié). Au niveau des capillaires, les chylomicrons et les VLDL s'attachent progressivement aux parois où une lipoprotéine lipase les débarrasse de leur triglycéride en les hydrolysant en acides gras et en 2-monoacylglycérol. Le reste protéique du chylomicron retourne dans le flux sanguin et est capturé par le foie. Les acides gras et le monoglycéride pénètrent dans les cellules adjacentes (musculaires ou adipeuses) par diffusion grâce au gradient entre les deux compartiments. Ces composés sont utilisés directement dans la β -oxydation ou sont retransformés en triglycérides pour être stockés.

Le foie constitue l'organe central de gestion du métabolisme et du transport des lipides dans l'organisme. Il prend en charge les lipides résiduels d'origine intestinale et les intègre dans de nouvelles lipoprotéines afin de les redistribuer aux tissus périphériques. Cette voie centrifuge consiste en une cascade impliquant les VLDL, les IDL et les LDL. Enfin, les tissus périphériques captent des lipides (principalement cholestérol et acides gras libres non estérifiés) par le biais de l'endocytose et de l'hydrolyse des lipoprotéines d'origine hépatique ou intestinale. Quant au cholestérol, la plupart des tissus périphériques ne peuvent pas le métaboliser et ont recours, via les HDL, à une voie de transport centripète vers le foie, seul organe capable de l'éliminer par voie biliaire.

Figure 12. Distribution et fonction des lipoprotéines.



LPL lipoprotéine lipase ; AG : acides gras

Les apolipoprotéines.

Les apolipoprotéines, protéines associées aux lipoprotéines, sont synthétisées dans les sites d'assemblage des lipoprotéines, le foie et l'intestin.

Initialement, les apolipoprotéines ont été subdivisées en trois sous-familles distinctes selon la nomenclature A, B et C (Gustafson et al., 1966) ; les apoA sont principalement associées aux HDL, les apoB aux LDL et les apoC aux VLDL et HDL. En fait, cette nomenclature a considérablement évolué en raison de la découverte de nouvelles apolipoprotéines et de profils de distribution spécifiques au sein des lipoprotéines plasmatiques (Tableau 7). Par exemple, alors que les apolipoprotéines A-I et A-II se localisent quasi-exclusivement dans les HDL, l'apolipoprotéine A-IV peut aussi s'associer aux lipoprotéines riches en triglycérides ; les apolipoprotéines B se localisent non seulement dans les LDL, mais également dans les VLDL et les chylomicrons : les apoE, comme les

apoC, ne sont pas associées à un seul type de lipoprotéines, mais se retrouvent à la fois dans les VLDL et les HDL (Tableau 7).

Les apolipoprotéines exercent plusieurs rôles : transport et distribution des lipoprotéines aux tissus grâce à leurs récepteurs spécifiques (apo B et E), maintien de la structure des lipoprotéines (apo B, A-I, A-II et E), et actions de cofacteurs (apo A-I, A-II, A-IV, A-V, C-I, C-II, C-III) des enzymes du métabolisme lipidique (Mahley et al., 1984). Dans le cas particulier de la Lp(a), l'apo(a) spécifique de cette lipoprotéine est liée à une molécule apo B par un pont dissulfure (Berglund et Ramakrishnan, 2004).

Tableau 7. Les différentes apolipoprotéines et leur fonction.

Nom	Tissu	Distribution	Fonctions
apo AI	foie, intestin	Chylo, HDL	Structurale; activateur physiologique de la LCAT ; efflux de cholestérol
apo AII	foie (intestin)	HDL	Structurale; activateur/inhibiteur de la lipase hépatique ; efflux de cholestérol
apo AIV	foie, intestin	Chylo, HDL	Transport reverse du cholestérol; activateur de la LCAT ; métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
apo AV	foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
apo BI00	foie	VLDL, IDL, LDL	Structurale : synthèse et sécrétion des VLDL ; ligand du récepteur LDLR
apo B48	intestin	chylomicrons	Structurale ; synthèse et sécrétion des chylomicrons ; ligand du récepteur B48R
apo CI	foie (intestin)	Chylo, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP : activateur de la LCAT; inhibiteur de la liaison aux LDLR, LRP et VLDLR
apo CII	foie (intestin)	Chylo, VLDL, HDL	Activateur physiologique de la LPL
apo CIII	foie (intestin)	Chylo, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la LPL ; inhibiteur de la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG
apo D (apo AIII)	foie, intestin, rate pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport reverse du cholestérol (?)
apo E	foie, macrophage cerveau	Chylo, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDLR et LRP
apo F	foie	LDL (VLDL, HDL)	Inhibiteur de la CETP
apo G		HDL ?	
apo H		HDL ?	
apo J		HDL	Anti-inflammatoire
apo L		HDL ?	
apo SAA		HDL, Chylo	Phase aiguë de l'inflammation

LDLR : LDL receptor ; LRP : LDL receptor-related protein ; CETP : cholesteryl ester transfer protein ; VLLR VLDL recpetor ; TG : triglycérides ; LCAT : lecithine cholesterol acyltransferase ; LPL : lipoprotein lipase ; B48R : apoB48 receptor

L'apolipoprotéine E : une apolipoprotéine particulière.

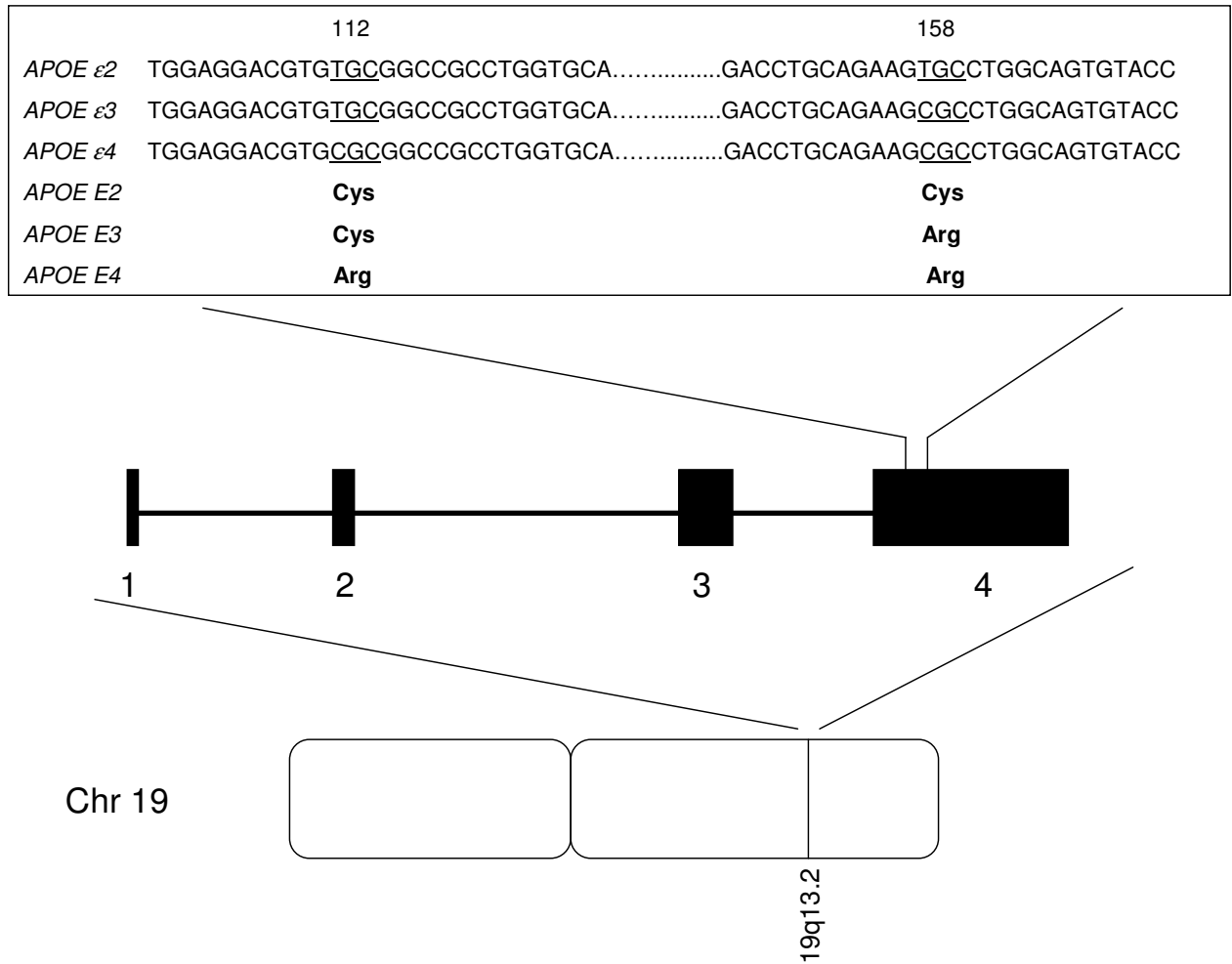
L'apolipoprotéine E (apoE) se distingue des autres apolipoprotéines car, outre son rôle dans le transport du cholestérol et des phospholipides (Shore et Shore, 1973; Mahley, 1988), son implication dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer a fait découvrir d'autres fonctions. L'apoE a été mise en évidence au sein des lésions de la maladie d'Alzheimer, aussi bien dans les plaques séniles que dans la dégénérescence neurofibrillaire (Namba et al., 1991). Des études génétiques ont ensuite montré que l'apoE intervenait dans la maladie d'Alzheimer, en tant que facteur de risque (pour l'allèle E4) ou protecteur (pour l'allèle E2) (Saunders et al., 1993).

Structure

Le gène de l'apoE est situé sur le chromosome 19, dans la région q13.2 (Olaisen et al., 1982; Das et al., 1985). Ce gène de 3,7 kb comporte quatre exons et trois introns (Das et al., 1985). Le premier exon est non codant, le deuxième exon code un peptide signal, le troisième exon les 61 premiers acides aminés et le quatrième l'essentiel de la protéine mature (Figure 13). L'ARNm a une longueur de 1163 paires de base (McLean et al., 1984).

L'apoE existe sous trois isoformes principales E2, E3, E4, produits des allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ (Hixson et Vernier, 1990). La fréquence des allèles varie selon les populations, toutefois l'isoforme E3 reste la plus fréquente (Hallman et al., 1991). Les différences entre les trois allèles résultent d'une transition de cytosine à thymine aux positions 112 et 158, modifiant les sites de restriction HhaI (Hixson et Vernier, 1990). L'apoE3 comporte une cystéine au résidu 112 et une arginine au résidu 158; la cystéine est présente à ces deux résidus pour l'isoforme E2, et l'arginine à ces deux mêmes positions pour l'apoE4 (Weisgraber et al., 1981).

Figure 13. Gène de l'apolipoprotéine E et les trois isoformes.

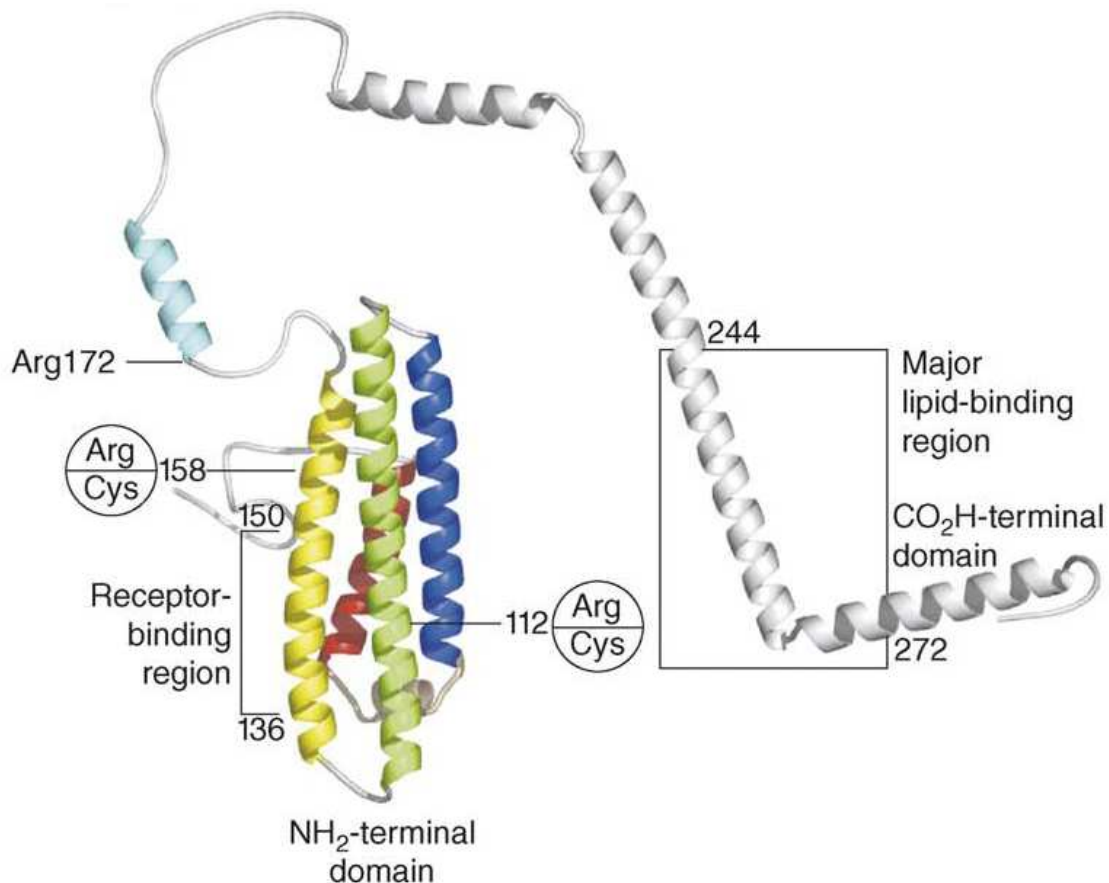


L'apoE mature secrétée est une protéine de masse moléculaire apparente de 34 kDa (299 acides aminés). Les isoformes de l'apoE forment des complexes différents: la présence des cystéines en position 112 et 158 de l'apoE2 permet la formation de dimères et de multimères; la seule cystéine en position 112 de l'apoE3 autorise la formation de dimères; l'absence de cystéine à ces positions, remplacées par des arginines dans l'apoE4 impose la présence de cette isoforme sous forme monomérique (Tozuka et al., 1992).

L'apoE comporte deux domaines structuraux correspondant à deux domaines fonctionnels (Figure 14). La partie N-terminale (1-191) (22 kDa) comporte quatre hélices alpha amphiphiles de 22 acides aminés (caractéristiques des apolipoprotéines) arrangées de façon antiparallèle (Wilson et al., 1991) et un domaine riche en acides aminés basiques (lysine et arginine) qui représente un site de fixation à l'héparine (142-147) (Weisgraber et al., 1986) et de liaison avec le récepteur LDL (141-155) (Innerarity et al., 1983; Weisgraber et al., 1983; Hatters et al., 2006). La partie C-terminale (216-299) (10 kDa) joue un rôle

majeur dans le transport des lipides, grâce à un site de liaison aux lipides (244-272) (Weisgraber, 1990). La partie située entre ces deux domaines fonctionnels est une région de structure non ordonnée.

Figure 14. Structure de la protéine ApoE.



Selon Hatters et al. (2006)

Synthèse

L'apoE est synthétisée principalement par le foie mais le second site de production est le cerveau (Elshourbagy et al., 1985). Sa synthèse est alors effectuée surtout par les astrocytes (Poirier et al., 1991) et la microglie (Nakai et al., 1996) même si les neurones sont capables d'en produire (Xu et al., 2006). L'apoE est la principale apolipoprotéine du système nerveux avec apoJ and apoA-1 (Pitas et al., 1987; Fagan et al., 1999).

Fonction

L'apoE est un des composants des lipoprotéines et particulier des VLDL, des HDL et des chylomicrons. L'apoE3 a une préférence pour former des complexes de type HDL, de même que l'apoE2; l'apoE4 forme plutôt des VLDL (Steinmetz et al., 1989; Weisgraber, 1990). L'apoE joue donc un rôle clairement établi dans le transport des lipides, mais de nombreuses données prouvent son intervention essentielle dans le système nerveux. Le cholestérol libéré par les lipoprotéines formées par l'ApoE dans le système nerveux central sert à la synaptogénèse et au maintien des connexions synaptiques (Pfrieger, 2003).

L'implication de l'ApoE dans la réparation, la croissance et le maintien de la myéline pendant le développement et après agression dans le système nerveux périphérique et central a été démontrée (Muller et Minwegen, 1987; Poirier et al., 1991). Lors de l'agression du nerf sciatique, l'apo E est produite en quantité élevée au niveau de la lésion, et l'expression des récepteurs de type LDL est augmentée dans les cellules de Schwann au niveau de la lésion (Ignatius et al., 1986; Boyles et al., 1990).

Des études *in vitro* sur des neurones du système périphérique de lapins ont mis en évidence une augmentation de la croissance neuritique, en particulier un accroissement du branchement neuritique, en présence d'une source de lipides (bêta-VLDL). Lorsque l'apo E de lapin (proche de l'apo E3 humaine) est ajoutée, une extension neuritique plus importante est observée (Handelmann et al., 1992). Cependant, les apoE3 et E4 humaines produisent un effet différent sur la croissance neuritique. En présence de bêta-VLDL, l'apoE3 augmente la croissance neuritique tandis que l'apoE4 diminue les branchements et l'extension neuritiques des neurones périphériques de lapins en culture (Nathan et al., 1994). Les effets spécifiques de l'apoE3 et de l'apoE4 sont inhibés par l'addition d'anticorps contre le domaine de liaison de l'apoE aux récepteurs, ou par une méthylation réductive des lysines de l'apoE, ce qui implique une intervention des récepteurs aux lipoprotéines (Nathan et al., 1994).

L'effet de l'apoE sur les neurones est médié par les récepteurs aux lipoprotéines: l'apoE sans lipides ne se lie pas aux récepteurs LDL ou LRP, présents sur les neurones. L'inhibition de la croissance neuritique par l'isoforme E4 serait associée à une dépolymérisation des microtubules ou tout au moins une déstabilisation du cytosquelette neuronal (Nathan et al., 1995; Nathan et al., 2002). Le rôle crucial de l'apoE au sein du système nerveux a été mis en évidence lors d'études de souris invalidées pour apoE. Chez ces souris knock-out, on note une diminution du nombre de synapses en fonction de l'âge,

une vacuolisation des dendrites, une rupture du système des endomembranes et une fragmentation des éléments microtubulaires (Masliah et al., 1995; Roses et al., 1996).

Métabolisme des lipides dans la SLA

La dénutrition est un des aspects communs de la SLA et peut être expliquée par différents facteurs parmi lesquels la modification du métabolisme physiologique (hypermétabolisme) semble prendre une part importante. L'hypermétabolisme se traduit par une augmentation de la dépense énergétique de repos qui a été démontrée dans la SLA (Kasarskis et al., 1996; Desport et al., 2001).

Pour expliquer cet hypermétabolisme, plusieurs auteurs ont initialement suggéré que l'augmentation du travail des seuls muscles respiratoires causait une majoration de la dépense énergétique de repos. Cette hypothèse est actuellement écartée en raison de résultats contradictoires (Bouteloup et al., 2009). Une augmentation de la dépense énergétique de l'ensemble des muscles squelettiques semble plus probable (Fergani et al., 2007).

L'hypothèse d'une altération du métabolisme glucidique a aussi été soulevée avec l'observation d'une intolérance au glucose sur un petit groupe de patients (Pradat et al., 2009). Cependant, les données sur les modifications du métabolisme lipidique sont plus nombreuses. Une hyperlipidémie est constatée chez les patients SLA et elle exerce un effet protecteur sur la survie (Dupuis et al., 2008). Les taux de cholestérol total, LDL-cholestérol et le rapport LDL/HDL sont d'un tiers supérieurs chez des patients SLA par rapport aux contrôles. D'autre part, le degré de stéatose hépatique est plus important chez des patients SLA autopsiés par rapport à des patients souffrant de maladie de Parkinson (Dupuis et al., 2008). Dans un modèle de souris transgéniques SOD1 pour lequel l'hypermétabolisme est démontré, l'absorption gastro-intestinale des lipides et l'élimination des lipides plasmatiques sont augmentées (Fergani et al., 2007). Ces phénomènes, tout comme l'augmentation de la consommation de glucose observée dans les mêmes modèles animaux, sont aisément expliqués par l'atteinte mitochondriale (Krasnianski et al., 2005).

Quatrième partie

Étude des gènes de susceptibilité dans les
formes sporadiques de sclérose latérale
amyotrophique

Introduction

La découverte de mutations du gène SOD1 dans les formes familiales de SLA a permis, notamment grâce au développement de modèles animaux, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la SLA, maladie principalement sporadique. L'intervention de mutations génétiques dans la SLA sporadique peut se concevoir dans le cadre d'une maladie dite « complexe », c'est-à-dire une affection liée à la conjonction de facteurs environnementaux et génétiques. Dans un modèle de maladie complexe, les gènes impliqués sont multiples et leur participation à la pathogénie est variable. De plus la combinaison de gènes impliqués peut elle même varier pour chaque individu atteint de la maladie.

Avec cette hypothèse de travail, l'identification des facteurs génétiques associés à la SLA repose sur la réalisation d'études d'association guidées par les pistes physiopathologiques préalablement connues ou suspectées. Notre objectif était d'étudier, parmi la multitude de gènes candidats pouvant intervenir dans les mécanismes physiopathologiques de la SLA, des gènes correspondant à des voies biochimiques connues et sur lesquelles il existe des possibilités de modification par les thérapeutiques actuelles.

