

UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

INSERM U930 Equipe « Neurogénétique et Neurométabolomique »

THÈSE présentée par :

Blandine MADJI HOUNOUM

soutenue le : **12 Octobre 2016**

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

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

Etude des altérations du métabolisme induites par le glutamate dans un modèle *in vitro* de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) par une approche métabolomique

THÈSE dirigée par :

Mme MAVEL Sylvie
Mme BLASCO Hélène

MCU, Université François - Rabelais de Tours
MCU-PH, Université François - Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

M. MARTIN Jean-Charles
M. REYNIER Pascal

DR, INRA UMR 1260 INSERM U476- Universités Aix-Marseille
PU-PH, Université d'Angers

JURY :

M. ANDRES Christian
Mme BLASCO Hélène
Mme MAVEL Sylvie
M. MARTIN Jean-Charles
M. RAOUL Cédric
M. REYNIER Pascal

PU-PH, Université François - Rabelais de Tours
MCU-PH, Université François - Rabelais de Tours
MCU, Université François - Rabelais de Tours
DR, INRA UMR 1260 INSERM U476- Universités Aix-Marseille
DR, Inserm UMR 1051- Université de Montpellier
PU-PH, Université d'Angers

"Et quand j'aurais le don de prophétie, la science de tous les mystères et toute la connaissance, quand j'aurais même toute la foi jusqu'à transporter des montagnes, si je n'ai pas l'amour, je ne suis rien." 1 Corinthiens 13 : 2

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

- Le docteur **Jean-Charles Martin** de l'Université d'Aix-Marseille et le professeur **Pascal Reynier** de l'Université d'Angers, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.
- Le professeur **Christian Andres** de l'Université de Tours et le directeur de l'équipe 2 de l'unité INSERM U930, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, mais aussi pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et de votre équipe de recherche pendant ces trois années de thèse.
- Le docteur **Cédric Raoul** de l'Université de Montpellier pour avoir bien voulu examiner mon manuscrit mais aussi et surtout pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire afin de m'enseigner la culture primaire des motoneurones, et pour ta disponibilité et ta patience lors de nos interminables réunions « papers ».

Je n'oublierai pas de témoigner toute ma gratitude à mes deux directrices de thèse **les docteurs Sylvie Mavel et Hélène Blasco** pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce travail. Merci pour votre confiance et la patience dont vous avez fait preuve pendant ces trois années communes de labeur pour supporter mes multiples « boulettes ». Vos précieux conseils et vos encouragements m'ont aidée à avancer tout au long de cette thèse. Je ne vous remercierai jamais assez de votre soutien, de votre disponibilité et de votre implication dans ce travail. J'ai beaucoup apprécié ces trois années sous votre direction (même si avec Sylvie, nous ne sommes jamais d'accord) et j'en sors très enrichie professionnellement et humainement. Vous êtes vraiment formidables!

Merci au professeur **Denis Guilloteau**, directeur de l'unité INSERM U930 pour m'avoir accueillie au sein de votre unité de recherche.

Je remercie également toutes les personnes rattachées à **l'équipe 2 de l'unité INSERM U930** pour votre soutien au quotidien.

Merci au professeur **Patrick Emond** et au docteur **Lydie Nadal-Desbarats** pour vos conseils, votre soutien et votre investissement dans mon travail. Merci beaucoup Lydie pour m'avoir

soutenue et accompagnée durant mes deux années d'enseignement, c'était une très belle expérience.

Merci aux docteurs **Patrick Vourc'h** et **Frédérique Laumonnier** pour m'avoir accordé du temps pour les manipulations et pour les conseils techniques sur la culture cellulaire et la biologie moléculaire.

Merci aussi à **Frédérique Montigny**, **Céline Brulard**, **Cinzia Bocca** et **Antoine Lefevre** pour tous les moments de partage.

Je tiens à remercier **Catherine Antar**, **Dr Sylviane Marouillat** et **Rose-Anne Thépault** pour votre gentillesse, votre aide au quotidien, votre soutien et pour cette bonne ambiance dans le laboratoire. Merci **Sylviane** pour ta disponibilité et ton aide précieuse. Tes conseils techniques pour la qPCR m'ont beaucoup aidée pour mes manipulations « foireuses ». Merci **Cathy** pour les expériences de PCR et pour tes propositions régulières d'aide, j'avais vraiment apprécié. Merci **Rose-Anne** pour ta bonne humeur, pour nos multiples discussions sur « l'Homme » qui marche sur l'eau et transforme l'eau en vin, pour m'avoir fait découvrir le produit « phare » de la Touraine et même m'avoir aidée à l'exporter dans le bordelais.

Merci à mes co-thésardes de bureau **les docteurs Audrey Dangoumau**, **Charlotte Veyrat-Durebex**, **Servane Alirol**, **Binta Diémé** et **Hélène Cubéros**, **Dévina Ung**, **Franck Patin**, **Cindy Maurel**, **Tania Bitar**. Merci de votre présence au quotidien, pour les fous-rires dans le bureau, pour la tentative de lutte contre les gros mots (source des kilos superflus mais pas que...) et aussi de m'avoir supportée durant ces trois années (un peu moins pour les plus chanceux). Merci **Hélène** pour tes conseils techniques lors de mes premières expériences de biologie moléculaire et pour avoir relu toute ma thèse, tu as été une vraie « cheuuuuf ».

Je tiens particulièrement à remercier mes acolytes des weekends et des heures tardives au labo, **Binta** et **Franck**. Merci pour votre soutien et pour toutes ces soirées où nous essayons de réinventer la métabolomique et de refaire le monde. Merci Binta d'avoir été là pendant ces deux années, d'avoir tout partagé avec moi. Ta présence et ton soutien m'ont beaucoup apporté. Tu es une personne géniale et je suis vraiment ravie de t'avoir comme amie.

Merci à mes co-équipiers de football, **Franck Patin**, **Antoine Lefevre**, **Nicolas Dalle**, **Thomas Barre**, **Sandrine Vonwill**. Qu'est-ce que nous nous éclatons au terrain même s'il nous arrivait

de prendre quelques raclées par les « jeunes du quartier ». J'ai beaucoup apprécié ces moments de détente, aussi courts soient-ils.

Je remercie l'équipe pédagogique du département de biochimie pour ces deux années d'enseignement. Merci au professeur **Frédéric Esnard**, les docteurs **Sandrine Dallet-Choisy**, **Fabien Lecaille** et tous les autres pour leur aide et conseils.

J'aimerais remercier particulièrement mes deux copines d'enseignement, les docteurs **Anne-Sophie Lamort** et **Hélène Cuberos** (eh oui vous êtes docteurs les filles !). Merci pour nos délires lors des stages résidentiels à la Rochelle (pichet d'eau dans les escaliers, à chanter Franky Vincent dans les rues, à boire des cocktails bizarres...) et pour nos interminables pauses thé (transformées en séances de psy avec Hélène pour vider nos « sacs »). De très bons moments passés à vos côtés et bien d'autres encore j'espère. Merci infiniment !

Merci au docteur **Catherine Debordes** de m'avoir encadrée pendant mon stage de Master 2. Merci pour tes conseils, ta disponibilité (malgré l'organisation des JS du RFMF) et surtout pour m'avoir initiée à la métabolomique.

Merci à mes amis qui ont toujours été à mes côtés depuis mes premières années de « fac », **Rahmat**, **Chimène**, **Marjorie**, **Bénédicte** et **Maryam**, nous avons parcouru du chemin ensemble et je suis fière de ce nous sommes aujourd'hui. Merci aussi à ma copine tourangelle **Emmanuelle**, ton soutien m'a beaucoup apporté.

Merci à ma grande famille de bordeaux (**famille Kordiko**, **Labeyrie** et **Le Fustec**) de m'avoir adoptée dès mes premières heures en France. Je vous suis très reconnaissante pour tout le soutien que vous m'avez apporté durant toutes ces années. Merci à ma famille d'Urzy (**famille Vieillard**) et à « **pépé** » d'avoir toujours été là pour moi.

Je tiens à remercier ma **belle-famille** pour ses encouragements, son accueil et pour tout l'amour qu'elle me porte. Merci à **Hodanou** et **Cécile** pour tous ces weekends sympathiques passés à Poitiers et pour nos discussions sur la métabolomique. Merci à **Florence**, **Neldji**, et **Dounia** pour l'attention que vous me portez.

Un grand merci à **mes parents**, sans qui je n'aurais pas pu envisager de poursuivre de si longues études. Merci d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir soutenue dans tous mes choix. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis et qui me permet d'avancer dans la vie. **Francis**

et **Ariane**, merci pour votre soutien et pour tout l'amour fraternel que vous m'apportez chaque jour malgré la distance. Merci à toute ma grande famille du Tchad, je ne pourrai pas citer tout le monde mais j'ai une pensée pour chacun d'entre vous.

Et comment ne pas te remercier, **Yota**, mon mari, mon meilleur. Quelques phrases ne suffiraient pas pour te remercier de tout ce que tu m'apportes au quotidien. Merci pour ton soutien et ton amour inconditionnels qui me donnent la force d'avancer.

Résumé

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une perte sélective des motoneurones et impliquant les effets neurotoxiques des astrocytes. Le but de ce travail est d'explorer les altérations du métabolisme dans les astrocytes induites par des conditions associées à la SLA.

Nous avons dans un premier temps mis en place une méthodologie d'analyse spectrométrique (résonance magnétique nucléaire et spectrométries de masse) du métabolome cellulaire. Ensuite, nous avons invalidé les cellules NSC-34 comme modèle *in vitro* d'étude de l'excitotoxicité induite par le glutamate. Nous avons enfin étudié les altérations métaboliques dans les astrocytes primaires dans des conditions de la SLA et décrit plusieurs dysfonctionnements métaboliques dans ces cellules induits par l'expression de la mutation *SOD1^{G93A}*, par la présence des motoneurones sauvages et par l'exposition au glutamate. Ce travail met en évidence les relations métaboliques entre la SLA et le métabolisme énergétique cérébral.

Nos résultats contribuent à la compréhension des altérations métaboliques des astrocytes dans la SLA et pourraient aider à appréhender de nouvelles cibles thérapeutiques associées aux altérations métaboliques dans la SLA, afin de protéger les motoneurones des perturbations délétères induites par le glutamate.

Mots Clés : SLA, métabolomique, modèle *in vitro*, glutamate, excitotoxicité, astrocytes, motoneurones, spectrométrie de masse

Abstract

The selective degeneration of motoneuron that characterizes amyotrophic lateral sclerosis (ALS), implicates non-cell-autonomous effects of astrocytes. The aim of this work is to explore the metabolic status of astrocytes exposed to ALS-associated conditions, using metabolomics approach.

We first, developed a methodology for the analysis of cellular metabolome using different analytical technologies, and then we evaluated the relevance of differentiated NSC-34 as an *in vitro* model for glutamate excitotoxicity studies. Finally, we evaluated metabolic alterations in astrocytes in ALS-associated conditions and we described several metabolic dysfunctions in these cells induced by the expression of a *SOD1*^{G93A} mutation, the presence of wildtype motoneurons and glutamate exposition. These studies highlight major impacts of ALS on the brain energetic metabolism.

This work provides novel insight for understanding the metabolic dysfunction of astrocytes in ALS conditions and opens perspective of therapeutics targets though focus on these metabolic ways, in order to protect motoneurons from glutamate injury.

Keywords: ALS, metabolomics, in vitro model, glutamate, excitotoxicity, astrocytes, motoneurons, mass spectrometry

Table des matières

Liste des tableaux	16
Liste des figures	18
Liste des annexes	20

Introduction générale..... 26

I. La Sclérose Latérale Amyotrophique..... 32

I.1. Historique.....	32
I.2. Epidémiologie	32
I.3. Clinique	33
I.4. Prise en charge des patients.....	36
I.4.1. Diagnostic.....	36
I.4.2. Traitements médicamenteux	37
I.4.3. Traitements non médicamenteux	37
I.4.4. Perspectives thérapeutiques.....	38
I.5. Etiologie.....	41
I.5.1. Facteurs environnementaux.....	41
I.5.2. Facteurs génétiques	41
I.6. Mécanismes physiopathologiques	46
I.6.1. Stress oxydant	47
I.6.2. Dysfonctionnement mitochondrial.....	48
I.6.3. Inflammation	50
I.6.4. Rôle des cellules gliales	53
I.6.5. Hypoxie	54
I.6.6. Altération du métabolisme	55

II. Rôle du glutamate dans le système nerveux central 58

II.1. Neurotransmission glutamatergique	59
II.1.1. Cycle glutamate-glutamine	60
II.1.2. Récepteurs du glutamate	60
II.1.3. Transporteurs du glutamate.....	64
II.2. L'excitotoxicité dans la SLA.....	64
II.2.1. Vulnérabilité des motoneurones à l'excitotoxicité.....	66

II.2.2.	Excitotoxicité directe.....	67
II.2.3.	Excitotoxicité indirecte	68
II.3.	Glutamate : cible thérapeutique de choix dans la SLA	69
III.	SLA et Métabolisme énergétique cérébral.....	73
III.1.	Astrocytes, partenaires énergétiques des motoneurones	73
III.2.	Hypothèse de l'altération des interactions métaboliques astrocyte-motoneurone dans la SLA	76
IV.	Approches d'exploration des modèles <i>in vitro</i> de la SLA	78
IV.1.	Modèles cellulaires d'étude dans la SLA.....	78
IV.1.1.	Cultures primaires	78
IV.1.2.	Lignées cellulaires.....	79
IV.1.3.	Cultures issues des cellules souches.....	80
IV.1.4.	Co-culture motoneurones-astrocytes.....	81
IV.2.	Métabolomique	82
IV.2.1.	Métabolome.....	82
IV.2.2.	Approches métabolomiques	83
IV.2.3.	Analyse métabolomique	83
IV.2.4.	Traitement des données	86
IV.2.5.	Normalisation des données.....	88
IV.2.6.	Analyses statistiques	90
IV.3.	Etudes métabolomiques dans la SLA	93
IV.4.	L'analyse métabolomique des cultures cellulaires	104
Travaux de recherche.....		118
Objectif.....		120
Partie I : Développement de méthodologies d'analyse du métabolome cellulaire par RMN, GC-MS et LC-MS		122
I.	Résumé de l'étude.....	124
II.	Discussion & conclusion.....	140

Partie II : Evaluation des caractéristiques motoneuronales des cellules NSC-34 comme modèle <i>in vitro</i> d'étude de l'excitotoxicité dans la SLA	142
I. Résumé de l'étude.....	144
II. Discussion & conclusion.....	158
Partie III : Etude des modifications des profils métaboliques de cultures primaires d'astrocytes induites par l'expression de la mutation <i>SOD1</i>^{G93A}, la présence des motoneurones primaires sauvages et l'exposition au glutamate	160
I. Résumé de l'étude.....	162
II. Article en soumis à Glia	164
III. Discussion & conclusion.....	194
III.1. Choix de la méthodologie expérimentale.....	194
III.1.1. Modèle cellulaire.....	194
III.1.2. Techniques analytiques	195
III.2. Altérations observées du métabolisme des astrocytes.....	196
III.2.1. Influence de la mutation <i>SOD1</i> ^{G93A} sur le métabolisme des astrocytes	196
III.2.2. Influence des motoneurones sauvages sur le métabolisme des astrocytes <i>SOD1</i> ^{G93A}	197
III.2.3. Influence du glutamate sur le métabolisme des astrocytes <i>SOD1</i> ^{G93A} en co-culture avec les motoneurones sauvages.....	199
III.2.4. Altérations du métabolisme des astrocytes dans les conditions de la SLA.....	199
Conclusions & perspectives.....	202
Bibliographie	208
Annexes	242

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères de Airlie House (EI Escorial révisés)	36
Tableau 2 : Molécules ayant fait l’objet d’essais cliniques entre 2004 et 2016 pour le traitement de la SLA.....	39
Tableau 3: Gènes impliqués dans la SLA	42

Liste des figures

Figure 1 : Présentation des motoneurones touchés dans la SLA (schéma adapté de Swinnen <i>et al.</i> , 2014)	34
Figure 2 : Hypothèses des mécanismes pathogéniques et les interventions thérapeutiques (adapté de Mitsumoto <i>et al.</i> , 2014).	40
Figure 3 : Répartition des principaux gènes de causalité liés à la SLA dans la forme familiale et sporadique (d'après Turner <i>et al.</i> 2013, Corcia <i>et al.</i> 2014).....	43
Figure 4 : A -Structure cristalline de la protéine <i>SOD1</i> (homodimère), B -Activité de la protéine <i>SOD1</i> , de la catalase et du glutathion peroxydase, la réaction de Fenton et celle d'Haber-Weiss.	44
Figure 5 : Principaux mécanismes physiopathologiques de dégénérescence des motoneurones dans la SLA (d'après Veyrat-Durebex <i>et al.</i> , 2014).....	47
Figure 6 : Impact du complexe SOD muté/Bcl-2 (d'après Tan <i>et al.</i> 2014)	49
Figure 7 : Mécanisme de modulation de la réponse neuroinflammatoire par les cellules gliales dans la SLA. A - par activation des cellules gliales, B - par infiltration des cellules immunitaires. Mg, microglie ; Ast, astrocytes ; NMJ, jonction neuromusculaire. (adapté de Puentes <i>et al.</i> , 2016)	51
Figure 8 : La libération et la recapture du glutamate au niveau de la fente synaptique et le cycle glutamate/glutamine (Figure adaptée de Kristis <i>et al.</i> , 2015).	59
Figure 9 : Classification des récepteurs du glutamate : métabotropiques et ionotropiques	61
Figure 10 : Perméabilité aux Ca^{2+} des récepteurs AMPA. L'editing de la sous-unité GluA2, à savoir la mutation d'une glutamine (Q) en arginine (R), retire la perméabilité aux Ca^{2+} .62	
Figure 11 : Protéines d'interaction avec les récepteurs du glutamate (d'après Aarts <i>et al.</i> , 2003)	63
Figure 12 : Mécanisme de l'excitotoxicité induite par le glutamate et les différentes cascades de signalisation, à l'origine de la dégénérescence neuronale.	65
Figure 13 : Structure chimique du riluzole ou 2-amino-6-(trifluorométhoxy) benzothiazole	69
Figure 14 : les différents sites d'action du riluzole selon Doble 1996 : (A) inhibition de la libération du glutamate ; (B) blocage des récepteurs d'acides aminés excitateurs ; (C) inactivation des canaux sodique voltage dépendant.....	70
Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme de couplage neuro-métabolique et les différentes voies associées (d'après Petit and Magistretti 2016)	75

Figure 16 : Représentation schématique de l'organisation des sciences en « omique » (d'après l'Inserm 2011)	82
Figure 17 : Les différentes étapes d'une étude métabolomiques, de la préparation des échantillons à l'interprétation des résultats (d'après Blasco <i>et al.</i> , 2016c).	84
Figure 18 : Analyses statistiques multivariées. Tiré de Roux <i>et al.</i> 2011	91

Liste des annexes

Annexe 1 : Historique de la SLA.....	244
Annexe 2 : Informations supplémentaires de l'article n°2	246
Annexe 3 : Informations supplémentaires de l'article n°4	264
Annexe 4 : Informations supplémentaires de l'article n°5	274

Liste des abréviations

ACP : Analyse en composante principale

ADN: Acide désoxyriboNucléique

ADP: Adénosine diphosphate

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

AMP et AMPc: Adénosine monophosphate et Adénosine monophosphate cyclique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

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

ARN (ARNm) : Acide RiboNucléique (ARN messenger)

ATC: Anatomique Thérapeutique et Chimique

ATP : Adénosine Triphosphate

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BMRB : Biological Magnetic Resonance Bank

C9ORF72 : Chromosome 9 open reading frame

CNM : Couplage NeuroMétabolique

CQ : Contrôle de Qualité

CV : Coefficient de Variation

DER : Dépense énergétique de repos

DFT: Démence Fronto-Temporale

EAAT : Excitatory Amino-Acid Transporter

EMG : Electro-MyoGramme

FMN : Fédération Mondiale de Neurologie

FT-ICR : Fourier transform ion cyclotron resonance

FUS : Fused in Sarcoma

GABA : Gamma aminobutyric acid

GC-MS: Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GLAST : Glutamate/aspartate transporter

GLUT : Glucose transporter

GLT : Glutamate transporter

GS : Glutamine synthase

GSH et GSSG : Glutathion réduit et Glutathion oxydé

HAS : Haute Autorité de Santé

HESC : Human Embryonic Stem Cells
 HMDB : Human metabolome data base
 HPLC : Chromatographie liquide à haute pression
 IMC : Indice de Masse Corporelle
 IP3 : Inositol triphosphate
 iPSC: Induced Pluripotent Stem Cells
 IRM : Imagerie par Résonance magnétique
 KA : Kainate
 LCR : Liquide céphalo-rachidien
 LC-HRMS : Chromatographie Liquide Couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution
 MCT : MonoCarboxylic Transporter
 MNC et NMP : Motoneurone centraux et périphériques
 m/z : masse sur charge
 NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate
 NO : Oxyde Nitrique
 NOS : Nitric Oxide Synthase
 NPC : Neural Progenitors Cells
 OPLS-DA : Orthogonal Partial Least Square –Discriminant Analysis
 PA : Personnes par An
 PC: Composante Principale
 PKC : Protéine Kinase C
 PLS : Partial Least Square
 Ppm : Partie par million
 RE : Réticulum Endoplasmique
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 RT : Temps de Rétention
 ROS : Reactive Oxygen Species
 SLAf et SLAs : Sclérose Latérale Amyotrophique familiale et sporadique
 SNC et SNP : Système Nerveux Central et Périphérique
 SOD : Superoxyde Dismutase
 TARDBP : Tar DNA-binding protein
 TOF : Time of flight
 TSP : Trimethylsilylpropionate

UMP : Uridine monophosphate

VDAC : canal sélectif des anions voltage-dépendant

VGLUT : Transporteur vésiculaire de glutamate

Introduction générale

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), également appelée la maladie de Charcot ou de Lou Gehrig est une maladie neurodégénérative chronique apparaissant à l'âge adulte. Elle est caractérisée par une perte sélective et progressive des motoneurones du cortex cérébral moteur (motoneurones supérieurs ou centraux), de la moelle épinière et du tronc cérébral (motoneurones inférieurs ou périphériques). Les motoneurones centraux sont connectés aux motoneurones périphériques qui eux innervent directement les muscles. La dégénérescence de ces motoneurones est à l'origine des paralysies extensives conduisant au décès, le plus fréquemment par défaillance respiratoire (Kanning et al. 2010; Wijesekera and Leigh 2009) dans les deux à quatre ans après le diagnostic (Chiò et al. 2013). Cette maladie reste aujourd'hui incurable et d'évolution toujours fatale.

L'incidence de la SLA en France est estimée à 2,5 pour 100 000 habitants et sa prévalence comprise entre 5 et 8 pour 100 000 habitants (Marin et al. 2009). La SLA est familiale (SLAf) dans 5-10% des cas tandis que les 90 à 95% des cas restants sont sporadiques (SLAs) (Couratier et al. 2016). Environ 20 % des cas familiaux de la SLA sont associées à près de 170 mutations du gène codant la superoxyde dismutase de type 1 (*SOD1*) (Andersen 2004). La population caucasienne, les hommes, les personnes âgées de plus de 60 ans, et les antécédents familiaux de SLA sont des facteurs de risque clairement démontrés (Chiò et al. 2013; Marin et al. 2016b). Il n'existe à ce jour aucun marqueur biologique de diagnostic, ni de pronostic utilisable en pratique de routine.

De nombreux facteurs génétiques et environnementaux ont été associés à la survenue de la SLA, cependant les mécanismes physiopathologiques impliqués restent mal connus. Parmi ces mécanismes, le rôle de l'excitotoxicité (destruction neuronale) induite par le glutamate est unanimement admis (Van Den Bosch et al. 2006) et est à l'origine du seul médicament indiqué aujourd'hui dans cette pathologie, le riluzole, un antagoniste du glutamate (Bensimon et al. 1994; Lacomblez et al. 1996). Le glutamate est au cœur des hypothèses actuelles concernant la mort cellulaire, et par extension, le développement de biomarqueurs et de nouveaux médicaments pour la SLA (Blasco et al. 2014b; Gordon and Meiningner 2011). Des études réalisées sur les patients atteints de la SLA indiquent une altération du métabolisme (Blasco et al. 2016c), notamment le métabolisme énergétique (Dupuis et al. 2011) qui est une caractéristique importante dans la pathogénèse de la SLA. En effet, la SLA est associée à une perte de poids, à un hypermétabolisme basal et à une altération du métabolisme lipidique et glucidique (Desport et al. 2005; Dupuis et al. 2012). Plusieurs études ont mis en évidence l'implication des astrocytes dans la dégénérescence des motoneurones (Lino et al. 2002;

Pramatarova et al. 2001). Ces astrocytes jouent un rôle crucial dans la clairance du glutamate et protégeraient ainsi les motoneurones des effets délétères du glutamate (Van Den Bosch et al. 2006). Le manque de connaissances sur le mécanisme principal de dégénérescence des motoneurones dans la SLA reste un obstacle majeur au développement de médicaments (Mitsumoto et al. 2014). Nous suggérons dans ce travail que la modification du métabolisme et le dysfonctionnement induit par le glutamate pourraient être liés. Parmi les approches permettant d'approfondir la compréhension des mécanismes physiopathologiques, l'approche métabolomique semble être appropriée pour étudier les altérations métaboliques.

L'objectif de ce travail de thèse est d'approfondir la connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA, en particulier les altérations du métabolisme induites par le glutamate au niveau cellulaire en utilisant une approche métabolomique.

Ce travail se décline en trois grandes parties : Une première partie vise à mettre au point les différentes méthodes de préparation et d'analyse du métabolome cellulaire. Une deuxième partie consiste à évaluer du point de vue moléculaire et cellulaire la ligne cellulaire hybride NSC-34 (issue de la fusion de motoneurones et des cellules du neuroblastome) comme modèle *in vitro* d'étude de l'excitotoxicité. Enfin une troisième partie porte sur la mise au point d'un modèle de co-culture à partir des cultures primaires de motoneurones et des astrocytes, puis l'étude des modifications du profil métabolique de ce modèle soumis à l'excitotoxicité induite par le glutamate.

Cette thèse comporte 4 travaux publiés et un sous presse.

Article 1- Revue de littérature ayant examiné les méthodologies couramment utilisées pour la préparation des cellules et d'extraction des métabolites en vue d'analyse métabolomique en générale et particulièrement par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS).