Notre travail s'est basé sur les données récentes montrant des modifications du métabolisme des lipides dans la SLA expliquant l'augmentation du métabolisme énergétique déjà observé et pouvant influencer sur l'évolution de la maladie. Le gène de l'Apolipoprotéine E (APOE) avait déjà été suspecté comme gène de susceptibilité dans la SLA, principalement en raison de son implication dans une autre maladie neurodégénérative, la maladie d'Alzheimer. L'anatomopathologie très différente de ces deux pathologies explique, au moins en partie, les résultats négatifs des études d'association entre le gène APOE et le risque de SLA. Cependant, plusieurs de ces études ont montré une relation entre le génotype APOE et le phénotype. Nous proposons donc de vérifier ce lien, rendu plausible par les données sur le métabolisme des lipides, sur une grande population de patients ayant une SLA sporadique.

La deuxième étude que nous présentons, repose sur l'intervention du fer dans la physiopathologie de la SLA. En effet, la réaction de Fenton, à l'origine de la production de

radicaux hydroxyles, fait intervenir l'ion ferreux et la SOD1. Plusieurs études ont trouvé une association entre le gène HFE, impliqué dans l'hémochromatose familiale de type 1 et la SLA. Ces résultats restent cependant peu convaincants et notre objectif était de les vérifier dans la population française de patients atteints de SLA sporadique.

APOE ϵ 4 increases the risk of bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis in men.

Résumé.

Le gène APOE a été initialement étudié dans la SLA en raison de son rôle dans la maladie d'Alzheimer. En effet, l'allèle ϵ 4 augmente le risque de développer une maladie d'Alzheimer, les homozygotes ayant 14 fois plus de risque que les sujets qui ne portent pas l'allèle ϵ 4. Les études sur le lien entre l'allèle ϵ 4 et la SLA se sont toutes révélées négatives mais certaines ont montré un effet de l'allèle ϵ 4 sur le phénotype. Récemment, il a été démontré que l'hyperlipidémie était un facteur pronostique en augmentant la survie dans la SLA (Dupuis et al., 2008). L'intervention du gène APOE dans la SLA méritait donc d'être revue, à la lumière de ces nouvelles données et en tenant compte des fonctions de mieux en mieux connues d'APOE, notamment son action sur les hormones sexuelles (Ost et al., 2008; Kolovou et al., 2008 ; Raber et al., 2008). Les différences phénotypiques homme-femme dans la SLA vont aussi dans ce sens.

Notre étude avait donc pour objectif de déterminer si les allèles du gène APOE pouvaient constituer des facteurs modifiant le phénotype de la SLA sporadique en étudiant plus particulièrement l'effet de l'allèle ϵ 4 sur le site de début et la durée d'évolution de la maladie.

L'analyse inclut les génotypes de 1546 patients présentant une SLA sporadique. Elle confirmait qu'un début bulbaire est plus fréquent chez la femme (odds ratio (OR) = 2,17; intervalle de confiance (IC) à 95%: 1,74-2,72) et chez les patients ayant un début tardif (OR = 3,47 en comparant le groupe avec un début tardif par rapport au groupe avec un début précoce; IC 95%: 2,58-4,67). La distribution des porteurs de l'allèle ϵ 4 était significativement différente entre les patients avec début bulbaire et ceux avec début spinal (OR = 1,39 début bulbaire versus spinal; IC 95%: 1,08-1,80), et ceci était dû à une différence observée uniquement chez les hommes (OR = 1,78; IC 95%: 1,25-2,53).

Nos résultats montraient donc que l'allèle $\epsilon 4$ est un facteur de risque pour un début bulbaire chez l'homme. Nous discutons les hypothèses physiopathologiques qui pourraient expliquer ce résultat. Il est possible que les hommes soient physiologiquement protégés contre un début bulbaire et que la présence de l'allèle $\epsilon 4$ inhiberait cette protection, possiblement en interférant avec la voie des androgènes. Les données phénotypiques et épidémiologiques de la SLA sont compatibles avec cette hypothèse. Le génotype APOE pourrait donc être un élément à considérer lors des essais thérapeutiques et les hommes porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ pourraient être candidats à des thérapeutiques spécifiques.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the most frequent adult-onset motor neuron disease, is characterized by degeneration of both lower and upper motor neurons. This neurodegenerative disease is sporadic in 80-90% of cases. Mutations of the *SOD1* gene have been reported in 20% of familial ALS (FALS) cases (Rosen et al., 1993) and 3-5 % in sporadic cases (Andersen, 2001). *Alsin*, *senataxin*, *angiogenin*, *TARDBP* and *FUS* genes have also been identified in FALS (Yang et al., 2001; Chen et al., 2004; Greenway et al., 2006; Siddique et Dellefave, 2006; Sreedharan et al., 2008; Kwiatkowski et al., 2009), but only 5% of all ALS cases can be explained by known genetic mutations.

The causes of the remaining forms of ALS are unknown. Several association studies have searched for possible genetic risk factors for sporadic ALS (SALS). To date, the *SMNI* gene seems to pose the greatest genetic risk; abnormal *SMNI* gene copy number is associated with two to three times higher risk of acquiring ALS (Corcia et al., 2002; Corcia et al., 2006). Two *VEGF* (vascular endothelial growth factor) gene haplotypes may also be associated with the disease (Lambrechts et al., 2003).

The apolipoprotein E (*APOE*) locus was initially studied in ALS because of its role in other neurodegenerative disorders, including Alzheimer (AD) and Parkinson disease. Three alleles ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) exist in Humans (Hixson et Vernier, 1990). The $\epsilon 4$ allele increases risk of AD and decreases age-at-onset in a dose-dependent manner (Saunders et al., 1993), representing one of the strongest genetic risk factors so far identified in this complex disease; individuals homozygous for the $\epsilon 4$ allele have approximately 14 times greater risk for developing late-onset AD than those who possess other alleles. Studies of the *APOE* alleles as a risk factors for developing ALS were negative (Mui et al., 1995; al-Chalabi et al., 1996; Moulard et al., 1996; Smith et al., 1996; Bachus et al., 1997; Siddique et al., 1998; Drory et al., 2001; Lacomblez et al., 2002; Zetterberg et al., 2008). An association of $\epsilon 4$ allele with bulbar-onset was reported by some authors (al-Chalabi et al., 1996; Moulard et al., 1996) but not by others (Smith et al., 1996; Bachus et al., 1997; Siddique et al., 1998; Drory et al., 2001). One study demonstrated a deleterious effect of the $\epsilon 4$ allele on survival (Drory et al., 2001). Other studies showed an effect of the $\epsilon 4$ allele on the age-at-onset (Moulard et al., 1996; Zetterberg et al., 2008) but others were negative (Mui et al., 1995; al-Chalabi et al., 1996; Bachus et al., 1997; Siddique et al., 1998; Drory et al., 2001).

APOE is a regulator of plasma lipid levels, which may be a prognostic factor for survival in ALS (Dupuis et al., 2008). Taking account into these recent data, the role of *APOE* in ALS needs to be reviewed. Furthermore, the link between *APOE* and sex hormones could suggest a gender-related influence of *APOE* genotype on the disease phenotype. Such effect was previously observed in several diseases (Ost et al., 2008; Kolovou et al., 2009). In ALS, the higher frequency of the bulbar-onset form in women suggests a gender-related effect which could be caused by *APOE*.

In the current study, we examined the frequency of *APOE* alleles in a large cohort of patients with SALS. The aim was to determine whether *APOE* alleles might act as modifying factors for SALS phenotype, particularly the effect of $\epsilon 4$ allele on the site-of-onset and the disease duration and regarding such allelic effects in respect to gender. We discuss our results in the context of a detailed review of *APOE* association studies.

Subjects and methods.

Subjects.

Clinical data and blood samples were obtained from 1546 patients with SALS and 955 controls. The diagnosis of ALS was made in one of the French ALS Study Group's centers, according to diagnostic criteria for definite or probable ALS (Brooks et al., 2000). None presented with clinical features of frontotemporal dementia. For each patient, clinical data comprised gender, site-of-onset (limb or bulbar), age-at-onset and, if available, disease duration.

The site-of-onset was defined as either bulbar or limb-onset. Bulbar-onset was defined as symptoms first occurring at the bulbar level with dysphagia, dysphonia or dysarthria. Limb-onset was defined as symptoms first occurring in the limbs. The age-at-onset was defined as the time at which first motor weakness was reported by the patient. The duration of ALS was defined as the interval between onset and death or tracheotomy.

The control group encompassed 955 unaffected unrelated French-Caucasian individuals selected after an ethnic and medical questionnaire and matched for age and gender with the ALS population. All participants signed a consent form.

Genotyping.

DNA was extracted by standard procedures from peripheral blood (Sambrook et al., 1989). The *APOE* polymorphisms were determined by polymerase chain reaction, followed by Cfo1 (Boehringer, Mannheim, Germany) digestion and electrophoresis, as previously described (Hixson et Vernier, 1990). Analysis of *APOE* genotype was performed by an investigator blind to the disease status (SALS or control).

APOE alleles as susceptibility factors for SALS

We evaluated the *APOE* genotype and alleles frequency in the SALS and control groups. We also studied *APOE* allele frequencies in SALS sub-groups defined by the number of SMN1 gene copies (Corcia et al., 2002).

APOE alleles as modifying factors of the disease.

We tested the influence of age-at-onset and *APOE* genotype on the site-of-onset in males and females. The evaluation of the relationship between *APOE* genotype, site-of-onset, and disease duration was performed by 3 independent analyses, considering $\epsilon 4$ vs non $\epsilon 4$ -carriers; $\epsilon 3$ vs non $\epsilon 3$ -carriers and $\epsilon 2$ vs non $\epsilon 2$ -carriers. To test age-at-onset, the ALS sample was dichotomized into young vs old and also analyzed as tertiles. We also analysed the effect of age-at-onset, gender, and site-of-onset on the disease duration.

Statistical analysis.

Allele and genotype frequencies were counted and tested for Hardy-Weinberg equilibrium. The χ^2 test was performed to search for an association. Significance threshold was 0.05. Logistic regression was performed on Statview[®] to identify confounding factors and to reveal explicative factors for observed significant differences. We included only patients without missing data in the analyses. Survival curves were estimated by Kaplan Meier methods and comparison of survival data between different groups (i.e age-at-onset, gender, *APOE* alleles carriers, site-of-onset) was performed using the log-rank test. The power of this study was sufficient to detect a difference of 5% between controls and patients, accepting an alpha risk of 5% and a beta risk of 20%.

Review of previously published studies.

We performed a review of previously published studies on *APOE* alleles in SALS. We searched in MEDLINE (PubMed) for English-language publications with keywords Amyotrophic lateral sclerosis or motor neuron disease and *APOE* or apolipoprotein. The search revealed 34 publications. We included only studies that matched the following criteria: (1) case-control association studies in which the cases (at least a part) were diagnosed as sporadic ALS, and (2) availability of information on genotype frequency (at least $\epsilon 4$ carriers/ $\epsilon 4$ non-carriers). The following data were extracted from each included study: sample size of SALS cases and controls, *APOE* genotype, site-of-onset (bulbar or limb), age-at-onset and duration of the disease for cases. For each included study, allele and genotype frequencies were tested for Hardy-Weinberg equilibrium. We compared the allele frequency between SALS patients and controls and between two sub-groups of SALS patients defined by the site-of-onset (bulbar-onset and limb-onset). The χ^2 test was performed to search for an association.

Results.

APOE alleles as susceptibility factors for SALS

Genotype frequencies respected Hardy-Weinberg equilibrium in both groups (not shown). We did not observe statistical differences between SALS and control groups, taking into account genotype and allele frequencies of the *APOE* gene (Tableau 8).

The distribution of alleles did not differ between two subgroups of 440 patients defined by the number of *SMN1* gene copies, *i.e* 2 copies versus 1 or 3 (Tableau 9).

Tableau 8. Genotypes and alleles frequencies of the *APOE* gene in SALS and control groups.

Genotypes	ALS patients		Controls	
	Frequency (%)	n	Frequency (%)	n
$\epsilon 2\text{-}\epsilon 2$	0.3	4	0.2	2
$\epsilon 2\text{-}\epsilon 3$	12.0	185	11.6	111
$\epsilon 2\text{-}\epsilon 4$	1.8	28	1.9	18
$\epsilon 3\text{-}\epsilon 3$	64.8	1002	65.4	624
$\epsilon 3\text{-}\epsilon 4$	20.0	310	18.7	179
$\epsilon 4\text{-}\epsilon 4$	1.1	17	2.2	21
Total	100	1546	100	955
Alleles				
$\epsilon 2$	7.2	221	7.0	133
$\epsilon 3$	80.8	2499	80.5	1538
$\epsilon 4$	12.0	372	12.5	239
Total	100	3092	100	1910

χ^2 test for genotypes (grouping $\epsilon 2\text{-}\epsilon 2$ and $\epsilon 2\text{-}\epsilon 3$): $\chi^2=0.105$; $p=0.95$.

χ^2 test for alleles: $\chi^2=0.294$; $p=0.86$.

Tableau 9. Alleles frequencies of the *APOE* gene in SALS sub-groups defined by the number of SMN1 gene copies.

SMN1 gene	1 or 3 copies		2 copies		
	Alleles	Frequency (%)	n	Frequency (%)	n
	ε2	6.9	7	6.3	49
	ε3	80.4	82	81.7	636
	ε4	12.7	13	12.0	93
	Total	100	102	100	778

χ^2 test: $\chi^2=0.112$; $p=0.95$.

APOE alleles as modifying factors of the disease

Univariate analysis showed significant differences in the distribution of gender, age-at-onset and ε4 allele between bulbar and limb-onset forms (Tableau 10). There were no significant differences with ε2 and ε3 alleles (not shown). Women were significantly more frequent in the bulbar-onset group than in the limb-onset one (OR=2.17; CI 95%: 1.74-2.72). The age-at-onset was significantly higher in the bulbar-onset group than in the limb-onset group (OR=3.47 comparing the oldest group to the youngest; CI 95%: 2.58-4.67). There was a significant difference in the distribution of *APOE* ε4 carriers between the two sub-groups defined by the site-of-onset (OR=1.39 bulbar versus limb-onset; CI 95%: 1.08-1.80). Such a difference was not observed for the two other *APOE* alleles (not shown).

The observed differences in univariate analysis were confirmed by multivariate analysis. As gender and age-of-onset were not independent variables ($p<0.0001$), we included only the gender parameter in multivariate analyses, which confirmed the independent influence of ε4 allele and gender on the site-of-onset (Tableau 10). A more detailed analysis showed that the difference in ε4 carriers according to the site-of-onset was largely due to the male patients and was not seen in the female group (Tableau 11 and Figure 15).

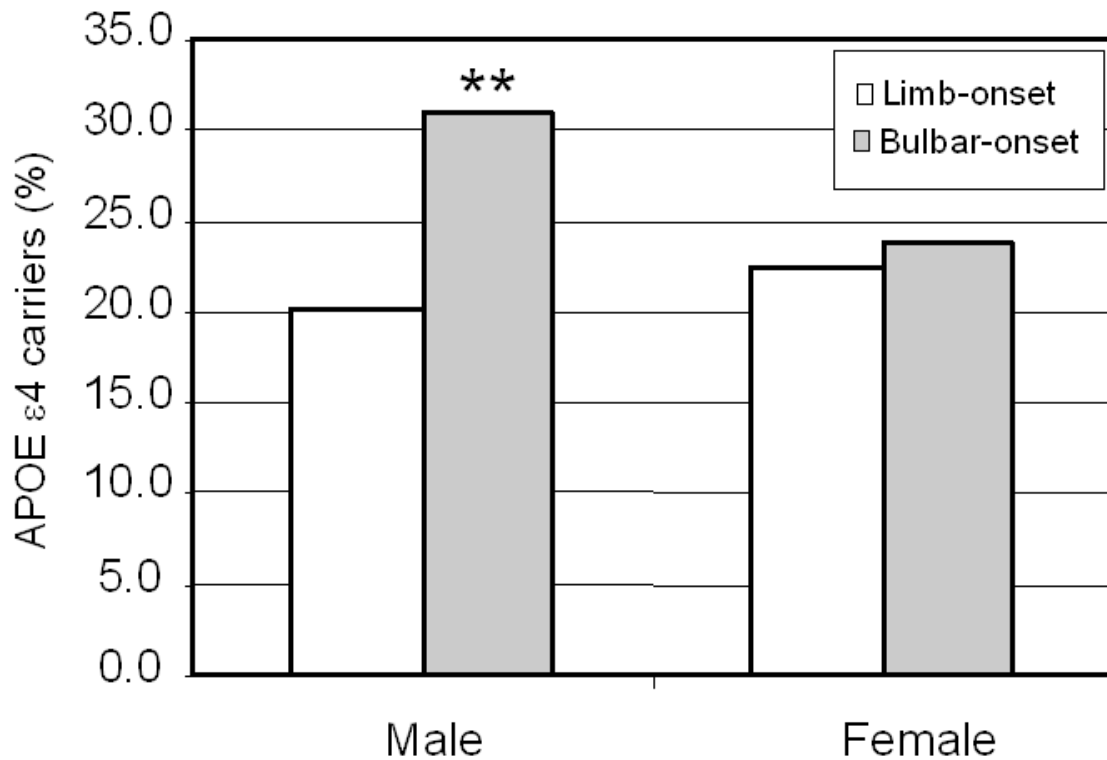
Tableau 10. Modifying factors for site-of-onset: results of univariate and multivariate analyses (N=1482).

Factors	Site-of-onset		Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Bulbar-onset	Limb-onset	<i>p</i> value	OR (IC 95%)	<i>p</i> value	OR (IC 95%)
Gender						
M	204 (44.0%)	642 (63.1%)	< 0.0001	1	< 0.0001	1
F	260 (56.0%)	376 (36.9%)		2.17 (1.74-2.72)		2.18 (1.74-2.73)
Age-at-onset						
≤ 55	80 (17.2%)	373 (36.3%)	< 0.0001	1		
56-67	159 (34.3%)	343 (33.7%)		2.16 (1.59-2.94)		
≥ 68	225 (48.5%)	302 (29.7%)		3.47 (2.58-4.67)		
APOE ε4 status						
Non ε4 carriers	339 (73.1%)	805 (79.1%)	0.0105	1	0.0101	1
ε4 carriers	125 (26.9%)	213 (20.9%)		1.39 (1.08-1.80)		1.41 (1.08-1.81)

Tableau 11. Modifying factors for site-of-onset: results of univariate and multivariate analyses in each gender group (N=1482).

Gender	Factors	Site-of-onset		Univariate analysis		Multivariate analysis	
		Bulbar-onset	Limb-onset	p value	OR (IC 95%)	p value	OR (IC 95%)
Male	Age-at-onset						
	≤ 55	49 (24.0%)	254 (39.6%)	< 0.0001	1	< 0.0001	
	56-67	68 (33.4%)	213 (33.2%)		1.66 (1.10-2.49)		1.67 (1.11-2.53)
	≥ 68	87 (42.6%)	175 (27.2%)		2.58 (1.73-3.84)		2.62 (1.75-3.92)
	APOE ε4 status						
	Non ε4 carriers	141 (69.1%)	513 (80.0%)	0.0014	1	0.0011	1
ε4 carriers	63 (30.9%)	129 (20.0%)		1.78 (1.25-2.53)		1.82 (1.27-2.61)	
Female	Age-at-onset						
	≤ 55	31 (11.9%)	119 (31.6%)	< 0.0001	1		
	56-67	91 (35.0%)	130 (34.6%)		2.69 (1.67-4.33)		
	≥ 68	138 (53.1%)	127 (33.8%)		4.17 (2.63-4.63)		
	APOE ε4 status						
	Non ε4 carriers	198 (76.1%)	292 (77.7%)	0.66			
ε4 carriers	62 (23.8%)	84 (22.3%)					

Figure 15. Distribution of $\epsilon 4$ carriers between bulbar and limb onset in male and female ALS patients.

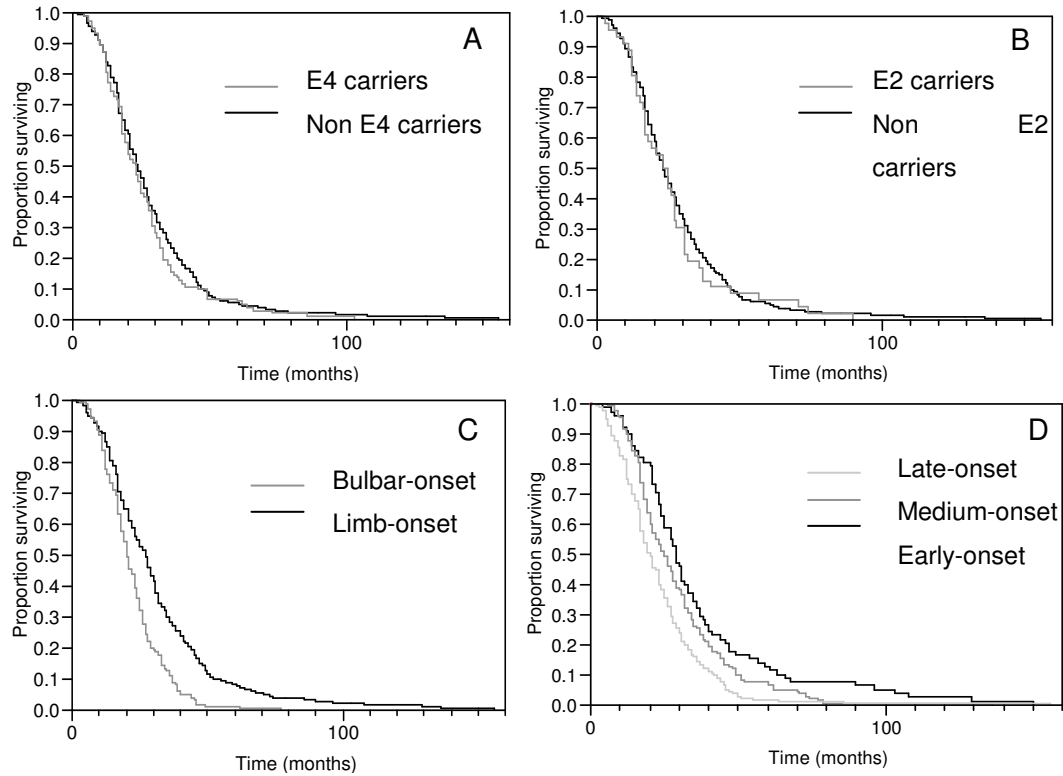


χ^2 test: Men: $\chi^2=10.15$; $p=0.001$; Women: $\chi^2=0.17$; $p=0.66$.