Madji Hounoum Blandine et al. *“Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry-based cell metabolomics: experimental design, recommendations and applications”* Trends in Analytical Chemistry, (2016) 75, pp.118-28

Article 2- Mise au point de la méthodologie d'analyse pour les études métabolomiques sur des cultures cellulaires en utilisant la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), la

chromatographie gazeuse ou liquide couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS et LC-HRMS).

Madji Hounoum Blandine *et al.* “*Analytical methodology for study of adherent mammalian cell metabolomics using NMR, GC-MS and LC-HRMS*” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2015) 407, pp. 8861–8872

Article 3- Revue de littérature ayant examiné les principales études sur la recherche des biomarqueurs dans la SLA en utilisant l’approche métabolomique. Cette revue discute également des atouts et les limites des différentes stratégies d’études utilisées.

Blasco H, Patin F, Madji Hounoum Blandine *et al.* “*Metabolomics in Amyotrophic Lateral Sclerosis: how far can it take us*” *European Journal of Neurology* (2015) 23, pp. 447–54

Article 4- Evaluation de la lignée cellulaire NSC-34 comme modèle d’étude de l’excitotoxicité induite par le glutamate dans la SLA par comparaison aux cultures primaires de motoneurones.

Madji Hounoum Blandine *et al.* “*NSC-34 motor neuron-like cells are unsuitable as experimental model for glutamate-mediated excitotoxicity*” *Frontiers in Molecular Neuroscience*, (2016)10:11, pp118

Article 5- Etude des altérations métaboliques dans les astrocytes primaires dans des conditions associées à la SLA telles que l’expression de la mutation *SOD1*, la présence des motoneurones sauvages et l’exposition au glutamate

Madji Hounoum Blandine *et al.* “*Wildtype motoneurons, ALS-linked SOD1 mutation and glutamate profoundly modify astrocytes metabolism and lactate shuttling*” Soumis dans *Glia*

Globalement, nos travaux ont permis de mettre en place une méthodologie d’analyse métabolomique des cellules et de contribuer à la compréhension des altérations métaboliques dans les astrocytes et de leurs implications dans la physiopathologie de la SLA. Ces données pourraient aider à appréhender de nouvelles cibles thérapeutiques associées aux altérations métaboliques dans la SLA, afin de protéger les motoneurones des perturbations délétères directement ou indirectement induites par le glutamate.

I. La Sclérose Latérale Amyotrophique

I.1. Historique

La SLA fut étudiée pour la première fois il y a plus de 150 ans par le neurologue Guillaume Duchenne (1850) qui pensa que la maladie n'était que musculaire. La première démonstration d'une atteinte de la moelle épinière est faite en 1853 par le médecin Jean Cruveilhier au cours d'une autopsie, montrant une atrophie des racines antérieures. En 1874, le neurologue Jean-Martin Charcot, établit avec précision les caractéristiques cliniques et pathologiques de la SLA (Charcot 1874). Il fut le premier à utiliser le terme « sclérose latérale amyotrophique ». Le terme « sclérose » se réfère au « durcissement » des tractus corticospinaux résultant de la dégénérescence des motoneurones et de leur remplacement par des cellules gliales. La sclérose est dite « latérale » car les fibres nerveuses qui sont altérées se situent dans la partie latérale de la moelle épinière. Le terme « amyotrophique » se réfère à l'atrophie des fibres musculaires induite par la dégénérescence des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière qui conduit à l'affaiblissement musculaire et à l'apparition de fasciculations (Rowland and Shneider 2001).

Pourtant, jusque-là la SLA fut exclusivement connue par les cliniciens et scientifiques. Ce n'est que dans la décennie 1940-1950 qu'elle fut largement connue par le grand public, après qu'elle devint « épidémique » dans la population de l'île de Guam dans l'océan Pacifique et qu'elle toucha un célèbre joueur de baseball aux Etats-Unis, Lou Gehrig, qui donna son nom à la maladie (maladie de Lou Gehrig). Ce ne fut que dans les années 1990 que la recherche scientifique sur la SLA a explosé et l'une des avancées majeures fut l'identification des modèles cellulaires et animaux de la maladie qui globalement facilitent l'approche multidisciplinaire dans l'identification de nouveaux mécanismes et des voies impliquées dans la SLA (Tableau en Annexe 1).

I.2. Epidémiologie

La SLA est la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte et l'une des maladies neurologiques les plus graves. L'incidence de la SLA dans le monde a été estimée en moyenne à 1,75 (1,55-1,96) pour 100 000 personnes par an (PA) (Marin et al. 2016b). Cette incidence est relativement homogène en Europe (2 à 3 pour 100 000 PA) (Couratier et al. 2016), en Amérique du nord et en Nouvelle Zélande (1,66 à 1,97 pour 100 000 PA). Une certaine

hétérogénéité a été observée entre l'Europe du Nord (1,46 à 2,32 pour 100 000 PA) et l'Asie de l'Est (0,42-1, 24 pour 100 000 PA), la Chine et le Japon ou l'Asie du Sud (0,58-0,89 pour 100 000 PA) (Marin et al. 2016b). Cette variation de l'incidence de la SLA en fonction des zones géographiques renforce l'hypothèse de la forte implication des facteurs environnementaux et le mode de vie dans la survenue de la maladie, ainsi que des facteurs génétiques, en particulier les « ascendants » des populations.

Le plus souvent la maladie se manifeste sporadiquement (SLAs) avec une étiologie indéterminée (90-95% des cas), tandis qu'environ 5 à 10% des patients ont une histoire familiale antérieure de la maladie du motoneurone et/ou de démence fronto-temporale (Byrne et al. 2011). La transmission de ces formes familiales de SLA (SLAf) se fait souvent sur le mode autosomique dominant. Des cas de transmission autosomale récessive ont été décrits (Gros-Louis et al. 2006). On évoque la SLAf lorsqu'il existe deux cas au sein d'une même famille (Valdmanis and Rouleau 2008). Les deux formes sporadique et familiale de la SLA possèdent des symptômes cliniques très similaires (Byrne et al. 2011).

L'âge moyen d'apparition de la maladie se situe autour de 60 ans (Chio et al. 2002; Pasinelli and Brown 2006; Pugliatti et al. 2013). Il existe également des formes à début précoce, vers 30 ans, représentant seulement 5% des cas (Haverkamp et al. 1995). La moyenne de survie de la SLA est de 1 à 5 ans (Cleveland and Rothstein 2001). Globalement, il existe une prépondérance masculine, définie par un sex-ratio de 1,2-1,5 homme pour une femme (Manjaly et al. 2010; McCombe and Henderson 2010). Cette différence selon le sexe pourrait résulter de plusieurs facteurs de risques professionnels ou environnementaux (Sutedja et al. 2009)

I.3. Clinique

La SLA se caractérise cliniquement par l'association à des degrés divers d'une paralysie progressive des muscles à innervation spinale et bulbaire, secondaire à une atteinte des motoneurones périphériques (MNP) et des motoneurones centraux (MNC) (Figure 1). Malgré les nombreuses études sur la recherche de biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques, il n'existe à ce jour aucun marqueur fiable utilisable en clinique. Le diagnostic est principalement clinique et repose sur la coexistence de symptômes cliniques d'atteinte de ces motoneurones, et sans signe d'atteinte des autres systèmes notamment sensitif, cérébelleux, extrapyramidal et cognitif.

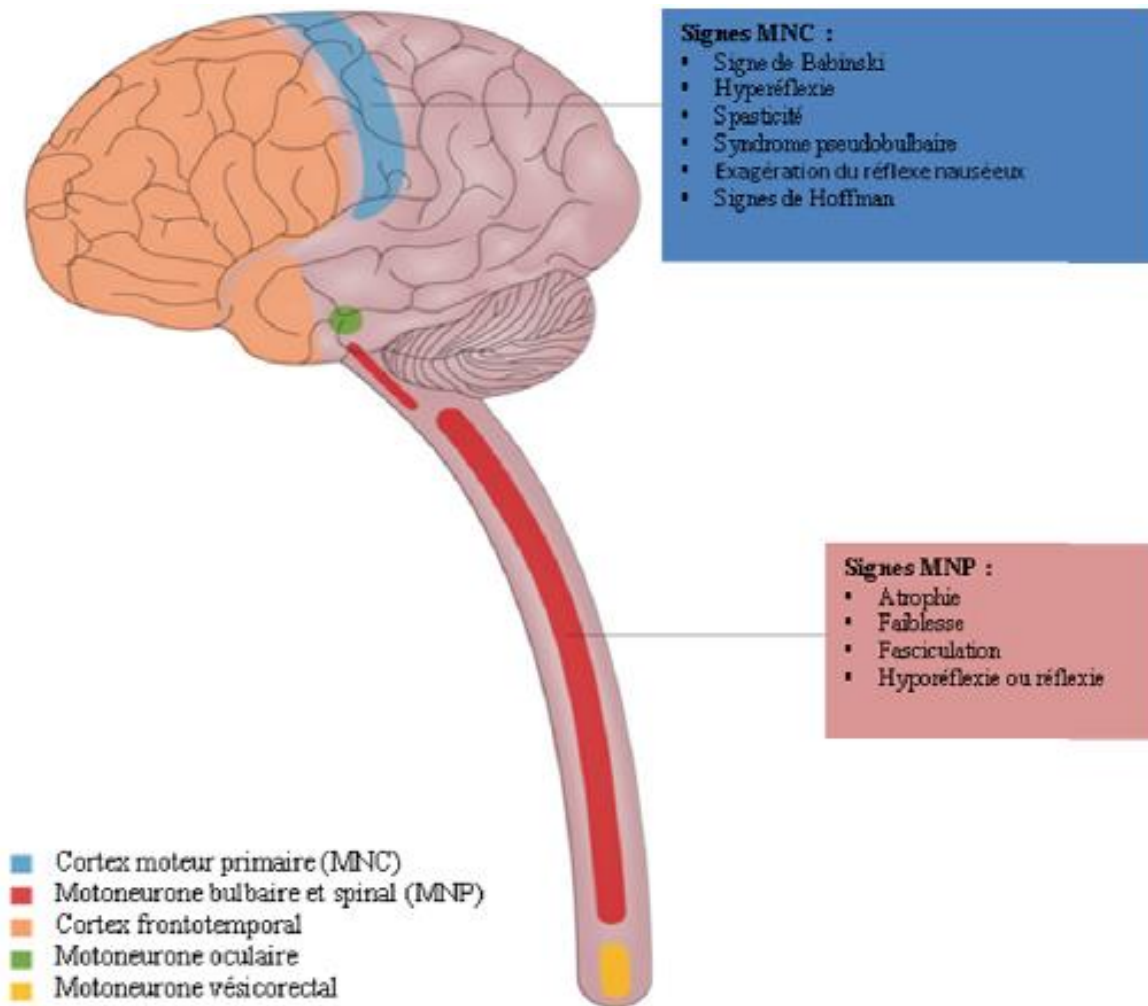


Figure 1 : Présentation des motoneurones touchés dans la SLA (schéma adapté de Swinnen *et al.*, 2014)

Les motoneurones dans le cortex primaire moteur (bleu, Figure 1) et motoneurones bulbo-spinaux périphériques (en rouge) sont les sites préférentiellement touchés par la SLA. Les neurones dans le cortex fronto-temporal (orange), cependant, sont fréquemment impliqués ainsi le phénotype résultant sera dans le spectre de démence SLA-frontotemporale. La participation du neurone moteur oculaire (vert) et vésicorectal (jaune), est rare, et se produit surtout dans les cas de maladie de longue durée d'évolution.

La présentation clinique de la SLA est très hétérogène en fonction de la prédominance du type de motoneurones atteints, de la répartition topographique de l'atteinte, du mode évolutif et des signes associés. On distingue principalement deux formes cliniques de SLA, la forme spinale et la forme bulbaire :

- La forme spinale de la maladie est due à la dégénérescence des MNP, elle est caractérisée par une atteinte de la motricité (faiblesse et une fonte musculaire) des membres inférieurs et supérieurs. Progressivement, une spasticité se développe dans les membres atrophiés et affaiblis, affectant la dextérité manuelle et la démarche. Environ 2/3 des patients atteints de la SLA classique présentent la forme spinale de la maladie.
- La forme bulbaire correspond à la dégénérescence des MNP du tronc cérébrale conduisant à des troubles de la parole et/ou de la déglutition, elle est constatée dans environ 1/3 des cas (Argyriou et al. 2005). Les symptômes au niveau des membres peuvent apparaître presque simultanément avec les symptômes bulbaires, ou dans la grande majorité des cas 1 à 2 ans après.

Pour évaluer le degré d'atteinte des MNP, l'électromyographie, la biopsie musculaire, et l'estimation du nombre d'unités motrices sont utilisés. Cependant, aucune technique radiologique et/ou électrophysiologique n'est utilisée en routine pour évaluer l'atteinte des MN (Marin et al. 2016a). La principale conséquence clinique liée à la dégénérescence des motoneurones est une atteinte progressive des muscles des quatre membres, de la langue et des muscles respiratoires.

Une atteinte cognitive est possible dans la SLA, 30% des cas liés à une mutation *C9orf72* présentent des troubles cognitifs (Hodges 2012). Ces troubles se caractérisent par une atteinte des fonctions exécutives telles que les troubles de la flexibilité mentale, de la mémoire de travail, les troubles attentionnels et la réduction de la fluence verbale (Murphy et al. 2007). 15 à 20% des patients SLA ayant des troubles cognitifs répondraient aux critères de démence fronto-temporale (DFT) (Phukan et al. 2012; Phukan et al. 2007). Il est également associé une atteinte du langage et des troubles du comportement. Des troubles du comportement tels qu'une apathie, une irritabilité et une désinhibition ont été également observés en association avec des troubles cognitifs chez des patients (Grossman et al. 2007).

I.4. Prise en charge des patients

I.4.1. Diagnostic

L'hétérogénéité phénotypique de la SLA et surtout de l'absence de marqueur biologique de diagnostic rendent difficile le diagnostic absolu et compromettent la certitude du diagnostic dans la pratique clinique. Les critères diagnostiques de la SLA ont été établis par la Fédération Mondiale de Neurologie (FMN) (critères El Escorial, 1994; critères révisés Airlie House, 2000) (Brooks et al. 2000). Ces critères sont basés sur les degrés d'association d'atteinte clinique des MNP et des MNC dans différents territoires, et permettent d'attribuer à chaque patient un degré de certitude diagnostique, variant de SLA possible, probable, à certaine (Brooks et al. 2000). Ces critères ont aussi été repris et sont validés par la Haute Autorité de Santé (HAS). La SLA est alors classée en : cliniquement certaine, cliniquement probable et cliniquement possible (Tableau 1).

Tableau 1 : Critères de Airlie House (El Escorial révisés)

Critères d'Airlie House (1998)	Définition clinique
SLA cliniquement certaine	Signes d'atteinte des MNC + MNP bulbaire dans trois régions spinales ou deux régions spinales et bulbaires
SLA cliniquement probable	Signes d'atteinte des MNC + MNP dans au moins deux régions avec MNC rostral par rapport aux signes périphériques
SLA cliniquement probable étayée par des examens paracliniques	Signes d'atteinte des MNC + MNP dans une région et des MNP par ENMG dans au moins deux membres
SLA cliniquement possible	Signes d'atteinte des MNC + MNP dans une région ou des MNC dans deux régions ou MNP rostral par rapport aux MNC

ENMG : ElectroNeuroMioGraphie ; MNC : Motoneurone Central ; MNP : Motoneurone Périphérique ; SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique.

L'électromyogramme (EMG) apporte des arguments en faveur d'une atteinte du MNP en mettant en évidence la combinaison d'une dénervation en cours, ce qui impose l'enregistrement de fibrillations et de potentiels positifs et de signes de réinnervation sous la forme de potentiels d'unité motrice larges, instables s'associant à un appauvrissement du tracé. Le scanner cérébral

et l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) sont fréquemment réalisés afin de vérifier l'intégrité de la moelle épinière et/ou du cerveau. L'analyse du liquide céphalo-rachidien n'est pas systématique et est surtout réalisée pour s'assurer de l'absence d'infection.

I.4.2. Traitements médicamenteux

A ce jour, il n'existe pas de traitement permettant de guérir, ni même de stopper l'évolution de la SLA (HAS, 2006). Le Riluzole (Rilutek®), un antagoniste du glutamate présumé, est le seul médicament approuvé permettant de ralentir l'évolution de la maladie. Ce traitement a montré une prolongation de la survie des patients de l'ordre de 6 mois dans deux essais thérapeutiques (Lacomblez et al. 1996; Miller et al. 2007b). La vitamine E peut être prescrite en raison de ses propriétés anti-oxydantes bien que les études réalisées chez l'homme n'aient pas démontré d'effets significatifs sur l'évolution de la maladie (Mitsumoto et al. 2014). Le traitement de la SLA repose sur l'utilisation conjointe, deux fois par jour, du Riluzole et de la vitamine E dosée à 500 mg. Cependant le Riluzole peut entraîner des effets secondaires tels que la fatigue, la somnolence, des vertiges, des nausées et de la diarrhée. Et dans certains cas une légère élévation des enzymes hépatiques peut se produire (Mitsumoto et al. 2014).

L'absence de traitement curatif est regrettable, mais les traitements symptomatiques apportent du confort et sont donc primordiaux dans la prise en charge des patients : certes ils n'améliorent pas la survie globale des patients mais ils améliorent leur qualité de vie. Il apparaît donc indispensable de traiter les crampes, la spasticité, les douleurs, l'hypersalivation ainsi que la symptomatologie anxio-dépressive lorsqu'elles sont présentes. L'évaluation de la qualité de vie semble également cruciale pour concevoir une intervention clinique et évaluer de nouveaux traitements (O'Doherty et al. 2010).

I.4.3. Traitements non médicamenteux

La prise en charge pluridisciplinaire spécialisée est essentielle, au sein d'équipes spécialisées regroupant des neurologues, des pneumologues, des kinésithérapeutes, des infirmières, des diététiciens, des ergothérapeutes, des orthophonistes et des psychologues. Cette prise en charge globale augmente la survie et la qualité de vie des patients (Van den Berg et al. 2005). La suppléance des fonctions vitales chez le patient atteint de la SLA est préconisée par la HAS en France. Elle comprend des thérapeutiques physiques, des soins palliatifs, une nutrition entérale et une assistance respiratoire (Has 2006).

La prise en charge musculaire de relaxation est essentielle car à tous les stades de la maladie, la thérapie physique est utile pour le maintien de la mobilité. Une kinésithérapie régulière permet de prévenir l'algodystrophie (syndrome douloureux des articulations secondaires à un traumatisme) et la thrombose veineuse.

La prise en charge respiratoire est nécessaire. En effet, l'atteinte respiratoire est liée à une dégénérescence des centres respiratoires mais aussi à l'atteinte neuromusculaire. Elle peut se manifester de manières diverses : hypoxie nocturne ou hypoventilation alvéolaire et hypercapnie. La ventilation non invasive permet bien souvent d'améliorer la qualité de vie des patients et de prolonger leur survie. Bach *et al* rapporte une survie pouvant atteindre 114 mois chez certains de leurs patients sous ventilation (Bach 2002). Kleopa *et al*, sur 122 patients, notent une survie de quatorze mois chez des patients ventilés contre trois mois chez les patients non ventilés (Kleopa et al. 1999).

La prise en charge nutritionnelle est également centrale. En effet, la dénutrition est un facteur de mauvais pronostic et elle impacte notamment le capital musculaire du patient. Il existe souvent un amaigrissement qui peut être d'origine mixte : diminution des apports en raison de la faiblesse ou d'une dysphasie, mais aussi hypermétabolisme. L'instauration d'une gastrostomie est parfois rendue nécessaire, lorsque les troubles bulbaires sont sévères ou quand les apports oraux sont insuffisants (dégradation de l'état nutritionnel du patient).

Une prise en charge spécialisée permet de préserver et de développer l'indépendance et l'autonomie des patients dans leur environnement quotidien.

La prise en charge psychologique du patient et des aidants est enfin essentielle du fait de l'aggravation progressive du tableau clinique et de l'évolution inéluctable de la maladie vers le décès. La SLA peut s'accompagner de troubles du contrôle émotionnel, il s'agit d'une baisse du seuil émotionnel ou de phénomène de pleurs ou de rires réflexes. Un syndrome dépressif peut y être associé.

I.4.4. Perspectives thérapeutiques

Dès 2005, puis confirmé en 2015, plusieurs molécules ont été évaluées dans le cadre d'un traitement à visée étiologique par la HAS mais la commission n'en a retenu aucune et a conclu à une absence de bénéfice suite à un traitement qui associe de l'alphatocophérol et du Riluzole [HAS, protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) Sclérose Latérale Amyotrophique

(ALD9), 2015, Paris]. La recherche de nouveaux traitements médicamenteux continue et un certain nombre de molécules sont en cours d'essai. Ces traitements ciblent différents mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA tels que l'excitotoxicité induite par le glutamate, l'accumulation de la protéine *SOD1*, le stress oxydatif, la dysfonction mitochondriale, et l'atteinte musculaire (Blasco et al. 2016b; Mitsumoto et al. 2014; Zinman and Cudkowicz 2011) (**Figure 2**). Plus de 50 essais cliniques ont pourtant été réalisés depuis des dizaines d'années pour retarder la progression de la maladie, mais malheureusement, ils se sont révélés décevants. Les différentes molécules qui ont fait l'objet d'essais cliniques réalisés entre 2004 et 2016 sont reportées dans le **Tableau 2**. Toutefois, les avancées technologiques (séquençage haut débit...), ainsi que l'avènement de la thérapie cellulaire, de l'immunothérapie et de la thérapie génique ouvrent de nouvelles perspectives (Petrou et al. 2016; Vucic et al. 2014).

Tableau 2 : Molécules ayant fait l'objet d'essais cliniques entre 2004 et 2016 pour le traitement de la SLA

Cible physiopathologique	Molécule testée	Références
Autophagie	Lithium	(Aggarwal et al. 2010; Chio et al. 2010; Miller et al. 2011; Morrison et al. 2013)
Excitotoxicité	Talampanel	(Pascuzzi et al. 2010)
	Ceftriaxone	(Berry et al. 2013)
	Flecainide	(Park et al. 2015)
Inflammation, apoptose	Minocycline	(Gordon et al. 2007)
	TCH346	(Miller et al. 2007a)
	Glatiramère	(Meininger et al. 2009)
Inhibiteur de PDE4 β et de TNF	Pentoxifylline	(Meininger et al. 2006)
Facteurs neurotrophiques	Xaliprodon	(Meininger et al. 2004)
	IGF-I	(Sorenson et al. 2008)
Mitochondrie	Créatinine	(Rosenfeld et al. 2008; Shefner et al. 2004)
	Acétyl-L-carnitine	(Beghi et al. 2013)
	Dexpramipexole	(Cudkowicz et al. 2013)

	Olesoxime	(Lenglet et al. 2014)
Neuroinflammation	Célécoxib	(Cudkowicz et al. 2006)
Neuroprotection	Erythropoïétine	(Lauria et al. 2015)
Stress oxydatif	Vitamine E	(Graf et al. 2005)
	CoQ10	(Kaufmann et al. 2009)
	Bromocriptine	(Nagata et al. 2016)
Peroxisome	Pioglitazone	(Dupuis et al. 2012)

L'une des principales raisons des échecs thérapeutiques dans la SLA est l'absence de connaissance de la physiopathologie et donc de biomarqueurs associés à cette physiopathologie. Le délai entre l'apparition des symptômes et le diagnostic est de plus d'un an, ceci limite considérablement la participation à des essais cliniques et la possibilité d'une prise en charge précoce des patients.

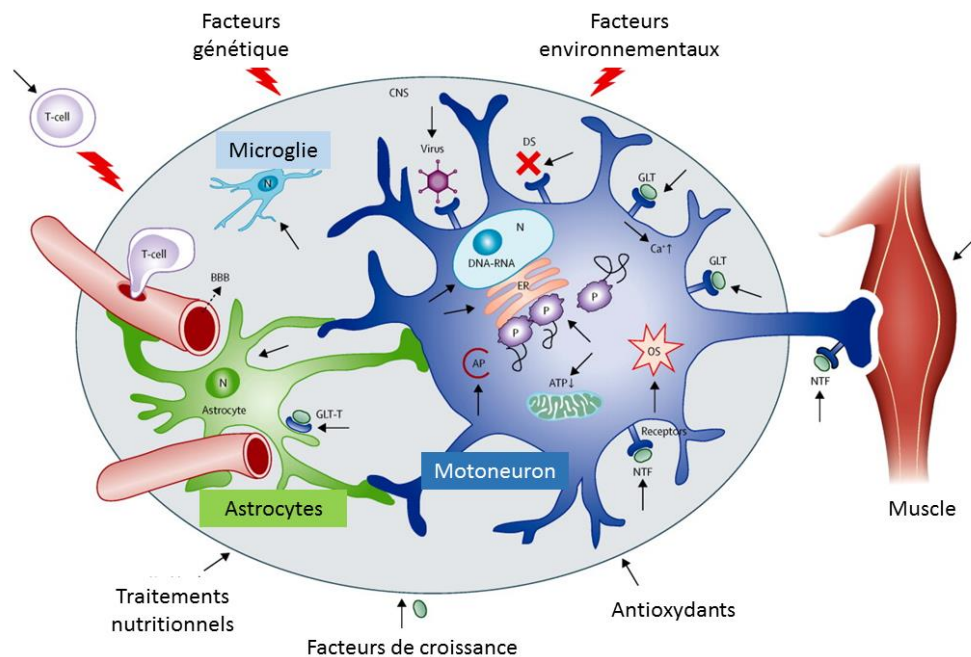


Figure 2 : Hypothèses des mécanismes pathogéniques et les interventions thérapeutiques (adapté de Mitsumoto *et al.*, 2014).

Les cibles thérapeutiques présumées dans les motoneurones, les astrocytes, la microglie et les lymphocytes T dans le SNC. Les flèches noires montrent les cibles étudiées dans les essais

cliniques. AP : autophagie, BBB : barrière hémato-encéphalique (en association avec la déficience neurovasculaire), Ca^{2+} : ion calcium, DS : signal de la mort ou de l'apoptose, ER : réticulum endoplasmique, GLT : glutamate, GLT-T : transporteur de glutamate, N: noyau, NTF : facteurs neurotrophiques, OS : stress oxydatif, P : protéines.

I.5. Etiologie

Malgré les grands progrès génétiques et/ou environnementaux réalisés pour la compréhension des causes de la SLA, il n'existe pas de cause clairement identifiée à ce jour. Certaines mutations génétiques sont impliquées, notamment dans les formes de SLA familiales mais on en connaît moins sur les facteurs environnementaux et génétiques impliqués dans les formes sporadiques de la maladie. Des études épidémiologiques indiquent que la SLA résulte probablement des interactions entre des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques en intégrant l'âge, le moment et la durée d'exposition à ces facteurs de risques exogènes (Al-Chalabi and Hardiman 2013; Zufiria et al. 2016).

I.5.1. Facteurs environnementaux

Les études épidémiologiques et expérimentales ont mis en évidence un rôle de l'environnement dans la pathogenèse de la SLA. Parmi eux, il y a les facteurs liés au mode de vie (Fang et al. 2006), les expositions environnementales (métaux lourds, pesticides, toxines...) (Kamel et al. 2005; Qureshi et al. 2006), professionnelles ou chimiques (Malek et al. 2012; Sutedja et al. 2009; Vinceti et al. 2010), les agents infectieux (Douville et al. 2011; Oluwole et al. 2007), les apports nutritionnels (Fitzgerald et al. 2014), le degré d'activité physique (Huisman et al. 2013; Pupillo et al. 2014; Scarmeas et al. 2002), et la traumatologie (Peters et al. 2013). A ce jour, aucune association entre un facteur de risque environnemental et la SLA n'a pu être démontrée de manière convaincante et reproductible (Gil et al. 2007).

I.5.2. Facteurs génétiques

Bien que la physiopathologie de la SLA reste à ce jour méconnue, il est unanimement admis que l'implication des facteurs génétiques est un des éléments majeurs dans la mort des motoneurones. Depuis la découverte de mutations du gène codant la superoxyde dismutase de type 1 (*SOD1*) (Rosen et al. 1993a), le nombre de gènes liés à, ou, favorisant la survenance de la

SLA n'a cessé de croître. Plusieurs gènes responsables de la SLA (dans les SLAf) ou associés à la SLA (dans les SLAs) ont été décrits (Van Damme and Robberecht 2009). En plus des mutations *SOD1* (Rosen et al. 1993a), des mutations dans le gène codant la protéine TAR DNA-Binding Protein (*TARDBP*) (Mackenzie et al. 2007b; Sreedharan et al. 2008), fused in sarcoma (*FUS*) (Kwiatkowski et al. 2009), Ubiquilin2 (*UBQLN2*) (Deng et al. 2011), *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez et al. 2011) et plusieurs autres sont associées aux phénotypes de la SLA (Chen et al. 2013; Corcia et al. 2014) (Tableau 3).

Tableau 3: Gènes impliqués dans la SLA

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

Parmi les gènes impliqués dans la SLA, quatre (*SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72*) sont considérés de manière unanime comme des facteurs génétiques pathogènes majeurs de la SLA et sont responsables d'un peu plus de la moitié des formes familiales et environ 5% des formes sporadiques (Turner et al. 2013b) (**Figure 3**). Plusieurs critères doivent au préalable être validés

pour retenir l'implication d'un gène dans la SLA : la mutation doit co-ségréger avec la maladie dans les familles et cette mutation ne doit pas être trouvée chez des sujets contrôles (Corcia et al. 2014).

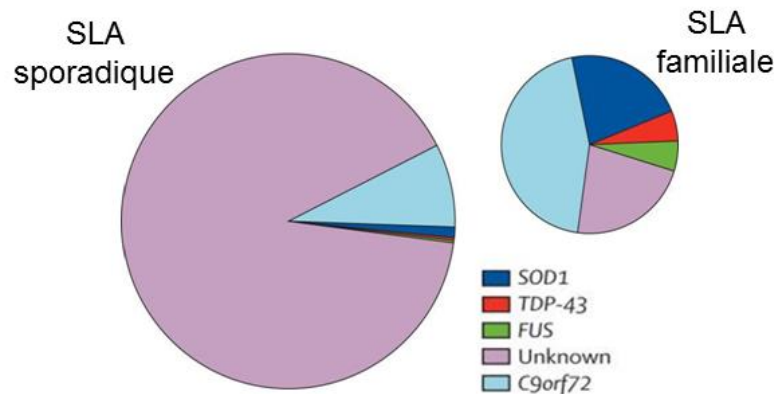


Figure 3 : Répartition des principaux gènes de causalité liés à la SLA dans la forme familiale et sporadique (d'après Turner et al. 2013, Corcia et al. 2014)

Plusieurs gènes de susceptibilité ont été identifiés mais leur pathogénèse reste mal comprise (Corcia et al. 2014; Schymick et al. 2007). Leur présence augmente le risque de développer la maladie (Corcia et al. 2014), comme par exemple le gène de l'*ApoE* (Siddique et al. 1998), de la survie des motoneurones (*SMN*) (Corcia et al. 2002a), de la paraoxonase (*PON*) (Ticozzi et al. 2010), du *vasculo endothelial growth factor* (*VEGF*) et de l'angiogénine (*ANG*) (van Es et al. 2011).

1.5.2.1. Gène de la superoxyde dismutase 1 (*SOD1*)

Le gène *SOD1* fut le premier facteur génétique identifié dans la SLA, il est localisé sur le locus 21q22.1 (Rosen et al. 1993a). Globalement 10-20% des cas familiaux de SLA et 1-5% des cas sporadiques de SLA sont associés aux mutations *SOD1*. A ce jour, plus de 170 mutations du gène *SOD1* ont été identifiées dans la SLA (Couratier et al. 2016). La plupart des mutations *SOD1* sont transmises de façon autosomique dominante, excepté la mutation D90A qui peut présenter une transmission soit récessive soit dominante, en fonction certainement du fond génétique et/ou des facteurs environnementaux (Cudkowicz et al. 1997). La protéine *SOD1* est composée de 153 acides aminés. Elle est particulièrement abondante dans le cytoplasme (1% de ses protéines totales) sous la forme d'un homodimère, et est également appelée « Cu-Zn

SOD » parce que chacune des sous unités contient un atome de cuivre (nécessaire à son activité enzymatique) et un atome de zinc (assurant la stabilité de sa structure protéique) (Valentine et al. 2005) (Figure 4). La *SOD1* joue un rôle important dans le processus de détoxification au sein de la cellule. Elle catalyse la réduction (« dismutation ») de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en dioxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce peroxyde d'hydrogène peut oxyder les résidus méthionine, cystéine, tyrosine et tryptophane au niveau des protéines (Giulivi and Davies 2001; Tornvall et al. 2010). Il peut également rompre les liaisons S-S (Tornvall et al. 2010) et créer ces mêmes liaisons au sein des protéines ou peptides (Sidorova et al. 2004; van der Wijk et al. 2004). Les mutations dans le gène de la *SOD1* pourraient inverser sa réaction physiologique en produisant le radical hydroxyle (Figure 4B). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être réduit par des métaux tel que Fer *via* la réaction de Fenton pour former le radical hydroxyle ($OH^\bullet$) (Liochev 1999) ou par le radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) suivant la réaction d'Haber-Weiss. Le radical hydroxyle est initiateur de la peroxydation lipidique mais cette réaction est empêchée par la réduction du H_2O_2 en eau par la catalase ou la glutathion peroxydase (Figure 4B) (de Haan et al. 1992).

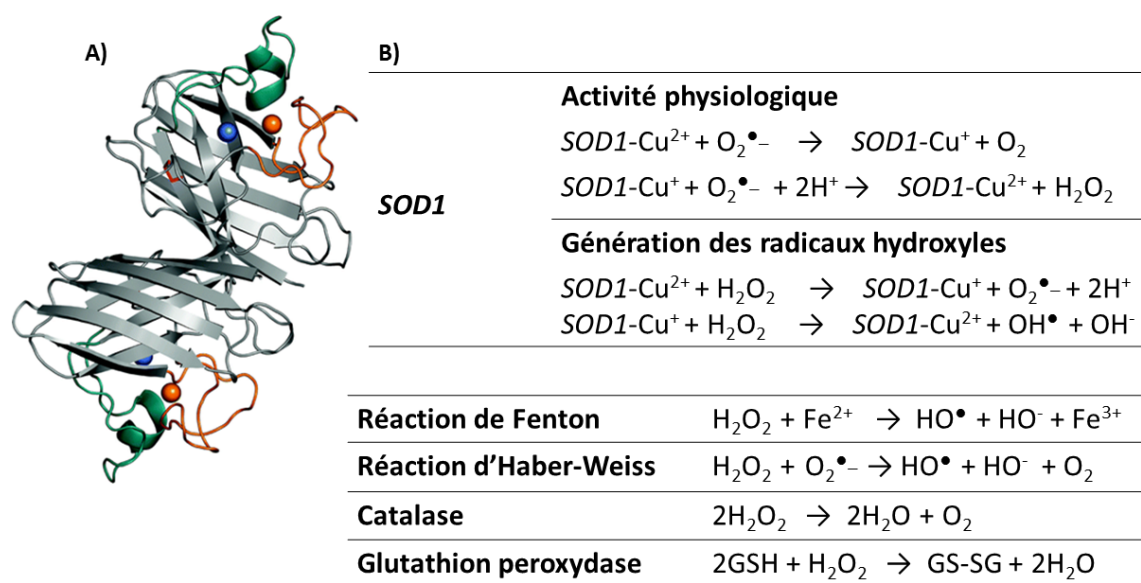


Figure 4 : A-Structure cristalline de la protéine *SOD1* (homodimère), **B-**Activité de la protéine *SOD1*, de la catalase et du glutathion peroxydase, la réaction de Fenton et celle d'Haber-Weiss.

Les atomes de cuivre et de zinc sont représentés par des sphères bleues et orange, respectivement. Le pont disulfure sous-unitaire est représenté en rouge. Les flèches argentées représentent les feuillets bêta-antiparallèles qui sont au nombre de huit dans chaque sous-unité et forment une structure caractéristique cylindrique appelée « bêta-baril ». Le dimère est retenu

par des interactions hydrophobes et non covalentes qui confèrent une grande stabilité à la protéine *SOD1* (d'après Valentine et al. 2005).

La *SOD* existe sous trois formes : cytosolique (*SOD1*), mitochondriale (*SOD2*) et extracellulaire (*SOD3*). Les mutations du gène *SOD1* identifiées dans la SLA semblent affecter la stabilité de la protéine *SOD1* et/ou induisent un changement dans son repliement (structure tertiaire, conformation). En raison de la fonction physiologique principale de la *SOD1*, on aurait pensé que l'effet toxique des mutations proviendrait d'une diminution de sa capacité à protéger les cellules contre les dommages oxydants en métabolisant les radicaux superoxydes. Toutefois plusieurs études suggèrent que la *SOD1* mutée exercerait son action pathogène par un gain de fonction qui serait toxique plutôt qu'une perte de fonction (Borchelt et al. 1994; Gurney et al. 1994). Ceci est supporté par le fait que le KO-*SOD1* soit associé à un développement et une vie normale des souris (Reaume et al. 1996) et que l'expression de certaines mutations *SOD1* (G93A ou G37R) provoquent des phénotypes de la SLA dans les souris, malgré l'élévation des niveaux d'activité *SOD1* (Cleveland 1999).

I.5.2.2. Gène *TARDBP*

Le gène *TARDBP* (*Tar DNA-binding protein*), localisé sur le locus 1p36.22, a été associé à la SLA en 2008 (Mackenzie et al. 2007b; Sreedharan et al. 2008). Il code une protéine de 43 kD dénommée TDP-43. La mise en évidence de mutations sur ce gène a été étayée par l'existence d'inclusions marquées par des anticorps anti-TDP 43 dans le cytoplasme des neurones des patients SLA (Sreedharan et al. 2008). A ce jour 30 mutations de ce gène ont été trouvées dans 5% des cas de SLAf et 1% des cas de SLAs (Couratier et al. 2016). Dans les conditions physiologiques, la protéine TDP-43 est localisée dans le noyau des neurones et est impliquée dans plusieurs processus métaboliques de l'ADN et de l'ARN dont la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription et l'épissage de l'ARN. Les mutations de *TARDBP* se traduisent par le clivage et la phosphorylation anormale de la TDP-43 du noyau, ainsi que sa redistribution vers le cytoplasme des neurones et des cellules gliales. Les mutations *TARDBP* ont également été décrites dans les démences fronto-temporales (DFT) ou dans des formes SLA avec atteinte cognitive.

I.5.2.3. Gène *fused in sarcoma* (*FUS*)

Depuis la découverte de mutations dans le gène *TARDBP*, plusieurs autres gènes similaires situés dans des régions du génome liés à la SLA ont été étudiés. Ceci a permis de mettre en évidence des mutations dans le gène *FUS* (*fused in sarcoma*) (Kwiatkowski et al. 2009) dans la région de liaison 16q11.2 dans la SLA. La fréquence de mutation dans ce gène est de 4-6% dans des cas de SLAf et 0,7-1,8% dans des cas de SLAs (Corcia et al. 2012; Millecamps et al. 2010). Le gène *FUS* (15 exons) code une protéine de 525 acides aminés qui présente de nombreuses similitudes fonctionnelles avec TDP-43 dont une région riche en glycine et deux régions RRM (RNA recognition motif) qui lient l'ADN et les ARN, jouant un rôle dans la réparation de l'ADN, ainsi que dans la régulation de la transcription et l'épissage des ARN. Les mutations du gène *FUS* sont toutes dominantes sauf une rapportée dans une famille du Cap Vert de transmission récessive. A ce jour, environ 60 mutations ont été décrites, la plus fréquente affecte l'exon 14 et plus précisément le codon 521 (arginine) (Vance et al. 2009).

I.5.2.4. Gène chromosome 9 open reading frame 72 (*C9orf72*)

Le gène *C9orf12* situé sur le chromosome 9, est l'un des plus récemment décrits et le contributeur génétique majeur à la SLA connu à ce jour. Sa prévalence est variable en fonction des pays, elle est impliquée dans plus de 40% des cas de SLAf aux Etats-Unis et en Europe, et plus de 5-11 % des cas de SLAs (Byrne et al. 2012). Cette mutation est une expansion à l'état hétérozygote d'une séquence hexanucléotidique (GGGGCC) répétée en tandem et située entre l'intron 1a et 1b du gène *C9orf72*. Chez les patients atteints de la SLA, le nombre de répétitions est supérieur à 100 alors que chez les individus sains, il peut y avoir 2 à 25 répétitions. Les études indiquent la présence très fréquente de troubles cognitifs ou du comportement dans les cas de SLA serait liée à une expansion dans *C9orf72*, ce qui distingue ces formes de celle liée à une mutation de *SOD1* dans laquelle les troubles cognitifs sont observés chez environ 2% des patients. La mutation *C9orf12* est également plus fréquente dans la DFT (34%) (Devenney et al. 2014).

I.6. Mécanismes physiopathologiques

Divers processus physiopathologiques semblent contribuer à la dégénérescence des motoneurones. Parmi les mécanismes physiopathologiques connus, citons : le stress oxydant, le dysfonctionnement mitochondrial, l'inflammation, l'hypoxie, l'excitotoxicité au glutamate et les cellules non-neurales telles que les astrocytes et les microglies (Mancuso and Navarro

2015; Veyrat-Durebex et al. 2014) (Figure 5). L'interaction entre les facteurs génétiques et micro-environnementaux contribue très fortement à la pathogenèse de la maladie (Moujalled and White 2016; Pasinelli and Brown 2006).

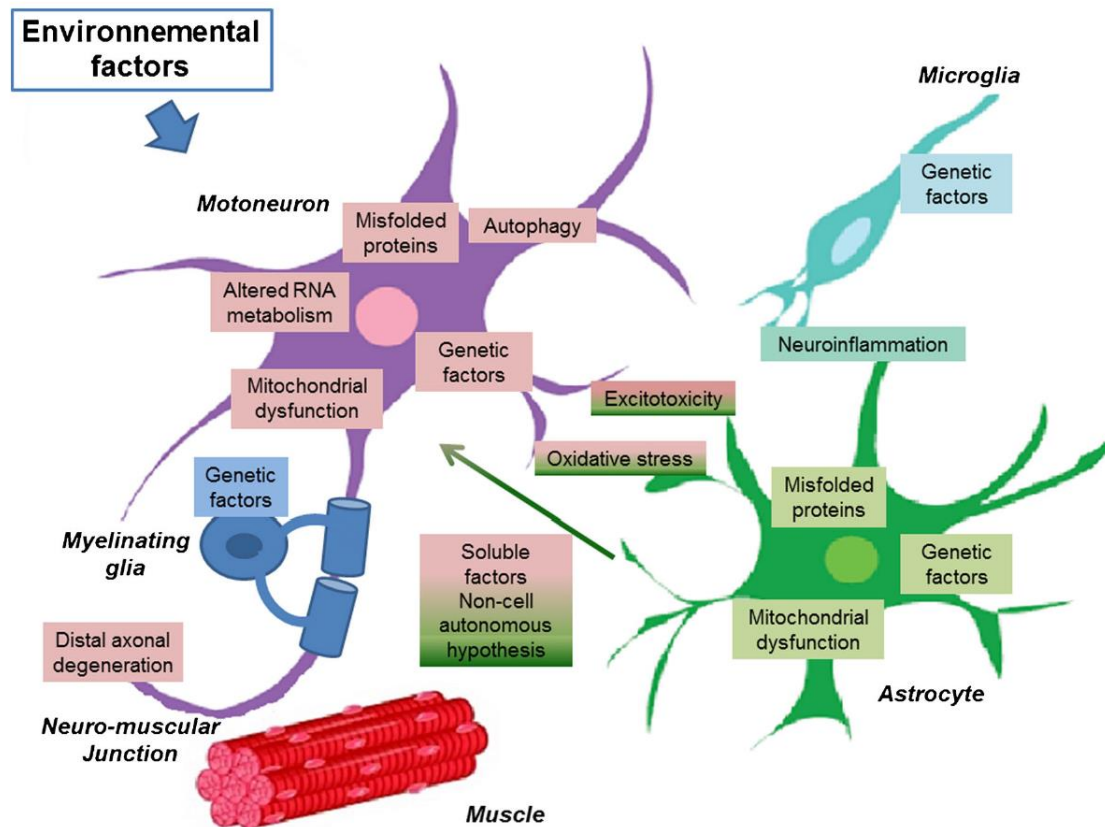


Figure 5 : Principaux mécanismes physiopathologiques de dégénérescence des motoneurones dans la SLA (d'après Veyrat-Durebex et *al.*, 2014)

I.6.1. Stress oxydant

Un intérêt particulier a été porté sur le stress oxydant dans la SLA du fait de la mutation du gène *SOD1*, qui code une protéine anti-oxydante majeure dans toutes les cellules. En outre, les analyses du liquide céphalo-rachidien (LCR), des urines, du plasma et des tissus du système nerveux central (SNC) post-mortem des patients SLA, ont montré une élévation des marqueurs biochimiques de dommages par les radicaux libres ou d'un métabolisme anormal des radicaux libres (Shaw et al. 1995b; Shibata et al. 2001). Parmi ces marqueurs du stress oxydant trouvés, il y a le 4-hydroxynonénal (issu de la peroxydation des lipides membranaires de la moelle épinière) (Simpson et al. 2004) et le 8-oxo-désoxyguanosine (forme oxydée de l'ADN)

(Bogdanov et al. 2000; Mitsumoto et al. 2008). Des études faites sur des modèles animaux et cellulaires de la SLA ont également montré des dommages oxydatifs (Barber and Shaw 2010; Kiskinis et al. 2014; Parakh et al. 2013). L'une des plus importantes conséquences du stress oxydatif est l'oxydation des ARNm principalement dans les motoneurones et les astrocytes à des stades précoces et pré-symptomatiques de la maladie. Certains ARNms paraîtraient plus sensibles à l'oxydation, comme les ARNm impliqués dans la chaîne de transport des électrons mitochondriaux, la biosynthèse protéique, la myélinisation et les voies du cycle de Krebs et de la glycolyse (Mancuso and Navarro 2015). Cependant les mécanismes pathogéniques à l'origine de l'augmentation de l'oxydation dans la SLA sont très peu connus.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que le stress oxydatif interagit avec d'autres mécanismes physiopathologiques qui participent à la dégénérescence des motoneurones, tels que l'excitotoxicité au glutamate, le dysfonctionnement mitochondriale, l'agrégation des protéines et les altérations de signalisation dans les astrocytes et la microglie. Récemment, un certain nombre de potentielles nouvelles thérapies antioxydantes ont été identifiés; cependant, celles-ci doivent franchir les étapes des essais pharmacologiques, pharmacocinétiques et cliniques (Miquel et al. 2014; Nanou et al. 2013).

I.6.2. Dysfonctionnement mitochondrial

Les premières études réalisées sur les tissus des patients atteints de la SLA avaient montré des anomalies structurelles et morphologiques dans les mitochondries au niveau des muscles, du foie, de la moelle épinière et du cortex moteur (Hirano et al. 1984; Sasaki and Iwata 1999). Cela paraît évident par la fréquence élevée des mutations de l'ADN mitochondrial identifiées dans les tissus du cortex moteur et de la diminution de l'ADN mitochondrial dans le muscle et la moelle épinière dans des cas de SLAs (Dhaliwal and Grewal 2000; Orrell and Schapira 2002; Wiedemann et al. 2002). Il a également été rapporté une diminution des copies d'ADN mitochondriaux (ADNmt) et une augmentation du nombre des mutations d'ADNmt, une dérégulation du métabolisme calcique intracellulaire (Zhou et al. 2010) et du transport axonal mitochondrial (Perlson et al. 2010) dans la SLA. Plusieurs autres études réalisées sur des modèles murins (Jung et al. 2002; Mattiazzi et al. 2002) et cellulaires (Menzies et al. 2002) de la SLA renforcent cette hypothèse de la dysfonction mitochondriale dans la SLA (Kawamata and Manfredi 2010). Cette dysfonction mitochondriale semble être multifactorielle (Tan et al. 2014). L'agrégation de la *SOD1* mutée dans les mitochondries est une caractéristique commune dans la SLA. Le consensus de la localisation mitochondriale est que la *SOD1* sauvage soit dans

Le canal VDAC participe activement au couplage calcique mitochondrie-réticulum endoplasmique (RE). Il est capable d'interagir avec le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3) du réticulum endoplasmique (ER) ainsi qu'avec d'autres protéines chaperonnes pour former un complexe de jonction entre ces deux organelles facilitant ainsi le transfert direct et local du calcium (**Figure 6**).

D'autres études ont mis en évidence une altération de la bioénergétique mitochondriale comme mécanisme mitochondrial conduisant à la mort cellulaire dans la SLA, nous pouvons citer la mutation dans la sous-unité I du cytochrome c oxydase (Comi et al. 1998), des mutations dans le gène mitochondrial tRNA (Borthwick et al. 2006), la déficience du complexe I et la diminution du rapport ATP / ADP (Ghiasi et al. 2012). En outre, la suppression de VDAC1 dans les souris exprimant la mutation *SOD1*, accélère l'apparition de la maladie (Israelson et al. 2010), ceci suggère que la bioénergétique mitochondriale est essentielle pour la survie des motoneurones.

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

I.6.3. Inflammation

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

La mort des motoneurones dans la SLA est accompagnée par une réponse neuro-inflammatoire marquée par l'activation de la microglie, des astrocytes et des lymphocytes T localisés au niveau des régions touchées dans le SNC (Brettschneider et al. 2012; Kawamata et al. 1992). Cette activation est suivie par la sécrétion des marqueurs d'inflammation tels que les espèces

réactives de l'oxygène (ROS), de l'oxyde nitrique (NO), de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), des molécules pro-inflammatoires (prostaglandines, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ et IL-6) et du glutamate (Almer et al. 2001; Frakes et al. 2014; Puentes et al. 2016; Robertson et al. 2001; Sargsyan et al. 2005). Ainsi, une augmentation du taux de prostaglandines E2 a été décrite dans le LCR de patients SLA (Almer et al. 2001). Par ailleurs, le niveau d'expression de la COX-2, une enzyme impliquée dans la synthèse des prostaglandines inflammatoires, est plus élevé dans la moelle épinière de patients SLA et de modèles murins de la pathologie (Almer et al. 2001; Yasojima et al. 2001). Le facteur de croissance des fibroblastes (FGF-1) sécrété par les motoneurones durant le stress oxydatif induit l'activation des astrocytes, qui à son tour initie l'apoptose des motoneurones. Plusieurs autres facteurs sont également impliqués dans les interactions cellules gliales-motoneurones, il s'agit notamment des facteurs neurotrophiques (NT) tels que le facteur de croissance transformant bêta ($\text{TGF-}\beta$), bFGF, le NT issu du cerveau (BDNF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance des nerfs (NGF) (Moisse and Strong 2006) (Figure 7-A).

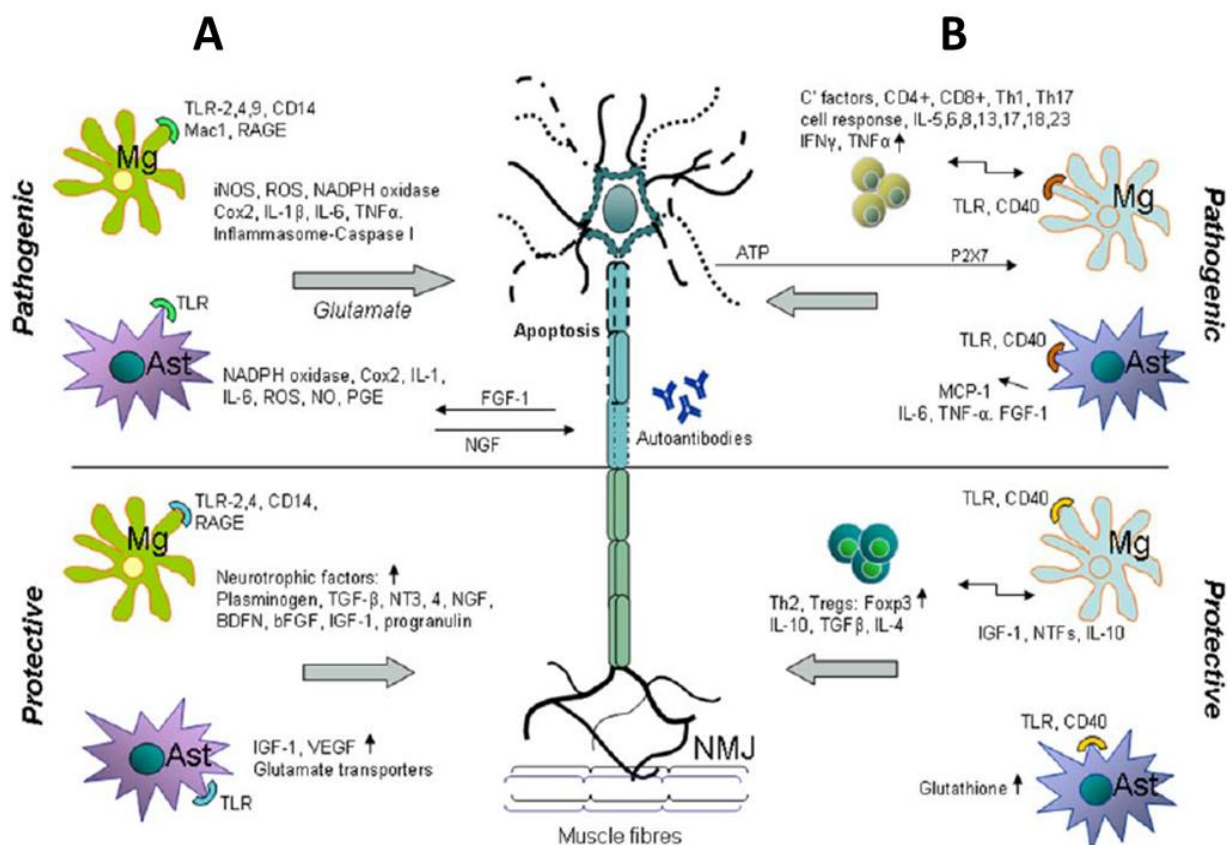


Figure 7 : Mécanisme de modulation de la réponse neuroinflammatoire par les cellules gliales dans la SLA. **A-** par activation des cellules gliales, **B-** par infiltration des cellules immunitaires.