We found no differences in the disease duration between male and female (not shown), $\epsilon 4$ -carriers and others (Figure 16A; $p=0.28$) and between $\epsilon 2$ -carriers and others (Figure 16B; $p=0.53$) using Kaplan-Meier survival analysis for 404 patients. The disease duration was significantly different between the limb-onset group and the bulbar-onset group (Figure 16C, $p<0.0001$) and between the three sub-groups of patients defined by the age-at-onset (Figure 16D; $p<0.0001$).

Figure 16. Kaplan-Meier curves used to compare duration of disease in several groups of patients.

Kaplan-Meier curves used to compare duration of disease in two groups defined by the presence of $\epsilon 4$ allele ($\epsilon 4$ -carriers vs non $\epsilon 4$ -carriers) (A); the presence of $\epsilon 2$ allele ($\epsilon 2$ -carriers vs non $\epsilon 2$ -carriers) (B) and the site-of-onset (limb-onset vs bulbar-onset) (C). Kaplan-Meier curves used to compare disease duration in three groups defined by the age-at-onset (ALS population divided into tertiles) (D).



Review of previously published studies.

We identified 9 reports that met our selection criteria and had accessible genotype information (Tableau 12). All but one of the studies (Lacomblez et al., 2002) had power less than 90%. Only six studies investigated the association between the *APOE* alleles and the site-of-onset (Tableau 13). We could not perform a meta-analysis because most studies had small numbers of bulbar-onset cases and there were important differences in $\epsilon 4$ allele frequencies in the controls of several studies.

Tableau 12. Results of previously published studies about $\epsilon 4$ allele as susceptibility factor for SALS.

Studies	Number of chromosomes (SALS/ Controls)	$\epsilon 4$ allele frequency (SALS/ Controls)	<i>p</i> value
Mui et al., 1995	144/2408	18.8/13.6	0.08
Al-Chalabi et al., 1996	246/242	16.3/11.6	0.13
Smith et al., 1996 ¹	310/2408 ²	15.5/13.6 ²	0.36
Moulard et al., 1996	260/1350	8.1/11.6	0.10
Bachus et al., 1997	302/2646	14.2/15.1	0.69
Siddique et al., 1998 ²	726/702	14.5/14.2	0.91
Drory et al., 2001 ²	200/266	15.5/10.9	0.14
Lacomblez et al., 2002	806/2182	10.2/13.1	0.03
Zettenberg et al., 2008	120/2530	20.0/15.0	0.14

¹ control group from Mui et al., 1995

² alleles' frequencies were calculated using Hardy-Weinberg equilibrium hypothesis with presented data.

Tableau 13. Results of previously published studies about $\epsilon 4$ allele as site of onset modifying factor in SALS.

Studies	Number of patients (Bulbar / Limb)	$\epsilon 4$ carriers frequency (Bulbar / Limb)	<i>p</i> value
Al-Chalabi et al., 1996	33/90	42.4/22.2	0.03
Smith et al., 1996	34/121	20.6/31.4	0.22
Moulard et al., 1996	53/77	24.5/9.1	0.02
Bachus et al., 1997	43/108	23.3/26.9	0.64
Siddique et al., 1998	95/268	22.1/28.4	0.24
Drory et al., 2001	24/76	37.5/26.3	0.29

Discussion.

The purpose of our study was to clarify the role of the *APOE* gene in SALS. We limited the confounding factors commonly encountered in association studies (Chanock et al., 2007) by including patients with homogeneous clinical phenotype using standard diagnostic criteria (Brooks et al., 2000); recruiting patients and controls from the same geographical area, and excluding subjects with non-Caucasian ancestors; and genotyping all samples randomly and without knowledge of the clinical status. No sample was excluded due to problems in DNA amplification or genotyping, and the genotype frequencies respected the Hardy-Weinberg equilibrium.

In our large sample, we did not find an association between a particular *APOE* allele and the occurrence of ALS. We observed an $\epsilon 4$ allele frequency of 12.0%, which was comparable to that of the control group (12.5%). These results were consistent with previously published studies (Table e-3) (Mui et al., 1995; al-Chalabi et al., 1996; Moulard et al., 1996; Smith et al., 1996; Bachus et al., 1997; Siddique et al., 1998; Drory et al., 2001; Lacomblez et al., 2002; Zetterberg et al., 2008). Only Lacomblez et al. found a decrease in E4 protein levels in ALS, but their method used an indirect assessment of *APOE* genotype (Lacomblez et al., 2002).

We also failed to find a distinct effect of *APOE* alleles in sub-groups of patients defined by *SMNI* gene copy number. We did not observe an association of either allele or genotype with age-at-onset or gender. We searched for a modifying effect of several factors including *APOE* alleles on the characteristics of the disease, and found gender and age effects on the site-of-onset, with a higher representation of women and older patients having bulbar-onset than limb-onset. A higher frequency of the bulbar form in women was previously observed (Traynor et al., 2000), occurring in half of patients aged 80 years or more compared to just a third of ALS patients overall (Forbes et al., 2004).

We also examined potential effects of several factors on disease duration. We found significantly shorter duration in the bulbar-onset group and a significant effect of the age-at-onset on the disease course. Older patients had a shorter disease duration. The prognosis of bulbar-onset patients is widely regarded as being unfavourable when compared to limb-onset patients, and the influence of age-at-onset on disease duration has been demonstrated (Forbes et al., 2004). These two results lead us again to consider our sample as

representative of the general ALS population. We did not find any effect of $\epsilon 4$ or $\epsilon 2$ allele on disease duration. Previously published studies showed heterogeneous results: not significant (Mui et al., 1995; Moulard et al., 1996; Smith et al., 1996; Zetterberg et al., 2008), a negative effect of $\epsilon 4$ allele (Drory et al., 2001) or a protective effect of $\epsilon 2$ allele (Moulard et al., 1996; Li et al., 2004).

Nevertheless, taking into account these potential factors, our multivariate analysis showed that *APOE* alleles have an effect on the site-of-onset, as $\epsilon 4$ -carriers were significantly more frequent in the bulbar-onset group than in the limb-onset group. Two other studies showed similar results (al-Chalabi et al., 1996; Moulard et al., 1996) while four other failed to detect such association (Smith et al., 1996; Bachus et al., 1997; Siddique et al., 1998; Drory et al., 2001). Our data confirm that the $\epsilon 4$ allele is a risk factor in bulbar-onset, showing for the first time that this association is unique to men. Considering the main stratification factors (gender, 2 groups, age-at-onset, 3 and site-of-onset, 2), 12 subgroups can be defined with each subgroup needing to be of a sufficient size to be representative of the ALS population and to allow sufficient power in analyses. Our study population was the largest to date and included 31% of bulbar-onset patients which is representative of the general ALS population.

If the $\epsilon 4$ allele is a risk factor for bulbar-onset ALS in men, what would be the pathophysiology? Although the pathogenesis of ALS is still unknown, pathological and experimental data do not suggest differences between bulbar-onset and limb-onset forms. Indeed, isolated progressive bulbar palsy is very rare and patients with bulbar symptoms at onset usually develop motor neuron signs outside the bulbar muscles eventually. Nevertheless, a genetic heterogeneity model could explain different aetiologies for limb-onset and bulbar-onset, with the $\epsilon 4$ allele contributing only to bulbar-onset. Another explanation would be that *APOE* alleles are in linkage disequilibrium with other mutations in the *APOE* gene or in adjacent genes in sub-groups of patients, like the TOMM40 gene (Bekris et al., 2009).

The $\epsilon 4$ allele might also have a role in patients with associated unusual signs (dementia or extrapyramidal signs) which were not recorded in our data bank. Analogous to the role of $\epsilon 4$ allele in Alzheimer disease, an effect in ALS patients with dementia could be suspected. Interestingly, progressive bulbar palsy is particularly associated with cognitive dysfunction (Abrahams et al., 1997). We did not include demented patients with clinical

features of frontotemporal dementia but cognitive deficits are present in about a half of ALS patients (Lomen-Hoerth et al., 2003).

A more direct relationship might exist between the *APOE* ϵ 4 allele and bulbar motor neurons, which are rich in androgen receptors. Indeed, bulbar and spinal muscular atrophy (Kennedy's disease) is caused by a polyglutamine expansion in the androgen receptor, which exerts its deleterious effects when translocated by androgen stimulation in the nucleus of bulbar motor neurons (Merry, 2001; Finsterer, 2009). Based on experimental data, *APOE* and the androgen receptor seem to be linked in neurite outgrowth. Reduced androgen receptor-mediated neuritic sprouting was observed in the presence of *APOE* ϵ 4 (Raber, 2008). Androgens exert a protective effect against cognitive deficits in *APOE* ϵ 4 mice expressing *APOE* ϵ 4 (Raber et al., 2002). Men could be protected by androgens against bulbar-onset ALS (the incidence of bulbar-onset is lower in men than women) and the ϵ 4 allele might inhibit this protection, perhaps by interfering negatively with the androgen pathway. The fact that androgen levels are higher in old men carrying ϵ 4 alleles speaks also to a decreased androgen transduction pathway in presence of the ϵ 4 alleles (Berteau-Pavy et al., 2007). Androgen and oestrogen levels need to be examined in SALS patients. The higher incidence of bulbar-onset in the oldest men may also be explained by the natural decrease of androgens during aging in men.

To conclude, the analysis of our large sample of SALS patients, as well as the review of previously published studies confirms that *APOE* ϵ 4 is not a susceptibility factor for the development of SALS. The results also show that the *APOE* gene does not have a modifying effect on the rate of progression or the age of disease onset. Nevertheless, we observed that the ϵ 4 allele is a risk factor for bulbar-onset SALS in men. The clinical relevance of this observation may be important in two domains. First, in clinical trials, the *APOE* gene could play a significant role in defining subgroups of patients, which should be considered in the stratification of trials. Second, the *APOE* ϵ 4 association with the bulbar subgroup of SALS suggests a role for this protein in the maintenance of the motor neurons, particularly in the brain stem, and a possible negative modulation of the androgen pathway. Men carrying *APOE* ϵ 4 allele may benefit from specific therapeutic approaches.

Gène HFE et SLA sporadique.

Le gène HFE, impliqué dans l'hémochromatose familiale de type 1, a été étudié dans la SLA sporadique. Le fer est capable de catalyser, grâce à la réaction de Fenton, la production de radicaux libres oxygénés qui contribuent au stress oxydant, une des voies physiopathologiques proposées dans la SLA (Shaw, 2005). Par ailleurs, des taux élevés de fer ont été trouvés dans les prélèvements autopsiques de moelle épinière de patients (Ince et al., 1994).

Deux polymorphismes du gène HFE ont été identifiés comme associés de l'hémochromatose familiale (Feder et al., 1996), avec un rôle cependant peu convaincant pour H63D. L'hypothèse du rôle de la protéine HFE dans le métabolisme du fer a été confirmée par l'obtention, par plusieurs équipes, de souris knock-out pour le gène HFE et qui développaient une surcharge en fer comparable à celle observée au cours de l'hémochromatose génétique (Zhou et al., 1998; Bahram et al., 1999; Levy et al., 1999). La molécule HFE forme avec la bêta-2-microglobuline un complexe qui se lie au récepteur de la transferrine (TfR1). Le rôle de la molécule HFE n'est pas clairement déterminé. Il semblerait que le complexe HFE-TfR n'ait pas de rôle régulateur à proprement parler mais que TfR pourrait séquestrer HFE pour l'empêcher d'agir ailleurs (Andrews et Schmidt, 2007). Le rôle de la molécule HFE dans l'évaluation du pool ferrique de l'organisme est établi mais les mécanismes exacts demeurent inconnus (Goswami et Andrews, 2006).

Ainsi l'implication du gène HFE dans l'homéostasie du fer et dans le stress oxydant a conduit à suspecter son intervention dans la physiopathologie de la SLA. Après une première étude négative sur un petit échantillon (Yen et al., 2004), quatre études montrent une association significative entre le polymorphisme H63D et la survenue d'une SLA sporadique avec un odds-ratio de 1,85 (intervalle de confiance à 95%: 1,35-2,54) (Goodall et al., 2005), 2,54 (intervalle de confiance à 95%: 1,36-4,73) (Wang et al., 2004), 1,7 (intervalle de confiance à 95%: 1,1-2,5) (Sutedja et al., 2007) et 2,32 (intervalle de confiance à 95% : 1,33 -4,03) (Restagno et al., 2007).

L'objectif de notre étude était de déterminer si les polymorphismes du gène HFE étaient des facteurs de susceptibilité pour la SLA sporadique dans la population française et leur lien éventuel avec le phénotype (forme clinique, durée d'évolution, âge de début).

Patients et Méthode.

Population.

Les données cliniques et les prélèvements sanguins de 244 patients présentant une SLA sporadique et 302 sujets contrôles provenaient d'une base nationale de recueil des prélèvements de patients suivis dans les centres SLA français. Les sujets contrôles étaient appariés selon l'âge, le sexe et l'origine ethnique. Le diagnostic de sclérose latérale amyotrophique était porté dans l'un des centres SLA français selon les critères consensuels et internationaux d'El Escorial (Brooks et al., 2000). Tous les participants avaient donné leur consentement écrit.

Genotypage.

L'ADN était extrait selon la procédure standardisée habituelle. L'amplification de l'ADN était faite grâce à une PCR (polymerase chain reaction) réalisée avec 50 µl contenant 200 ng d'ADN du sujet, 10 pmol de chaque amorce pour l'étude du polymorphisme C282Y ou 20 pmol de chaque amorce pour H63D, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, et 1,75 U d'Ampli-Taq polymerase (PROMEGA). Les conditions de la PCR étaient les suivantes: 1 cycle à 92°C pendant 5 minutes, 30 cycles à 92°C pendant 1 minute, 56°C pendant 1 minute, 72°C pendant 1 minute, et 1 cycle à 72°C pendant 7 minutes. Les amorces utilisées étaient les suivantes : C282Y, amorce forward 5'-TGGCAAGGGTAAACAGATCC-3', amorce reverse 5'-CTCAGGCACTCCTCTCAACC-3'; H63D, amorce forward 5'-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC-3', amorce reverse 5'-GCCACATCTGGCTTGAAATT-3'.

Les polymorphismes du gène HFE étaient mis en évidence dans chaque produit de PCR par une technique de restriction enzymatique utilisant RsaI pour C282Y (ROCHE Diagnostics) et MboI pour H63D (PROMEGA France) (Jouanolle et al., 1997). Les réactions de restriction étaient réalisées dans les conditions suivantes : 30 µl du produit de PCR avec 15 U de MboI ou 12 U de RsaI pendant 3 heures à 37°C. Les fragments obtenus

après restriction étaient révélés par électrophorèse sur un gel Resophor 2%. Le produit de PCR de 387 paires de base (pb) est coupé par Rsa1 en 2 fragments de 247 et 140 pb respectivement si la mutation C282Y est absente. En revanche, la présence de la mutation C282Y crée un nouveau site de restriction et après digestion 3 fragments (247, 111 et 29 pb) sont obtenus. Avec Mbo1, l'ADN normal est coupé en 2 fragments de 138 et 70 pb. La mutation H63D supprime le site de restriction de Mbo1.

Analyse statistique.

L'analyse des polymorphismes était réalisée en aveugle vis-à-vis du statut patient/témoin. Les génotypes des patients présentant une SLA sporadique étaient comparés à ceux des contrôles grâce au test du χ^2 ou grâce au test de Fisher en cas d'effectif inférieur à 5. Une différence était significative pour un p inférieur à 0,05. Pour évaluer l'effet des polymorphismes du gène HFE sur le risque de SLA, un test de régression logistique était employé. Pour évaluer l'effet des polymorphismes sur le phénotype, les fréquences des allèles étaient comparées dans différents sous-groupes de patients définis selon la forme clinique (spinale ou bulbaire) ou l'âge de début (avant 55 ans, entre 55 et 65 ans, après 65 ans grâce au test du χ^2).

Les durées d'évolution furent estimées par la méthode de Kaplan-Meier et la comparaison des courbes obtenues dans les sous-groupes définis par la présence des différents allèles fut réalisée grâce au test du logrank.

La puissance de l'étude était suffisante pour détecter une différence de 5% entre patients et contrôles en acceptant un risque alpha de 5% et un risque bêta de 20%.

Résultats.

La fréquence du polymorphisme C282Y du gène HFE était significativement différente entre patients et témoins (Tableau 14). L'odds-ratio était calculé à 2,51 (intervalle de confiance à 95% : 1,28-4,92). Aucune différence significative n'était observée entre patients et contrôles pour les fréquences des polymorphismes H63D.

Tableau 14. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles C et Y du polymorphisme C282Y du gène HFE pour patients et contrôles.

C282Y	Patients		Contrôles		
	Allèles	Fréquence (%)	Nombre	Fréquence (%)	Nombre
C		97,7	477	94,5	571
Y		2,3	11	5,5	33
Total		100	488	100	604

(test du χ^2 , $\chi^2 = 7,19$; $p = 0,0007$)

Tableau 15. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles H et D du polymorphisme H63D du gène HFE pour patients et contrôles.

H63D	Patients		Contrôles		
	Allèles	Fréquence (%)	Nombre	Fréquence (%)	Nombre
H		84,2	411	83,9	183
D		15,8	77	16,1	35
Total		100	488	100	218

(test du χ^2 , $\chi^2 = 0,0086$; $p = 0,92$)

Aucune différence significative n'était observée entre les deux groupes de patients SLA définis selon la forme clinique pour les deux polymorphismes testés (Tableau 16 et Tableau 17).

Tableau 16. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles C et Y du polymorphisme C282Y du gène HFE comparés selon la forme clinique.

C282Y	Forme spinale		Forme bulbaire		
	Allèles	Fréquence (%)	Nombre	Fréquence (%)	Nombre
C		98,1	318	97,3	146
Y		1,9	6	2,7	4
Total		100	324	100	150

(test du χ^2 , $\chi^2 = 0,33$; $p = 0,56$)

Tableau 17. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles H et D du polymorphisme H63D du gène HFE comparés selon la forme clinique.

H63D	Forme spinale		Forme bulbaire		
	Allèles	Fréquence (%)	Nombre	Fréquence (%)	Nombre
H		84,9	275	82,0	123
D		15,1	49	18,0	27
Total		100	324	100	150

(test du χ^2 , $\chi^2 = 0,63$; $p = 0,43$)

Aucune différence significative n'était observée entre les deux groupes cliniques de patients SLA définis selon l'âge de début pour le polymorphisme C282Y (Tableau 18). La fréquence du polymorphisme H63D est significativement différente entre les patients ayant un début de maladie avant 55 ans et ceux ayant un début après 65 ans (Tableau 19) avec un odds-ratio à 2,03 (intervalle de confiance à 95% : 1,08-3,82).

Tableau 18. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles C et Y du polymorphisme C282Y du gène HFE comparés selon l'âge de début de la maladie.

C282Y	Début avant 55 ans		Début après 65 ans		
	Allèles	Fréquence (%)	Nombre	Fréquence (%)	Nombre
C		96,6	143	99,0	192
Y		3,4	5	1,0	2
Total		100	148	100	194

(test de Fisher, $p = 0,24$)

Tableau 19. Nombre de chromosomes et fréquences des allèles H et D du polymorphisme H63D du gène HFE comparés selon l'âge de début.

H63D	Début avant 55 ans		Début après 65 ans	
	Fréquence (%)	Nombre	Fréquence (%)	Nombre
H	89,7	131	81,1	159
D	10,3	15	18,9	37
Total	100	146	100	196

(test du chi², $\chi^2 = 4,8$; p = 0,03)

Discussion.

Les résultats présentés ici sont préliminaires et donc à interpréter avec prudence. De plus, selon le facteur testé, les effectifs entre les patients et les témoins ne sont pas systématiquement égaux et comparables. La taille des échantillons est d'autant plus importante que les études d'association dans la SLA sporadique montrent souvent des résultats divergents pour un même gène testé, et notamment pour ceux considérés dans cette étude. La poursuite des analyses permettra de tirer des conclusions plus définitives.

Nos résultats montrent une association significative entre le risque de SLA et le polymorphisme C282Y alors que toutes les autres études n'ont pas trouvé de différence significative pour ce polymorphisme qui est habituellement impliqué dans l'hémochromatose familiale. La fréquence chez les témoins (5,5%) est comparable à celles des autres études de la littérature (2 à 10%) mais cette remarque est aussi valable pour notre population SLA. Néanmoins, la différence entre les deux groupes est significative et la puissance de l'étude est forte (100%).

Les données expérimentales et biologiques plaident plutôt pour une accumulation de fer dans la SLA : augmentation des taux sériques de ferritine (Goodall et al., 2008; Qureshi et al., 2008) et taux de fer élevés dans le système nerveux central (Oba et al., 1993; Imon et al., 1995; Kasarskis et al., 1995). Dans l'hémochromatose familiale, l'allèle Y du polymorphisme C282Y semble responsable de l'accumulation de fer alors que les autres

polymorphismes (notamment H63D) ne sont que très rarement associés à un phénotype d'hémochromatose (Gurrin et al., 2009). Cependant, l'accumulation de fer dans le système nerveux central des patients ayant une hémochromatose de type 1 n'est pas prouvée et chez l'animal le système nerveux central semble protégé contre la surcharge en fer (Papanastasiou et al., 2000). On pourrait imaginer que la présence de l'allèle Y favorise une « compartimentation » du fer dans le foie, protégeant ainsi le système nerveux central et plus particulièrement les neurones moteurs d'une accumulation en fer et réduisant par conséquent le risque de SLA. Il serait alors possible d'envisager un traitement par fer chez les patients SLA pour favoriser cette compartimentation.