Mg, microglie ; Ast, astrocytes ; NMJ, jonction neuromusculaire. (adapté de Puentes *et al.*, 2016)

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

Outre l'activation des cellules gliales, l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC est l'une des caractéristiques de la SLA et le rôle des cellules T dans la progression de la maladie a été clairement établi. En effet, les cellules T sont associées à la mort des motoneurones et le nombre des cellules T cytotoxiques CD8⁺ et les cellules NK (Natural Killer) corrèle avec la progression de la maladie. *A priori* les cellules T semblent jouer un rôle protecteur, Beers et ses collaborateurs avaient montré que les cellules T CD4⁺ renforçaient la neuroprotection médiée par les cellules gliales et permettaient ainsi de ralentir la progression de la maladie dans les modèles murins (Beers et al. 2008). Comme le montre la figure 7-B, l'expression de la protéine CD40 dans les cellules gliales semble être un élément clé de reconnaissance pour les cellules T. Les microglies activées peuvent d'avantage renforcer les réponses pro-inflammatoires (sécrétion de TNF- α , IL-6 et IL-1 β ...). La protéine MCP-1 secrétée par les astrocytes favorise l'infiltration des microglies et des macrophages dans les tissus atteints.

Les cellules gliales peuvent également exercer un rôle protecteur dans la pathophysiologie de la SLA. Les cellules microgliales sécrètent des facteurs anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) et aussi des facteurs de croissance (Beers et al. 2011; Lewis et al. 2012). L'augmentation de taux des cellules régulatrices T FoxP3⁺ et la production de TGF- β et IL-4 protégeraient les motoneurones et seraient associées au ralentissement de la progression de la SLA (Henkel et al. 2013). Les astrocytes jouent un rôle protecteur en sécrétant des facteurs de croissance, en régulant l'expression du transporteur au glutamate GLT1 et en augmentant la sécrétion du glutathion qui protégerait les motoneurones du stress oxydatif (Vargas and Johnson 2010).

I.6.4. Rôle des cellules gliales

Comme les cellules microgliales, les astrocytes réactifs expriment des facteurs pro-inflammatoires et interagissent avec les motoneurones (Figure 7). Par conséquent, leur dysfonctionnement pourrait altérer le fonctionnement des motoneurones. La présence d'inclusions contenant la *SOD1* mutée dans les astrocytes a été rapportée chez des patients et des modèles murins de la SLA (Bruijn et al. 1997; Levine et al. 1999; Schiffer et al. 1996; Schiffer and Fiano 2004).

Il a été rapporté en 2001 et 2002 que l'expression sélective des mutations *SOD1* dans les motoneurones dans les souris transgéniques était insuffisante pour développer la maladie (Lino et al. 2002; Pramatarova et al. 2001). Ces études avaient suggéré une implication des cellules gliales dans la mort des motoneurones dans les modèles de la SLA. En 2003, Clement et ses collaborateurs (Clement et al. 2003a) avaient créé des souris chimériques en injectant des cellules souches embryonnaires sauvages qui se sont développées en cellules non neuronales de la moelle épinière dans les souris transgéniques *SOD1* mutée. La présence des cellules non neuronales exprimant la mutation *SOD1* induisait un phénotype SLA dans les motoneurones sauvages avoisinants et inversement, la présence des cellules non-neuronales sauvages améliorait le phénotype SLA et prolongeait la survie des motoneurones.

L'identification des astrocytes comme étant des cellules non-neuronales majeures dans la pathogénèse de la *SOD1* a été renforcée en 2007 par l'étude réalisée par Di Giorgio et ses collaborateurs (Di Giorgio et al. 2007). Ils ont étudié les motoneurones obtenus à partir des cellules souches embryonnaires, comprenant des cellules portant la mutation G93A ainsi que des cellules sauvages et cultivées avec des cellules gliales mutantes. Les motoneurones sauvages et mutants *SOD1* avaient tous les deux développé des signes de neurodégénérescence en présence des cellules gliales mutantes. La même année, Nagai et ses collaborateurs (Nagai et al. 2007) avaient montré que l'expression de la mutation *SOD1* uniquement dans les motoneurones des souris n'était pas suffisante pour induire la neurodégénérescence mais quand les motoneurones sauvages de la moelle épinière ou des cellules souches embryonnaires étaient cultivées avec les astrocytes mutants *SOD1*, la mort neuronale se produisait. De plus, les effets toxiques des mutants astrocytes étaient motoneurone-spécifiques, et ceci indépendamment de la présence des mutations *SOD1* dans les autres types cellulaires (les fibroblastes, la microglie, les neurones corticaux et les myocytes). D'autres études ont également soutenu ce caractère non-neuronal de la toxicité des mutations *SOD1* dans la SLA (Yamanaka et al. 2008) .

Cependant le mécanisme par lequel les astrocytes induisent la mort des motoneurones n'est pas encore totalement élucidé.

Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann ont également été impliquées dans la SLA. Elles ont pour fonction principale de doter les axones de gaines de myéline afin d'améliorer la propagation des signaux dans le SNC pour les oligodendrocytes et dans le système nerveux périphérique (SNP) pour les cellules de Schwann. Il a été rapporté une dérégulation et une dysfonction oligodendrocytaire chez les patients atteints de la SLA et dans les modèles murins de la maladie (Mackenzie et al. 2011; Philips et al. 2013b). En effet, la dysfonction des oligodendrocytes était observée avant l'apparition de la maladie (Kang et al. 2013).

I.6.5. Hypoxie

Plusieurs études ont mis en évidence une susceptibilité particulière des motoneurones à l'hypoxie dans les modèles murins de SLA : il existerait une altération précoce, préclinique, de la barrière hémato-encéphalique et spinale ; et des anomalies qualitatives et quantitatives de plusieurs facteurs angiogéniques ont également été mises en évidence chez le modèle murin (VEGF, angiogénine) (Tankersley et al. 2007). Peu de résultats ont néanmoins été répliqués chez l'homme, chez qui il faut tenir compte de l'existence de deux types d'hypoxémies : une hypoxémie chronique, définie par une pression partielle en O₂ inférieure à 60% à distance de toute décompensation respiratoire, associée à une diminution de la capacité vitale, et une hypoxémie intermittente, caractérisée par des épisodes de désaturation répétées avec ré-oxygénation. Ces deux voies sont complémentaires et mettent en jeu des réponses différentes au niveau cellulaire : la voie du facteur de transcription sensible à l'hypoxie (HIF-1 et -2) pour l'hypoxie prolongée ; et la voie du facteur de transcription nucléaire kappa B (NFκ-B) et des médiateurs inflammatoires pour les épisodes d'hypoxémies intermittentes. Les dosages des taux de différents médiateurs dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de SLA sporadique, à divers stades évolutifs de la maladie (VEGF, angiogénine, angiopoïétine-2, érythropoïétine, IL-6, TNF-α et PGE-2) ont mis en évidence des anomalies de la voie HIF-1/VEGF/ANG chez les patients atteints de SLA hypoxémiques par rapport aux patients neurologiques n'ayant pas une SLA (Devos et al. 2004; Moreau et al. 2011; Nagata et al. 2007). Les taux d'IL-6, de TNF-α, d'ANG-2, de VEGF et de PGE-2 étaient élevés chez les patients SLA et corrélés à la sévérité de l'hypoxie, ce qui pourrait témoigner d'un mécanisme de compensation (Gao et al. 2014; Just et al. 2007; Moreau et al. 2010).

I.6.6. Altération du métabolisme

Le dysfonctionnement du métabolisme dans la SLA a été rapporté depuis plusieurs années (Hatazawa et al. 1988; Reyes et al. 1984; Van den Bergh et al. 1978). Plusieurs études ont montré que les patients SLA présentaient une altération de l'homéostasie énergétique et ce déséquilibre influence négativement la progression de la maladie et la survie des patients (Desport et al. 2001; Desport et al. 2005; Dupuis et al. 2004; Dupuis et al. 2011; Gallo et al. 2013; Shimizu et al. 2012). D'autres évidences proviennent des études réalisées sur des modèles murins de SLA qui présentent un hypermétabolisme et une altération du métabolisme du glucose et des lipides (Dupuis et al. 2004; Dupuis et al. 2011; Palamiuc et al. 2015).

I.6.6.1. Altération de l'homéostasie métabolique dans la SLA

L'homéostasie énergétique résulte de l'équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Dans la population saine, l'alimentation est théoriquement en balance avec les dépenses énergétiques de repos (DER) et les dépenses énergétiques liées à l'activité. Les réserves d'énergie, principalement sous forme de triglycérides dans les adipocytes, ainsi que l'indice de masse corporelle (IMC) sont alors relativement stables. Une personne est considérée comme hypermétabolique si le ratio métabolique (DER mesurées/DER théoriques) est supérieur à 1,1 (ou 110%). Une prévalence élevée d'hypermétabolisme a été montrée chez les patients SLA, selon les études, 47,5 à 68% des patients sont hypermétaboliques et les DER mesurées sont en moyenne 14 à 20% supérieures aux DER théoriques (Desport et al. 2001; Desport et al. 2005). Dans la SLA, la balance énergétique est profondément altérée. En effet, les patients SLA présentent généralement une dyslipidémie, un IMC faible et une augmentation des DER au cours de la maladie (Desport et al. 2001; Dupuis et al. 2011; Funalot et al. 2009). Des altérations énergétiques similaires ont été trouvées dans les modèles murins de la SLA (Dupuis et al. 2004; Fergani et al. 2007; Kim et al. 2011). Cependant l'origine de ce déficit énergétique observée chez les patients SLA reste malheureusement inconnue à ce jour. Une étude portant sur des souris *SOD1* a montré que la correction du déficit énergétique par un régime riche en graisse a permis de retarder l'apparition de la maladie avec une augmentation de la survie et de réduire la dénervation musculaire et la mort des neurones moteurs (Dupuis et al. 2004; Zhao et al. 2012). En revanche, la restriction calorique chez ces souris a aggravé la maladie avec une réduction de la survie (Hamadeh and Tarnopolsky 2006; Patel et al. 2010). Ces études suggèrent donc que l'hypermétabolisme basal est un événement précoce dans la SLA et qu'il participe à la pathogenèse de la maladie.

Il a été rapporté une altération du métabolisme du glucose et un défaut de β -oxydation des acides gras chez les patients SLA (Pradat et al. 2010; Sanjak et al. 1987). Cependant, l'intolérance au glucose documentée dans la SLA (Gonzalez de Aguilar et al. 2005; Harno et al. 1984; Koerner 1976; Perurena and Festoff 1987) pourrait être considérée comme étant secondaire à la maladie à cause de l'atrophie des muscles (Reyes et al. 1984). Des récentes études rétrospectives ont confirmé une association modérée mais significative du diabète avec l'apparition de la SLA (Lekoubou et al. 2014; Mariosa et al. 2015; Sun et al. 2015), suggérant ainsi que l'altération du métabolisme du glucose pourrait jouer un rôle clé dans le déséquilibre énergétique.

L'altération du métabolisme lipidique dans la SLA a été bien documentée. En 1987, Sanjak et ses collaborateurs avaient montré une déficience en corps cétoniques chez les patients SLA durant l'exercice physique, il est à noter que la β -oxydation des acides gras est une source importante des corps cétoniques (Sanjak et al. 1987). En 2008, il a été rapporté que la dyslipidémie définie par le ratio LDL/HDL était caractéristique de la SLA et qu'elle corrélait positivement avec la survie des patients SLA (Dupuis et al. 2008). Les patients SLA semblent présenter une hyperlipidémie avec notamment une augmentation du cholestérol, du LDL, des triglycérides et du ratio LDL/HDL (Dedic et al. 2012; Dupuis et al. 2008). Une étude récente réalisée dans notre équipe a retrouvé une hypercholestérolémie au diagnostic chez près de 70% des patients présentant une SLA sporadique (Patin et al. 2015). Une autre étude observationnelle prospective a retrouvé une hypercholestérolémie chez 73% des patients SLA à l'inclusion alors qu'elle n'a été retrouvée que chez 64% des patients après 18 mois (Rafiq et al. 2015). Des études ont montré que soit l'hyperlipidémie ou un fort IMC serait un facteur de pronostique de survie (Dorst et al. 2011; Paganoni et al. 2011; Reich-Slotky et al. 2013; Shimizu et al. 2012), ceci renforce l'hypothèse d'un bénéfice de la masse grasse sur l'évolution de la maladie. Malgré les nombreux éléments évoqués, les causes et les conséquences exactes des troubles du métabolisme énergétique dans la SLA restent encore à déterminer.

I.6.6.2. Gènes associés à la SLA sont régulateurs du métabolisme énergétique

Il a été constaté que la déplétion du gène *TARDBP* dans les souris entraîne une perte dramatique de la masse grasse, suivie par une mort rapide et induit une diminution du niveau de la protéine Tbc1d1 (Chiang et al. 2010). La Tbc1d1 est une protéine Rab GTPase qui régule le métabolisme du glucose, la lipolyse et la sensibilité à l'insuline (Hargett et al. 2015). Inversement, la

surexpression de la protéine TDP-43 sauvage ou portant la mutation A315T dans le SNC entraîne la prise de poids, l'augmentation de la masse grasse et la résistance à l'insuline. L'hyperglycémie retrouvée dans les formes familiales de SLA pourrait également être liée à une mutation du gène *SOD1* (Hamasaki et al. 2015). En effet, Wang et ses collaborateurs avaient montré que la délétion de la *SOD1* induit une diminution de la production du glucose hépatique et du stockage de glycogène, et une augmentation des lipides hépatique chez les souris adultes (Wang et al. 2012). Cette délétion de la *SOD1* inhibe également la sécrétion des triglycérides dans le sang et conduit à l'altération du stockage lipidique dans les entérocytes des souris soumises à un régime riche en matière grasse (Kurahashi et al. 2012). En outre, la surexpression de la *SOD1* mutée G93A dans les souris induit une altération de la modulation du métabolisme de glucose par l'insuline dans les muscles (Smittkamp et al. 2014), une réduction de la masse grasse et une altération du métabolisme lipidique (Fergani et al. 2011). Il a été rapporté également que les mutations *FUS* dans les cellules en culture sont associées à une diminution des niveaux d'adénosine triphosphate (ATP) (Wang et al.). Des patients porteurs des mutations *C9Orf72* ont présenté une altération du métabolisme du glucose dans plusieurs régions cérébrales (Cistaro et al. 2014). Toutes ces études suggèrent que les facteurs génétiques dans la SLA pourraient converger vers un dysfonctionnement métabolique commun, cependant les mécanismes moléculaires sous-jacents de la régulation métabolique exercée par ces gènes restent à élucider.

Au vu de ces hypothèses, plusieurs études métaboliques ont été menées à partir de plusieurs échantillons biologiques (plasma, sérum, du LCR...) des patients atteints de la SLA (cf paragraphe « études métabolomiques dans la SLA » page 83)

II. Rôle du glutamate dans le système nerveux central

Bien que l'on sache depuis les années 1950 que le glutamate (ou l'acide glutamique) peut avoir des effets toxiques sur le système nerveux central (SNC) (Curtis and Watkins 1960; Hayashi 1952), il a fallu attendre les années 1980 pour qu'il soit vraiment reconnu comme étant le principal transmetteur exciteur dans le système nerveux des vertébrés (Collingridge and Lester 1989a; Fonnum 1984). A l'origine, le glutamate a été supposé avoir une fonction métabolique dans le SNC (Krebs 1935), comme il a été trouvé à l'intérieur de nombreux compartiments cellulaires, y compris le cytosol et les mitochondries de tous les types cellulaires du système nerveux central. Cependant, on sait maintenant que, malgré sa nature ubiquiste, le niveau de glutamate extracellulaire est en effet étroitement régulé, ce qui lui permet de fonctionner comme le principal neurotransmetteur exciteur dans le SNC des mammifères. Le glutamate est donc un acide aminé indispensable dans le SNC, mais en même temps aussi un acide aminé potentiellement toxique. Il est l'un des principaux constituants des protéines, mais le glutamate en état libre est aussi concerné dans divers procès métaboliques. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la cognition, la mémoire, l'apprentissage, la motricité (Danbolt 2001b) mais aussi le développement du SNC comme la plasticité synaptique, la différenciation, la migration et la mort neuronale (Komuro and Rakic 1993) et le métabolisme énergétique (Rodriguez-Rodriguez et al. 2013). Il est également impliqué dans de nombreuses pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et la SLA (Coyle and Puttfarcken 1993; Doble 1999).

Le glutamate est présent en concentration importante dans le SNC et est principalement répandu à l'intérieur du cytoplasme des neurones (5-15 mmol/kg de tissus frais en fonction des régions) (Danbolt 2001b; Hawkins 2009), tandis qu'il est présent à de plus faibles concentrations dans le milieu extracellulaire (0.5 - 2 μ M) (Hawkins 2009) et dans le liquide céphalo-rachidien (<1 μ M) (Meldrum 2000). Chez l'adulte, la concentration en glutamate plasmatique est 100 fois plus élevée que celle du milieu extracellulaire du SNC (Hawkins 2009), car cet acide aminé peut également avoir un rôle au niveau d'autres organes comme le cœur, les intestins, les reins, le pancréas et le placenta (Danbolt 2001b).

II.1. Neurotransmission glutamatergique

Contrairement aux autres neurotransmetteurs comme le GABA (acide γ -aminobutyrique), la glycine (acide amino acétique) et la taurine qui sont des inhibiteurs, le glutamate et l'aspartate sont excitateurs. Le glutamate est synthétisé à partir de la glutamine ou de l' α -cétooglutarate dans les neurones et les cellules gliales et en plus dans les neurones par le cycle glutamate-glutamine (Figure 8). Dans les neurones, le glutamate est stocké dans des vésicules synaptiques grâce aux récepteurs vésiculaires (v-GLuT). Durant la neurotransmission, le glutamate contenu dans les vésicules des neurones présynaptiques est libéré dans la fente synaptique en réponse à la dépolarisation membranaire et active les récepteurs du glutamate (AMPA, NMDA, Kainate et mGluR) au niveau des neurones post-synaptiques (Figure 8). Le signal d'excitation se termine par une clairance active du glutamate de la fente synaptique par les transporteurs du glutamate (EAAT) localisés à la fois sur les astrocytes et les terminaisons présynaptiques. Cette recapture est essentiellement gliale (Kritis et al. 2015). Les astrocytes sont à l'origine de la majeure partie du glutamate repris par les cellules gliales dans des conditions normales.

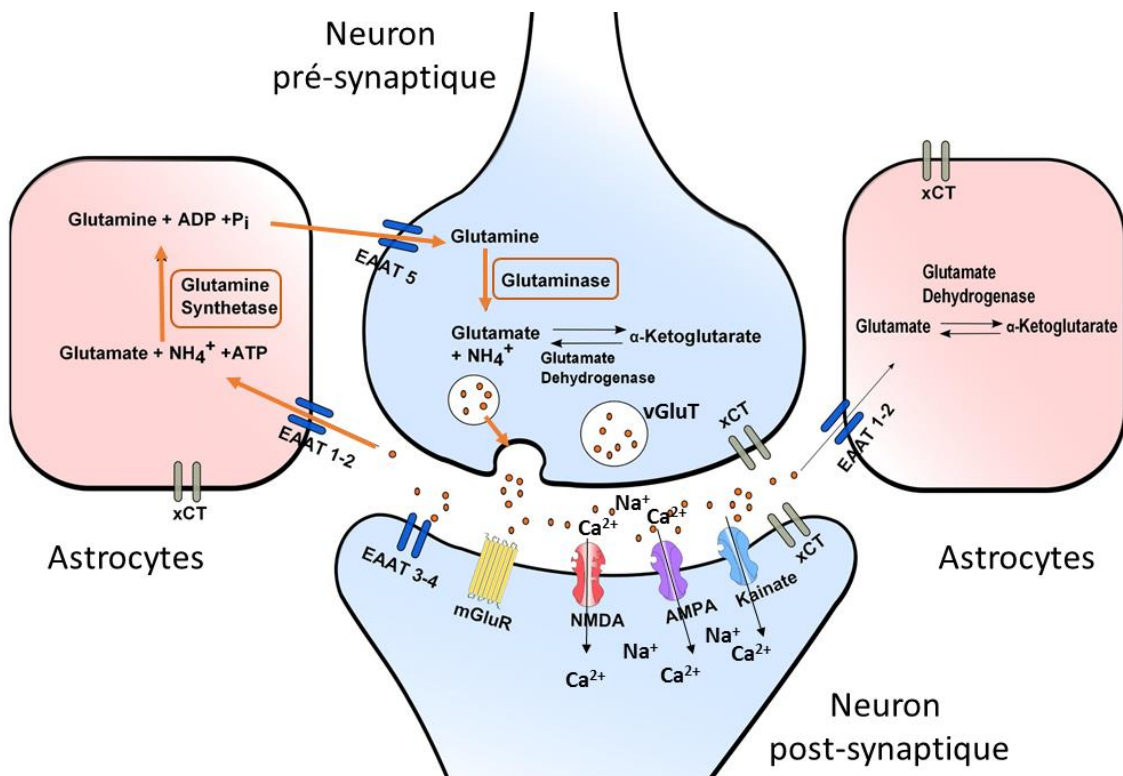


Figure 8 : La libération et la recapture du glutamate au niveau de la fente synaptique et le cycle glutamate/glutamine (Figure adaptée de Kristis *et al.*, 2015).

II.1.1. Cycle glutamate-glutamine

Le cycle glutamate-glutamine représente le mécanisme central dans la régulation de la concentration du glutamate au niveau des terminaisons neuronales. Le glutamate capturé par les astrocytes est converti en glutamine par une enzyme spécifique aux astrocytes, la glutamine synthétase (Martinez-Hernandez et al. 1977). La glutamine formée est à nouveau libérée dans l'espace extracellulaire, où elle est transportée dans le neurone présynaptique et reconvertie ensuite en glutamate par la glutaminase (Kritis et al. 2015; Laake et al. 1995; Waniewski and Martin 1986). Le glutamate néoformé est ensuite libéré dans le milieu extracellulaire *via* les transporteurs vésiculaires du glutamate (vGLuT) (Figure 8).

Le glutamate capturé par les astrocytes peut également être oxydé en α -cétooglutarate *via* la glutamate déshydrogénase (McKenna et al. 1996; Yu et al. 1982) (Figure 8). Cette dernière voie montre clairement qu'en plus d'être un transmetteur exciteur, le glutamate est un substrat métabolique important dans les astrocytes (Dienel and Cruz 2006; Hawkins 2009). La fonction du glutamate comme neurotransmetteur dépend fortement du métabolisme des astrocytes (Hertz 2006). Le mécanisme de recapture du glutamate par les astrocytes *via* les transporteurs est capital dans la clairance du glutamate synaptique car il permet de maintenir la concentration du glutamate extérieure faible (Rothstein et al. 1996) et protégeant ainsi les neurones des effets délétères du glutamate, notamment la suractivation des récepteurs du glutamate (excitotoxicité).

II.1.2. Récepteurs du glutamate

Le glutamate exerce donc son rôle de neurotransmetteur exciteur en agissant sur deux types de récepteurs du glutamate : les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques (Figure 9). Ces récepteurs sont exprimés principalement dans le SNC et sont situés sur la surface des neurones et aussi des cellules gliales.

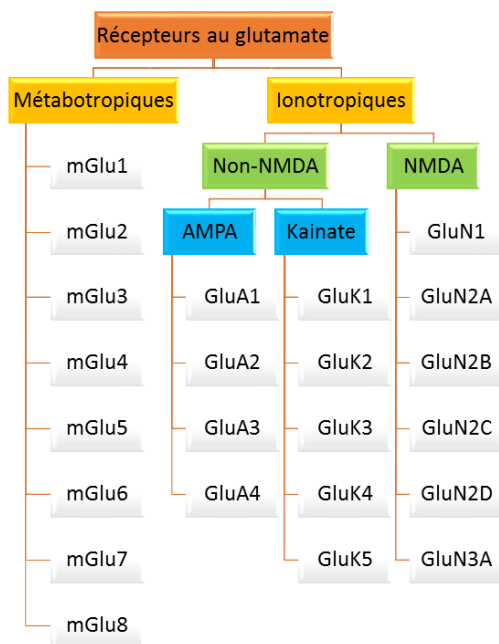


Figure 9 : Classification des récepteurs du glutamate : métabotropiques et ionotropiques

II.1.2.1. Récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques sont divisés en trois familles nommés en fonction de la spécificité pharmacologique de leur agoniste : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate (AMPA), N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et kainate (KA) (Figure 9). *In vivo*, ces récepteurs sont composés d'au moins quatre sous unités sous forme d'hétéro- ou homo-oligomères : les récepteurs NMDA sont composés de sous-unités GluN1 et GluN2 (A-D), les récepteurs AMPA sont des tétramères composés d'une association variable de quatre sous-unités (GluA1-4) et les récepteurs KA sont des combinaisons tétramériques des sous unités (GluK1-5) (Figure 9). Ces récepteurs ionotropiques incorporent des canaux ioniques qui sont perméables aux cations. Leur activation entraîne un influx d'ions Na^+ et Ca^{2+} dans les cellules qui provoque une dépolarisation et par conséquent génère un potentiel d'action. Leur perméabilité relative aux Na^+ et Ca^{2+} varie en fonction de la famille et de la composition des sous-unités du récepteur (Dingledine et al. 1999; Sommer and Seeburg 1992). Les récepteurs NMDA peuvent se lier au glutamate, à la glycine, au Mg^{2+} , Zn^{2+} et les polyamines. Ils forment des canaux plus perméables aux Ca^{2+} qu'aux Na^+ et K^+ . Ce sont des hétéromères GluN1/GluNx, la sous unité GluN1 est obligatoire pour avoir un canal fonctionnel car elle porte le site de liaison de la glycine (Schell et al. 1995). Les récepteurs KA et AMPA interagissent uniquement avec le glutamate et leurs agonistes spécifiques, et présentent une forte perméabilité aux Na^+ et K^+ comparé aux Ca^{2+} (Kostandy 2012).

Contrairement aux récepteurs NMDA qui sont toujours perméables aux Ca^{2+} , les récepteurs AMPA présentent des niveaux de perméabilité variables en fonction de la présence ou l'absence de la sous-unité GluA2. La sous-unité GluA2 module la perméabilité aux Ca^{2+} , cette sous-unité subit l'édition (mutation post traductionnelle d'une Glutamine (Q) en Arginine (R)) qui lui retire sa perméabilité aux Ca^{2+} . Donc un hétéromère contenant GluA2 n'est pas perméable aux Ca^{2+} . Comme les récepteurs AMPA contiennent pratiquement tous la GluA2 éditée, ils ne laissent pas passer ou très peu de Ca^{2+} (voir schéma suivant Figure 10). Les hétéromères GluA1/GluA2 et GluA3/GluA2 sont les plus représentés dans le SNC (Hollmann et al. 1991; Hume et al. 1991).

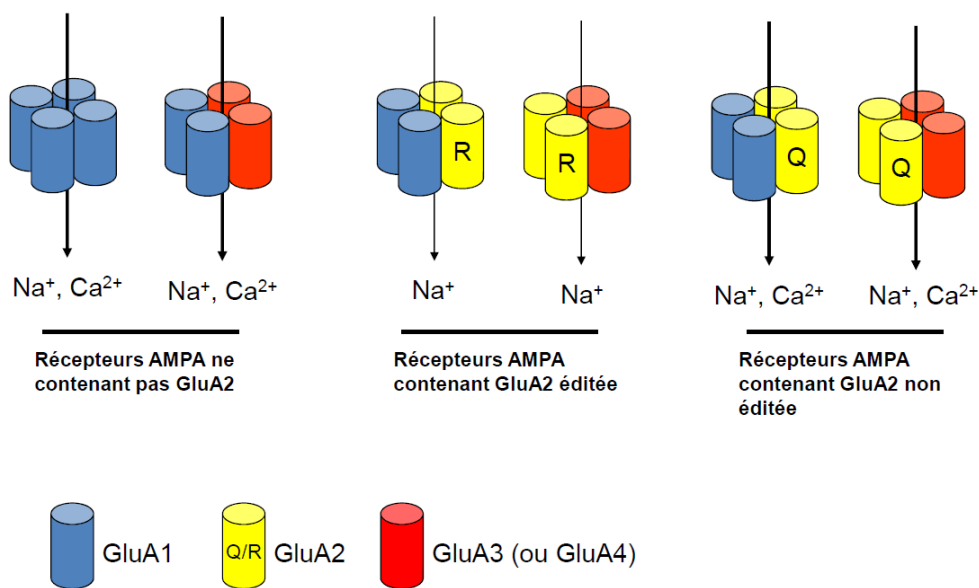


Figure 10 : Perméabilité aux Ca^{2+} des récepteurs AMPA. L'édition de la sous-unité GluA2, à savoir la mutation d'une glutamine (Q) en arginine (R), retire la perméabilité aux Ca^{2+} .

Au niveau fonctionnel, les récepteurs AMPA sont les plus importants dans la médiation de la neurotransmission excitatrice rapide (Collingridge and Lester 1989b). D'autre part, les récepteurs NMDA interviennent dans la composante tardive de la transmission excitatrice et jouent un rôle clé dans l'induction de la plasticité synaptique (Nicoll and Malenka 1999). Le rôle des récepteurs KA dans des conditions physiologiques et pathologiques reste très peu connu, ils interviendraient dans les actions post-synaptiques du glutamate (Lerma and Marques 2013).

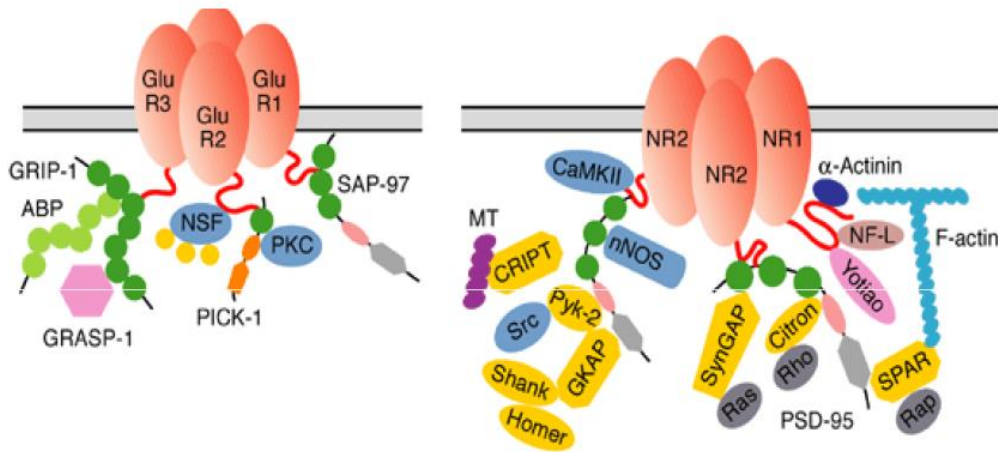


Figure 11 : Protéines d'interaction avec les récepteurs du glutamate (d'après Aarts *et al.*, 2003)

Les récepteurs du glutamate sont engagés dans des complexes multimériques grâce à des interactions avec des protéines postsynaptiques (Figure 11). Ces complexes régulent le trafic des récepteurs entre la membrane et le milieu intracellulaire. Ils peuvent aussi permettre des couplages entre deux récepteurs comme NMDA et mGlu. Les protéines Homer permettent de maintenir les récepteurs mGlu1/5 à proximité des protéines impliquées dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire et des récepteurs NMDA par l'intermédiaire de Shank (Figure 11).

II.1.2.2. Récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques sont couplés aux protéines G (α , β , γ) et influencent le système des seconds messagers dans les diverses fonctions telles que l'apprentissage, la mémoire, l'anxiété et la douleur. Ces récepteurs sont classés en trois groupes : mGlu1 et mGlu5 composent le groupe I, mGlu2 et mGlu3 composent le groupe II et mGlu4, mGlu6-8 composent le groupe III (Figure 9). Ils sont localisés à la fois au niveau pré- et post-synaptique.

Les récepteurs du groupe I sont couplés à la dégradation des phosphoinositides par Gq conduisant à la synthèse d'IP3 et à la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire (Kostandy 2012). Le groupe II et III inhibent l'action de l'adénylate cyclase par Gi/Go, conduisant à une diminution de la synthèse de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). La réduction des niveaux de l'AMPc pourrait inhiber la libération du glutamate par les cellules gliales et permettant ainsi la neuroprotection (Kostandy 2012; McMullan *et al.* 2012). Les récepteurs mGlu semblent donc moduler l'effet toxique du glutamate dans les neurones par des mécanismes qui restent à ce jour très peu compris (Anneser *et al.* 1998; McMullan *et al.* 2012; Pizzi *et al.* 2000).

II.1.3. Transporteurs du glutamate

Le glutamate est libéré au niveau de la fente synaptique par les neurones présynaptiques, mais les cellules non neuronales comme les astrocytes elles aussi libèrent et re-capturent du glutamate grâce aux transporteurs du glutamate (Bonansco et al. 2011; Perea and Araque 2007).

Il existe 3 et 4 types de récepteurs du glutamate chez les murins et les humains respectivement: GLT-1 (transporteur des acides aminés excitateurs chez les humains EAAT₂), qui est le transporteur spécifique aux astrocytes et le plus fréquent. EAAC1 (l'équivalent de EAAT₃ chez les humains) qui a une localisation neuronale, et GLAST (l'équivalent de EAAT₁ chez les humains) qui est un transporteur des astrocytes localisé préférentiellement au niveau du cortex cérébral (Kanai and Hediger 1992; Pines et al. 1992), EAAT₄ est le transporteur aspartate/glutamate chez l'humain, exprimé principalement dans le cervelet (Fairman et al. 1995).

La concentration du glutamate extracellulaire est fortement régulée par les astrocytes *via* les transporteurs du glutamate qu'ils contiennent. Ces astrocytes jouent ainsi un rôle capital dans la clairance du glutamate synaptique et permettent de maintenir la concentration du glutamate extérieure faible afin d'éviter la sur-stimulation des récepteurs du glutamate (excitotoxicité).

II.2. L'excitotoxicité dans la SLA

Le concept d'excitotoxicité a été formulé la première fois par Olney (Olney 1978) et était basé sur le fait que les acides aminés qui induisaient la mort neuronale étaient les seuls connus pour activer les récepteurs aux acides aminés excitateurs. L'augmentation anormale de la concentration de glutamate peut induire une sur-stimulation continue et incontrôlée des récepteurs du glutamate. Cette sur-stimulation des récepteurs entraîne une dérégulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire et initie ainsi une cascade de voies de signalisation conduisant à une sur-régulation des nNOS (nitric oxide synthase), dysfonctionnement mitochondriale, dérégulation de la phosphorylation oxydative, la production des ROS (espèces réactives de l'oxygène) (Reynolds and Hastings 1995), le stress du réticulum endoplasmique (RE) et la sécrétion des enzymes lysosomales conduisant à la mort neuronale (Figure 13). L'excitotoxicité est donc une dégénérescence neuronale induite par une sur-stimulation des récepteurs du glutamate. Plusieurs études ont montré que l'excitotoxicité induite par le glutamate pourrait contribuer aux lésions neuronales dans l'accident vasculaire cérébral (AVC),

les neurotraumatismes, l'épilepsie, et un certain nombre de maladies neurodégénératives, y compris la SLA (Coyle and Puttfarcken 1993; Doble 1999).

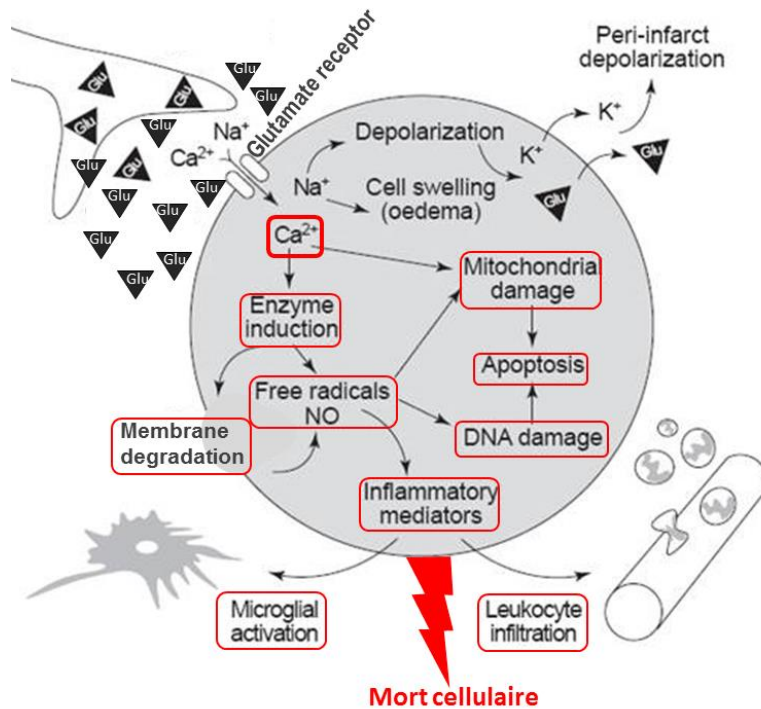


Figure 12 : Mécanisme de l'excitotoxicité induite par le glutamate et les différentes cascades de signalisation, à l'origine de la dégénérescence neuronale.

Bien que l'on sache depuis plus d'un demi-siècle que le glutamate peut être toxique pour les cellules nerveuses (Lucas and Newhouse 1957), il n'y a que depuis plus d'une vingtaine d'années que fut décrit pour la première fois une augmentation de la quantité de glutamate dans le plasma (Plaitakis and Carosco 1987), le liquide cérébro-spinal (LCR) et dans le SNC des patients SLA (Rothstein et al. 1990; Shaw et al. 1995a). Cependant, toutes les études ne confirment pas ces résultats (Perry et al. 1990), potentiellement à cause de la grande hétérogénéité dans la population des patients SLA et de l'instabilité métabolique du glutamate dans les échantillons biologiques. De manière particulièrement intéressante, les études ont montré que la quantité élevée de glutamate dans le sérum (Roisen et al. 1982) et LCR (Couratier et al. 1993) des patients SLA serait toxique pour les neurones en cultures en activant les récepteurs du glutamate non NMDA. De plus amples recherches démontrèrent que cette augmentation serait due à une recapture moindre du glutamate par les astrocytes et plus tard il a été montré une diminution de l'expression des transporteurs du glutamate dans des astrocytes

des patients SLA (Rothstein et al. 1992; Rothstein et al. 1995). Cependant aucune corrélation directe n'a été établie entre la toxicité induite et la concentration de glutamate dans le LCR ou le sérum des patient SLA. L'argument le plus important et le plus en faveur de l'hypothèse de l'excitotoxicité dans la SLA est qu'à ce jour le seul médicament approuvé pour le traitement de la SLA est le riluzole, qui possède des propriétés anti-glutamatergique et neuroprotectrice contre l'excitotoxicité (Bensimon et al. 1994; Lacomblez et al. 1996). Par ailleurs, le mécanisme d'action du glutamate reste une piste intéressante pour d'autres agents thérapeutiques ciblant le métabolisme du glutamate (Blasco et al. 2014b).

II.2.1. Vulnérabilité des motoneurones à l'excitotoxicité

Les motoneurones diffèrent des autres cellules neuronales dans le SNC par leur grande taille, leur fort ratio longueur axonale sur le diamètre du soma, leur grande capacité métabolique (McIlwain 1991), leur forte concentration en neurofilaments (Lee and Cleveland 1996) et des enzymes de capture de radicaux libres (Shaw et al. 1997), et leur forte densité en récepteurs du glutamate (Shaw et al. 1991). En ce qui concerne l'excitotoxicité induite par le glutamate, les motoneurones présentent deux propriétés intrinsèques spécifiques qui les rendent particulièrement vulnérables. La première propriété est le profil particulier de l'expression des sous unités du récepteur du glutamate AMPA, avec une expression de GluA1, GluA3 et GluA4 mais une expression non détectable de l'ARNm de GluA2 (Sun et al. 2006). La sous unité GluA2 joue un rôle important et déterminant dans la perméabilité au calcium du récepteur AMPA (Burnashev et al. 1992). La plupart des hétéro-oligomères de sous unités de récepteur AMPA dans le SNC humain possède la forme éditée de GluA2 qui les rend imperméables au calcium (Bettler and Mulle 1995). Ainsi l'absence de l'expression de la sous unité GluA2 dans les motoneurones chez les humains favorisant la perméabilité des récepteurs AMPA pourrait potentiellement rendre les motoneurones vulnérables à l'excitotoxicité par une augmentation de l'influx calcique durant l'activation des récepteurs du glutamate. La seconde propriété est l'absence de l'expression des protéines fixant le calcium telles que la parvalbumine et la calbindine D28K dans les motoneurones humains (Ince et al. 1993). Ces protéines liant le calcium intracellulaire pourraient jouer un rôle très important dans la protection des neurones contre les effets néfastes du calcium qui suit l'activation des récepteurs du glutamate. Ces propriétés semblent essentielles pour le bon fonctionnement du motoneurone mais dans les conditions pathologiques elles pourraient devenir responsables de la mort sélective des motoneurones dans la SLA. L'excitotoxicité dans la SLA peut être induite soit directement par

une augmentation du glutamate extracellulaire (une augmentation du relargage ou réduction de la clairance du glutamate), ou indirectement par une réponse inappropriée au glutamate (une hypersensibilité au glutamate, une altération de l'expression ou de la fonction des récepteurs du glutamate, une modification des canaux ioniques et de l'excitabilité) (King et al. 2016).

II.2.2. Excitotoxicité directe

L'augmentation du glutamate extracellulaire dans la SLA a conduit à l'hypothèse du dysfonctionnement de la régulation du glutamate extracellulaire. Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont confirmé l'hypothèse du dysfonctionnement des transporteurs du glutamate comme l'un des facteurs d'excitotoxicité dans la SLA (Howland et al. 2002; Rothstein et al. 1993; Velasco et al. 1996). Il a été montré que cette dérégulation serait exacerbée par l'expression des mutations *SOD1* (Yin and Weiss 2012). Des études sur des tissus humains avaient montré une réduction de la fonction du transporteur EAAT₂ dans le cortex et dans la moelle épinière des patients ayant la forme sporadique et aussi familiale de SLA (Fray et al. 1998; Rothstein et al. 1995; Sasaki et al. 2000). La surexpression de ces transporteurs dans les modèles murins de la SLA a montré des effets bénéfiques sur la survie des motoneurones (Guo et al. 2003; Rothstein et al. 2005). Ces études confortent l'hypothèse qu'une insuffisance de clairance du glutamate synaptique par les astrocytes pourrait induire une activation excessive des récepteurs du glutamate entraînant ainsi la mort des motoneurones.

La libération du glutamate dans le milieu au niveau de la fente synaptique se fait par exocytose *via* les transporteurs vésiculaires du glutamate (vGLuT). Il a été montré que la réduction de l'expression du vGLuT2 dans un modèle murin de la SLA était protectrice pour les motoneurones et permettait de préserver certaines jonctions neuromusculaires, toutefois cette inhibition n'a pas pu atténuer la perte de fonction des motoneurones dans ce modèle murin (Wootz et al. 2010). Certaines évidences de l'augmentation de la libération du glutamate proviennent des études *in vitro*. Ces études avaient montré que les synaptosomes des souris transgéniques portant la mutation *SOD1*^{G93A} avaient un efflux de glutamate basal très important comparé aux souris transgéniques *SOD1* ne portant pas de mutations et celles non transgéniques (Milanese et al. 2011). Ces souris portant la mutation *SOD1*^{G93A} présentaient un niveau de calcium basal élevé et une forte libération du glutamate en réponse à la dépolarisation (Milanese et al. 2011), à l'activation des récepteurs métabotropiques (Giribaldi et al. 2013). Le mécanisme exact de l'excitotoxicité directe dans la SLA reste mal connu, mais de toute évidence l'expression des

mutations *SOD1* dans les modèles murins de la SLA induit un changement fonctionnel dans les acteurs de libération et dans l'action du glutamate.

II.2.3. Excitotoxicité indirecte

L'excitotoxicité est retrouvée en cas de taux de glutamate extracellulaire normal avec une fragilité accrue des cellules.

L'activation des récepteurs du glutamate est l'une des principales voies de production des espèces réactives d'oxygène (ROS) *via* l'activation calcium dépendant de la NO synthase et la calpaïne (Lees 1993; Pellegrini-Giampietro 1994). Les ROS pourraient ainsi induire un stress cellulaire cumulatif et entraîner la mort neuronale. Il a été rapporté une diminution de l'expression des sous unités NR1 et NR2 du récepteur NMDA dans la moelle épinière des patients SLA (Samarasinghe et al. 1996; Virgo and de Belleruche 1995). L'expression de l'ARNm de la sous unité GluA2 du récepteur AMPA a été trouvée aussi diminuée dans la SLA (Pellegrini-Giampietro et al. 1997; Takuma et al. 1999). La GluA2 est connue pour réguler le flux calcique et protéger les motoneurones de l'excitotoxicité (Kawahara et al. 2003; Van Damme et al. 2002). Il a été également trouvé chez les patients SLA que les motoneurones supérieurs et inférieurs présentaient tous les deux une faible expression de la sous unité GluA2 comparé aux autres neurones (Shaw et al. 1999; Tomiyama et al. 1996). Cependant, la distribution de GluA2 dans les motoneurones est controversée particulièrement dans les modèles murins (Greig et al. 2000; Laslo et al. 2001; Petralia et al. 1997). Bien que les polymorphismes de la GluA2 aient été identifiés comme un facteur à risque pour la SLA (Bogaert et al. 2010), les modifications de l'expression de GluA2 sont considérées comme étant un élément majeur de l'excitotoxicité. Cependant le mécanisme de dérégulation de la GluA2 dans la SLA reste à élucider. Certaines études ont montré que les modifications de l'expression de la GluA2 sont régulées par les astrocytes (Van Damme et al. 2007; Yin et al. 2012).

Les anomalies dans l'excitabilité intrinsèque des motoneurones pourraient également jouer un rôle dans la progression de la SLA. Cette excitabilité est déterminée par les réponses des neurones aux *stimuli* induisant la dépolarisation ou l'hyperpolarisation. L'hyperexcitabilité des motoneurones dans la SLA est bien décrite (Vucic and Kiernan 2013). Des modifications similaires ont été trouvées dans les modèles murins de SLA (Pambo-Pambo et al. 2009; van Zundert et al. 2008), et dans les cultures de motoneurones portant la mutation *SOD1*, *C9orf72* ou *FUS* (Kuo et al. 2005; Pieri et al. 2009; Wainger et al. 2014). Une étude récente chez un

modèle murin *SOD1*^{G93A} au moment de la dénervation a indiqué que 42% des motoneurones lombaires étaient hypoexcitables, malgré le fait que les mécanismes homéostatiques conservaient l'excitabilité dans la plupart des cellules (Delestree et al. 2014). Ces résultats contradictoires peuvent être dus à l'hétérogénéité de la population motoneuronale (Leroy et al. 2014; Venugopal et al. 2015), spécialement les motoneurones larges (de type F) qui innervent les fibres rapides et les petits (de type S) qui innervent les fibres lents. Bien que les motoneurones de type F soient beaucoup plus sensibles à la dégénérescence dans la SLA, ils ont constaté que ceux de type S étaient hyperexcitables et présentaient une altération des arborescences dendritiques, tandis que les motoneurones de type F ne présentaient aucune modification de leur excitabilité intrinsèque. Une récente étude réalisée sur un modèle murin *SOD1*^{G93A} a également montré des différences entre ces deux types de motoneurones (Venugopal et al. 2015).

L'excitotoxicité dans la SLA reste une voie pathophysiologique intrigante qui non seulement pourrait expliquer la sélectivité de la mort des motoneurones, mais aussi le rôle des cellules non-neuronales avoisinantes dans la SLA et les mécanismes d'action du seul traitement qui existe, le riluzole.

II.3. Glutamate : cible thérapeutique de choix dans la SLA

Le riluzole, un anti-glutamatergique est à ce jour le seul traitement disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour la sclérose latérale amyotrophique. Cette AMM a été délivrée par la commission européenne le 10 juin 1996. Selon la classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique (ATC), il fait partie des « autres médicaments du système nerveux ».

Le riluzole ou 2-amino-6-(trifluorométhoxy)benzothiazole est un dérivé fluoré qui appartient à la classe des benzothiazoles (Figure 14). Il est commercialisé par Aventis pharma SA sous le nom de Rilutek®. De par son mode d'action, le riluzole prolonge de manière significative mais modérée (2 à 3 mois) la survie des patients atteints de SLA (Bensimon et al. 1994; Miller et al. 2007b).

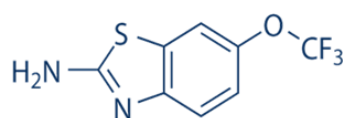


Figure 13 : Structure chimique du riluzole ou 2-amino-6-(trifluorométhoxy)benzothiazole

Malgré le grand nombre d'études sur les mécanismes d'action du riluzole, ses effets sur les motoneurones ne sont que partiellement connus. Ceci est principalement dû à son large éventail d'action sur les neurones à des concentrations différentes (Urbani and Belluzzi 2000).

L'effet principal du riluzole serait de réduire la concentration en glutamate dans la fente synaptique. Il a un effet neuroprotecteur par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes tels que l'inhibition de la libération présynaptique du glutamate (Martin et al. 1993; Nagoshi et al. 2015; Pratt et al. 1992), l'inhibition directe et non compétitive des récepteurs ionotropiques NMDA et AMPA en post synaptique et l'inactivation des canaux sodiques voltage dépendant (Doble 1996) (**Figure**). Le riluzole stabiliserait, par action directe, les canaux sodique voltage dépendant dans leur conformation inactive et donc empêcherait la dépolarisation (Benoit and Escande 1991). Cependant les effets exacts du riluzole sur la neurodégénérescence dans la SLA ne sont pas totalement élucidés.

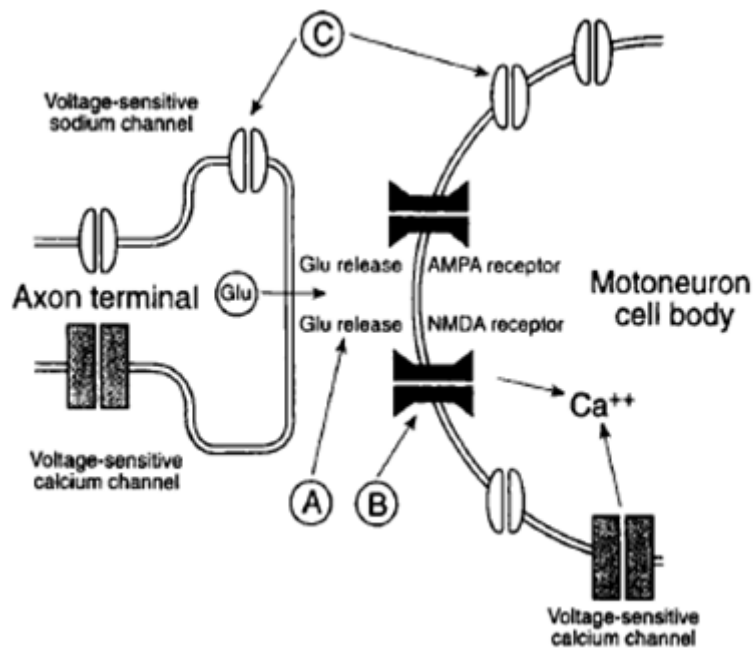


Figure 14 : les différents sites d'action du riluzole selon Doble 1996 : (A) inhibition de la libération du glutamate ; (B) blocage des récepteurs d'acides aminés excitateurs ; (C) inactivation des canaux sodique voltage dépendant.