Une autre hypothèse pourrait être envisagée pour expliquer l'éventuel rôle protecteur de l'allèle Y vis-à-vis de la SLA. Elle repose sur les liens entre les mutations du gène HFE (principalement C282Y) et l'hypertriglycéridémie primaire (Solanas-Barca et al., 2009). Cette étude montre la présence d'un allèle variant rare (allèle Y pour C282Y ou allèle D pour H63D) est 5,9 fois plus fréquente dans une population de patients hypertriglycéridémiques que dans une population normolipidique. Même si aucune différence significative n'est trouvée en comparant des patients présentant une hypercholestérolémie familiale avec une population normolipidique, un effet indirect de l'allèle Y par le biais d'une hyperlipidémie « protectrice » pourrait être suspecté.

Nous avons aussi mis en évidence un effet significatif du polymorphisme H63D sur l'âge de début avec une fréquence plus élevée de l'allèle D chez les patients dont la maladie a débuté après 65 ans. Un rôle modulateur sur l'évolution peut ainsi être envisagé mais doit être confirmé sur une plus grande population.

Ces deux résultats obtenus pour le gène HFE et leur caractère divergent par rapport aux autres études de la littérature pourraient suggérer que le lien entre HFE et SLA repose sur un autre polymorphisme de ce gène. Il est aussi possible d'imaginer que l'intervention du gène HFE dans la SLA est modulée par un ou plusieurs autres gènes de susceptibilité. Ces résultats incitent aussi à obtenir des données plus fines et complètes sur le métabolisme du fer.

Cinquième partie

Discussion

La pathogénie exacte de la SLA demeure inconnue. La découverte de mutations génétiques, notamment du gène SOD1, a ouvert la voie à des avancées considérables dans la compréhension de la physiopathologie grâce au développement de modèles animaux. Elle a aussi renforcé l'hypothèse d'une transmission génétique de la maladie, conduisant par là-même à de multiples études visant à identifier d'autres gènes. Ce raisonnement s'applique parfaitement aux formes familiales et d'autant plus facilement si on imagine une transmission mendélienne. Néanmoins, la proportion importante de formes sporadiques nous rappelle qu'une cause génétique dans la SLA doit s'envisager aussi dans le cadre d'une maladie complexe, c'est à dire résultant de l'association variable entre facteurs génétiques et environnementaux.

Ainsi, devant une maladie supposée d'étiologie complexe, l'exploration d'une hypothèse génétique repose avant tout sur les études d'association, mais aussi sur une bonne connaissance des facteurs cliniques et ethniques qui caractérisent les populations étudiées. Identifier un polymorphisme inhabituel dans une population de SLA sporadiques par une étude simple ou multiple (et parfois sur le génome entier) permet de faire des hypothèses quant aux mécanismes physiopathologiques ou de renforcer des pistes déjà connues. Nous avons déjà exposé les réserves au sujet des études « genome-wide » jusque là publiées mais des efforts méthodologiques pourraient améliorer leur qualité (Manolio et al., 2009). Le principal problème est que les études d'association ont souvent trouvés des résultats positifs mais ceux-ci sont rarement répliqués (Florez et al., 2003). L'échantillon testé doit être de taille suffisante car le principe est de rechercher un « petit effet ». Détecter une association peut être lié au hasard car la distribution des polymorphismes dans un échantillon permet d'atteindre le seuil de signification exigé malgré une puissance globalement insuffisante de l'étude. Les études de répllication ont de fortes chances d'être négatives à moins d'avoir une puissance statistique beaucoup plus forte que l'étude originale. Les auteurs d'une méta-analyse sur les études d'association concluent que les résultats des études princeps sont très souvent exacts (avec des odds ratio très souvent surestimés par l'effet du hasard) et que l'échec des études de répllication tient au fait qu'elles sont réalisées à une échelle trop petite (Lohmueller et al., 2003). Comme dans toutes les études cas-témoins, l'appariement des patients et des témoins peut poser problème et en génétique, l'origine ethnique doit impérativement être considérée. Enfin, identifier un polymorphisme ne signifie pas que ce marqueur est un facteur de susceptibilité car il peut s'agir d'un autre facteur en déséquilibre de liaison ayant permis d'établir l'association.

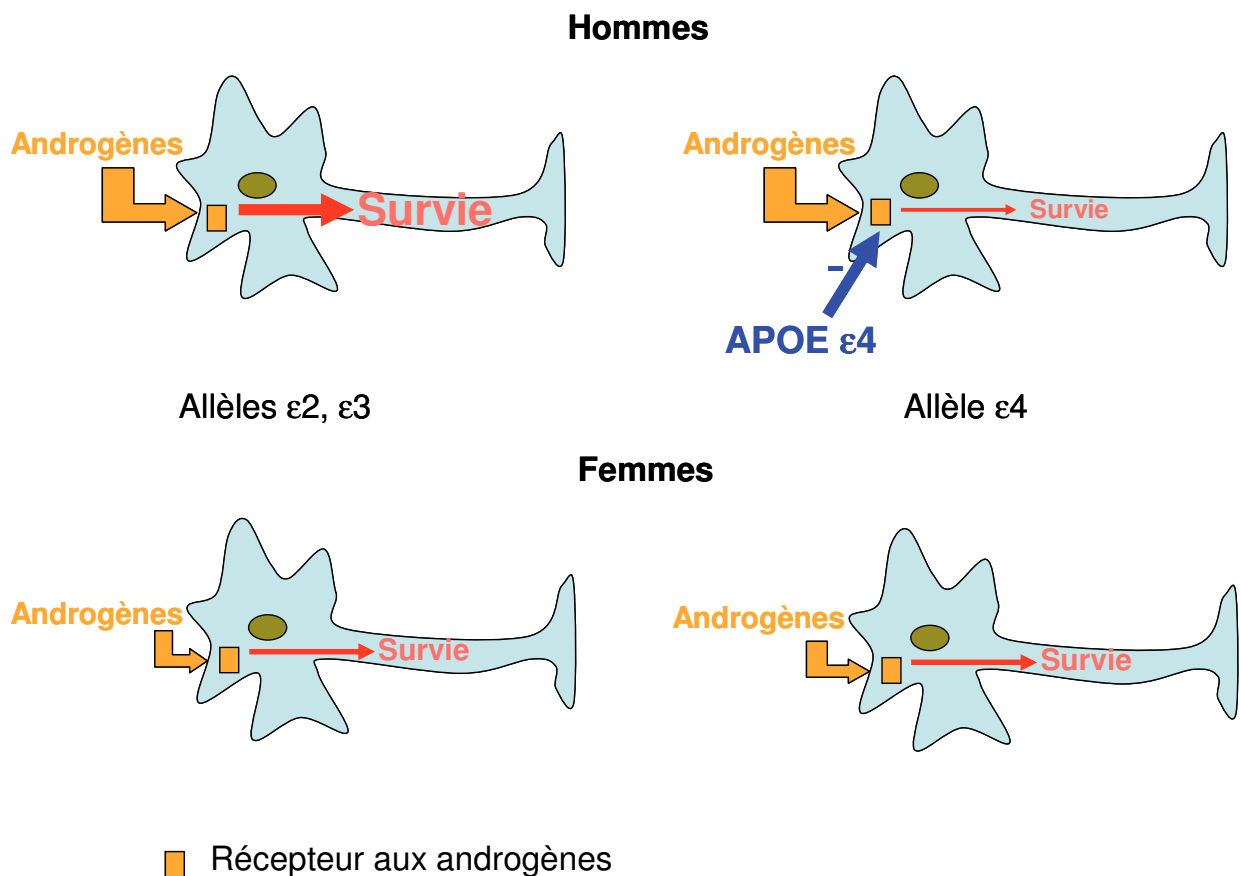
Dans notre étude sur le gène APOE, nous avons suivi ces recommandations avec notamment un échantillon et une puissance beaucoup plus grands que les études précédentes. Notre résultat concernant le lien entre l'allèle $\epsilon 4$ et un début bulbaire vient s'ajouter aux résultats de deux autres études (al-Chalabi et al., 1996; Moulard et al., 1996). Néanmoins, notre méthodologie était quelque peu différente en raison d'une analyse séparée des hommes et des femmes. Cette façon de procéder est inhabituelle pour une étude sur la SLA. Pourtant, les données épidémiologiques que nous avons détaillées plus haut, montrent que la présentation de la maladie et ses modalités évolutives sont différentes selon le sexe. De plus, l'analyse des caractéristiques de notre population SLA montre qu'elle est représentative.

L'association entre allèle $\epsilon 4$ et forme bulbaire chez les hommes est donc un résultat nouveau. La première explication dans l'hypothèse de SLA maladie complexe serait que les allèles du gène APOE soient en déséquilibre de liaison avec des mutations de ce gène ou d'autres gènes adjacents dans certains sous-groupes de patients. Les liens forts entre allèle $\epsilon 4$ et maladie d'Alzheimer font suspecter une relation allèle $\epsilon 4$ -démence masquée par notre résultat. Cependant, aucun patient répondant aux critères de démence fronto-temporale-SLA n'a été inclus mais les troubles cognitifs, très fréquents n'ont pas été analysés. Toutes ces hypothèses ne rendent pas compte de l'effet sexe. Nous retenons plutôt un effet direct d'APOE4 chez les hommes par l'intermédiaire des récepteurs aux androgènes qui sont en nombre important dans les neurones moteurs bulbaires (Fargo et al., 2008). Les récepteurs aux androgènes sont impliqués dans la croissance neuritique qui réduite en présence d'APOE4 (Raber et al., 2002; Raber, 2008). Les récepteurs aux androgènes exerceraient donc un effet trophique sur les neurones moteurs bulbaires, expliquant une plus forte prévalence des formes bulbaires chez la femme et les sujets âgés (andropause). APOE4 inhiberait cette action et l'effet serait donc d'autant plus visible chez les hommes (Figure 17)

Le gène APOE, par l'intermédiaire des différentes isoformes qu'il code, exercerait donc plus une action sur le phénotype que sur la pathogénie de la maladie. Néanmoins, ce résultat pourrait avoir des implications pratiques : la prise en compte du sexe, du « statut » hormonal et du génotype APOE dans les essais thérapeutiques et la prise en charge médicamenteuse. Tout d'abord, le dosage des taux sanguins d'androgènes chez les hommes et les femmes et une analyse des résultats selon le sexe et la forme clinique (bulbaire ou spinale) pourraient être une première étape. Une quantification des récepteurs aux androgènes dans les deux formes cliniques et les deux sexes par des techniques d'imagerie moléculaire pourrait aussi être réalisée. Enfin, on pourrait imaginer de relancer les essais

thérapeutiques avec les androgènes uniquement chez les hommes avec un début bulbaire et porteurs d'allèle $\epsilon 4$ ou une thérapie génique pour inhiber l'action délétère d'APOE4 sur les récepteurs aux androgènes (ça c'est peut-être un peu osé ?).

Figure 17. Action inhibitrice de APOE4 sur le récepteur aux androgènes des neurones moteurs bulbaire chez les hommes.



Nos résultats sur HFE sont préliminaires et concernent des effectifs plus petits. L'interprétation doit donc en être prudente. Les données expérimentales et biologiques dans la SLA démontrent une accumulation de fer dans la SLA (Goodall et al., 2008; Qureshi et al., 2008 ; Oba et al., 1993; Imon et al., 1995; Kasarskis et al., 1995) amenant à considérer la protéine HFE intervenant dans la régulation du métabolisme du fer. Tout d'abord, la fréquence de l'allèle D dans notre population SLA est comparable à celle observée chez les témoins et dans la population générale selon les données de la littérature. L'allèle D ne semble pas constituer un facteur de susceptibilité dans la population française comme dans

les populations irlandaise, anglaise, hollandaise et italienne (Restagno et al., 2007 ; Goodall et al., 2005 ; Sutedja et al., 2007). Le lien entre l'allèle D et l'âge de début tardif plaide tout de même en faveur d'un rôle de ce polymorphisme mais ces résultats restent à confirmer sur un effectif plus grand et l'étude est en cours.

L'association entre allèle Y du polymorphisme C282Y, associé à l'hémochromatose familiale de type 1, et SLA n'a pas été décrite jusque ici. Le lien observé dans notre population semble indiquer un effet « protecteur » de cet allèle sur le risque de SLA sporadique. Une intervention directe ou indirecte de ce polymorphisme peut alors être envisagée. L'allèle Y favoriserait, comme dans l'hémochromatose, l'accumulation dans le foie du fer qui ne pourrait pas exercer d'effet toxique via le stress oxydant dans le système nerveux. Tenant compte des liens entre HFE et hypertriglycéridémie (Solanas-Barca et al., 2009), un effet indirect de l'allèle Y par le biais d'une hyperlipidémie « protectrice » pourrait être suspecté.

L'intérêt pour HFE doit être consolidé par des études complémentaires explorant le métabolisme du fer dans la SLA. Des dosages biologiques exhaustifs (fer sérique, transferrine, ferritine) et conduits de manière prospective pourraient être proposés, en tenant compte des facteurs pouvant modifier de tels dosages (anémie, syndrome inflammatoire, alcoolisme...). L'évaluation du fonctionnement des neurones moteurs pourrait faire l'objet d'études expérimentales sur des modèles animaux d'hémochromatose. Enfin, un apport de fer pourrait se discuter dans le cadre d'essais thérapeutiques.

Conclusion

Les formes sporadiques de SLA représentent 90% des cas et l'hypothèse d'une intervention génétique dans la pathogénie de cette affection ne peut s'envisager que dans le cadre d'une maladie polygénique ou dans celui d'une maladie complexe alliant facteurs génétiques et environnementaux.

Considérant ce type de « modèle » pathogénique, la recherche des facteurs génétiques impliqués repose sur la réalisation d'études d'association guidées par les pistes physiopathologiques préalablement connues ou suspectées. Notre choix dans la multitude des gènes potentiels s'est orienté vers ceux qui appartiennent à des voies biochimiques connues sur lesquelles il existe des possibilités de modification par les thérapeutiques actuelles. Les données récentes sur les modifications du métabolisme des lipides dans la SLA et leur influence sur l'évolution, faisaient du gène APOE un candidat intéressant, ce d'autant que les résultats des études précédentes étaient contradictoires. En raison du stress oxydant, le métabolisme du fer a aussi été pointé du doigt dans la SLA mais les données sont plus éparpillées. Néanmoins, les avancées dans l'hémochromatose familiale, pathologie amenant à une accumulation de fer, offraient plusieurs gènes candidats dont le gène HFE.

Les résultats sur le gène APOE viennent s'ajouter à ceux de deux études précédentes mais apportent un regard neuf avec la notion d'effet sexe-dépendant. Le lien entre l'allèle $\epsilon 4$ et la forme bulbaire est confirmé mais uniquement chez l'homme faisant suspecter un facteur hormonal. Ce résultat important permet d'envisager une hypothèse physiopathologique solide par l'intermédiaire du récepteur aux androgènes très présent dans les neurones moteurs bulbaires et sur lequel APOE4 a une action inhibitrice. Il identifie un sous-groupe de patients (hommes porteurs d'un allèle $\epsilon 4$ avec un début bulbaire) pour lequel un traitement par androgènes pourrait être bénéfique et mériterait d'être étudié. De plus, le sexe, des facteurs hormonaux et du génotype APOE seraient alors autant d'éléments à prendre en compte pour la stratification des essais thérapeutiques.

Concernant le gène HFE, les résultats préliminaires vont dans le sens d'un effet protecteur de l'allèle Y du polymorphisme C282Y dans la population de SLA sporadique française. Ils montrent que le métabolisme du fer dans le foie et le sang n'interfère pas ou très peu avec l'utilisation de fer dans le système nerveux central, notamment dans les mécanismes conduisant au stress oxydant. Ces données incitent surtout à l'acquisition de données complémentaires sur le métabolisme du fer sérique chez les patients SLA et la

réalisation d'études expérimentales sur les mécanismes conduisant à l'accumulation de fer dans le système nerveux avant d'envisager des pistes thérapeutiques.

Bibliographie

- Abalkhail H, Mitchell J, Habgood J, Orrell R and de Bellerocche J. A new familial amyotrophic lateral sclerosis locus on chromosome 16q12.1-16q12.2. *Am J Hum Genet*, 2003;73 (2): 383-9.
- Abrahams S, Goldstein LH, Al-Chalabi A, et al. Relation between cognitive dysfunction and pseudobulbar palsy in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1997;62 (5): 464-72.
- Abrahams S, Leigh PN and Goldstein LH. Cognitive change in ALS: a prospective study. *Neurology*, 2005;64 (7): 1222-6.
- Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, et al. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, 1999;8 (2): 157-64.
- al-Chalabi A, Enayat ZE, Bakker MC, et al. Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with bulbar-onset motor neuron disease. *Lancet*, 1996;347 (8995): 159-60.
- Al-Chalabi A, Scheffler MD, Smith BN, et al. Ciliary neurotrophic factor genotype does not influence clinical phenotype in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 2003;54 (1): 130-4.
- Alexianu ME, Kozovska M and Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology*, 2001;57 (7): 1282-9.
- Anand P, Parrett A, Martin J, et al. Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease. *Nat Med*, 1995;1 (2): 168-72.
- Andersen PM. Genetics of sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2001;2 Suppl 1: S37-41.
- Andersen PM, Nilsson P, Keranen ML, et al. Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain*, 1997;120 (Pt 10): 1723-37.
- Andersen PM, Sims KB, Xin WW, et al. Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2003;4 (2): 62-73.
- Anderson GW, Even C, Rowland RR, et al. C58 and AKR mice of all ages develop motor neuron disease after lactate dehydrogenase-elevating virus infection but only if antiviral immune responses are blocked by chemical or genetic means or as a result of old age. *J Neurovirol*, 1995;1 (3-4): 244-52.
- Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, 1999;341 (26): 1986-95.
- Andrews NC and Schmidt PJ. Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol*, 2007;69: 69-85.
- Aoki M, Lin CL, Rothstein JD, et al. Mutations in the glutamate transporter EAAT2 gene do not cause abnormal EAAT2 transcripts in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1998;43 (5): 645-53.
- Appel SH, Smith RG, Alexianu M, et al. Increased intracellular calcium triggered by immune mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurosci*, 1995;3 (6): 368-74.
- Argyriou AA, Polychronopoulos P, Papapetropoulos S, et al. Clinical and epidemiological features of motor neuron disease in south-western Greece. *Acta Neurol Scand*, 2005;111 (2): 108-13.
- Armon C. Sports and trauma in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *J Neurol Sci*, 2007;262 (1-2): 45-53.
- Armon C, Kurland LT, Daube JR and O'Brien PC. Epidemiologic correlates of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 1991;41 (7): 1077-84.

- Bachus R, Bader S, Gessner R and Ludolph AC. Lack of association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with bulbar-onset motor neuron disease. *Ann Neurol*, 1997;41 (3): 417.
- Bahram S, Gilfillan S, Kuhn LC, et al. Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999;96 (23): 13312-7.
- Bar-Sela S, Reingold S and Richter ED. Amyotrophic lateral sclerosis in a battery-factory worker exposed to cadmium. *Int J Occup Environ Health*, 2001;7 (2): 109-12.
- Beaulieu JM, Nguyen MD and Julien JP. Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. *J Cell Biol*, 1999;147 (3): 531-44.
- Beckman JS, Carson M, Smith CD and Koppenol WH. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*, 1993;364 (6438): 584.
- Beghi E and Mennini T. Basic and clinical research on amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders in Italy: recent findings and achievements from a network of laboratories. *Neurol Sci*, 2004;25 Suppl 2: S41-60.
- Bekris LM, Galloway NM, Montine TJ, Schellenberg GD and Yu CE. APOE mRNA and protein expression in postmortem brain are modulated by an extended haplotype structure. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2009.
- Belzil VV, Valdmanis PN, Dion PA, et al. Mutations in FUS cause FALS and SALS in French and French Canadian populations. *Neurology*, 2009;73 (15): 1176-9.
- Benajiba L, Le Ber I, Camuzat A, et al. TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Annals of Neurology*, 2009;65 (4): 470-473.
- Berger MM, Kopp N, Vital C, et al. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology*, 2000;54 (1): 20-5.
- Berglund L and Ramakrishnan R. Lipoprotein(a): an elusive cardiovascular risk factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004;24 (12): 2219-26.
- Berteau-Pavy F, Park B and Raber J. Effects of sex and APOE epsilon4 on object recognition and spatial navigation in the elderly. *Neuroscience*, 2007;147 (1): 6-17.
- Bertrand I and Van Bogaert L. Rapport sur la SLA. *Rev Neurol (Paris)*, 1925;1: 779-906.
- Bettoni L, Bazzani M, Bortone E, et al. Steadiness of amyotrophic lateral sclerosis in the province of Parma, Italy, 1960-1990. *Acta Neurol Scand*, 1994;90 (4): 276-80.
- Blauw HM, Veldink JH, van Es MA, et al. Copy-number variation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a genome-wide screen. *Lancet Neurol*, 2008;7 (4): 319-26.
- Borasio GD, Linke R, Schwarz J, et al. Dopaminergic deficit in amyotrophic lateral sclerosis assessed with [I-123] IPT single photon emission computed tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1998;65 (2): 263-5.
- Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Shaw PJ and Turnbull DM. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann Neurol*, 1999;46 (5): 787-90.
- Bouteloup C, Desport JC, Clavelou P, et al. Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J Neurol*, 2009;256 (8): 1236-42.
- Boyles JK, Notterpek LM and Anderson LJ. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*, 1990;265 (29): 17805-15.
- Brockington A, Wharton SB, Fernando M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the central nervous system in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006;65 (1): 26-36.

- Brooks BR, Miller RG, Swash M and Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2000;1 (5): 293-9.
- Brownell B, Oppenheimer DR and Hughes JT. The central nervous system in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1970;33 (3): 338-57.
- Bruening W, Roy J, Giasson B, et al. Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 1999;72 (2): 693-9.
- Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, et al. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, 1997;18 (2): 327-38.
- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, et al. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*, 1998;281 (5384): 1851-4.
- Burns CJ, Beard KK and Cartmill JB. Mortality in chemical workers potentially exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1945-94: an update. *Occup Environ Med*, 2001;58 (1): 24-30.
- Caroscio JT, Mulvihill MN, Sterling R and Abrams B. Amyotrophic lateral sclerosis. Its natural history. *Neurol Clin*, 1987;5 (1): 1-8.
- Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ and Weiss JH. AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci*, 2000;20 (1): 240-50.
- Chance PF, Rabin BA, Ryan SG, et al. Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. *Am J Hum Genet*, 1998;62 (3): 633-40.
- Chancellor AM, Slattery JM, Fraser H and Warlow CP. Risk factors for motor neuron disease: a case-control study based on patients from the Scottish Motor Neuron Disease Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1993;56 (11): 1200-6.
- Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, et al. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature*, 2007;447 (7145): 655-60.
- Chapman J, Korczyn AD, Karussis DM and Michaelson DM. The effects of APOE genotype on age at onset and progression of neurodegenerative diseases. *Neurology*, 2001;57 (8): 1482-5.
- Chen W, Saeed M, Mao H, et al. Lack of association of VEGF promoter polymorphisms with sporadic ALS. *Neurology*, 2006;67 (3): 508-10.
- Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet*, 2004;74 (6): 1128-35.
- Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R and Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain*, 2005;128 (Pt 3): 472-6.
- Chio A, Calvo A, Dossena M, et al. ALS in Italian professional soccer players: the risk is still present and could be soccer-specific. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 2009;10 (4): 205-209.
- Chio A, Mora G, Leone M, et al. Early symptom progression rate is related to ALS outcome: a prospective population-based study. *Neurology*, 2002;59 (1): 99-103.
- Chioza BA, Ujfalussy A, Csiszar K, et al. Mutations in the lysyl oxidase gene are not associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2001;2 (2): 93-7.

- Chou SM, Wang HS and Taniguchi A. Role of SOD-1 and nitric oxide/cyclic GMP cascade on neurofilament aggregation in ALS/MND. *J Neurol Sci*, 1996;139 Suppl: 16-26.
- Chow CY, Landers JE, Bergren SK, et al. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet*, 2009;84 (1): 85-8.
- Chow CY, Zhang Y, Dowling JJ, et al. Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature*, 2007;448 (7149): 68-72.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*, 2003;302 (5642): 113-7.
- Cluskey S and Ramsden DB. Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Pathol*, 2001;54 (6): 386-92.
- Comi GP, Bordoni A, Salani S, et al. Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol*, 1998;43 (1): 110-6.
- Conover JC, Erickson JT, Katz DM, et al. Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature*, 1995;375 (6528): 235-8.
- Corbo M and Hays AP. Peripherin and neurofilament protein coexist in spinal spheroids of motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1992;51 (5): 531-7.
- Corcia P, Camu W, Halimi JM, et al. SMN1 gene, but not SMN2, is a risk factor for sporadic ALS. *Neurology*, 2006;67 (7): 1147-50.
- Corcia P, Jafari-Schluep HF, Lardillier D, et al. A clustering of conjugal amyotrophic lateral sclerosis in southeastern France. *Arch Neurol*, 2003;60 (4): 553-7.
- Corcia P, Mayeux-Portas V, Khoris J, et al. Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 2002;51 (2): 243-6.
- Corrado L, Del Bo R, Castellotti B, et al. Mutations of FUS Gene in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Med Genet*, 2009.
- Couillard-Despres S, Zhu Q, Wong PC, et al. Protective effect of neurofilament heavy gene overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998;95 (16): 9626-30.
- Couratier P, Hugon J, Sindou P, Vallat JM and Dumas M. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet*, 1993;341 (8840): 265-8.
- Cronin S, Blauw HM, Veldink JH, et al. Analysis of genome-wide copy number variation in Irish and Dutch ALS populations. *Hum Mol Genet*, 2008;17 (21): 3392-8.
- Cronin S, Tomik B, Bradley DG, Slowik A and Hardiman O. Screening for replication of genome-wide SNP associations in sporadic ALS. *Eur J Hum Genet*, 2009;17 (2): 213-8.
- Crow JP, Sampson JB, Zhuang Y, Thompson JA and Beckman JS. Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J Neurochem*, 1997;69 (5): 1936-44.
- Cruz DC, Nelson LM, McGuire V and Longstreth WT, Jr. Physical trauma and family history of neurodegenerative diseases in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Neuroepidemiology*, 1999;18 (2): 101-10.
- Cudkovicz ME, McKenna-Yasek D, Chen C, Hedley-Whyte ET and Brown RH, Jr. Limited corticospinal tract involvement in amyotrophic lateral sclerosis subjects with the A4V mutation in the copper/zinc superoxide dismutase gene. *Ann Neurol*, 1998;43 (6): 703-10.
- Cudkovicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE, et al. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1997;41 (2): 210-21.

- Currier RD and Haerer AF. Amyotrophic lateral sclerosis and metallic toxins. *Arch Environ Health*, 1968;17 (5): 712-9.
- Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK and Breslow JL. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem*, 1985;260 (10): 6240-7.
- Deapen DM and Henderson BE. A case-control study of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol*, 1986;123 (5): 790-9.
- DeKroon RM, Mihovilovic M, Goodger ZV, et al. ApoE genotype-specific inhibition of apoptosis. *J Lipid Res*, 2003;44 (8): 1566-73.
- del Aguila MA, Longstreth WT, Jr., McGuire V, Koepsell TD and van Belle G. Prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Neurology*, 2003;60 (5): 813-9.
- Del Bo R, Scarlato M, Ghezzi S, et al. Absence of angiogenic genes modification in Italian ALS patients. *Neurobiol Aging*, 2008;29 (2): 314-6.
- Desai J and Swash M. Extrapyramidal involvement in amyotrophic lateral sclerosis: backward falls and retropulsion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1999;67 (2): 214-6.
- Desport JC, Preux PM, Magy L, et al. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr*, 2001;74 (3): 328-34.
- Desport JC, Preux PM, Truong TC, et al. Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. *Neurology*, 1999;53 (5): 1059-63.
- Devon RS, Orban PC, Gerrow K, et al. Als2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006;103 (25): 9595-600.
- Dhaliwal GK and Grewal RP. Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains. *Neuroreport*, 2000;11 (11): 2507-9.
- Dore S, Kar S and Quirion R. Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, 1997;20 (8): 326-31.
- Drory VE, Birnbaum M, Korczyn AD and Chapman J. Association of APOE epsilon4 allele with survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 2001;190 (1-2): 17-20.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, et al. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 2008;70 (13): 1004-9.
- Durham HD, Roy J, Dong L and Figlewicz DA. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997;56 (5): 523-30.
- Dyck PJ, Stevens JC, Mulder DW and Espinosa RE. Frequency of nerve fiber degeneration of peripheral motor and sensory neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Morphometry of deep and superficial peroneal nerves. *Neurology*, 1975;25 (8): 781-5.
- Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW and Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985;82 (1): 203-7.
- Engelhardt JI and Appel SH. IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, 1990;47 (11): 1210-6.
- Estevez AG, Crow JP, Sampson JB, et al. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science*, 1999;286 (5449): 2498-500.
- Eymard-Pierre E, Lesca G, Dollet S, et al. Infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis is associated with mutations in the alsin gene. *Am J Hum Genet*, 2002;71 (3): 518-27.

- Fagan AM, Holtzman DM, Munson G, et al. Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (-/-), and human apoE transgenic mice. *J Biol Chem*, 1999;274 (42): 30001-7.
- Fargo KN, Galbiati M, Foecking EM, Poletti A and Jones KJ. Androgen regulation of axon growth and neurite extension in motoneurons. *Horm Behav*, 2008;53 (5): 716-28.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*, 1996;13 (4): 399-408.
- Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, et al. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem*, 1997;272 (22): 14025-8.
- Fergani A, Oudart H, Gonzalez De Aguilar JL, et al. Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Lipid Res*, 2007;48 (7): 1571-80.
- Fernandez-Santiago R, Hoenig S, Lichtner P, et al. Identification of novel Angiogenin (ANG) gene missense variants in German patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, 2009;256 (8): 1337-42.
- Ferracci F, Fassetta G, Butler MH, et al. A novel antineuronal antibody in a motor neuron syndrome associated with breast cancer. *Neurology*, 1999;53 (4): 852-5.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, et al. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 1997;69 (5): 2064-74.
- Feychting M, Jonsson F, Pedersen NL and Ahlbom A. Occupational magnetic field exposure and neurodegenerative disease. *Epidemiology*, 2003;14 (4): 413-9; discussion 427-8.
- Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, et al. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, 1994;3 (10): 1757-61.
- Finsterer J. Bulbar and spinal muscular atrophy (Kennedy's disease): a review. *Eur J Neurol*, 2009;16 (5): 556-61.
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, et al. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998;95 (3): 1148-53.
- Florez JC, Hirschhorn J and Altshuler D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2003;4: 257-291.
- Forbes RB, Colville S, Cran GW and Swingler RJ. Unexpected decline in survival from amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004;75 (12): 1753-5.
- Forbes RB, Colville S and Swingler RJ. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS/MND) in people aged 80 or over. *Age Ageing*, 2004;33 (2): 131-4.
- Forsyth PA, Dalmau J, Graus F, et al. Motor neuron syndromes in cancer patients. *Ann Neurol*, 1997;41 (6): 722-30.
- Frank B, Haas J, Heinze HJ, Stark E and Munte TF. Relation of neuropsychological and magnetic resonance findings in amyotrophic lateral sclerosis: evidence for subgroups. *Clin Neurol Neurosurg*, 1997;99 (2): 79-86.
- Fray AE, Ince PG, Banner SJ, et al. The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci*, 1998;10 (8): 2481-9.
- Friedlander RM, Brown RH, Gagliardini V, Wang J and Yuan J. Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature*, 1997;388 (6637): 31.

- Fujita Y and Okamoto K. Golgi apparatus of the motor neurons in patients with amyotrophic lateral sclerosis and in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*, 2005;25 (4): 388-94.
- Gallagher JP and Sanders M. Trauma and amyotrophic lateral sclerosis: a report of 78 patients. *Acta Neurol Scand*, 1987;75 (2): 145-50.
- Gamez J, Barcelo MJ, Munoz X, et al. Survival and respiratory decline are not related to homozygous SMN2 deletions in ALS patients. *Neurology*, 2002;59 (9): 1456-60.
- Gawel M, Zaiwalla Z and Rose FC. Antecedent events in motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1983;46 (11): 1041-3.
- Gellera C, Colombrina C, Ticozzi N, et al. Identification of new ANG gene mutations in a large cohort of Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics*, 2008;9 (1): 33-40.
- Giess R, Beck M, Goetz R, et al. Potential role of LIF as a modifier gene in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 2000;54 (4): 1003-5.
- Giess R, Holtmann B, Braga M, et al. Early onset of severe familial amyotrophic lateral sclerosis with a SOD-1 mutation: potential impact of CNTF as a candidate modifier gene. *Am J Hum Genet*, 2002;70 (5): 1277-86.
- Gonatas NK, Stieber A, Mourelatos Z, et al. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol*, 1992;140 (3): 731-7.
- Goodall EF, Greenway MJ, van Marion I, et al. Association of the H63D polymorphism in the hemochromatosis gene with sporadic ALS. *Neurology*, 2005;65 (6): 934-7.
- Goodall EF, Haque MS and Morrison KE. Increased serum ferritin levels in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *J Neurol*, 2008;255 (11): 1652-6.
- Gordon PH, Rowland LP, Younger DS, et al. Lymphoproliferative disorders and motor neuron disease: an update. *Neurology*, 1997;48 (6): 1671-8.
- Goswami T and Andrews NC. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem*, 2006;281 (39): 28494-8.
- Granieri E, Carreras M, Tola R, et al. Motor neuron disease in the province of Ferrara, Italy, in 1964-1982. *Neurology*, 1988;38 (10): 1604-8.
- Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, et al. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 2006;38 (4): 411-3.
- Gregory R, Mills K and Donaghy M. Progressive sensory nerve dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective clinical and neurophysiological study. *J Neurol*, 1993;240 (5): 309-14.
- Grohme K, Maravic MV, Gasser T and Borasio GD. A case of amyotrophic lateral sclerosis with a very slow progression over 44 years. *Neuromuscul Disord*, 2001;11 (4): 414-6.
- Gros-Louis F, Gaspar C and Rouleau GA. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 2006;1762 (11-12): 956-72.
- Gros-Louis F, Lariviere R, Gowing G, et al. A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 2004;279 (44): 45951-6.
- Gubbay SS, Kahana E, Zilber N, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. A study of its presentation and prognosis. *J Neurol*, 1985;232 (5): 295-300.
- Guegan C and Przedborski S. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest*, 2003;111 (2): 153-61.
- Gunnarsson LG, Lindberg G, Soderfeldt B and Axelson O. Amyotrophic lateral sclerosis in Sweden in relation to occupation. *Acta Neurol Scand*, 1991;83 (6): 394-8.

- Gunnarsson LG, Lygner PE, Veiga-Cabo J and de Pedro-Cuesta J. An epidemic-like cluster of motor neuron disease in a Swedish county during the period 1973-1984. *Neuroepidemiology*, 1996;15 (3): 142-52.
- Gunnarsson LG and Palm R. Motor neuron disease and heavy manual labor: an epidemiologic survey of Varmland County, Sweden. *Neuroepidemiology*, 1984 (3): 195-206.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997;388 (6641): 482-8.
- Gurrin LC, Bertalli NA, Dalton GW, et al. HFE C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis-related morbidity. *Hepatology*, 2009;50 (1): 94-101.
- Gustafson A, Alaupovic P and Furman RH. Studies of the composition and structure of serum lipoproteins. Separation and characterization of phospholipid-protein residues obtained by partial delipidization of very low density lipoproteins of human serum. *Biochemistry*, 1966;5 (2): 632-40.
- Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, et al. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science*, 2003;300 (5620): 808-12.
- Haley RW. Excess incidence of ALS in young Gulf War veterans. *Neurology*, 2003;61 (6): 750-6.
- Hall ED, Oostveen JA and Gurney ME. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia*, 1998;23 (3): 249-56.
- Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, et al. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet*, 1991;49 (2): 338-49.
- Hand CK, Mayeux-Portas V, Khoris J, et al. Compound heterozygous D90A and D96N SOD1 mutations in a recessive amyotrophic lateral sclerosis family. *Ann Neurol*, 2001;49 (2): 267-71.
- Hand CK and Rouleau GA. Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, 2002;25 (2): 135-59.
- Handelmann GE, Boyles JK, Weisgraber KH, Mahley RW and Pitas RE. Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res*, 1992;33 (11): 1677-88.
- Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 2002;40 (2): 140-55.
- Hantai D, Akaaboune M, Lagord C, et al. Beneficial effects of insulin-like growth factor-I on wobbler mouse motoneuron disease. *J Neurol Sci*, 1995;129 Suppl: 122-6.
- Harvey DG, Torack RM and Rosenbaum HE. Amyotrophic lateral sclerosis with ophthalmoplegia. A clinicopathologic study. *Arch Neurol*, 1979;36 (10): 615-7.
- Harwood CA, McDermott CJ and Shaw PJ. Physical activity as an exogenous risk factor in motor neuron disease (MND): a review of the evidence. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 2009;10 (4): 191-204.
- Hatters DM, Peters-Libeu CA and Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci*, 2006;31 (8): 445-54.
- Haverkamp LJ, Appel V and Appel SH. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain*, 1995;118 (Pt 3): 707-19.
- Hayashi H, Kato S, Kawada T and Tsubaki T. Amyotrophic lateral sclerosis: oculomotor function in patients in respirators. *Neurology*, 1987;37 (8): 1431-2.

- Hays AP (2006). The pathology of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis. Mitsumoto H., Przedborski S. and Gordon P. H. New York, Taylor and Francis: 43-80.
- Hays AP, Roxas A, Sadiq SA, et al. A monoclonal IgA in a patient with amyotrophic lateral sclerosis reacts with neurofilaments and surface antigen on neuroblastoma cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1990;49 (4): 383-98.
- Hentati A, Ouahchi K, Pericak-Vance MA, et al. Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics*, 1998;2 (1): 55-60.
- Hirano A. Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology*, 1996;47 (4 Suppl 2): S63-6.
- Hirano A, Nakano I, Kurland LT, et al. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1984;43 (5): 471-80.
- Hixson JE and Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*, 1990;31 (3): 545-8.
- Hodges JR, Davies R, Xuereb J, Kril J and Halliday G. Survival in frontotemporal dementia. *Neurology*, 2003;61 (3): 349-54.
- Horner RD, Kamins KG, Feussner JR, et al. Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology*, 2003;61 (6): 742-9.
- Hosler BA, Siddique T, Sapp PC, et al. Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *Jama*, 2000;284 (13): 1664-9.
- Howland DS, Liu J, She Y, et al. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99 (3): 1604-9.
- Hu MT, Ellis CM, Al-Chalabi A, Leigh PN and Shaw CE. Flail arm syndrome: a distinctive variant of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1998;65 (6): 950-1.
- Huang X, Chen PC and Poole C. APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 2004;62 (12): 2198-202.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, 1998;393 (6686): 702-5.
- Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, et al. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986;83 (4): 1125-9.
- Ikeda K, Iwasaki Y, Tagaya N, et al. Neuroprotective effect of basic fibroblast growth factor on wobbler mouse motor neuron disease. *Neurol Res*, 1995;17 (6): 445-8.
- Ilyin G, Courselaud B, Troadec MB, et al. Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload. *FEBS Lett*, 2003;542 (1-3): 22-6.
- Imon Y, Yamaguchi S, Yamamura Y, et al. Low intensity areas observed on T2-weighted magnetic resonance imaging of the cerebral cortex in various neurological diseases. *J Neurol Sci*, 1995;134 Suppl: 27-32.
- Ince PG, Evans J, Knopp M, et al. Corticospinal tract degeneration in the progressive muscular atrophy variant of ALS. *Neurology*, 2003;60 (8): 1252-8.
- Ince PG, Lowe J and Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1998;24 (2): 104-17.
- Ince PG, Shaw PJ, Candy JM, et al. Iron, selenium and glutathione peroxidase activity are elevated in sporadic motor neuron disease. *Neurosci Lett*, 1994;182 (1): 87-90.

- Ince PG and Wharton SB (2004). Cytopathology of the motor neuron. *Clinical Neurophysiology of Motor Neuron Diseases*. Eisen A. Amsterdam, Elsevier B. V.: 149-168.
- Innerarity TL, Friedlander EJ, Rall SC, Jr., Weisgraber KH and Mahley RW. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Binding of apolipoprotein E fragments. *J Biol Chem*, 1983;258 (20): 12341-7.
- Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, et al. CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol*, 2001;102 (4): 293-305.
- Jackson M, Morrison KE, Al-Chalabi A, Bakker M and Leigh PN. Analysis of chromosome 5q13 genes in amyotrophic lateral sclerosis: homozygous NAIP deletion in a sporadic case. *Ann Neurol*, 1996;39 (6): 796-800.
- Jackson M, Steers G, Leigh PN and Morrison KE. Polymorphisms in the glutamate transporter gene EAAT2 in European ALS patients. *J Neurol*, 1999;246 (12): 1140-4.
- Jeong SY and David S. Age-related changes in iron homeostasis and cell death in the cerebellum of ceruloplasmin-deficient mice. *J Neurosci*, 2006;26 (38): 9810-9.
- Jeong SY, Rathore KI, Schulz K, et al. Dysregulation of iron homeostasis in the CNS contributes to disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 2009;29 (3): 610-9.
- Johansen C and Olsen JH. Mortality from amyotrophic lateral sclerosis, other chronic disorders, and electric shocks among utility workers. *Am J Epidemiol*, 1998;148 (4): 362-8.
- Jokelainen M. Amyotrophic lateral sclerosis in Finland. II: Clinical characteristics. *Acta Neurol Scand*, 1977;56 (3): 194-204.
- Jones KR, Farinas I, Backus C and Reichardt LF. Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, 1994;76 (6): 989-99.
- Jouanolle AM, Fergelot P, Gandon G, et al. A candidate gene for hemochromatosis: frequency of the C282Y and H63D mutations. *Hum Genet*, 1997;100 (5-6): 544-7.
- Julien JP and Beaulieu JM. Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects? *J Neurol Sci*, 2000;180 (1-2): 7-14.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 2008;40 (5): 572-4.
- Kamel F, Umbach DM, Munsat TL, et al. Lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Epidemiology*, 2002;13 (3): 311-9.
- Kamel F, Umbach DM, Munsat TL, Shefner JM and Sandler DP. Association of cigarette smoking with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology*, 1999;18 (4): 194-202.
- Kamel F, Umbach DM, Stallone L, et al. Association of lead exposure with survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Environ Health Perspect*, 2008;116 (7): 943-7.
- Kasarskis EJ, Berryman S, Vanderleest JG, Schneider AR and McClain CJ. Nutritional status of patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to the proximity of death. *Am J Clin Nutr*, 1996;63 (1): 130-7.
- Kasarskis EJ, Tandon L, Lovell MA and Ehmann WD. Aluminum, calcium, and iron in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis using laser microprobe mass spectroscopy: a preliminary study. *J Neurol Sci*, 1995;130 (2): 203-8.
- Kato S. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*, 2008;115 (1): 97-114.

- Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature*, 2004;427 (6977): 801.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T and McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol*, 1992;140 (3): 691-707.
- Kawamura Y, Dyck PJ, Shimono M, et al. Morphometric comparison of the vulnerability of peripheral motor and sensory neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1981;40 (6): 667-75.
- Khwaja S, Sripathi N, Ahmad BK and Lennon VA. Paraneoplastic motor neuron disease with type 1 Purkinje cell antibodies. *Muscle Nerve*, 1998;21 (7): 943-5.
- Kihira T, Mukoyama M, Ando K, Yase Y and Yasui M. Determination of manganese concentrations in the spinal cords from amyotrophic lateral sclerosis patients by inductively coupled plasma emission spectroscopy. *J Neurol Sci*, 1990;98 (2-3): 251-8.
- Kihira T, Yoshida S, Komoto J, Wakayama I and Yase Y. Aluminum-induced model of motor neuron degeneration: subperineurial injection of aluminum in rabbits. *Neurotoxicology*, 1995;16 (3): 413-24.
- Kolovou G, Damaskos D, Anagnostopoulou K and Cokkinos DV. Apolipoprotein E gene polymorphism and gender. *Ann Clin Lab Sci*, 2009;39 (2): 120-33.
- Kondo K and Tsubaki T. Case-control studies of motor neuron disease: association with mechanical injuries. *Arch Neurol*, 1981;38 (4): 220-6.
- Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M and Przedborski S. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 1997;277 (5325): 559-62.
- Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S, et al. Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. *Brain: A Journal of Neurology*, 2005;128 (Pt 8): 1870-1876.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 1996;19 (8): 312-8.
- Kruman I, Pedersen W, Springer J and Mattson M. ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp Neurol* 1999 (160): 28-39.
- Kurland LT and Mulder DW. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution, with special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations. *Neurology*, 1954;4 (5): 355-78.
- Kurland LT and Mulder DW. Amyotrophic lateral sclerosis in the Mariana Islands. *Trans Am Neurol Assoc*, 1955 (80th Meeting): 72-5.
- Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 2009;323 (5918): 1205-8.
- Lacomblez L, Doppler V, Beucler I, et al. APOE: a potential marker of disease progression in ALS. *Neurology*, 2002;58 (7): 1112-4.
- Lai C, Xie C, McCormack SG, et al. Amyotrophic lateral sclerosis 2-deficiency leads to neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis through altered AMPA receptor trafficking. *J Neurosci*, 2006;26 (45): 11798-806.
- Lambrechts D, Lafuste P, Carmeliet P and Conway EM. Another angiogenic gene linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Mol Med*, 2006;12 (8): 345-7.

- Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet*, 2003;34 (4): 383-94.
- LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, et al. Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron*, 2002;34 (5): 715-27.
- Lee JR, Annegers JF and Appel SH. Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis and the effect of referral selection. *J Neurol Sci*, 1995;132 (2): 207-15.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 1995;80 (1): 155-65.
- Leigh PN, Dodson A, Swash M, Brion JP and Anderton BH. Cytoskeletal abnormalities in motor neuron disease. An immunocytochemical study. *Brain*, 1989;112 (Pt 2): 521-35.
- Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, et al. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain*, 1991;114 (Pt 2): 775-88.
- Lennox G, Lowe J, Landon M, et al. Diffuse Lewy body disease: correlative neuropathology using anti-ubiquitin immunocytochemistry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1989;52 (11): 1236-47.
- Leon-Monzon ME and Dalakas MC. Detection of poliovirus antibodies and poliovirus genome in patients with the post-polio syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1995;753: 208-18.
- Leveille A, Kiernan J, Goodwin JA and Antel J. Eye movements in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, 1982;39 (11): 684-6.
- Levy JE, Montross LK, Cohen DE, Fleming MD and Andrews NC. The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood*, 1999;94 (1): 9-11.
- Li CY and Sung FC. Association between occupational exposure to power frequency electromagnetic fields and amyotrophic lateral sclerosis: a review. *Am J Ind Med*, 2003;43 (2): 212-20.
- Li TM, Alberman E and Swash M. Clinical features and associations of 560 cases of motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1990;53 (12): 1043-5.
- Li YJ, Pericak-Vance MA, Haines JL, et al. Apolipoprotein E is associated with age at onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics*, 2004;5 (4): 209-13.
- Lin CL, Bristol LA, Jin L, et al. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*, 1998;20 (3): 589-602.
- Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES and Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nature Genetics*, 2003;33 (2): 177-182.
- Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, et al. Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology*, 2003;60 (7): 1094-7.
- Lomen-Hoerth C and Strong M (2006). *Cognition in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis*
- Mitumoto H. P. S. a. G. P. New York, Taylor & Francis: 17-42.
- Longstreth WT, McGuire V, Koepsell TD, Wang Y and van Belle G. Risk of amyotrophic lateral sclerosis and history of physical activity: a population-based case-control study. *Arch Neurol*, 1998;55 (2): 201-6.

- Ludolph AC, Hugon J, Dwivedi MP, Schaumburg HH and Spencer PS. Studies on the aetiology and pathogenesis of motor neuron diseases. 1. Lathyrism: clinical findings in established cases. *Brain*, 1987;110 (Pt 1): 149-65.
- MacGowan DJ, Scelsa SN, Imperato TE, et al. A controlled study of reverse transcriptase in serum and CSF of HIV-negative patients with ALS. *Neurology*, 2007;68 (22): 1944-6.
- Magnus T, Beck M, Giess R, et al. Disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: predictors of survival. *Muscle Nerve*, 2002;25 (5): 709-14.
- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988;240 (4852): 622-30.
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr. and Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*, 1984;25 (12): 1277-94.
- Mandrioli J, Faglioni P, Merelli E and Sola P. The epidemiology of ALS in Modena, Italy. *Neurology*, 2003;60 (4): 683-9.
- Manfredi G and Xu Z. Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion*, 2005;5 (2): 77-87.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 2009;461 (7265): 747-753.
- Maragakis NJ and Rothstein JD. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol*, 2001;58 (3): 365-70.
- Marques VD, Barreira AA, Davis MB, et al. Expanding the phenotypes of the Pro56Ser VAPB mutation: proximal SMA with dysautonomia. *Muscle Nerve*, 2006;34 (6): 731-9.
- Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999;58 (5): 459-71.
- Masliah E, Mallory M, Ge N, et al. Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp Neurol*, 1995;136 (2): 107-22.
- Massman PJ, Sims J, Cooke N, et al. Prevalence and correlates of neuropsychological deficits in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1996;61 (5): 450-5.
- Masu Y, Wolf E, Holtmann B, et al. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature*, 1993;365 (6441): 27-32.
- Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, et al. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem*, 2002;277 (33): 29626-33.
- McGuire V, Longstreth WT, Jr., Nelson LM, et al. Occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis. A population-based case-control study. *Am J Epidemiol*, 1997;145 (12): 1076-88.
- McGuire V and Nelson LM (2005). *Epidemiology of ALS. Amyotrophic lateral sclerosis.* Mitsumoto H., Przedborski S. and Gordon P. New York, Taylor & Francis: 17-42.
- McGuire V and Nelson LM (2006). *Epidemiology of ALS. Amyotrophic lateral sclerosis.* Mitsumoto H., Przedborski S. and Gordon P. New York, Taylor & Francis: 17-42.
- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, 2001;291 (5509): 1755-9.
- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*, 2000;5 (2): 299-309.

- McLean JW, Elshourbagy NA, Chang DJ, Mahley RW and Taylor JM. Human apolipoprotein E mRNA. cDNA cloning and nucleotide sequencing of a new variant. *J Biol Chem*, 1984;259 (10): 6498-504.
- Merry DE. Molecular pathogenesis of spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain Res Bull*, 2001;56 (3-4): 203-7.
- Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Iwai K, et al. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *Embo J*, 2004;23 (2): 386-95.
- Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, et al. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science*, 1994;265 (5175): 1107-10.
- Mitsumoto H and Tsuzaka K. Neurotrophic factors and neuro-muscular disease: II. GDNF, other neurotrophic factors, and future directions. *Muscle Nerve*, 1999;22 (8): 1000-21.
- Mitsumoto H and Tsuzaka K. Neurotrophic factors and neuromuscular disease: I. General comments, the neurotrophin family, and neuropoietic cytokines. *Muscle Nerve*, 1999;22 (8): 983-99.
- Miyata S, Nakamura S, Nagata H and Kameyama M. Increased manganese level in spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis determined by radiochemical neutron activation analysis. *J Neurol Sci*, 1983;61 (2): 283-93.
- Mizutani T, Aki M, Shiozawa R, et al. Development of ophthalmoplegia in amyotrophic lateral sclerosis during long-term use of respirators. *J Neurol Sci*, 1990;99 (2-3): 311-9.
- Moreira MC, Klur S, Watanabe M, et al. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet*, 2004;36 (3): 225-7.
- Mougeot JL, Richardson-Milazi S and Brooks BR. Whole-genome association studies of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: are retroelements involved? *Trends Mol Med*, 2009;15 (4): 148-58.
- Moulard B, Salachas F, Chassande B, et al. Association between centromeric deletions of the SMN gene and sporadic adult-onset lower motor neuron disease. *Ann Neurol*, 1998;43 (5): 640-4.
- Moulard B, Sefiani A, Laamri A, Malafosse A and Camu W. Apolipoprotein E genotyping in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: evidence for a major influence on the clinical presentation and prognosis. *J Neurol Sci*, 1996;139 Suppl: 34-7.
- Moullignier A, Moulouguet A, Pialoux G and Rozenbaum W. Reversible ALS-like disorder in HIV infection. *Neurology*, 2001;57 (6): 995-1001.
- Mui S, Rebeck GW, McKenna-Yasek D, Hyman BT and Brown RH, Jr. Apolipoprotein E epsilon 4 allele is not associated with earlier age at onset in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1995;38 (3): 460-3.
- Mulder DW and Kurland LT. Motor neuron disease: epidemiologic studies. *Adv Exp Med Biol*, 1987;209: 325-32.
- Muller HW and Minwegen P. Nonresident macrophages in peripheral nerve of rat: effect of silica on migration, myelin phagocytosis, and apolipoprotein E expression during Wallerian degeneration. *J Neurosci Res*, 1987;18 (1): 222-9.
- Munch C, Rosenbohm A, Sperfeld AD, et al. Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD. *Ann Neurol*, 2005;58 (5): 777-80.
- Murray B (2006). Natural history and prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis*. Mitsumoto H., Przedborski S. and Gordon P. H. New York, Taylor & Francis: 227-256.
- Murros K and Fogelholm R. Amyotrophic lateral sclerosis in Middle-Finland: an epidemiological study. *Acta Neurol Scand*, 1983;67 (1): 41-7.

- Nakai M, Kawamata T, Taniguchi T, Maeda K and Tanaka C. Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia. *Neurosci Lett*, 1996;211 (1): 41-4.
- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E and Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res*, 1991;541 (1): 163-6.
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, et al. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*, 1994;264 (5160): 850-2.
- Nathan BP, Chang KC, Bellosta S, et al. The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization. *J Biol Chem*, 1995;270 (34): 19791-9.
- Nathan BP, Jiang Y, Wong GK, et al. Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Brain Res*, 2002;928 (1-2): 96-105.
- Nelson LM, Matkin C, Longstreth WT, Jr. and McGuire V. Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. II. Diet. *Am J Epidemiol*, 2000;151 (2): 164-73.
- Nelson LM, McGuire V, Longstreth WT, Jr. and Matkin C. Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. I. Cigarette smoking and alcohol consumption. *Am J Epidemiol*, 2000;151 (2): 156-63.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 2004;306 (5704): 2090-3.
- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001;98 (15): 8780-5.
- Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99 (7): 4596-601.
- Niebroj-Dobosz I and Janik P. Amino acids acting as transmitters in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Acta Neurol Scand*, 1999;100 (1): 6-11.
- Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet*, 2004;75 (5): 822-31.
- Noonan CW, Reif JS, Yost M and Touchstone J. Occupational exposure to magnetic fields in case-referent studies of neurodegenerative diseases. *Scand J Work Environ Health*, 2002;28 (1): 42-8.
- Norris F, Shepherd R, Denys E, et al. Onset, natural history and outcome in idiopathic adult motor neuron disease. *J Neurol Sci*, 1993;118 (1): 48-55.
- Oba H, Araki T, Ohtomo K, et al. Amyotrophic lateral sclerosis: T2 shortening in motor cortex at MR imaging. *Radiology*, 1993;189 (3): 843-6.
- Obal I, Jakab JS, Siklos L and Engelhardt JI. Recruitment of activated microglia cells in the spinal cord of mice by ALS IgG. *Neuroreport*, 2001;12 (11): 2449-52.
- Okamoto K, Kihira T, Kobashi G, et al. Fruit and vegetable intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Neuroepidemiology*, 2009;32 (4): 251-6.
- Okamoto K, Mizuno Y and Fujita Y. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*, 2008;28 (2): 109-15.
- Olaisen B, Teisberg P and Gedde-Dahl T, Jr. The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. *Hum Genet*, 1982;62 (3): 233-6.
- Olson RE. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J Nutr*, 1998;128 (2 Suppl): 439S-443S.

- Ono S, Imai T, Igarashi A, et al. Decrease in the ciliary neurotrophic factor of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Neurol*, 1999;42 (3): 163-8.
- Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*, 2001;28 (2): 131-8.
- Orrell RW, Habgood JJ, de Belleruche JS and Lane RJ. The relationship of spinal muscular atrophy to motor neuron disease: investigation of SMN and NAIP gene deletions in sporadic and familial ALS. *J Neurol Sci*, 1997;145 (1): 55-61.
- Orru S, Mascia V, Casula M, et al. Association of monoamine oxidase B alleles with age at onset in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord*, 1999;9 (8): 593-7.
- Ost M, Nylen K, Csajbok L, et al. Apolipoprotein E polymorphism and gender difference in outcome after severe traumatic brain injury. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2008;52 (10): 1364-9.
- Pamphlett R and Coote P. Entry of low doses of mercury vapor into the nervous system. *Neurotoxicology*, 1998;19 (1): 39-47.
- Pamphlett R, McQuilty R and Zarkos K. Blood levels of toxic and essential metals in motor neuron disease. *Neurotoxicology*, 2001;22 (3): 401-10.
- Pamphlett R and Waley P. Motor neuron uptake of low dose inorganic mercury. *J Neurol Sci*, 1996;135 (1): 63-7.
- Panas M, Karadima G, Kalfakis N, et al. Genotyping of presenilin-1 polymorphism in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, 2000;247 (12): 940-2.
- Papanastasiou DA, Vayenas DV, Vassilopoulos A and Repanti M. Concentration of iron and distribution of iron and transferrin after experimental iron overload in rat tissues in vivo: study of the liver, the spleen, the central nervous system and other organs. *Pathol Res Pract*, 2000;196 (1): 47-54.
- Parboosingh JS, Meininger V, McKenna-Yasek D, Brown RH, Jr. and Rouleau GA. Deletions causing spinal muscular atrophy do not predispose to amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, 1999;56 (6): 710-2.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ and Ganz T. Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, 2001;276 (11): 7806-10.
- Parkkila S, Waheed A, Britton RS, et al. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997;94 (6): 2534-9.
- Pasinelli P, Borchelt DR, Houseweart MK, Cleveland DW and Brown RH, Jr. Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998;95 (26): 15763-8.
- Paubel A, Violette J, Amy M, et al. Mutations of the ANG gene in French patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, 2008;65 (10): 1333-6.
- Pearl D, Noursadeghi M, Manji H, Edwards S and Miller R. Lower motor neuron syndrome and HIV infection. *Sex Transm Infect*, 2003;79 (4): 351.
- Peled-Kamar M, Lotem J, Wirguin I, et al. Oxidative stress mediates impairment of muscle function in transgenic mice with elevated level of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997;94 (8): 3883-7.
- Pfriefer FW. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 2003;60 (6): 1158-71.
- Piao YS, Wakabayashi K, Kakita A, et al. Neuropathology with clinical correlations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000. *Brain Pathol*, 2003;13 (1): 10-22.

- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*, 2001;276 (11): 7811-9.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D and Weisgraber KH. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem*, 1987;262 (29): 14352-60.
- Poirier J, Hess M, May PC and Finch CE. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res Mol Brain Res*, 1991;11 (2): 97-106.
- Portet F, Cadilhac C, Touchon J and Camu W. Cognitive impairment in motor neuron disease with bulbar onset. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2001;2 (1): 23-9.
- Portet F, Touchon J and Camu W. [Amyotrophic lateral sclerosis and cognitive disorders: review and analysis of the literature]. *Rev Neurol (Paris)*, 2001;157 (2): 139-50.
- Pradat P-F, Bruneteau G, Munerati E, et al. Extrapiramidal stiffness in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 2009.
- Pradat PF and Bruneteau G. [Classical and atypical clinical features in amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)*, 2006;162 Spec No 2: 4S17-4S24.
- Pradat PF, Bruneteau G, Gordon PH, et al. Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*, 2009: 1-6.
- Praline J, Guennoc AM, Limousin N, et al. ALS and mercury intoxication: a relationship? *Clin Neurol Neurosurg*, 2007;109 (10): 880-3.
- Preux PM, Druet-Cabanac M, Couratier P, et al. Estimation of the amyotrophic lateral sclerosis incidence by capture-recapture method in the Limousin region of France. *J Clin Epidemiol*, 2000;53 (10): 1025-9.
- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, et al. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet*, 2003;33 (4): 455-6.
- Qureshi M, Brown RH, Jr., Rogers JT and Cudkowicz ME. Serum ferritin and metal levels as risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Open Neurol J*, 2008;2: 51-4.
- Raber J. AR, apoE, and cognitive function. *Horm Behav*, 2008;53 (5): 706-15.
- Raber J, Bongers G, LeFevour A, Buttini M and Mucke L. Androgens protect against apolipoprotein E4-induced cognitive deficits. *J Neurosci*, 2002;22 (12): 5204-9.
- Rabin BA, Griffin JW, Crain BJ, et al. Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 1999;122 (Pt 8): 1539-50.
- Ratovitski T, Corson LB, Strain J, et al. Variation in the biochemical/biophysical properties of mutant superoxide dismutase 1 enzymes and the rate of disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis kindreds. *Hum Mol Genet*, 1999;8 (8): 1451-60.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet*, 1996;13 (1): 43-7.
- Regal L, Vanopdenbosch L, Tilkin P, et al. The G93C mutation in superoxide dismutase 1: clinicopathologic phenotype and prognosis. *Arch Neurol*, 2006;63 (2): 262-7.
- Restagno G, Lombardo F, Ghiglione P, et al. HFE H63D polymorphism is increased in patients with amyotrophic lateral sclerosis of Italian origin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2007;78 (3): 327.
- Ringel SP, Murphy JR, Alderson MK, et al. The natural history of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 1993;43 (7): 1316-22.

- Robertson J, Doroudchi MM, Nguyen MD, et al. A neurotoxic peripherin splice variant in a mouse model of ALS. *J Cell Biol*, 2003;160 (6): 939-49.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 1993;362 (6415): 59-62.
- Roses AD, Einstein G, Gilbert J, et al. Morphological, biochemical, and genetic support for an apolipoprotein E effect on microtubular metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 1996;777: 146-57.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1990;28 (1): 18-25.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ and Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1995;38 (1): 73-84.
- Rouleau GA, Clark AW, Rooke K, et al. SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1996;39 (1): 128-31.
- Rowland LP and Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 2001;344 (22): 1688-700.
- Ruddy DM, Parton MJ, Al-Chalabi A, et al. Two families with familial amyotrophic lateral sclerosis are linked to a novel locus on chromosome 16q. *Am J Hum Genet*, 2003;73 (2): 390-6.
- Saeed M, Siddique N, Hung WY, et al. Paraoxonase cluster polymorphisms are associated with sporadic ALS. *Neurology*, 2006;67 (5): 771-6.
- Salazar AM, Masters CL, Gajdusek DC and Gibbs CJ, Jr. Syndromes of amyotrophic lateral sclerosis and dementia: relation to transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*, 1983;14 (1): 17-26.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular cloning. A laboratory guide*. New York, Cold Spring Harbor Laboratories Press: 4-48.
- Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, et al. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*, 1996;382 (6586): 70-3.
- Sapp PC, Hosler BA, McKenna-Yasek D, et al. Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet*, 2003;73 (2): 397-403.
- Sasaki S and Iwata M. Characterizations of heterotopic neurons in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol*, 1998;95 (4): 367-72.
- Sasaki S, Maruyama S, Yamane K, Sakuma H and Takeishi M. Swellings of proximal axons in a case of motor neuron disease. *Ann Neurol*, 1989;25 (5): 520-2.
- Sasaki S, Yamane K, Sakuma H and Maruyama S. Sporadic motor neuron disease with Lewy body-like hyaline inclusions. *Acta Neuropathol*, 1989;78 (5): 555-60.
- Sathasivam S and Shaw PJ. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis--what is the evidence? *Lancet Neurol*, 2005;4 (8): 500-9.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 1993;43 (8): 1467-72.
- Savettieri G, Salemi G, Arcara A, et al. A case-control study of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology*, 1991;10 (5-6): 242-5.
- Savitz DA, Checkoway H and Loomis DP. Magnetic field exposure and neurodegenerative disease mortality among electric utility workers. *Epidemiology*, 1998;9 (4): 398-404.
- Scarpa M, Colombo A, Panzetti P and Sorgato P. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in the province of Modena, Italy. Influence of environmental exposure to lead. *Acta Neurol Scand*, 1988;77 (6): 456-60.