Ces mécanismes ci-dessus peuvent agir en synergie pour bloquer l'excitotoxicité et donc doter le riluzole d'une activité neuroprotectrice importante (Blasco et al. 2014b). Cette activité neuroprotectrice mais aussi son activité anti-convulsivante pourrait également être expliquée par le

fait que le riluzole interagirait avec les courants sodiques d'une part mais aussi les courants potassiques dans les neurones corticaux (Zona et al. 1998). Ce médicament neuroprotecteur ralentirait l'inactivation des canaux potassiques dans les neurones par un mécanisme oxydatif voltage-dépendant. Ce mécanisme sous-entend une inhibition de la libération du glutamate (Xu et al. 2001).

Le riluzole bloque le courant sodium persistant et en partie le courant calcique. De plus il diminue la transmission glutamatergique, probablement *via* l'inhibition de la PKC qui régule l'activité des récepteurs NMDA présynaptiques ayant un effet facilitateur sur la sortie du glutamate (Lamanauskas and Nistri 2008). Il semble également stimuler les voies de transduction dépendantes de la protéine G conduisant le riluzole à neutraliser l'activation des récepteurs NMDA et donc d'inhiber la libération de glutamate (Doble 1996; Hubert et al. 1994). De plus il inhiberait la protéine kinase C (PKC) qui régule les récepteurs NMDA présynaptiques (Noh et al. 2000). Il augmenterait également l'expression des sous unités GluR1 et GluR2 des récepteurs AMPA à la surface des cellules et modifierait ainsi leur perméabilité (Du et al. 2007).

Il a été rapporté que le riluzole pourrait augmenter l'expression et le taux de GLT1, mais aussi qu'il augmenterait les autres transporteurs sans sélectivité (Carbone et al. 2012; Fumagalli et al. 2008). Ceci stimule alors l'absorption de glutamate par les neurones et les astrocytes (Rothstein et al. 1996). Dall'Igna *et al.*, en 2013, ont démontré, sur une culture de cellules astrogliale C6, que le riluzole dépendait d'autres voies intracellulaires indépendantes mettant en jeu la protéine kinase C, le phosphatidylinositol-3-kinase et le récepteur du facteur de croissance fibroblastique. Cette étude montre également une augmentation de l'expression du transporteur EAAC1 (Dall'Igna et al. 2013).

Selon Chowdhury *et al.*, le riluzole augmenterait le métabolisme du glucose dans le cortex préfrontal de rat et dans l'hippocampe (Chowdhury et al. 2008). Une étude, en 2013, a démontré l'influence du riluzole sur le transport du glucose dans les neurones touchés dans le SLA et dans les tissus des muscles squelettiques. Elle a montré que le riluzole augmente la vitesse de transport du glucose, directement ou non, par la phosphorylation de la 5'AMP-protéine kinase activée (AMPK) ce qui augmente alors la production d'ATP dans les cellules pour leurs permettre de lutter contre les phénomènes excitotoxiques (Daniel et al. 2013).

Le riluzole peut également agir sur la transmission GABAergique (Jahn et al. 2008) et affecter la fonction des récepteurs à l'acétylcholine (Bellingham 2011; Deflorio et al. 2012; Mohammadi et al. 2002).

Le riluzole semble agir sur plusieurs cibles impliquées dans le métabolisme énergétique cérébral dont les partenaires clés sont les astrocytes et les neurones. Nous suggérons dans ce travail de thèse que pour mieux comprendre les mécanismes d'action du glutamate et de son antagoniste, le riluzole dans la SLA, il est primordial d'identifier précisément les interactions métaboliques entre les astrocytes et les motoneurones.

III. SLA et Métabolisme énergétique cérébral

On a longtemps pensé que la physiopathologie de la SLA était restreinte aux motoneurones. Il semble cependant que la SLA soit une maladie systémique avec notamment une altération du métabolisme énergétique global et une contribution majeure des astrocytes. Au cours des trente dernières années, plusieurs études réalisées sur les différents aspects cellulaires et moléculaires du métabolisme énergétique cérébral ont montré que les cellules gliales et particulièrement les astrocytes sont des acteurs clés dans le fonctionnement du cerveau. Les astrocytes sont fortement impliqués dans les processus de signalisation neuronale et leur métabolisme est étroitement couplé à celui des neurones, notamment par l'activation de la navette lactate astrocyte-neurone (Kreft et al. 2012). Plus précisément, les astrocytes ajustent la production d'énergie aux besoins énergétiques des neurones *via* différents mécanismes regroupés sous le terme « de couplage neurométabolique » (CNM) (Pellerin and Magistretti 2004; Petit and Magistretti 2016).

Les astrocytes sont bien plus nombreux que les neurones dans le cerveau humain (Nedergaard et al. 2003) et participent activement à la régulation du glutamate (clairance et recyclage), l'homéostasie des ions, au stockage de l'énergie sous forme de glycogène, l'expression des facteurs neurotrophiques, la production des molécules anti-oxydantes, la modulation de l'activité synaptique *via* la libération des gliotransmetteurs, et à la formation et le remodelage des synapses (Kreft et al. 2012). Ces mécanismes qui sont les clés de l'activité cérébrale et cognitive contribuent à la dégénérescence neuronale dans les conditions pathologiques. Ainsi les astrocytes semblent jouer un rôle primordial dans l'étiologie des maladies neurodégénératives et particulièrement la SLA, en effet ils interviennent activement dans de nombreuses hypothèses physiopathologiques de cette maladie, notamment l'excitotoxicité induite par le glutamate (Allaman et al. 2011).

III.1. Astrocytes, partenaires énergétiques des motoneurones

Dans le schéma du métabolisme énergétique cérébral classique, l'oxygène et le glucose sont transportés dans le cerveau *via* le sang. Le glucose est capturé par les neurones et les cellules gliales *via* les transporteurs du glucose (Maher et al. 1994), métabolisé *via* la glycolyse et le cycle de Krebs pour satisfaire le besoin énergétique de chaque type cellulaire. En 2001, une étude estimait que la grande partie de la consommation énergétique était attribuée aux neurones

(~ 90-95%), et seulement une petite fraction (~5-10%) était attribuée aux cellules gliales (Attwell and Laughlin 2001). En conséquence, supposant que le glucose soit l'unique substrat énergétique, il serait probable que la consommation de glucose par chaque type cellulaire soit similaire. Une année plus tard, en utilisant du 2-déoxyglucose (2DG) marqué et une technique d'immunohistochimie, une autre étude a montré que l'accumulation du 2DG était identique dans les neurones et les astrocytes dans le cortex cérébral (Wittendorp-Rechenmann et al. 2002). En 2003, Véga et ses collaborateurs avaient étudié la distribution du 2DG, du glucose et du lactate entre les cellules gliales et les axones et ils avaient montré que la consommation du glucose était attribuée à 80% aux cellules gliales (Vega et al. 2003). Ces résultats suggèrent fortement que pour répondre aux besoins énergétiques des neurones, les cellules gliales doivent libérer un intermédiaire métabolique du glucose, le lactate qui serait finalement repris et oxydé par les neurones (**Figure 15**) (Pellerin and Magistretti 2003; Pellerin et al. 1998). Plusieurs autres études supportent cette hypothèse (Kreft et al. 2012; Magistretti 2006; Pellerin et al. 1998; Poitry-Yamate et al. 1995; Tsacopoulos et al. 1988). De plus, en 2005, Sickmann et ses collaborateurs avaient montré que le lactate sécrété dans le milieu de culture des astrocytes provenait du métabolisme du glucose extracellulaire et non de la dégradation du glycogène (Sickmann et al. 2005).

Il est connu depuis un certain temps que les cellules gliales, et plus particulièrement, les astrocytes, ont une grande capacité à produire du lactate *via* la glycolyse aérobie (Walz and Mukerji 1988). Ainsi, il a été montré que le glutamate, par l'intermédiaire d'un mécanisme impliquant sa capture suivie d'une activation du Na⁺, K⁺-ATPase, provoque une augmentation à la fois de la consommation du glucose et de la production du lactate (Pellerin and Magistretti 1994). Plusieurs observations *in vitro* et *in vivo* ont fourni de nouvelles informations sur le mécanisme intracellulaire associé à la réponse métabolique des astrocytes (**Figure 15**) (Magistretti and Allaman 2015; Petit and Magistretti 2016).

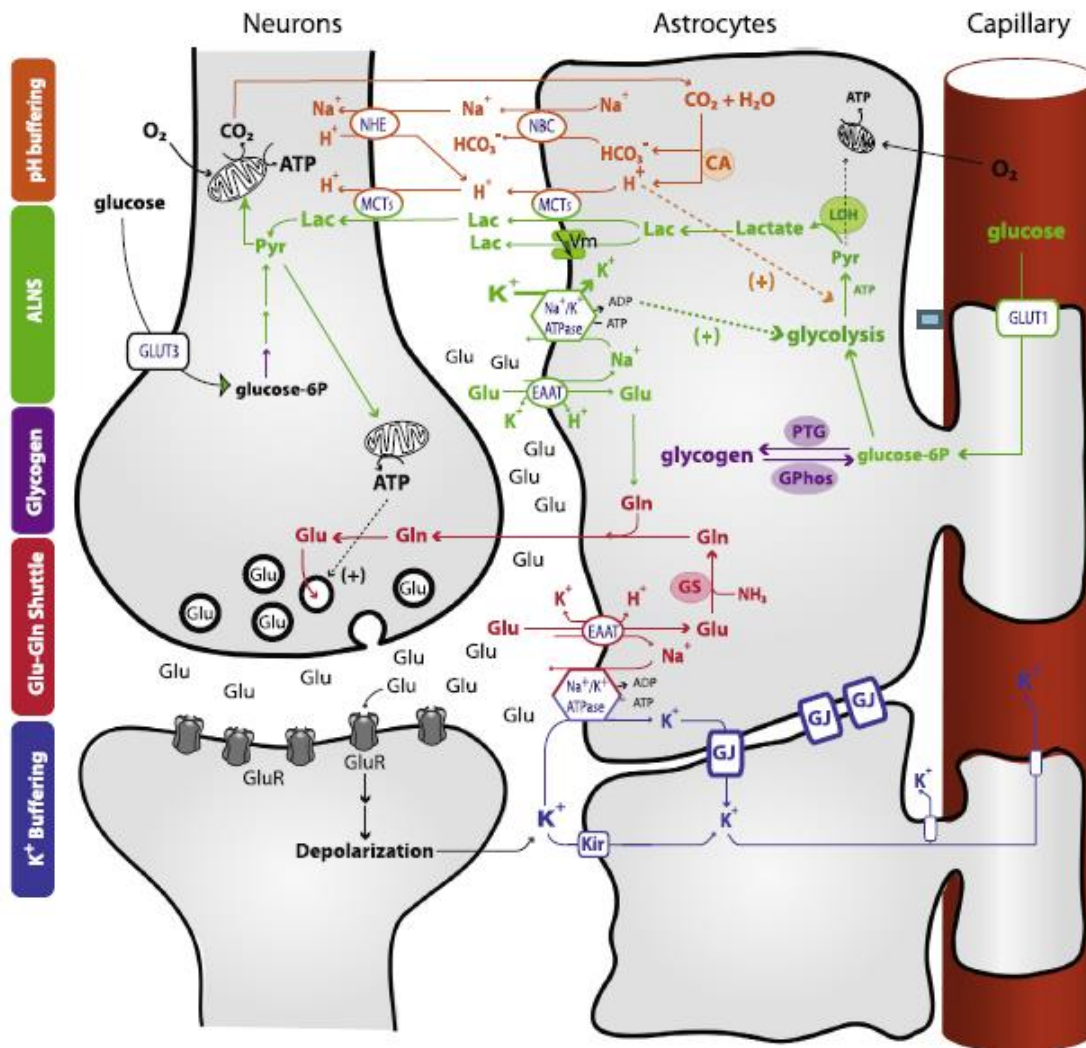


Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme de couplage neuro-métabolique et les différentes voies associées (d'après Petit and Magistretti 2016)

Le pH tampon (la voie en orange), l'anhydrase carbonique dans les astrocytes convertit le CO_2 en H^+ et HCO_3^- . Deux HCO_3^- sont transportés dans le milieu extracellulaire avec un Na^+ via le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), augmentant ainsi le pouvoir tampon extracellulaire. Le proton resté dans l'astrocyte pourrait entraîner le transport du lactate (Lac) de l'astrocyte au neurone via les transporteurs des monocarboxylates (MCTs). L'excès de H^+ dans le neurone est extrudé via l'échange Na^+/H^+ (NHE). (ii) La navette lactate astrocyte-neurone (ANLS) est représentée par la voie en vert. La capture du glutamate (Glu) par l'astrocyte est accompagnée de l'entrée du Na^+ grâce à l'action de la Na^+/K^+ -ATPase. Ce mécanisme déclenche la glycolyse dans les astrocytes et l'absorption du glucose circulant via le transporteur de glucose (GLUT1). Le lactate est transporté au neurone via les transporteurs MCTs, où il peut être utilisé substrat énergétique après être converti en pyruvate (Pyr). Les neurones peuvent également capturer le

glucose *via* le transporteur neuronal GLUT3. (iii) Le métabolisme du glycogène représenté par la voie violette. Les astrocytes stockent le glucose sous forme de glycogène, dont la synthèse est modulée par le glycogène synthase et la sous-unité non catalytique de la protéine phosphatase 1 (PTG). La dégradation du glycogène est contrôlée par le glycogène phosphorylase (GPhos). (iv) le cycle glutamate-glutamine est représenté en rouge. Le glutamate libéré au niveau de la fente synaptique active les récepteurs glutamatergiques ionotropiques (GluR) et entraîne une dépolarisation post-synaptique. Les transporteurs des acides aminés excitateurs (EAATs) sont responsables de la grande partie du glutamate capturé dans la fente synaptique. Le Glu est converti en glutamine (Gln) par la glutamine synthétase (GS) et ensuite recapté par les neurones pour la synthèse de glutamate. (v) Tampon potassique est représenté par la voie en bleue. Les astrocytes capturent l'excès de K^+ libéré dans le milieu extracellulaire. Les ions K^+ naviguent au travers du réseau astrocytaire *via* les gaps junctions (GJ) (Magistretti and Allaman 2015).

De cette observation *in vitro*, il a été suggéré que les astrocytes seraient capables de détecter l'activité synaptique au niveau des synapses glutamatergiques et en retour de métaboliser le glucose en lactate qui serait fourni aux neurones (Magistretti 2006; Petit and Magistretti 2016). La preuve d'une telle fonction importante était attribuée essentiellement aux transporteurs du glutamate des astrocytes (Cholet et al. 2001).

Une étude *in vivo* utilisant des oligonucléotides anti sens dirigés contre le transporteur GLAST a montré une diminution de la consommation du glucose dans le cortex somatosensoriel (Cholet et al. 2001). Des résultats similaires ont été également observés dans les souris KO GLT1 (Voutsinos-Porche et al. 2003). Parallèlement à l'augmentation de la consommation du glucose déclenchée par l'absorption du glutamate, il a été montré que le glutamate provoque également une stimulation rapide du transport du glucose dans les astrocytes (Loaiza et al. 2003). Le glucose peut servir également de précurseur pour la synthèse du glutamate (Hertz and Dienel 2002).

III.2. Hypothèse de l'altération des interactions métaboliques astrocyte-motoneurone dans la SLA

Bien qu'une grande partie de la recherche sur la SLA soit orientée vers l'étude des propriétés intrinsèques des motoneurones, de plus en plus d'études s'intéressent à l'implication des cellules gliales dans la dégénérescence des motoneurones. Des études ont montré des effets

toxiques des mutations *SOD1* dans les cellules non-neuronales notamment des astrocytes sur la survie des motoneurones dans les modèles murins de la SLA (Clement et al. 2003a; Nagai et al. 2007). Ainsi, il est clairement admis que les astrocytes jouent un rôle important dans la SLA, cependant le mécanisme par lequel l'expression de la mutation *SOD1* change les propriétés des astrocytes et la contribution des astrocytes dans la dégénérescence des motoneurones et sa propagation dans la SLA reste largement à élucider. L'une des grandes difficultés à déterminer exactement la contribution des astrocytes dans l'apparition et la progression de la maladie est la grande complexité des interactions entre les astrocytes et les motoneurones. En utilisant des modèles *in vitro* de la SLA notamment les co-cultures astrocyte-motoneurone, certaines études ont pu mettre en évidence des changements fonctionnels notamment une anomalie métabolique induite par l'interaction entre les deux types cellulaires. (Ferraiuolo et al. 2011). Ferraiuolo et ses collaborateurs avaient montré ainsi une dysfonction du transporteur de lactate (MCT) dans les astrocytes exprimant la mutation *SOD1* et qui serait à l'origine de la diminution de taux de lactate dans la moelle épinière. Ils avaient également montré que l'augmentation du taux de lactate permettrait de préserver la survie des motoneurones.

Il a été rapporté dans une étude réalisée sur les astrocytes isolés des souris pré-symptomatiques *SOD1*^{G93A}, une réduction des transcrits majeurs des acteurs impliqués dans la navette du lactate entre les astrocytes et les motoneurones, tels que le transporteur du glutamate (GLAST), la pompe Na⁺/K⁺-ATPase, la phosphoglycérate kinase (Pgk) et le transporteur de lactate MCT (slc16a). Cette réduction de l'expression de MCT a été également observée dans les astrocytes de la moelle épinière des patients SLA et à plus de 50% dans le cortex moteur (Lee et al. 2012b). Ceci supporte l'hypothèse de l'altération du métabolisme de lactate et de sa navette astrocyte-motoneurone dans la maladie. Une autre étude avait montré que les motoneurones co-cultivés avec des astrocytes transgéniques présentaient des anomalies du potentiel membranaire mitochondrial, qui pourraient être liées à une carence de support énergétique (Bilsland et al. 2008). En accord avec cette hypothèse d'altération des interactions métaboliques astrocyte-motoneurone dans la SLA, il a également été montré que lorsque les astrocytes portant la mutation *SOD1*^{G93A} sont cultivés seuls, ils ne présentent aucune anomalie de sécrétion de lactate, contrairement à lorsqu'ils sont co-cultivés avec motoneurones non transgéniques, probablement *via* la libération du glutamate entraînant ainsi une altération du métabolisme du lactate dans les astrocytes (Ferraiuolo et al. 2011).

IV. Approches d'exploration des modèles *in vitro* de la SLA

Devant l'impasse thérapeutique et l'absence de connaissance de tous les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA et de leurs liens, de nombreux travaux s'attachent à explorer la pathogénèse de cette maladie dans différents modèles cellulaires et animaux afin d'améliorer la connaissance des mécanismes et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces travaux utilisent différentes approches dites en « omique » permettant d'approfondir la compréhension des mécanismes physiopathologiques. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'exploration de la physiopathologie de la SLA sur des modèles cellulaires par l'approche métabolomique.

IV.1. Modèles cellulaires d'étude dans la SLA

Les avancées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA imposent un modèle d'étude pertinent, associant facilité d'utilisation, reproductibilité dans l'utilisation de ce modèle et spécificité par rapport à la pathologie. Différents modèles cellulaires sont utilisés pour étudier la SLA au niveau de la cellule et particulièrement du motoneurone. Une revue de la littérature a été faite dans notre équipe résumant les différents modèles cellulaires utilisés dans l'exploration de la physiopathologie (Veyrat-Durebex et al. 2014). Les données tirées des modèles *in vitro* expérimentaux sont utilisées pour (1) évaluer les premiers événements dans la mort des motoneurones, (2) améliorer la connaissance sur des mécanismes physiopathologiques et (3) identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces modèles *in vitro* proviennent soit des cultures primaires, soit des lignées cellulaires ou des cellules souches.

IV.1.1. Cultures primaires

Les cultures primaires les plus utilisées dans les études de la SLA sont celle des motoneurones et d'astrocytes :

- Malgré la complexité de leur culture, les motoneurones primaires sont utilisés pour étudier la physiopathologie de la SLA au niveau cellulaire. Ils sont généralement obtenus à partir du cortex, d'hippocampe ou de la moelle épinière de rongeurs (Camu and Henderson 1992; Raoul et al. 2002).

- Les astrocytes primaires obtenus à partir du cortex, d'hippocampe ou de la moelle épinière des rongeurs sont utilisés pour étudier le rôle des cellules gliales dans la physiopathologie de la SLA notamment dans la neuroinflammation et l'excitotoxicité induite par le glutamate (Aebischer et al. 2011; Harlan et al. 2016; Milosevic et al. 2016; Rojas et al. 2015).

IV.1.2. Lignées cellulaires

Il existe plusieurs lignées cellulaires neuronales utilisées actuellement dans les études sur la SLA.

- La lignée Neuro-2a qui a été établie à partir d'un neuroblastome spontané d'une souris albinos il y a plus de 40 ans (Klebe and Ruddle 1969). Ces cellules développent des neurites et produisent une grande quantité de protéines des microtubules qui sont essentiels pour la dynamique des axones (Olmsted et al. 1970). Cette lignée cellulaire est utilisée pour étudier la dysfonction mitochondriale, les agrégats protéiques et le stress oxydant dans la SLA (Cacabelos et al. 2016; Ezzi et al. 2007; Kabashi et al. 2010; Yan et al. 2016).
- La lignée SH-SY5Y, trois fois sous-clonée à partir de cellules SKN-SH, remonte à 1970. Elle a été établie à partir de cellules de neuroblastome métastatique prélevées dans la moelle osseuse d'une fille de 4 ans (Biedler et al. 1973; Biedler et al. 1978). Cette lignée cellulaire possède de nombreuses propriétés intéressantes, comme la possibilité de produire de la dopamine, du GABA et de l'acétylcholine. Elle est utilisée pour étudier la dysfonction mitochondriale, les facteurs génétiques et le stress oxydant dans la SLA (Wang et al. 2015; Zhu et al. 2016)
- Les cellules PC12, issues d'un phéochromocytome de rat, forment une lignée stable et produisent de la dopamine et du glutamate. Elles peuvent être différenciées en utilisant des facteurs de croissance neuronaux et donner un phénotype excitable avec des neurites (Greene and Tischler 1976). Elles sont utilisées pour les études fonctionnelles des facteurs génétiques et des agrégations protéiques dans la SLA (Benmohamed et al. 2011; Trippier et al. 2012)
- La lignée cellulaire NSC-34 a été développée à partir de la fusion de cellules de neuroblastome de souris N18TG2 et de motoneurones de moelle épinière d'embryon de souris (Cashman et al. 1992). Les cellules NSC-34 expriment des propriétés spécifiques

des motoneurones, y compris la génération de potentiels d'action, l'expression de protéines des neurofilaments, ainsi que la synthèse, le stockage et la libération de l'acétylcholine. La lignée NSC-34 est une lignée cellulaire assez stable. Cette lignée est donc la plus utilisée dans les études *in vitro* sur la SLA (Dangoumau et al. 2016; Madji Hounoum et al. 2016b; Moreno-Ortega et al. 2016; Veyrat-Durebex et al. 2015). En raison des propriétés intéressantes des cellules NSC-34 citées ci-dessus, nous avons initialement prévu de développer un projet d'étude métabolomique à partir de ces cellules.

IV.1.3. Cultures issues des cellules souches

En 2007, il a été rapporté que les fibroblastes humains pouvaient être reprogrammés en cellules souche pluripotentes induites (iPSC, de l'anglais induced Pluripotent Stem Cells) (Takahashi et al. 2007) et sur la base de cette découverte de nouveaux modèles cellulaires de la SLA ont été développés. En effet, en 2008 la première culture des motoneurones humains issue d'iPSC des patients ALS a été réalisée (Dimos et al. 2008). Depuis, plusieurs techniques ont été développées pour produire la lignée iPSC (Taura et al. 2009) et convertir les fibroblastes des patients SLA en motoneurones (Meyer et al. 2014; Son et al. 2011). Des progéniteurs neuronaux (NPCS, de l'anglais Neural Progenitors Cells) isolés de la moelle épinière *post mortem* des patients SLA peuvent également être cultivés et différenciés en motoneurones, astrocytes et oligodendrocytes en culture (Haidet-Phillips et al. 2011). Ces motoneurones et astrocytes issus d'iPSC ou d'hESC (de l'anglais human Embryonic Stem Cells) sont donc utilisés dans les études *in vitro* et notamment sur l'implication des cellules non neuronales et sur les facteurs génétiques dans la SLA (Almad et al. 2016; Myszczyńska and Ferraiuolo 2016). Cependant l'un des inconvénients majeurs de ces cellules reprogrammées, est l'hétérogénéité phénotypique entre les cellules souches (Osafune et al. 2008) ou entre les clones iPS différenciés obtenus à partir d'un même individu (Thatava et al. 2013). En utilisant la lignée iPS des patients atteints de la SLA atteints portant les mutations TDP-43, Egawa et ses collaborateurs avaient montré qu'après la différenciation de chaque clone d'iPS en motoneurones, les cellules présentaient d'importantes variations de taux d'expression de TDP-43, de formation d'agrégat et de mort cellulaire après le stress oxydant (Egawa et al. 2012).

IV.1.4. Co-culture motoneurones-astrocytes

Devant la complexité de la physiopathologie de la SLA, dans laquelle plusieurs types cellulaires sont impliqués, de nombreux travaux utilisent des modèles de co-cultures de la maladie. Ces modèles sont le plus souvent des co-cultures des astrocytes et des motoneurones provenant de moelles épinières de rongeurs, bien que les cellules NSC-34 soit souvent utilisées à la place des motoneurones (Foran et al. 2011; Veyrat-Durebex et al. 2015). Haastert *et al.*, ont mis au point un système de co-culture de motoneurones embryonnaires de rat et de cellules de Schwann (Haastert et al. 2005). Ces modèles permettent d'étudier des interactions neurones-glies et ont mis en évidence le rôle important des astrocytes dans la physiopathologie de la SLA (Di Giorgio et al. 2007; Nagai et al. 2007; Raoul et al. 2002; Veyrat-Durebex et al. 2015). En raison de l'importance du rôle des astrocytes dans le développement de la maladie (cf sous chapitre « rôle des cellules gliales », page 43), les modèles de co-cultures motoneurones-cellules gliales semblent être à ce jour mieux adaptés que les modèles monocultures pour des études *in vitro* sur la SLA, notamment concernant la compréhension des interactions métaboliques entre les astrocytes et les motoneurones.

IV.2. Métabolomique

La métabolomique est une science qui s'inscrit dans la continuité de la génomique, la transcriptomique et de la protéomique (Sumner et al. 2003) (Figure 16): Elle a pour objectif de donner un aperçu le plus large possible sur le profil des métabolites d'un échantillon étudié.