- Schwarz S, Husstedt I, Bertram HP and Kuchelmeister K. Amyotrophic lateral sclerosis after accidental injection of mercury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1996;60 (6): 698.
- Schymick JC, Scholz SW, Fung HC, et al. Genome-wide genotyping in amyotrophic lateral sclerosis and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *Lancet Neurol*, 2007;6 (4): 322-8.
- Schymick JC, Yang Y, Andersen PM, et al. Progranulin mutations and amyotrophic lateral sclerosis or amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia phenotypes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2007;78 (7): 754-6.
- Seeburger JL, Tarras S, Natter H and Springer JE. Spinal cord motoneurons express p75NGFR and p145trkB mRNA in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*, 1993;621 (1): 111-5.
- Sejvar JJ, Holman RC, Bresee JS, Kochanek KD and Schonberger LB. Amyotrophic lateral sclerosis mortality in the United States, 1979-2001. *Neuroepidemiology*, 2005;25 (3): 144-52.
- Sendtner M, Ditttrich F, Hughes RA and Thoenen H. Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: preclinical studies and clinical implications. *J Neurol Sci*, 1994;124 Suppl: 77-83.
- Sha Q, Zhang Z, Schymick JC, Traynor BJ and Zhang S. Genome-wide association reveals three SNPs associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis through a two-locus analysis. *BMC Med Genet*, 2009;10: 86.
- Shaw CE, Enayat ZE, Powell JF, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis. Molecular pathology of a patient with a SOD1 mutation. *Neurology*, 1997;49 (6): 1612-6.
- Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005;76 (8): 1046-57.
- Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP and Wastell HJ. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration*, 1995;4 (2): 209-16.
- Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, et al. Presence of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) immunoreactivity in neuronal hyaline inclusions in spinal cords from mice carrying a transgene for Gly93Ala mutant human Cu/Zn SOD. *Acta Neuropathol*, 1998;95 (2): 136-42.
- Shore VG and Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry*, 1973;12 (3): 502-7.
- Siddique T and Dellefave L (2006). *Familial ALS and Genetic Approaches to ALS Amyotrophic lateral sclerosis*. Mitsumoto H., Przedborski S. and Gordon P. New York, Taylor & Francis: 141-166.
- Siddique T, Hong S, Brooks BR, et al. (1998). X-linked dominant ALS. annual meeting of the American Academy of Neurology. Minneapolis.
- Siddique T, Pericak-Vance MA, Caliendo J, et al. Lack of association between apolipoprotein E genotype and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics*, 1998;1 (3): 213-6.
- Siddons MA, Pickering-Brown SM, Mann DM, Owen F and Cooper PN. Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism frequencies in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 1996;208 (1): 65-8.
- Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, et al. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1996;39 (2): 203-16.

- Sitte HH, Wanschitz J, Budka H and Berger ML. Autoradiography with [3H]PK11195 of spinal tract degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 2001;101 (2): 75-8.
- Sleegers K, Brouwers N, Maurer-Stroh S, et al. Progranulin genetic variability contributes to amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 2008;71 (4): 253-9.
- Slowik A, Tomik B, Wolkow PP, et al. Paraoxonase gene polymorphisms and sporadic ALS. *Neurology*, 2006;67 (5): 766-70.
- Smith RG, Haverkamp LJ, Case S, Appel V and Appel SH. Apolipoprotein E epsilon 4 in bulbar-onset motor neuron disease. *Lancet*, 1996;348 (9023): 334-5.
- Smith RG, Henry YK, Mattson MP and Appel SH. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1998;44 (4): 696-9.
- Solanas-Barca M, Mateo-Gallego R, Calmarza P, et al. Mutations in HFE Causing Hemochromatosis Are Associated with Primary Hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009.
- Spalloni A, Albo F, Ferrari F, et al. Cu/Zn-superoxide dismutase (GLY93-->ALA) mutation alters AMPA receptor subunit expression and function and potentiates kainate-mediated toxicity in motor neurons in culture. *Neurobiol Dis*, 2004;15 (2): 340-50.
- Spielman R and Ewens W. The tdt and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet*, 1996;59: 983-989.
- Spielman R, McGinnis R and Ewens W. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*, 1993;52 (3): 506-516.
- Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, et al. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci*, 2002;193 (2): 73-8.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 2008;319 (5870): 1668-72.
- Steinmetz A, Thiemann E, Czekelius P and Kaffarnik H. Polymorphism of apolipoprotein E influences levels of serum apolipoproteins E and B in the human neonate. *Eur J Clin Invest*, 1989;19 (4): 390-4.
- Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci*, 2005;8 (1): 85-92.
- Strickland D, Smith SA, Dolliff G, Goldman L and Roelofs RI. Amyotrophic lateral sclerosis and occupational history. A pilot case-control study. *Arch Neurol*, 1996;53 (8): 730-3.
- Sussmuth SD, Brettschneider J, Ludolph AC and Tumani H. Biochemical markers in CSF of ALS patients. *Curr Med Chem*, 2008;15 (18): 1788-801.
- Sutedja NA, Sinke RJ, Van Vught PW, et al. The association between H63D mutations in HFE and amyotrophic lateral sclerosis in a Dutch population. *Arch Neurol*, 2007;64 (1): 63-7.
- Swash M, Scholtz CL, Vowles G and Ingram DA. Selective and asymmetric vulnerability of corticospinal and spinocerebellar tracts in motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1988;51 (6): 785-9.
- Takahashi H, Snow BJ, Bhatt MH, et al. Evidence for a dopaminergic deficit in sporadic amyotrophic lateral sclerosis on positron emission scanning. *Lancet*, 1993;342 (8878): 1016-8.

- Takahashi R, Yokoji H, Misawa H, et al. A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet*, 1994;7 (1): 79-84.
- Takeuchi H, Kobayashi Y, Ishigaki S, Doyu M and Sobue G. Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 2002;277 (52): 50966-72.
- Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T and Kanazawa I. Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1999;46 (6): 806-15.
- Tanridag T, Coskun T, Hurdag C, et al. Motor neuron degeneration due to aluminium deposition in the spinal cord: a light microscopical study. *Acta Histochem*, 1999;101 (2): 193-201.
- Testa D, Lovati R, Ferrarini M, Salmoiraghi F and Filippini G. Survival of 793 patients with amyotrophic lateral sclerosis diagnosed over a 28-year period. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2004;5 (4): 208-12.
- Tian G, Lai L, Guo H, et al. Translational control of glial glutamate transporter EAAT2 expression. *J Biol Chem*, 2007;282 (3): 1727-37.
- Ticozzi N, Silani V, LeClerc AL, et al. Analysis of FUS gene mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis within an Italian cohort. *Neurology*, 2009;73 (15): 1180-1185.
- Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, et al. Increase in oxidized NO products and reduction in oxidized glutathione in cerebrospinal fluid from patients with sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 1999;260 (3): 204-6.
- Tomkins J, Banner SJ, McDermott CJ and Shaw PJ. Mutation screening of manganese superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*, 2001;12 (11): 2319-22.
- Tomkins J, Dempster S, Banner SJ, Cookson MR and Shaw PJ. Screening of AP endonuclease as a candidate gene for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuroreport*, 2000;11 (8): 1695-7.
- Tomkins J, Usher P, Slade JY, et al. Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuroreport*, 1998;9 (17): 3967-70.
- Tozuka M, Hidaka H, Miyachi M, et al. Identification and characterization of apolipoprotein(AII-E2-AII) complex in human plasma lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1992;1165 (1): 61-7.
- Traynor BJ, Codd MB, Corr B, et al. Incidence and prevalence of ALS in Ireland, 1995-1997: a population-based study. *Neurology*, 1999;52 (3): 504-9.
- Traynor BJ, Codd MB, Corr B, et al. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. *Arch Neurol*, 2000;57 (8): 1171-6.
- Troost D, Van den Oord JJ and Vianney de Jong JM. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1990;16 (5): 401-10.
- Tsuchiya K, Sano M, Shiotsu H, et al. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration mimicking spinal progressive muscular atrophy exists: additional autopsy case with a clinical course of 19 years. *Neuropathology*, 2004;24 (3): 228-35.
- Tu PH, Gurney ME, Julien JP, Lee VM and Trojanowski JQ. Oxidative stress, mutant SOD1, and neurofilament pathology in transgenic mouse models of human motor neuron disease. *Lab Invest*, 1997;76 (4): 441-56.

- Turner M and Al-Chalabi A. Early symptom progression rate is related to ALS outcome: a prospective population-based study. *Neurology*, 2002;59 (12): 2012-3; author reply 2013.
- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, et al. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis*, 2004;15 (3): 601-9.
- Turner MR, Parton MJ, Shaw CE, Leigh PN and Al-Chalabi A. Prolonged survival in motor neuron disease: a descriptive study of the King's database 1990-2002. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003;74 (7): 995-7.
- Tysnes OB, Vollset SE, Larsen JP and Aarli JA. Prognostic factors and survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology*, 1994;13 (5): 226-35.
- Valdmanis PN, Kabashi E, Dyck A, et al. Association of paraoxonase gene cluster polymorphisms with ALS in France, Quebec, and Sweden. *Neurology*, 2008;71 (7): 514-20.
- Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, et al. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007;104 (37): 14825-30.
- Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, et al. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol*, 2008;7 (5): 409-16.
- Van Den Bosch L, Storkebaum E, Vleminckx V, et al. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis*, 2004;17 (1): 21-8.
- van Es MA, Diekstra FP, Veldink JH, et al. A case of ALS-FTD in a large FALS pedigree with a K17I ANG mutation. *Neurology*, 2009;72 (3): 287-8.
- van Es MA, Van Vught PW, Blauw HM, et al. ITPR2 as a susceptibility gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a genome-wide association study. *Lancet Neurol*, 2007;6 (10): 869-77.
- van Es MA, van Vught PW, Blauw HM, et al. Genetic variation in DPP6 is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 2008;40 (1): 29-31.
- Van Es MA, Van Vught PW, Veldink JH, et al. Analysis of FGGY as a risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*, 2009: 1-7.
- van Es MA, Veldink JH, Saris CG, et al. Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 2009;41 (10): 1083-7.
- Van Landeghem GF, Tabatabaie P, Beckman G, Beckman L and Andersen PM. Manganese-containing superoxide dismutase signal sequence polymorphism associated with sporadic motor neuron disease. *Eur J Neurol*, 1999;6 (6): 639-44.
- Van Vught PW, Sutedja NA, Veldink JH, et al. Lack of association between VEGF polymorphisms and ALS in a Dutch population. *Neurology*, 2005;65 (10): 1643-5.
- Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain*, 2006;129 (Pt 4): 868-76.
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, 2009;323 (5918): 1208-11.
- Veldink JH, Kalmijn S, Van der Hout AH, et al. SMN genotypes producing less SMN protein increase susceptibility to and severity of sporadic ALS. *Neurology*, 2005;65 (6): 820-5.

- Veldink JH, van den Berg LH, Cobben JM, et al. Homozygous deletion of the survival motor neuron 2 gene is a prognostic factor in sporadic ALS. *Neurology*, 2001;56 (6): 749-52.
- Verma A, Berger JR, Snodgrass S and Petito C. Motor neuron disease: a paraneoplastic process associated with anti-hu antibody and small-cell lung carcinoma. *Ann Neurol*, 1996;40 (1): 112-6.
- Vigliani MC, Polo P, Chio A, et al. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and cancer do not differ clinically from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, 2000;247 (10): 778-82.
- Vogels OJ, Oyen WJ, van Engelen BG, Padberg GW and Horstink MW. Decreased striatal dopamine-receptor binding in sporadic ALS: glutamate hyperactivity? *Neurology*, 1999;52 (6): 1275-7.
- Vukosavic S, Dubois-Dauphin M, Romero N and Przedborski S. Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 1999;73 (6): 2460-8.
- Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*, 1999;21 (2): 195-9.
- Walker MP, Schlaberg R, Hays AP, Bowser R and Lipkin WI. Absence of echovirus sequences in brain and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Neurol*, 2001;49 (2): 249-53.
- Wang XS, Lee S, Simmons Z, et al. Increased incidence of the Hfe mutation in amyotrophic lateral sclerosis and related cellular consequences. *J Neurol Sci*, 2004;227 (1): 27-33.
- Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, et al. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis*, 2001;8 (6): 933-41.
- Weisgraber KH. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J Lipid Res*, 1990;31 (8): 1503-11.
- Weisgraber KH, Innerarity TL, Harder KJ, et al. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding. *J Biol Chem*, 1983;258 (20): 12348-54.
- Weisgraber KH, Rall SC, Jr. and Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem*, 1981;256 (17): 9077-83.
- Weisgraber KH, Rall SC, Jr., Mahley RW, et al. Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem*, 1986;261 (5): 2068-76.
- Weisskopf MG, McCullough ML, Calle EE, et al. Prospective study of cigarette smoking and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol*, 2004;160 (1): 26-33.
- Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF and Schon EA. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem*, 2002;80 (4): 616-25.
- Wilhelmsen KC, Forman MS, Rosen HJ, et al. 17q-linked frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis without tau mutations with tau and alpha-synuclein inclusions. *Arch Neurol*, 2004;61 (3): 398-406.
- Williams TL, Day NC, Ince PG, Kamboj RK and Shaw PJ. Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1997;42 (2): 200-7.
- Williamson TL, Bruijn LI, Zhu Q, et al. Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic

- lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998;95 (16): 9631-6.
- Wills AM, Cronin S, Slowik A, et al. A large-scale international meta-analysis of paraoxonase gene polymorphisms in sporadic ALS. *Neurology*, 2009;73 (1): 16-24.
- Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW and Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*, 1991;252 (5014): 1817-22.
- Wilson SAK. The amyotrophy of chronic lead poisoning: amyotrophic lateral sclerosis of toxic origin. *Rev Neurol Psychiatry*, 1907;5 (1): 441-455.
- Wong PC and Borchelt DR. Motor neuron disease caused by mutations in superoxide dismutase 1. *Curr Opin Neurol*, 1995;8 (4): 294-301.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, et al. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, 1995;14 (6): 1105-16.
- Worrall BB, Rowland LP, Chin SS and Mastrianni JA. Amyotrophy in prion diseases. *Arch Neurol*, 2000;57 (1): 33-8.
- Wu D, Yu W, Kishikawa H, et al. Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 2007;62 (6): 609-17.
- Wu LJ, Leenders AG, Cooperman S, et al. Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res*, 2004;1001 (1-2): 108-17.
- Xu Q, Bernardo A, Walker D, et al. Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J Neurosci*, 2006;26 (19): 4985-94.
- Yamanaka K, Miller TM, McAlonis-Downes M, Chun SJ and Cleveland DW. Progressive spinal axonal degeneration and slowness in ALS2-deficient mice. *Ann Neurol*, 2006;60 (1): 95-104.
- Yang Y, Hentati A, Deng HX, et al. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 2001;29 (2): 160-5.
- Yen AA, Simpson EP, Henkel JS, Beers DR and Appel SH. HFE mutations are not strongly associated with sporadic ALS. *Neurology*, 2004;62 (9): 1611-2.
- Yoshida M. Amyotrophic lateral sclerosis with dementia: the clinicopathological spectrum. *Neuropathology*, 2004;24 (1): 87-102.
- Yoshida S, Uebayashi Y, Kihira T, et al. Epidemiology of motor neuron disease in the Kii Peninsula of Japan, 1989-1993: active or disappearing focus? *J Neurol Sci*, 1998;155 (2): 146-55.
- Zetterberg H, Jacobsson J, Rosengren L, Blennow K and Andersen PM. Association of APOE with age at onset of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 2008;273 (1-2): 67-9.
- Zhang P, Land W, Lee S, et al. Electron tomography of degenerating neurons in mice with abnormal regulation of iron metabolism. *J Struct Biol*, 2005;150 (2): 144-53.
- Zheng C, Nennesmo I, Fadeel B and Henter JJ. Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol*, 2004;56 (4): 564-7.
- Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, et al. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998;95 (5): 2492-7.
- Zhu Q, Couillard-Despres S and Julien JP. Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp Neurol*, 1997;148 (1): 299-316.
- Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 2002;417 (6884): 74-8.

Attention n’oubliez pas d’effacer le texte suivant quand vous n’en aurez plus besoin.

Pour le traitement de votre bibliographie, vous pouvez :

- soit structurer vos références ; vous avez à votre disposition, dans le menu déroulant des Pages annexes, trois niveaux de titre : ‘Subdivision 1’ (style 3|Bibli_tit2), ‘Subdivision 2’ (style 3|Bibli_tit3) et ‘Subdivision 3’ (style 3|Bibli_tit4)
- soit en faire une simple liste sans subdivisions (par exemple ordre alphabétique des auteurs)

Pour l’écriture de vos entrées bibliographiques vous avez 2 possibilités, que vous pouvez d'ailleurs combiner :

- écrire vos références en choisissant dans le menu déroulant des Pages annexes ‘Référence bibliographique’ (style '3|Bibli_item)
- utiliser les champs prédéfinis ci-dessous en prenant soin, avant de les remplir, de les recopier autant de fois que nécessaire ou tout du moins en prenant la précaution d'en garder un vierge.

Ouvrages imprimés

NOM, Prénom ou Initiales. *Titre en italique*. Lieu d'édition : Editeur, Date de publication, nombre de pages p.

Ouvrages électroniques

NOM, Prénom ou Initiales. *Titre en italique*. [en ligne ou cédérom ou bande magnétique ou disquette], Lieu d'édition : Editeur, Date de publication recommandée, [référence du JJ mois AAAA (date à laquelle le document a été consulté)]. renseignements nécessaires pour localiser le document cité

Chapitre dans un ouvrage imprimé

NOM, Prénom ou Initiales. Titre du chapitre. In : NOM, Prénom ou Initiales (éd.), *Titre de l'ouvrage en italique*. Lieu d'édition : Editeur, Date de publication, nombre de pages p.

Rapports imprimés

NOM, Prénom ou Initiales. *Titre en italique*. Lieu de publication, Date de publication

Travaux universitaires

NOM, Prénom ou Initiales. *Titre du mémoire ou de la thèse en italique*. Nature de la thèse ou du mémoire, Université de soutenance, Date de soutenance, Nombre de pages p.

Articles de périodiques imprimés

NOM, Prénom ou Initiales. Titre de l'article. *Titre du périodique en italique*, Année, volume et/ou numéro, pagination

Articles de périodiques électroniques

NOM, Prénom ou Initiales. Titre de l'article. *Titre du périodique en italique*, [en ligne ou cédérom ou bande magnétique ou disquette], Année, volume et/ou numéro, [référence du JJ mois AAAA (date à laquelle le site a été consulté)]. renseignements nécessaires pour localiser le document cité

Communication dans un congrès

NOM, Prénom ou Initiales. Titre de la communication. In : NOM, Prénom ou Initiales (éd.), *Titre du congrès, Lieu du congrès, Date du congrès*. Lieu d'édition : Editeur, Date de publication, pagination

Sites web consultés

Nom du site. [référence du JJ mois AAAA (date à laquelle le site a été consulté)], URL du site

Publications personnelles

- Praline J, Guennoc AM, Limousin N, et al. ALS and mercury intoxication: a relationship? Clin Neurol Neurosurg, 2007; 109 (10): 880-3.
- Martin I, Vourc'h P, Mahe M, Thepault RA, Antar C, Vedrine S, Praline J, Camu W, Andres CR, Corcia P. Association study of the ubiquitin conjugating enzyme gene UBE2H in sporadic ALS. Amyotroph Lateral Scler, 2008: 1-4.
- Paubel A, Violette J, Amy M, Praline J, Meininger V, Camu W, Corcia P, Andres CR, Vourc'h P. Mutations of the ANG gene in French patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Arch Neurol, 2008;65 (10): 1333-6.
- Praline J, Corcia P (2008). Génétique de la sclérose latérale amyotrophique. EMC. Paris, Elsevier Masson, SAS. Neurologie: 17-078-A-15.
- Praline J, Guennoc AM, Malinge MC, de Toffol B and Corcia P. Pure bulbar motor neuron involvement linked to an abnormal CAG repeat expansion in the androgen receptor gene. Amyotroph Lateral Scler, 2008;9 (1): 40-2.
- Corcia P, Praline J, Vourc'h P and Andres C. Génétique des maladies du motoneurone. Rev Neurol (Paris), 2008;164 (2): 115-30.
- Praline J, Guennoc AM, Vourc'h P, De Toffol B, Corcia P. Primary lateral sclerosis may occur within familial amyotrophic lateral sclerosis pedigrees. Amyotroph Lateral Scler, 2008: 1-3.
- Praline J, Limousin N, Vourc'h P, Pallix M, Debiais S, Guennoc AM, Andres CR, Corcia P. CADASIL and ALS: A link? Amyotroph Lateral Scler, 2009: 1-3.
- Corcia P, Camu W, Praline J, Gordon PH, Vourc'h P, Andres C. The importance of the SMN genes in the genetics of sporadic ALS. Amyotroph Lateral Scler, 2009: 1-5.
- Praline J, Corcia P, Pradat P-F (2009). Génétique des maladies du motoneurone. EMC. Paris, Elsevier Masson, SAS. Neurologie: 17-001-A-70.

Case report

ALS and mercury intoxication: A relationship?

Julien Praline^{a,b,*}, Anne-Marie Guennoc^a, Nadège Limousin^a,
Habib Hallak^c, Bertrand de Toffol^a, Philippe Corcia^{a,b}

^a Department of Neurology and Neurophysiology, CHRU, Tours, France

^b INSERM U619, Tours, France

^c Neurology and Medicine Department, Hospital Center, Chateauroux, France

Received 4 April 2007; received in revised form 12 July 2007; accepted 13 July 2007

Abstract

We report the case of an 81-year-old woman in whom clinical signs and features of electromyographic activity patterns were consistent with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Increased blood level and massive urinary excretion of mercury proved mercury intoxication. Despite a chelation treatment with Meso 2–3 dimercaptosuccinic acid (DMSA), she died after 17 months.

The pathophysiology of sporadic ALS remains unclear. However, the role of environmental factors has been suggested. Among some environmental factors, exposure to heavy metals has been considered and ALS cases consecutive to occupational intoxication and accidental injection of mercury have been reported. Although no autopsy was performed, we discuss the role of mercury intoxication in the occurrence of ALS in our case, considering the results of experimental studies on the toxicity of mercury for motor neuron.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis; Mercury intoxication; Motor neuron disease; Mercury; Heavy metal poisoning

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease involving primarily the motor neurons of the cerebral cortex, brainstem and spinal cord. It is one of the most common neurodegenerative disorders of adult onset. The incidence of ALS in the general population ranges about 1.5 new cases per year per 100,000 inhabitants. Usually sporadic, this pathology is encountered in all ages of adult life. At this time, even in cases with mutations in Superoxide Dismutase 1 (SOD1) gene, the pathogenesis remains unclear. Several facts suggest the involvement of environmental factors as the existence of conjugal ALS or cluster of ALS cases [1], the similarities with lathyrism and konzo [2] and the results of epidemiologic studies [3]. Furthermore, in the Chamorro population, the ALS-parkinsonism demen-

tia complex (Guam disease) is linked to the consumption of cycad nuts, either as a component of cycad flour or indirectly through consumption of fruit bats [4]. Exposure to agricultural chemicals seems to be a risk factor for ALS [5].