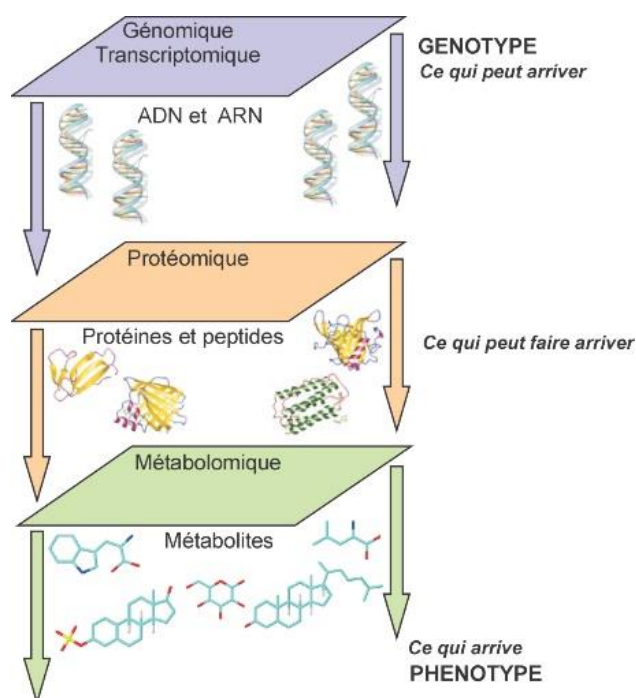


Figure 16 : Représentation schématique de l'organisation des sciences en « omique » (d'après l'Inserm 2011)

IV.2.1. Métabolome

La métabolomique est une méthode d'exploration du métabolome qui comprend l'ensemble des composés de petits poids moléculaires (< 1000-1500 Da) appelés métabolites (Wishart et al. 2013), présents dans un échantillon biologique (cellules, tissu, fluide biologique, organe ou organisme). Ces métabolites peuvent être des sucres, des acides aminés, des acides organiques, des dérivés nucléosides, les vitamines, les stéroïdes *etc.* (Nicholson et al. 2002). Ils représentent les produits intermédiaires et finaux de la régulation cellulaire nécessaire au fonctionnement de la cellule ou de l'organe. Le métabolome est donc en perpétuelle évolution et dépend de l'état physiologique, développemental ou pathologique d'un système biologique (Raamsdonk et al. 2001) d'où son grand intérêt dans la mise en évidence de perturbations physiopathologiques.

Leur caractérisation peut donner un aperçu général sur l'impact ou l'empreinte métabolique des facteurs étudiés (actions génomiques ou environnementales) mais aussi une information plus ciblée sur les voies métaboliques concernées et les mécanismes sous-jacents, mettant en évidence des inter-relations métaboliques qui n'auraient pas pu être détectées avec des approches biochimiques traditionnelles. Ainsi, l'analyse métabolomique des cellules est apparue comme une approche importante pour l'étude de la biochimie cellulaire et de la physiopathologie de certaines maladies (Madji Hounoum et al. 2016a).

IV.2.2. Approches métabolomiques

Il existe différents types d'approches métabolomiques en fonction des objectifs de l'étude.

- L'analyse non ciblée ou globale consiste à analyser l'ensemble des métabolites détectables dans un échantillon. Elle a pour but de comparer des empreintes entre différents groupes afin de rechercher de potentiels métabolites discriminants plusieurs situations biologiques. C'est une approche sans *a priori*.
- L'analyse ciblée consiste à analyser un nombre défini de métabolites connus et prédéfinis. Ce type d'approche cible donc une ou plusieurs voies métaboliques spécifiques ou des métabolites appartenant à une famille chimique donnée.

La métabolomique est une approche émergente qui est appliquée dans de nombreux domaines et principalement dans le domaine de la santé, la pharmacologie, l'agro-alimentaire, la microbiologie, la physiologie végétale et animale, *etc.*

IV.2.3. Analyse métabolomique

L'analyse métabolomique débute par une préparation des échantillons en vue de leur analyse. Une fois les analyses faites, les données brutes obtenues (spectres, chromatogrammes) sont ensuite traitées par des logiciels adaptés pour extraire l'information. Les tables de données obtenues sont analysées avec des logiciels d'analyses statistiques (multivariées et univariées) pour dégager l'information discriminante et significative. Les signaux discriminants sont soit déjà identifiés en amont soit après des analyses statistiques. Les métabolites identifiés sont ensuite utilisés pour annoter les voies métaboliques perturbées et poser une interprétation biologique du phénomène observé. Ces étapes sont représentées dans la **Figure 17** tirée de notre revue (Blasco et al. 2016c).

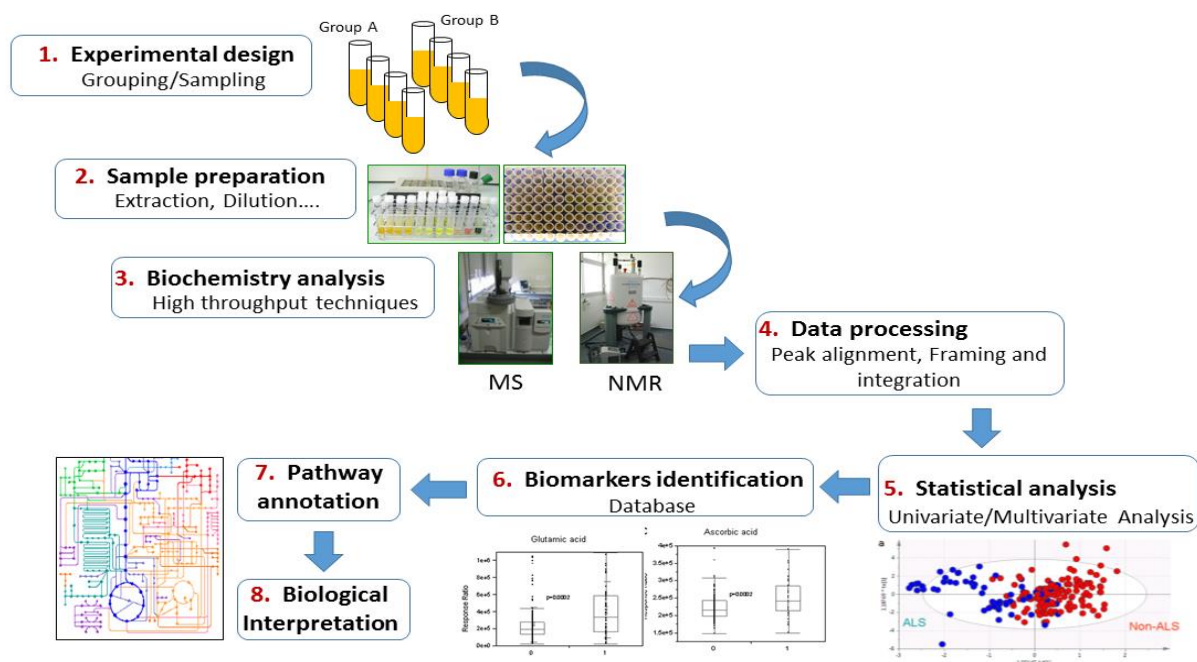


Figure 17 : Les différentes étapes d'une étude métabolomique, de la préparation des échantillons à l'interprétation des résultats (d'après Blasco *et al.*, 2016c).

IV.2.3.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est une étape primordiale dans une étude métabolomique car elle est fonction des techniques analytiques utilisées et détermine la qualité et la reproductibilité des données analytiques. Elle peut également être source de biais dans l'interprétation des résultats. Cette étape permet d'éliminer de la matrice biologique la majorité des protéines (sérum, plasma, LCR, tissus) qui peuvent gêner la suite de l'analyse. Elle permet de rendre également l'échantillon compatible avec la technique analytique utilisée telle que la dérivation chimique des échantillons pour la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et encore l'utilisation des solvants deutérés pour la spectroscopie par résonance magnétique (RMN). En fonction du type d'étude que l'on veut réaliser (non ciblée ou ciblée) on peut inclure une étape de pré concentration des échantillons ou au contraire réaliser le moins d'étapes de préparations possibles pour éviter la perte de métabolites peu abondants et assurer la reproductibilité de la préparation. Pour l'analyse de chaque matrice biologique, il est donc nécessaire de développer et de valider un protocole d'extraction adapté et robuste. En ce qui concerne la préparation des cellules, les recommandations et les différentes étapes sont détaillées dans la revue que j'ai effectuée, page 94 (Madji Hounoum *et al.* 2016a).

IV.2.3.2. Techniques analytiques en métabolomique

A ce jour le métabolome humain n'est pas complètement caractérisé. Cependant plusieurs bases de données telle que HMDB (Human Metabolome DataBase) recensent plus de 40 000 métabolites et plus de 700 voies métaboliques associées aux maladies (Wishart et al. 2013; Wishart et al. 2016). En raison de l'abondance de ces métabolites, de leurs diversités chimiques ainsi que de la grande variabilité des concentrations observées, une seule technique analytique ne suffit pas pour couvrir la détection complète du métabolome humain. Les deux principales méthodologies analytiques utilisées en métabolomique sont : la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la Spectrométrie de Masse (SM).

IV.2.3.2.1. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie RMN a montré son grand potentiel dans l'analyse de divers fluides biologiques, de tissus intacts et d'extraits de tissus. Cette technique permet à la fois de détecter simultanément plusieurs métabolites dans un mélange et de les quantifier, l'intégrale du signal étant proportionnelle à la concentration molaire du métabolite correspondant. Elle a pour avantages d'être non destructive, rapide, peu coûteuse, reproductible et nécessite une préparation minimale de l'échantillon. La plupart des analyses RMN sont basées sur les signaux du noyau proton (^1H) car il présente une grande sensibilité par rapport au noyau ^{13}C , par exemple, seulement présent à 1% à l'état naturel. En outre, les protons sont présents dans tous les composés organiques et de ce fait les spectres reflètent la composition quasi-complète de l'échantillon biologique étudié.

IV.2.3.2.2. Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse (MS) consiste à mesurer le rapport de la masse d'un ion sur sa charge (m/z). Le développement et les améliorations apportées aux spectromètres de masse (Orbitrap[®], FT-ICR ; Fourier transform-ion cyclotron resonance ; TOF, time of flight) ont permis sa large utilisation en métabolomique. La MS à haute résolution offre plusieurs avantages dans les études métabolomiques car elle permet d'avoir des informations spécifiques sur la masse moléculaire (masse exacte et enrichissement isotopique) et la structure (fragmentation MS/MS) des métabolites. La sensibilité de la MS permet la mesure de concentrations en deçà du μM . Cependant de nombreux métabolites mis en évidence lors d'expériences métabolomiques n'ont pas encore été identifiés et cela constitue une limite majeure dans l'interprétation biologique des résultats. La MS peut être couplée à des méthodes séparatives: la chromatographie gazeuse (GC) et la chromatographie liquide (LC).

La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique qui permet d'abord de séparer les molécules en fonction de leur température d'ébullition dans la colonne de chromatographie et ensuite de les détecter et de les quantifier avec le spectromètre de masse. C'est une technique assez sensible généralement associée à une source à ionisation par impact électronique ou par ionisation chimique. La principale limite de cette technique est qu'elle ne peut analyser que des métabolites volatiles et thermostables. Elle nécessite généralement une étape de préparation supplémentaire des échantillons (dérivation chimique) afin de rendre les métabolites plus volatiles. Ce traitement des échantillons est assez long et peut conduire à une perte de métabolites et une moins bonne reproductibilité des analyses. De plus la GC-MS ne permet pas d'observer des composés très polaires tels que les nucléotides (Lee et al. 2013).

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est aujourd'hui la technique la plus utilisée en métabolomique (Patti 2011) grâce aux nombreux types de colonnes existant pour couvrir une large gamme de métabolites. De plus la LC-MS permet de limiter la suppression d'ionisation, de séparer potentiellement des molécules isobares et des isomères par l'utilisation de colonnes adaptées (Bowers 1996). Par ailleurs elle nécessite peu de préparation d'échantillon comparé à la GC-MS. Un de ses avantages est l'utilisation de sources d'ionisations douces des composés permettant la détection de l'ion moléculaire. Les expériences de fragmentation de l'ion moléculaire (MS/MS, MSⁿ) permettent de l'identifier ou sinon de le caractériser. On distingue plusieurs systèmes chromatographiques notamment la chromatographie liquide à haute (HPLC) ou ultra-haute pression (UHPLC) et des systèmes basés sur la chromatographie capillaire et la nano-chromatographie.

IV.2.4. Traitement des données

Le traitement des données brutes consiste en la détection automatique des informations spectrales et chromatographiques de l'ensemble des composés détectés dans l'intégralité des échantillons analysés. Il a pour but de convertir les signaux bruts en un format numérique contenant uniquement les informations analytiques pertinentes tout en évitant les biais et ceci en utilisant des logiciels dédiés. Ces logiciels permettent la détection des signaux de chaque échantillon, et leur réaligement. L'ensemble des signaux détectés est ensuite présenté sous une forme de tableau de données compatibles avec les logiciels d'analyse statistique : à chaque ligne, correspond une variable, c'est-à-dire un signal caractérisé par un temps de rétention (TR) et un rapport masse sur charge (m/z) pour la MS ou un déplacement chimique (ppm) pour la

RMN et à chaque colonne, l'intensité ou l'aire des pics chromatographiques (MS) ou spectraux (RMN) de chaque variable dans un échantillon donné.

IV.2.4.1. RMN ^1H

Pour les traitements des spectres unidimensionnels (1D) en RMN, il existe deux stratégies généralement en fonction de l'approche métabolomique choisie (ciblée ou non ciblée) et aussi en fonction de la qualité des spectres obtenus. Dans les deux cas, les spectres acquis doivent dans un premier temps tous être phasés, la ligne de base corrigée puis les spectres calibrés et réalignés.

La première stratégie consiste à découper manuellement l'ensemble des spectres après leur superposition en utilisant par exemple le logiciel AMIX viewer de chez Bruker. Cette méthode permet de sélectionner des zones spectrales correspondant aux métabolites d'intérêts tout en évitant les zones de bruits et du signal résiduel d'eau. Bien souvent le découpage se fait après l'identification des métabolites et donne des bandes spectrales appelés aussi « bucket » de tailles variables. Cette méthode est généralement utilisée pour les analyses ciblées. Cependant cette stratégie peut poser problème lorsqu'il s'agit d'échantillons très complexes avec des forts décalages des pics notamment à cause des variations de pH ou de force ionique dans les échantillons, c'est le cas par exemple des urines.

La deuxième stratégie consiste donc à découper de manière automatique les spectres en « buckets » de tailles fixes, par exemple de 0,04 ppm. Cette méthode de traitement est adaptée pour les analyses non ciblée et nécessite un alignement rigoureux des spectres. Le logiciel AMIX viewer peut être utilisé mais pour des matrices très complexes comme les urines, d'autres logiciels proposant des algorithmes d'alignement des spectres peuvent être utilisés afin de résoudre les variations de déplacements chimiques. Le principal inconvénient du découpage fixe est une perte de résolution spectrale. En effet une bande spectrale de 0.04 ppm peut correspondre à un fragment de pic. En fonction de la partie du pic intégré dans la bande spectrale, cette méthode peut conduire à des biais dans l'intensité mesurée du pic. Une approche alternative est d'analyser les données en bandes spectrales variables définies par l'examineur après l'alignement de tous les spectres (Vu et al. 2011) ou être définies automatiquement par des logiciels de « découpage intelligent » (De Meyer et al. 2008).

L'identification des métabolites obtenus en ^1H -RMN peut être faite en utilisant les bases des données, soit publiques telles que HMDB, BMRB (Biological Magnetic Resonance Bank) ou des données de la littérature, soit « faites maison » par une banque de données du laboratoire ou encore commerciales grâce au logiciel tel que Chenomx (<http://www.chenomx.com/>).

Un métabolite est considéré putativement identifié lorsque tous ses déplacements chimiques et les constantes de couplage correspondent à ceux de la molécule candidate. Afin d'approfondir l'étude structurale de certains métabolites inconnus, des expériences de RMN bidimensionnelles sont réalisées : COrelation Spectroscopy (COSY) et Heteronuclear Single-Quantum Correlation (HSQC) permettant de mettre en évidence les corrélations ^1H - ^1H et ^1H - ^{13}C respectivement. Les métabolites identifiés sont confirmés par des ajouts ou «spiking» des métabolites standards.

IV.2.4.2. LC-MS

Pour le traitement des données obtenues par LC-MS, les logiciels gratuits de type MZmine ou XCMS (Smith et al. 2006) [acronyme de diverses formes (X) de la chromatographie (C) couplée à la spectrométrie de masse (MS)] sont les plus couramment utilisés. Les fichiers LC-MS sont dans un premier temps convertis au format pris en charge par ces logiciels (par exemple mzXML pour le logiciel XCMS). L'analyse XCMS se décompose généralement en quatre parties : détection des pics et filtres de bruit, l'alignement inter-échantillons, la correction des temps de rétention et enfin la complétion des données manquantes lorsqu'une variable est présente dans un grand nombre d'échantillons mais absente dans quelques-uns. A chaque couple m/z et TR est associée une intensité. Le traitement des données et l'identification des métabolites en LC-MS seront détaillés dans la revue que j'ai effectuée durant ma thèse (Madji Hounoum et al. 2016, en page 94).

IV.2.5. Normalisation des données

La normalisation a pour objectif d'éliminer le plus de biais analytiques possibles (rendement d'extraction, les effets de suppression d'ions en LC-MS, *etc*) tout en conservant les variations biologiques. Ainsi il est primordial de choisir pour chaque technique analytique une méthode de normalisation adaptée.

IV.2.5.1. RMN ^1H

Il existe plusieurs méthodes de normalisation en RMN. Parmi celles-ci notons la normalisation par quotient probabiliste qui a été spécialement développée pour pallier les effets de dilution dans les fluides biologiques. Le principe de cette méthode est de normaliser dans un premier temps chaque spectre par son intensité totale (pour pallier aux effets de dilution) puis de prendre le spectre médian comme spectre de référence. Ensuite l'aire de chaque pic du spectre est divisée par l'aire du pic correspondant du spectre de référence. Le quotient médian de tous les

quotients est déterminé et enfin tous les pics du spectre sont normalisés au quotient médian (Dieterle et al. 2006). En RMN les pics sont souvent normalisés par rapport à un standard externe de concentration connue comme le TSP ou à une molécule interne comme la créatinine ou par l'aire totale du spectre. Une revue récente a référencé les principales méthodes de traitement et de normalisation des spectres 1D en RMN (Euceda et al. 2015).

IV.2.5.2. LC-MS

En LC-MS les effets de suppression d'ions pourraient être dus en outre à l'encrassement de la source entraînant des diminutions de l'intensité du signal au sein d'une même analyse rendant ainsi délicat l'étape de normalisation des données. Il est donc primordial de corriger ces fluctuations des signaux afin qu'elles n'entravent pas l'interprétation des données. Ces fluctuations des signaux peuvent être évaluées par l'ajout des étalons internes (de structures similaires aux métabolites d'intérêts et idéalement marqués) dans tous les échantillons. Une autre alternative est l'utilisation des échantillons de contrôle qualité (QC, de l'anglais *Quality Control*). Pour une expérience, les QC sont en général un mélange de l'ensemble des échantillons analysés, ce qui permet d'avoir une bonne représentativité des échantillons. Afin de modéliser et de corriger le biais analytique de chaque métabolite, les QC sont injectés régulièrement au cours de la séquence d'acquisition. La littérature mentionne de 5 à 20 QC environ injectés au début de la séquence pour stabiliser le système puis un toutes les 10 acquisitions. Cette méthode offre également la possibilité d'intégrer des données provenant de différentes séries analytiques (Dunn et al. 2011a).

La dérive analytique des signaux (diminution de l'intensité du signal) dépend de la molécule étudiée, il est donc judicieux de corriger les données individuellement pour chaque molécule. Pour ce faire, la régression locale de type LOESS (de l'anglais *Locally Estimated Scatterplot Smoothing*) est généralement utilisée pour les données métabolomiques. Elle consiste à corriger l'intensité de chaque métabolite dans les échantillons en fonction de l'intensité de ce métabolite dans les QC passés au cours de la série d'analyse. La correction du signal pour chaque série d'analyse peut être évaluée par le calcul du coefficient de variation des QC ou encore de la baisse du signal au cours de l'analyse. Cependant, cette correction a ses limites et n'est vraiment efficace que sur les petites séries correspondant à 35-40h d'analyse. De plus elle nécessite d'injecter fréquemment des QC (tous les 4, 5 échantillons) pour une correction optimale du signal (Dunn et al. 2011a).

La normalisation par les standards internes (avant l'extraction) ou externes (à la fin de l'extraction) est souvent utilisée en métabolomique. Cependant cette méthode de normalisation

n'est pas parfaite. En effet des métabolites élués en même temps que les standards peuvent influencer leur ionisation à cause des phénomènes de suppression d'ions. Il s'agit du phénomène de «cross contribution» (Redestig et al. 2009). Il existe d'autres méthodes de normalisation telles que la normalisation à l'aire totale ou encore à la médiane de l'intensité du métabolite (Lee et al. 2012a).

Toutefois, toutes ces méthodes de normalisation possèdent leurs avantages et leurs inconvénients. A ce jour, il n'existe pas de méthode de normalisation permettant d'éliminer 100% de la variabilité analytique tout en gardant la variabilité biologique.

IV.2.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont pour but de générer des empreintes métaboliques pertinentes et discriminantes entre plusieurs groupes d'échantillons. Deux types d'analyses statistiques sont utilisables, les analyses univariées et multivariées :

IV.2.6.1. Analyses multivariées

Les analyses multivariées permettent d'étudier simultanément un grand nombre de variables. Elles sont adaptées pour synthétiser et visualiser rapidement dans un espace réduit les nombreux signaux (métabolites) obtenus lors des analyses métabolomiques. En raison de la disparité en intensités, des variations inter-échantillons entre les variables étudiées et des fluctuations incontrôlées lors des analyses chimiques, les données exportées doivent être préalablement soumises à un procédé de prétraitement dit de « normalisation ». Il convient de « centrer » les données (pour déplacer la distribution des valeurs autour de la valeur de 0 et non autour de la moyenne, c'est-à-dire retrancher l'intensité moyenne de la variable à l'intensité de la variable dans l'échantillon donné) et, si besoin, d'effectuer une mise à l'échelle (appelée *scaling* en anglais). Ceci se fait selon une mesure de distribution (par exemple en utilisant l'écart-type, on parle alors de réduction) ou une mesure de taille (comme l'utilisation de la moyenne ou du rang ou encore une « transformation » comme la transformation logarithmique).

Lorsque l'on détecte X variables par observation (par exemple, X métabolites dans un échantillon), chaque observation est alors représentée par un point dans un espace à X dimensions. Cette multi-dimensionnalité est difficilement interprétable. L'intérêt des outils statistiques multivariés est de permettre de condenser l'information contenue dans les X variables en quelques variables latentes ou composantes principales en conservant au maximum la variabilité entre les variables originelles. Cela favorise considérablement l'interprétation des données. Les composantes principales sont classées en fonction de leur capacité à interpréter la

variance entre les variables. Ainsi la 1^{ère} composante est celle qui explique la plus grande variance. La 2^{ème} composante explique un pourcentage Y de la variance qui n'est pas expliquée par la 1^{ère} et est orthogonale à cette dernière et ainsi de suite. Les deux, trois premières composantes permettent d'expliquer la majorité de la variance totale. Les échantillons sont donc représentés dans cet espace à 2, 3 dimensions (axes) qui est appelé « score plot ». Les échantillons sont regroupés en fonction de leur similarité ou séparés en fonction de leur différence. A partir de ce « score plot » il est possible de mettre en évidence les variables qui permettent de séparer ou de regrouper les variables. Il s'agit du « loading plot ». Ces variables se répartissent de part et d'autre du graphique par analogie aux échantillons qui les sur-expriment ou sous-expriment, permettant ainsi de mettre en évidence des variables discriminantes. La Figure 18 est tirée de la revue de Roux *et al.*, (Roux et al. 2011) représente l'interprétation d'une matrice de données en analyses multivariées.

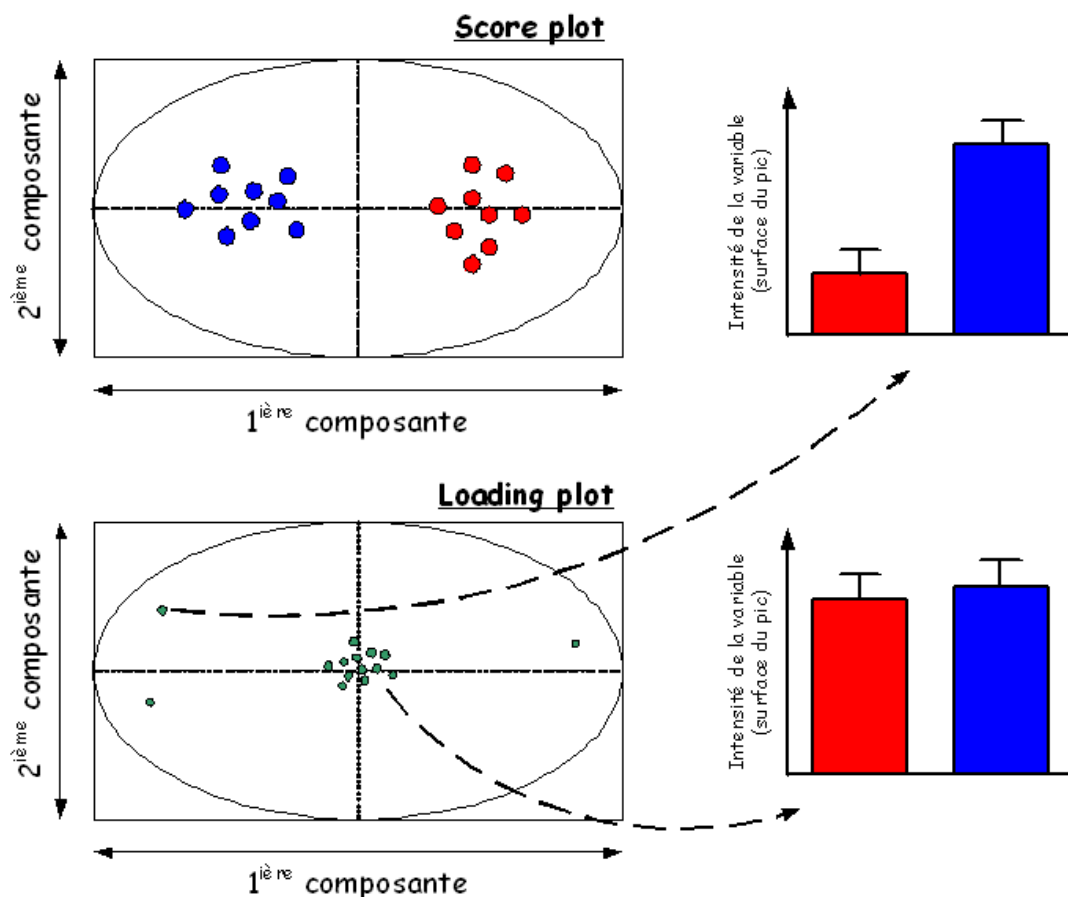


Figure 18 : Analyses statistiques multivariées. Tiré de Roux et *al.* 2011

Les échantillons peuvent contenir des informations Y qui peuvent être continues (par exemple le poids) ou discrètes (par exemple sain ou malade). Il existe deux types d'analyses statistiques

multivariées en fonction des questions que l'on se pose et des informations Y des échantillons dont on dispose :

- Les analyses statistiques descriptives

L'objectif est d'obtenir une vision globale des données, sans aucun *a priori*, afin de révéler la structure latente. La plus connue est l'analyse en composante principale (ACP). Elle permet de décrire les données et n'a pas besoin de l'information Y. Elle permet ainsi de décrire les variables et de mettre en évidence les variables prépondérantes dans la répartition spontanée des échantillons.