Heavy metals have been suspected because of their proved neurotoxicity. Some metals are key constituents of metalloproteins and their accumulation lead to systemic disease with neurologic symptoms. For example, Wilson disease and hemochromatosis are linked to copper and iron accumulation, respectively. Other metals without known physiological function but with described neurotoxicity are mercury and lead [6]. Among all metals implicated in environmental or occupational intoxication, mercury appears as one of the most neurotoxic [7]. Neurological clinical features suggestive of mercury intoxication comprise peripheral and central nervous system signs as erethism, tremor, peripheral neuropathy or cortical blindness [8]. ALS cases related to mercury intoxication [9–13] and professional exposure have been reported [14].

We describe the occurrence of ALS in an 81-year-old woman who also presented mercury intoxication after

* Corresponding author at: Department of Neurology, CHU Bretonneau, 2 bis boulevard Tonnellé, 37044 Tours Cedex 9, France. Tel.: +33 247473825; fax: +33 247473808.

E-mail address: julien.praline@med.univ-tours.fr (J. Praline).

Génétique de la sclérose latérale amyotrophique

J. Praline, P. Corcia

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la plus fréquente des maladies du motoneurone de l'adulte. Bien que la physiopathologie de cette affection reste en grande partie méconnue, il est clair que cette pathologie a une origine multifactorielle et vraisemblablement polygénique. L'existence de formes familiales dont le mode de transmission est le plus souvent autosomique dominant fut le premier argument en faveur d'une étiologie génétique. L'identification de mutations du gène SOD1 en 1993 a confirmé cette hypothèse et conduit à l'élaboration d'un nombre croissant de travaux sur l'implication de facteurs génétiques dans la SLA. Au cours de ces dix dernières années, le nombre de gènes de causalité et régions chromosomiques liés à la survenue de formes familiales de SLA a considérablement augmenté : actuellement, huit formes familiales sont décrites. Dans les formes sporadiques, l'identification de mutations du gène SOD1 et leur similitude phénotypique avec les formes familiales ont également conduit à rechercher et identifier des facteurs génétiques de susceptibilité. Nous rapportons les principaux résultats des études génétiques de liaison (dans les formes familiales) et d'association (dans les formes sporadiques) qui corroborent l'hypothèse génétique dans la SLA.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Sclérose latérale amyotrophique ; Motoneurone ; Génétique ; Facteurs de susceptibilité ; Sclérose latérale amyotrophique familiale

Plan

■ Introduction	1
■ Génétique des formes familiales	1
Gène de la SOD1 (ALS1)	2
Gène de l'alsine (ALS2)	3
Gène de la senataxine (ALS4)	3
ALS5	3
Gène VAPB (ALS8)	3
Autres gènes dans les formes familiales	3
■ Génétique des formes sporadiques	3
Gène de la SOD1	3
Gène de l'apolipoprotéine E	4
Gène SMN	4
Gène du VEGF	4
Gène de l'angiogénine	4
Gènes des neurofilaments	4
Gène HFE	4
Gène de l'EAAT2	4
Autres gènes de susceptibilité	5
■ Test et conseil génétique dans la sclérose latérale amyotrophique	5

■ Introduction

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la plus fréquente des maladies du motoneurone. Sa physiopathologie reste à ce jour méconnue. L'intervention de facteurs environnementaux a été fréquemment suspectée au travers de l'observation de foyers dans lesquels l'incidence de la SLA était anormalement élevée (cas des îles de Guam) [1], l'existence de formes conjuguales [2] et

aussi de cas de lathyrisme et de konzo [3]. Le cas du complexe de l'île de Guam associant syndrome parkinsonien, SLA et démence est particulier car un facteur environnemental et une prédisposition génétique semblent associés. La toxicité environnementale provient de la consommation des noix de cycade directe (farine) ou indirecte (chauves-souris qui mangent des noix de cycade). Par ailleurs, dans la population chamorro des îles de Guam, le nombre de polymorphismes du gène de la protéine tau et du gène CYP2D6 est accru [4, 5]. Enfin, la cycasine, composant des noix de cycade, augmente l'expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) codant la protéine tau [6].

Des facteurs génétiques interviennent aussi dans le développement d'une dégénérescence motoneuronale. Il existe deux grands types de facteurs génétiques : les gènes dits de causalité responsables de la SLA lorsqu'ils sont mutés et les gènes de susceptibilité qui favorisent la survenue de la SLA mais ne sont pas responsables directement de la maladie. La présence de ces allèles ne suffit pas à développer une SLA mais en augmente le risque.

Bien que la majorité des cas de SLA soit sporadique (90 % des cas), l'existence de formes familiales est reconnue depuis la fin du XIX^e siècle. La description princeps portait sur 13 personnes sur deux générations de la famille Farr présentant un tableau d'atrophie musculaire progressive [7]. Le diagnostic de forme familiale de SLA (SLAF) est porté dès que deux membres d'une même famille sont atteints. Ces formes représentent 10 % des cas parmi lesquelles 20 % sont liées à une mutation du gène de la superoxyde dismutase 1 (SOD1) [8].

■ Génétique des formes familiales

Même si la mutation du gène de la SOD1 est la plus fréquemment impliquée, elle ne représente que 20 % des SLAF [9]. À ce

SHORT COMMUNICATION

Pure bulbar motor neuron involvement linked to an abnormal CAG repeat expansion in the androgen receptor gene

JULIEN PRALINE^{1,2}, ANNE-MARIE GUENNOC¹, MARIE-CLAIRE MALINGE³,
BERTRAND DE TOFFOL¹ & PHILIPPE CORCIA^{1,2}

¹ALS Centre, CHRU de Tours, Tours, ²INSERM U619, Tours, and ³Department of Medical Genetics, CHRU d'Angers, France

Abstract

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is an X-linked adult motor neuron disorder caused by an abnormal CAG-repeat expansion in the first exon of the androgen receptor gene. This disease associates progressive lower motor neuron affection and endocrine disturbances. Bulbar symptoms appear usually late in the clinical course but clinical heterogeneity is demonstrated. We report the case of a 62-year-old male with a 10-year history of progressive bulbar involvement related to an abnormal CAG-repeat expansion in the androgen receptor gene. This atypical phenotype led us to discuss the role of some genetic or environmental factors in SBMA.

Key words: *Motor neuron disease, spinal and bulbar muscular atrophy, bulbar palsy, androgen receptor*

Introduction

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is an X-linked adult motor neuron disorder that combines lower motor neurons affection with endocrine disorders. This disorder, also called Kennedy disease, is caused by an abnormal CAG-repeat expansion in the first exon of the androgen receptor gene (1).

The phenotype associates proximal limb muscles atrophy, bulbar involvement and endocrine disturbances as gynaecomastia, diabetes mellitus, hyperlipaemia and hypofertility (2). First symptoms are usually cramps, fasciculations or hand tremor (3). Clinical course is extremely slow but some reports highlight rapid progression (4). To date, there is growing evidence for a clinical heterogeneity in SBMA.

We report here the case of a 62-year-old male with a 10-year history of progressive bulbar involvement related to an abnormal CAG-repeat expansion in the androgen receptor gene. This atypical phenotype led us to discuss the role of some genetic or environmental factors in SBMA.

Case report

A 62-year-old male, heating engineer and father of two children, was seen for the first time in

September 2005 for a 10-year history of dysarthria, dysphonia and difficulties to blow. His past medical history was dominated by diabetes mellitus treated with diet, metformine (750 mg/day) and glimepirid (2 mg/day) and hyperlipaemia treated with fenofibrate (200 mg/day). His maternal grandparents were first cousins. His hobbies were gardening and hunting. He never practised sport.

He complained of muscle cramps but did not experience difficulties in all daily living activities. Gait was normal and unlimited, and he could lift heavy objects and reach things above his head or stand up from a sitting position without help. There was no loss of dexterity or fatiguability. There was no dysphagia, choking or weight loss. He did not experience any difficulty of breathing or laryngospasm episodes. At examination, there were fasciculations and atrophy of the tongue (Figure 1) without weakness but oral myokimia was noted. Testing was graded 5 (MRC scale) at the four limbs without atrophy and fasciculations both proximal and distal even after mild voluntary contractions. Deep tendon reflexes were diminished at the four limbs. Plantar responses were both flexor. Gag reflex was normal. There was no sensory deficit. There were no sphincter, no cerebellar disturbances and no postural or exertional hand tremor. There was bilateral

Correspondence: J. Praline, ALS Centre, CHRU Tours, 2 Boulevard Tonnelé, 37044 Tours cedex 9, France. Fax: 33 247473808. E-mail: julien.praline@med.univ-tours.fr

(Received 6 February 2007; accepted 4 July 2007)

ISSN 1748-2968 print/ISSN 1471-180X online © 2008 Informa UK Ltd. (Informa Healthcare, Taylor & Francis AS)
DOI: 10.1080/17482960701553915

ORIGINAL ARTICLE

Primary lateral sclerosis may occur within familial amyotrophic lateral sclerosis pedigrees

JULIEN PRALINE^{1,2}, ANNE-MARIE GUENNOC¹, PATRICK VOURC'H²,
BERTRAND DE TOFFOL¹ & PHILIPPE CORCIA^{1,2}

¹ALS Centre, Tours, and ²INSERM U930, CHRU de Tours, Tours, France

Abstract

Primary lateral sclerosis (PLS) is considered to be a specific sporadic motor neuron disorder, but some reports have shown familial history of motor neuron disorders that may comprise PLS cases. Here we report a novel pedigree highlighting an intrafamilial occurrence of PLS and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cases. These observations strengthen the hypothesis that PLS may represent an ALS phenotype with a long evolution and strongly suggest the involvement of common genetic factors that can lead to upper and lower motor neuron death.

Key words: *Amyotrophic lateral sclerosis, primary lateral sclerosis, motor neuron diseases*

Introduction

Motor neuron diseases encompass different phenotypes ranging from degeneration restricted to upper motor neurons (UMN), degeneration restricted to lower motor neurons (LMN), or degeneration of both types of motor neurons. These types of degenerations define primary lateral sclerosis (PLS), progressive muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), respectively. Until recently, PLS was considered to be a specific sporadic motor neuron disorder but there is a growing body of literature supporting the occurrence of familial forms of the condition (1–3). We report a novel pedigree highlighting an intrafamilial occurrence of PLS with ALS cases.

Case report

A 56-year-old female (patient III:1, Figure 1), without past medical history, was first seen in 2002 for gait disturbance, urinary dysfunction, and paresthesias of the lower limbs. The clinical course of the disease was slow. Clinical examination showed brisk deep tendon reflexes (DTR) in the lower limbs with a right extensor plantar response. There were no bulbar signs and no limb weakness. The patient described lower extremity paresthesias, but sensory examination was normal. There were no cerebellar

or extra-pyramidal signs and cognition was normal. Nerve conduction studies (NCS) and electromyography of all four limbs and bulbar musculature were normal. Transcranial magnetic stimulation (TMS) revealed absent motor evoked potentials in all four limbs. Spinal MRI and CSF analysis were also normal. In 2007, the patient complained of dysarthria, dysphonia and choking. Clinical examination confirmed the existence of UMN signs in all four limbs, and a positive jaw jerk was elicited. There was no weight loss or respiratory insufficiency. Mild sensory changes were noted, and the patient described urinary frequency and urgency. Electromyography remained normal.

Her 73-year-old mother (patient II:1, Figure 1) was first seen in April 2006 with a six-month history of dysarthria and dysphonia. Her past medical history had been unremarkable. Clinical examination showed tongue atrophy and fasciculations, with mild weakness in the lower extremities. All DTR were brisk with bilateral extensor plantar responses. There were fasciculations at all four limbs without sensory, sphincter, cerebellar or cognitive disturbances. NCS were normal; however, electromyography revealed diffuse denervation in the bulbar region and in all four limbs. The disease progressed rapidly, leading to the death of the patient after six months due to acute respiratory distress.

Correspondence: J. Praline, ALS Centre, 2 Boulevard Tonnellé, 37044 Tours Cedex 1, France. E-mail: julien.praline@med.univ-tours.fr

(Received 2 July 2008; accepted 16 September 2008)

ISSN 1748-2968 print/ISSN 1471-180X online © 2008 Informa UK Ltd. (Informa Healthcare, Taylor & Francis AS)
DOI: 10.1080/17482960802483038

CADASIL and ALS: A link?

JULIEN PRALINE^{1,2}, NADEGE LIMOUSIN¹, PATRICK VOURC'H^{2,3}, MAUD PALLIX¹, SEVERINE DEBIAIS¹, ANNE-MARIE GUENNOC¹, CHRISTIAN R. ANDRES^{2,3} & PHILIPPE CORCIA^{1,2}

¹ALS Centre, Service de Neurologie et de Neurophysiologie Clinique, CHRU, Tours, ²UMR INSERM U930, Université François Rabelais de Tours, and ³Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHRU de Tours, France

Abstract

We report the case of a 66-year-old female who presented with dysarthria and dysphonia. Brain MRI abnormalities showed confluent white matter lesions and subcortical lacunar infarcts, suggesting cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL), confirmed by the presence of a heterozygous mutation in the *Notch3* gene. Clinical signs and course were consistent with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) as was the electromyographic pattern. The possible pathogenic role for a mutation in the *Notch3* gene is discussed considering recent data on hypoxia in the pathophysiology of ALS.

Key words: *Amyotrophic lateral sclerosis, motor neuron disease, CADASIL, Notch3*

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease involving primarily the motor neurons of the spinal cord, brainstem and cerebral cortex. It is one of the most common neurodegenerative disorders of adult onset. The incidence of ALS in the general population is in the order of 1.5/100,000. Mainly sporadic, this disease is encountered in all ages of adult life. The pathogenesis remains unclear.

Bulbar onset forms represent 20–30% of ALS cases and occur more frequently in women and older people, and may occasionally be confused with brainstem infarction (1,2).

Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL) is a rare genetic disease associated with mutations of the *Notch3* gene on chromosome 19. The estimated prevalence of CADASIL is 1–2/100,000. The major clinical signs are migraine with aura, early onset and recurrent ischaemic strokes, epilepsy and dementia. Neuromuscular features such as myopathy or peripheral neuropathy have been reported in some cases (3).

We describe a 66-year-old female with CADASIL who developed clinical signs suggestive of motor neuron disease.

Case report

A 66-year-old female presented with a six-month history of progressive dysarthria. She had a distant history of uterine cervical neoplasm. She never complained of migraine. She had a primary school level of education and had been a dressmaker. Clinical examination revealed dysphonia and dysarthria without choking. Tongue protrusion was not possible and she was unable to purse her lips. Manual muscle testing was normal, and deep tendon reflexes (DTR) were brisk at the four limbs. Plantar responses were both extensor and Hoffmann's sign was present in both upper limbs. There were no oculomotor, sensory, sphincter disturbances or cognitive impairment. Her weight was 42 kg (6.6 stones); BMI was 16.4 and there was a history of rapid weight loss. Her Mini Mental State Examination (MMSE) score was 26/30 (errors in mental arithmetic sub-test), and she could manage all the activities of daily life by

Correspondence: J Praline, Department of Neurology, CHU Bretonneau, 2 Boulevard Tonnellé, 37044 Tours, Cedex 9, France. Fax: 33 247473808. E-mail: julien.praline@med.univ-tours.fr

(Received 23 March 2009; accepted 8 May 2009)

ISSN 1748-2968 print/ISSN 1471-180X online © 2009 Informa UK Ltd. (Informa Healthcare, Taylor & Francis AS)
DOI: 10.1080/17482960903033153

Génétique des maladies du motoneurone

J. Praline, P. Corcia, P.-F. Pradat

Les maladies du neurone moteur forment un groupe cliniquement hétérogène : en effet, le trouble moteur peut être lié à une atteinte isolée du neurone moteur périphérique (NMP) et/ou central (NMC), ou compliquée d'autres lésions neurologiques. Cette hétérogénéité n'est pas uniquement phénotypique mais concerne aussi les caractéristiques génétiques puisque les facteurs génétiques intervenant dans les maladies du motoneurone peuvent soit être directement responsables soit favoriser la dégénérescence du neurone moteur. Ces perturbations vont entraîner des anomalies métaboliques ou fonctionnelles le plus souvent spécifiques à chacune de ces pathologies. Dans la mesure où la physiopathologie de la plupart de ces affections reste méconnue voire inconnue, l'apport de la génétique dans notre compréhension des mécanismes qui sous-tendent cette dégénérescence motoneuronale est majeure : l'identification d'un facteur génétique impliqué dans le processus de mort des neurones moteurs permet d'étayer des hypothèses physiopathologiques en tenant compte des propriétés de la protéine codée par le gène muté. Parallèlement, la découverte d'une mutation génétique peut permettre de développer des modèles animaux, et d'observer les modifications structurelles et fonctionnelles qui en découlent. Chacune des maladies du neurone moteur, les gènes impliqués et la piste physiopathologique présumée sont détaillés.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Amyotrophie spinale ; Paraplégie spastique héréditaire ; Neuropathie motrice distale héréditaire ; Motoneurone ; Génétique

Plan

■ Introduction	1
■ Amyotrophies spinales	1
Amyotrophie spinale infantile (ASI)	1
Amyotrophies spinales progressives de l'adulte	2
Amyotrophie spinale avec dysautonomie	2
Amyotrophie spinale avec atteinte bulbaire : maladie de Kennedy	2
Cas particulier : gangliosidose GM2	2
■ Neuropathies motrices distales héréditaires (dNMH)	2
Gènes des heat shock proteins (HSP)	2
Gène GARS (glycyl-t ARN synthétase)	3
Gène BSCL2 (Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2)	3
Gène de la dynactine	3
Gène IgHMBP2 (immunoglobulin mu binding protein 2)	3
Gène de la senataxine	3
■ Paraparésies spastiques héréditaires (PSH)	3
Paraparésies spastiques héréditaires de transmission autosomique dominante	3
Paraparésies spastiques héréditaires de transmission autosomique récessive	4
Paraparésies spastiques héréditaires de transmission récessive liée à l'X	5

■ Introduction

Les maladies du neurone moteur forment un groupe cliniquement hétérogène et sont classifiées selon le neurone moteur atteint : neurone moteur central (NMC), neurone moteur

périphérique (NMP) ou les deux. Il est ainsi possible de distinguer la sclérose latérale primitive (SLP) ou la paraparésie spastique lorsque l'atteinte concerne le NMC, les amyotrophies spinales lorsque l'atteinte prédomine sur le NMP et enfin la sclérose latérale amyotrophique (SLA) en présence d'une atteinte conjointe des deux neurones moteurs. À ce jour, la physiopathologie de la plupart de ces affections reste inconnue. Dans toutes ces affections, l'intervention d'un facteur génétique, causal ou de susceptibilité, pour la dégénérescence motoneuronale a été mis en évidence.

Nous proposons ici une mise au point sur les facteurs génétiques liés ou associés à ces différentes affections du motoneurone en précisant les liens unissant ces facteurs à des mécanismes physiopathologiques. Nous ne traiterons pas de la SLA, déjà abordée dans un autre article. Concernant la SLP, une seule étude a trouvé une liaison entre une forme familiale et le chromosome 4 (locus 4p16.1) [1].

■ Amyotrophies spinales

Amyotrophie spinale infantile (ASI)

L'ASI, de transmission autosomique récessive, concerne 1/4 000 naissances. Cliniquement, l'atteinte bilatérale et symétrique du NMP du tronc et des membres prédomine en proximal et aux membres inférieurs. Trois phénotypes sont définis selon l'âge de début et la sévérité [2]. Il existe aussi une forme de l'adulte dite de type IV, plus rare et plus bénigne, débutant entre 15 et 50 ans (médiane à 37 ans), avec une marche souvent conservée après 20 ans d'évolution.

L'ASI est liée à une délétion homozygote de l'exon 7 du gène SMN1 présente dans presque tous les cas d'ASI [3]. Les gènes

Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative d'évolution toujours fatale. Dans les formes sporadiques (SLAS), l'étiologie demeure inconnue et l'hypothèse d'une participation génétique dans le cadre d'un modèle de maladie complexe est envisagée. Notre travail porte sur deux gènes de susceptibilité dans la SLAS : le gène de l'Apolipoprotéine E (APOE) et le gène impliqué dans l'hémochromatose familiale de type 1 (HFE). Notre première étude confirme sur une population de 1482 patients atteints de SLA sporadique le lien entre allèle $\epsilon 4$ et la forme bulbaire de la maladie mais uniquement chez les hommes. Nous proposons une explication physiopathologique faisant intervenir le récepteur aux androgènes, particulièrement exprimé au niveau des motoneurones bulbaires. Notre deuxième étude sur 244 patients et 302 contrôles ne retrouve pas l'association entre le polymorphisme H63D et le risque de SLA sporadique notée dans d'autres populations. En revanche, l'allèle Y du polymorphisme C282Y semble exercer un effet protecteur vis-à-vis de la SLA. Ces données sont discutées dans le contexte de l'hypothèse physiopathologique du stress oxydant.

Mots-clés : Sclérose Latérale Amyotrophique, Apolipoprotéine E, Hémochromatose familiale, HFE, Génétique, Biologie Moléculaire

Résumé en anglais

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease. The cause of sporadic cases (SALS) remains unknown but a genetic participation in a model of complex disease is suspected. Our work concerns two susceptibility genes for SALS: Apolipoprotein E gene (APOE) and the gene involved in familial hemochromatosis (HFE). Our first study including 1482 patients with SALS confirms a link between $\epsilon 4$ allele and bulbar-onset of the disease, only in men. We suggest a pathophysiological explanation with a role for the androgen receptor which is particularly abundant in motor neurons of the brainstem.

Our second study about 244 patients and 302 controls did not find any association between the H63D polymorphism and SLAS, which has previously been showed. However, the Y allele of the C282Y polymorphism seems to exert a protective effect against SALS. We discuss these data within the pathophysiological hypothesis of oxidative stress in ALS.

Key-words : Amyotrophic lateral sclerosis, Apolipoprotein E, Hereditary hemochromatosis, HFE, Genetics