- Les analyses statistiques explicatives et prédictives

L'objectif est d'expliquer une ou plusieurs informations Y (continues ou discrètes) en fonction des variables explicatives X contenues dans les matrices de données. Parmi les méthodes explicatives nous avons la régression PLS (de l'anglais Partial Least Squares) ou régression des moindres carrés partiels ou encore OPLS (de l'anglais Orthogonal Partial Least Squares). Le but est de maximiser les corrélations entre les variables expliquées X et les variables à expliquer Y. Le but est de construire un modèle qui permet de maximiser la séparation entre les classes d'appartenance des observations. Il permet ainsi de mettre en évidence les métabolites qui permettent de séparer les groupes. Ces méthodes peuvent également être utilisées dans un but prédictif. Dans ce cas, le modèle construit à partir d'un jeu de données initiales peut également être utilisé pour expliquer un nouveau jeu de données. On cherche alors à tester la capacité prédictive du modèle en utilisant un jeu de données indépendant externe.

L'OPLS-DA est une modification de la PLS-DA. Elle consiste à diviser la variance systématique des variables X en deux parties. La première est linéairement reliée à la classe Y et la seconde est indépendante (orthogonale) à Y. Seule la variation liée à Y est utilisée pour modéliser Y. L'OPLS-DA permet donc de séparer les variabilités inter-classe et intra-classe. Ce fractionnement de la variance a pour objectif de faciliter l'interprétation et l'application du modèle à de nouveaux échantillons.

- Paramètres des modèles multivariés

Chaque modèle multivarié est caractérisé par ses capacités à modéliser les variables. Ses capacités de modélisation sont données par les paramètres R^2X , R^2Y et Q^2 .

L'ACP est caractérisée par les paramètres de R^2X et Q^2 alors que les modèles supervisés tels que l'OPLS-DA sont caractérisés par les paramètres de R^2X , R^2Y et Q^2 .

Le paramètre R^2X représente la variation des variables X qui est expliquée par le modèle. Si par exemple $R^2X=0,32$, cela veut dire que 32% de la variabilité entre les variables X est expliquée par le modèle. Le paramètre R^2Y représente la variabilité liée aux variables Y qui est

expliquée par le modèle. Et enfin le paramètre Q^2 représente la part de variation des variables qui peut être prédit par le modèle.

IV.2.6.2. Analyses univariées

Les analyses statistiques univariées permettent d'analyser une à une les variables explicatives en fonction d'une métadonnée (concentration, ordre de passe, origine géographique...) sans tenir compte des interactions existant entre les variables contrairement aux analyses multivariées. Dans les études métabolomiques, ces analyses sont généralement faites en complément des analyses multivariées pour analyser individuellement les métabolites identifiés comme étant très discriminants dans les analyses multivariées. Elles permettent donc d'évaluer les altérations de ces métabolites dans un groupe d'échantillons par rapport à un autre et ainsi suivre à terme un biomarqueur et non un profil complet. Ces analyses aident également à la compréhension physiopathologique car elles permettent de sortir un groupe de métabolites significativement modifiés avec un certain seuil de taux de modification et les intégrer dans des voies métaboliques afin d'émettre des hypothèses mécanistiques.

IV.3. Etudes métabolomiques dans la SLA

Lors de ma thèse, j'ai contribué à réaliser une revue de la littérature permettant d'avoir une vue d'ensemble des études concernant cette pathologie (Blasco H., Patin F., Madji Hounoum B., et al 2016). Comme pour la majorité des études dans le domaine de la santé, les principaux objectifs de l'approche métabolomique dans la SLA sont : (i) d'améliorer la précision du diagnostic, (ii) de caractériser le phénotype, (iii) d'améliorer la compréhension de la physiopathologie et (iv) de caractériser les effets métaboliques des traitements. Une des perspectives les plus prometteuses est l'utilisation de la métabolomique dans les essais thérapeutiques afin d'améliorer la méthodologie de ces essais par l'apport de cette discipline en expansion qu'est la « pharmacométabolomique ».

À ce jour, neuf articles ont rapporté des études métabolomiques réalisées chez les patients SLA et quelques études pathophysiologiques et des effets des médicaments chez les patients ou les modèles de la SLA. Ces différentes études ouvrent les perspectives de découverte de biomarqueurs spécifiques, qui permettraient d'approfondir les connaissances des voies physiopathologiques impliquées dans la maladie et permettre l'identification de cibles thérapeutiques (Blasco et al. 2010; Blasco et al. 2013; Blasco et al. 2016a; Lawton et al. 2014). Ces biomarqueurs pourraient aider au diagnostic précoce et au pronostic de la maladie, ce qui

permettrait une prise en charge précoce des patients dit « à risque » de développer une SLA avant l'apparition des premiers symptômes (Blasco et al. 2014a; Blasco et al. 2016d; Turner et al. 2013a; Turner et al. 2009).

Différents marqueurs biologiques ont été identifiés dans la SLA par des études métabolomiques, notamment le glutamate (Blasco et al. 2013; Wuolikainen et al. 2011) et de nombreux autres métabolites (listés dans la revue ci-dessous) (Blasco et al. 2016c; Lawton et al. 2014; Wuolikainen et al. 2016). Ces biomarqueurs ont permis d'identifier des voies métaboliques altérées dans la SLA et de construire les réseaux métaboliques impliqués dans la pathogénèse de la maladie. Cependant, aucun marqueur biologique n'est utilisé en pratique de routine à ce jour, principalement à cause de l'hétérogénéité de la maladie et l'absence de méthodologie standardisée appliquée à la recherche de biomarqueurs. De ce fait, les marqueurs trouvés ne sont pas toujours les mêmes d'une étude à une autre mais ils convergent vers les mêmes voies physiopathologiques. De manière générale, en plus de l'hétérogénéité des méthodes analytiques, les études sont réalisées par site sur des petites cohortes et ne sont donc pas forcément représentatives de la population SLA et nécessiteraient une validation des résultats par une cohorte externe. L'ensemble de ces manques font que les résultats d'une étude à un instant donné ne sont pas transposables à une autre. Une standardisation des méthodes et la mise en place d'un consortium sont primordiales pour améliorer l'apport de la métabolomique dans les études sur la SLA.

REVIEW ARTICLE

Metabolomics in amyotrophic lateral sclerosis: how far can it take us?

H. Blasco^{a,b,c}, F. Patin^{a,b,c}, B. Madji Hounoum^{a,b}, P. H. Gordon^d, P. Vourc'h^{a,b,c}, C. R. Andres^{a,b,c} and P. Corcia^{a,b,e}

^aInserm U930, Tours; ^bUniversité François-Rabelais, Tours; ^cLaboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHRU de Tours, Tours, France; ^dNorthern Navajo Medical Center, Shiprock, NM, USA; and ^eCentre SLA, Service de Neurologie, CHRU Bretonneau, Tours, France

Keywords:

amyotrophic lateral sclerosis, biomarkers, diagnosis, metabolomics, prognosis

Received 31 August 2015
Accepted 4 December 2015

European Journal of Neurology 2016, **23**: 447–454

doi:10.1111/ene.12956

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset motor neuron disease. Alongside identification of aetiologies, development of biomarkers is a foremost research priority. Metabolomics is one promising approach that is being utilized in the search for diagnosis and prognosis markers. Our aim is to provide an overview of the principal research in metabolomics applied to ALS. References were identified using PubMed with the terms 'metabolomics' or 'metabolomic' and 'ALS' or 'amyotrophic lateral sclerosis' or 'MND' or 'motor neuron disorders'. To date, nine articles have reported metabolomics research in patients and a few additional studies examined disease physiology and drug effects in patients or models. Metabolomics contribute to a better understanding of ALS pathophysiology but, to date, no biomarker has been validated for diagnosis, principally due to the heterogeneity of the disease and the absence of applied standardized methodology for biomarker discovery. A consensus on best metabolomics methodology as well as systematic independent validation will be an important accomplishment on the path to identifying the long-awaited biomarkers for ALS and to improve clinical trial designs.

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset motor neuron disease. Although progress in the understanding of genetic causes and pathophysiological mechanisms has been made, principal questions are unanswered. The search for biomarkers that aid diagnosis, characterize phenotype, define pathophysiology and measure disease progression is of utmost importance for the field.

The characteristics of an 'ideal' biomarker [1,2] are high sensitivity and specificity throughout the disease course including the pre-symptomatic stage, clinical relevance with the capacity to discriminate different clinical phenotypes, reproducibility and easy accessibility.

Several approaches have been tested to find biomarkers from neuroimaging (magnetic resonance spectro-

scopy and diffusion tensor imaging), neurophysiological studies (thanks to the tracking transcranial magnetic stimulation that appeared as a useful diagnostic investigation when combined with either the Awaji criteria or cortical thickness analysis [3–5]) to fluid analysis.

Metabolomics is a powerful strategy to ascertain metabolic signatures from a combination of small molecules in biological fluid. The method selects metabolites across a large spectrum of concentrations, polarity and masses [6–8], based on high-throughput techniques. This emerging strategy has been used in the field of neurodegenerative diseases, especially ALS.

Similar to studies in other fields, the main objectives of the metabolomics approach in ALS are (i) to improve diagnostic accuracy, (ii) to characterize phenotype, (iii) to improve understanding of pathophysiology and (iv) to characterize the metabolic effects of drug interventions. The aim of this review is to provide an overview of the principal research in the field and to summarize the principal goals, methodologies and most significant results of the studies published to date in ALS. The strengths and limitations of the

Correspondence: Dr H. Blasco, Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire, Hôpital Bretonneau, CHRU de Tours; 2, Bd Tonnellé, 37044 – Tours Cedex 1, France (tel.: + 33 2 47 47 37 95; fax: + 33 2 47 47 86 13; e-mail: helene.blasco@univ-tours.fr).

strategy are then discussed and future perspectives for metabolomics studies in ALS are provided.

Search strategy

References for this review were identified by searches of PubMed and references from relevant articles. The search terms were 'metabolomics' or 'metabolomic' and 'ALS' or 'amyotrophic lateral sclerosis' or 'MND' or 'motor neuron disorders'. The date of the publications was not restricted. The terms 'amyotrophic lateral sclerosis' or 'ALS' and 'biomarker(s)' were also searched and, amongst these studies, only the papers reporting metabolomics data were selected.

Studies aimed at improving diagnostic accuracy

Identification of biomarkers for diagnosis

Study sample

Nine metabolomics studies have been conducted with the intent of identifying diagnosis biomarkers (Table 1); all compared profiles in cerebrospinal fluid (CSF) or blood from ALS patients to those of controls, but so far none has tested both types of samples. Controls comprised patients with other neurological diseases or healthy controls who are most widely available but cannot aid in the assessment of biomarkers that discriminate between diseases. To date, results of metabolomics studies in ALS suffer from a lack of specificity, due in part to heterogeneity of both ALS and control subjects [9].

Pre-analytical and analytical steps

Wuolikainen *et al.* [10] reported the optimal conditions for a metabolomics study in ALS CSF. Since the first metabolomics study in ALS [11], emergent technologies, including high resolution ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy [12–14], gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), have been developed that improve sensitivity, specificity and reliability of the technique [15–18]. The different steps of metabolomics studies are shown in Fig. 1.

Strategy of analysis

Targeted metabolomics focuses on metabolites with sufficient signal [12,13]. This strategy may have a two-step analytical approach with univariate analyses that assess the contribution of each metabolite followed by multivariate modelling of the most important contributors.

To date, most studies have used untargeted approaches with multivariate analyses followed by univariate analysis (Tables 1 and S1).

Several groups [11,17,19,20] used orthogonal partial least squares and discriminant analysis (OPLS-DA) modelling using SIMCA software. Clustering analysis using Ward's method can assess clusters with minimum within-cluster variance [15,16]. One group used a random forest to generate classification trees that categorized patients and controls; a Wilcoxon test highlighted candidate biomarkers.

Whatever the statistical strategy, biostatisticians familiar with the questions at hand are best able to manage the high ratio of generated metabolites to the size of the population with a reasonable scope of conclusions. Raw data from one targeted study [13] were used to evaluate a new mathematical tool, never applied to metabolomics: the dominance-based rough set approach (DRSA) [21]. The classification perspective was adopted to apply an original methodology based on DRSA to induction of 'condition–decision' relationships from the data and representing them by so-called monotonic decision rules. This strategy thus opened the perspective of developing new mathematical tools.

Validation of biomarkers that predict diagnosis

There are two principal strategies that validate potential diagnostic biomarkers. The first is to perform the same analysis on two similar types of samples collected from two different cohorts with the same clinical and demographic characteristics. The second strategy is to develop a multivariate model that explains the pathophysiological findings and to apply this model to an independent cohort to validate its performance (external validation).

Internal validation

All the studies based on OPLS-DA using SIMCA used internal validation, based on cross-validation by withholding one-seventh of the samples in seven successive simulations, such that each sample was omitted once in order to guard against overfitting.

Table S2 shows some performances of diagnosis predictors using methodology based on a single set. The performances are correct but the scope of these results is limited by bias inherent to the use of a single set. As this disease is highly heterogeneous the applicability of the models cannot be ensured.

A group compared patients and controls in both sets (sets I and II) [17]; prediction performance was different between the sets of data, suggesting a heterogeneity amongst participants [17].

Table 1 Characteristics of metabolomics studies performed in ALS patients

Reference	Samples	Patients (number, % male, age)		Controls (number, % male, age)		External validation	Multicentric study	Analytical techniques
		ALS	MND	Healthy controls	Neurological controls			
Gray <i>et al.</i> [14]	CSF	41 70% male 62.2 ± 10.4 years		14 42.9% male 53.2 ± 8.9 years		No	No	NMR
Lawton <i>et al.</i> [16]	Plasma	172 56% male 58.4 ± 10.2 years		50 46% male 53.2 ± 10.1 years	73 66% male 54.9 ± 0.2 years	No	Yes	GC-MS UPLC/MS/ MS ²
Blasco <i>et al.</i> [19]	CSF	81 59% male 63.9 ± 11.6 year	14 50% male 60.9 ± 13.4 years		86 54.8% male 63.2 ± 15.0 years	Yes	Yes	NMR
Blasco <i>et al.</i> [20]	CSF	66 63.6% male 63.4 ± 11.5 years			128 50% male 62.2 ± 12.5 years	No	Yes	LC-HRMS
Lawton <i>et al.</i> [15]	Plasma	Study 1 : 62 73% male 54.4 ± 14.0 years Study 2: 99 52% male 58.0 ± 10.9 years		Study 1: 69 64% male 50.7 ± 15.6 years Study 2: 48 44% male 53.4 ± 10.1 years		Yes	Yes	GC-MS UHPLC/ MS/MS ²
Wuolikainen <i>et al.</i> [17]	CSF	Set I: 38 49% male 60.2 ± 9.7 years Set II: 40 52.2% male 63.2 ± 10.9 years			Set I: 45 44% male 60.6 ± 8.3 years Set II: 43 51% male 62.6 ± 11.1 years	Yes	No	GC/TOFMS
Blasco <i>et al.</i> [13]	CSF	50 62% male 64.6 (35.0–90.6) years			44 61% 60.6 (26.8–82.9) years	No	Yes	NMR
Kumar <i>et al.</i> [12]	Serum	30 83% male 42 ± 17 years		25 80% male 40 ± 20 years	10 100% male 36 ± 10 years	No	No	NMR
Rozen <i>et al.</i> [11]	Plasma	Study 1: 23 Study 1: 5 62% male 54.5 ± 12.4 years Study 2: 17 Study 1: 2 68% male 52.3 ± 13.5 years		Study 1: 30 55% 55.6 ± 13.0 years Study 2: 33 67% male 56.3 ± 13.5 years		No	No	HPLC and electrochemical detection

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CSF, cerebrospinal fluid; GC-MS, gas chromatography coupled with mass spectrometry; GC/TOFMS, gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry; HPLC, high performance liquid chromatography; LC-HRMS, liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry; MND, motor neuron disorder; NMR, nuclear magnetic resonance; UPLC/MS/MS², ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; UHPLC/MS/MS², ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

Lawton *et al.* [16] predicted diagnosis using other mathematical methods (Table S2), but the analysis overfits the data due to absence of an independent

cohort. Thus, the investigators evaluated potential bias with a random permutation ($n = 100$) that corresponds to the internal validation performed by SIMCA.

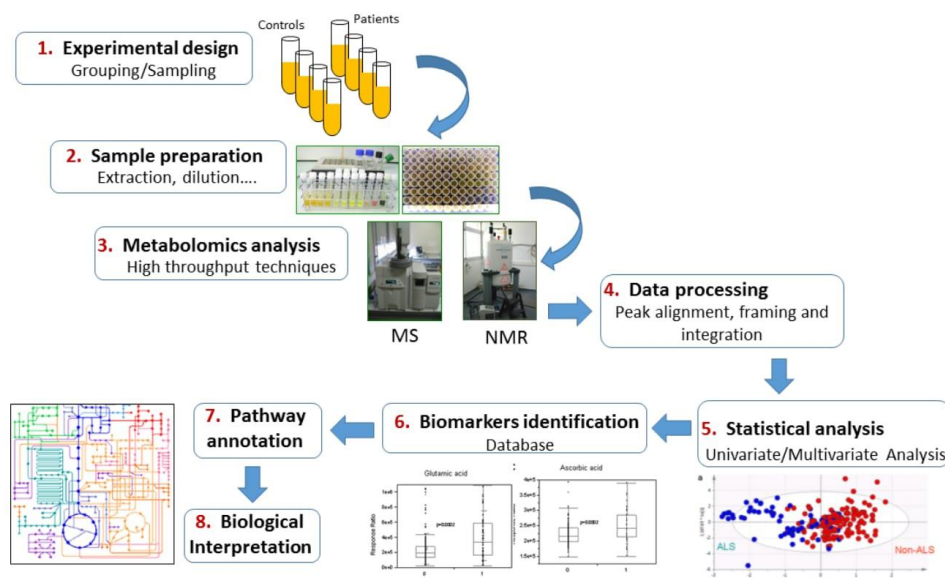


Figure 1 Process of metabolomics analysis to find biomarkers and to explore disease pathophysiology.

External validation

Many authorities stress that external validation is necessary in the process of developing effective biomarkers [2,22]. Experiments done on independent instrument platforms [15] are one technique but sample heterogeneity means that examination of an independent cohort assesses validity better than other analytical techniques.

In our study [19], an important gap between the prediction performances in the test set compared to the training set was highlighted: e.g. sensitivity fell from 98.6% to 78.9% and specificity from 100% to 76.5% between the two.

Very good results in studies that used a single cohort to model diagnosis compared to the moderately good results obtained when employing an independent cohort suggest that the latter step lends greater rigor and is indispensable for external validation.

To date, no biomarker has had full external validation and none is ready for routine clinical use.

Phenotypic characterization

Two groups showed a correlation between metabolite levels and disease progression [12] or the ALS Functional Rating Scale [16]. Moreover, Rozen *et al.* [11] discovered a distinctive metabolic signature of patients

with lower motor neuron disease compared to ALS patients. Thus, metabolomics could help in the understanding of mechanisms seemingly related to ALS.

Wuolikainen *et al.* [17,18] evaluated metabolomics profiles by gene mutation underlying familial ALS in two studies. Comparison of the metabolome between patients with *SOD* mutations and the sporadic ALS patient group without any mutation revealed excellent ability to distinguish between groups. *SOD1* mutations are rare, but patients with more common mutations such as *C9ORF72* could also be studied with the goal of improving understanding of the disease physiology.

Examination of cellular events

When focusing only on studies that provided identities of the molecules, no matter the degree of confidence that the identification was correct, not always detailed in the papers, our examination of publications found considerable disagreements amongst studies. The most consistently identified metabolic processes, in blood and CSF, were provided by the analysis of all published relevant metabolites using MetaboAnalyst 3.0 (developed by the University of Alberta and McGill University, Alberta and Montreal, Canada) (Table 2). To note, *P* values are calculated from the enrichment analysis and adjusted by the Holm–Bonferroni

method. Interestingly, the involvement of branched amino acids (BCAA) (Table 2, Fig. S1) was found. BCAA, precursors for neurotransmitter synthesis, may be neurotoxic at a high level and may modulate glutamate metabolism, largely implicated in ALS pathogenesis [23–26]. The mitochondrial transamination of BCAA (BCAT) in astrocytes initiates their catabolism, and a BCAA-based nitrogen shuttle might influence the glutamate/glutamine cycle in brain [25,27]. Alpha-ketoglutarate, produced by the tricyclic acid cycle in astrocytes, is transaminated to glutamate by mitochondrial BCAT; branched-chain keto acids could be transferred to neurons for a second transamination [28]. Glutamate metabolism is also one of the most relevant pathways, as this amino acid is the only biomarker that has been identified from both metabolomics and targeted studies. Like other highlighted metabolic pathways, the aminoacyl RNA biosynthesis

pathway is not specific for ALS. Aminoacyl transfer RNA are substrates for translation and their synthesis aims to match amino acids with transfer RNA containing the corresponding anticodon. The identification of this pathway by MetaboAnalyst software is due to the high number of discriminant amino acids in the majority of the studies. Due to the differences in analysed tissues and/or analytical methods in the different studies, discrepancies exist in the identification of the most relevant biomarkers and even in the level ratio (ALS/controls) of metabolites.

Researchers found a relationship between some metabolites and apoSOD1 structure as well as aggregation mechanisms [29], thus suggesting the relevance of combining metabolomics and fundamental experiments [29]. A metabolomics study performed in SOD1 G93A mice [30] revealed that pre-symptomatic SOD1 mice showed significant differences in levels of some

Table 2 Main metabolic pathways potentially altered in ALS, including the number of metabolites found in the different metabolomics studies/total number of compounds in the pathway

Metabolic ways	Number of metabolites	P value
Caffeine metabolism		
3-Methylxanthine, 7-methylxanthine, caffeine, theobromine, theophylline, 1,7-dimethyluric acid, paraxanthine, 1-methyluric acid	8/21	1.09E-06
Aminoacyl-tRNA biosynthesis		
L-Serine, L-histidine, L-phenylalanine, L-threonine, L-cysteine, L-tyrosine, L-glutamic acid, L-isoleucine, L-glutamine, L-valine, L-proline	11/75	6.33E-06
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis		
Pyruvic acid, L-threonine, alpha-ketobutyrate, L-isoleucine, 2-oxoisovaleric acid, L-valine	6/11	8.91E-05
Pantothenate and CoA biosynthesis		
Pyruvic acid, L-cysteine, 5,6-dihydrouracil, 2-oxoisovaleric acid, L-valine, pantothenic acid	6/27	8.91E-05
D-Glutamine and D-glutamate metabolism		
L-Glutamic acid, L-glutamine, D-glutamic acid, D-glutamine	4/11	0.0002
Glycine, serine and threonine metabolism		
Pyruvic acid, L-serine, L-threonine, L-cysteine, alpha-ketobutyrate, creatine, sarcosine	7/48	0.0004
Nitrogen metabolism		
Formic acid, L-histidine, L-phenylalanine, L-tyrosine, L-glutamic acid, L-glutamine	6/39	0.0007
Arginine and proline metabolism		
Pyruvic acid, L-glutamic acid, L-glutamine, L-proline, D-proline, creatine, creatinine, sarcosine	8/77	0.0014
Pyruvate metabolism		
Formic acid, pyruvic acid, acetic acid, 1,2-propanediol	4/32	0.0127
Sulfur metabolism		
Acetic acid, L-serine, L-cysteine	3/18	0.0141
Propanoate metabolism		
Acetone, alpha-ketobutyrate, L-valine, 2-hydroxybutyrate	4/32	0.0128
Taurine and hypotaurine metabolism		
Pyruvic acid, acetic acid, L-cysteine	3/20	0.0188
Glutathione metabolism		
Ascorbic acid, L-cysteine, L-glutamic acid, pyroglutamic acid	4/38	0.0229
Alanine, aspartate and glutamate metabolism		
Pyruvic acid, L-glutamic acid, L-glutamine	3/24	0.0307
Phenylalanine metabolism		
Pyruvic acid, L-phenylalanine, L-tyrosine, 3-phenylpropionic acid	4/45	0.0399
beta-Alanine metabolism		
5,6-Dihydrouracil, pantothenic acid, L-histidine	3/28	0.0459

P value is calculated using MetaboAnalyst 3.0.

amino acids with modulatory effects of gender and disease stage. This approach has also been used in cell models of ALS and revealed an increased aerobic glycolysis and amino acid deficit [31]. The findings in mice and cell models are consistent with reports in ALS patients. However, these metabolic pathways are not specific; they are characteristic of cell aggression.

Metabolomics can also be used to study the role of putative toxins such as beta-*N*-methylamino-L-alanine in pathogenesis [29].

Examination of the metabolic effect of drugs

Most metabolomics studies have focused on the development of diagnosis biomarkers and have usually included patients before taking medications. In blinded studies, a group [11] showed that the metabolic signature related to riluzole was strong enough to identify patients on the drug with 100% confidence. Lawton *et al.* [15] performed a wash-out sub-study and observed that the wash-out had minimal effect on healthy subjects but affected numerous metabolites in ALS patients. This kind of study offers the promise that larger metabolomics studies could help evaluate the mechanism of action of drugs used in clinical trials.

Metabolomics analysis to elucidate the metabolic effect of methionine sulfoximine in murine models revealed a modification of the plasma amino acid profile [30]. A global metabolomics approach characterized the neuroprotective effects of pioglitazone in *Drosophila* [32] and these findings may deserve further study in order to use potential biomarkers in clinical trials.

Perspectives

So far no biomarker can by itself diagnose or measure progression in ALS better than clinical examination. The ultimate promise of metabolomics biomarkers is to aid early diagnosis for routine practice, but hurdles remain [33]. New applications are emerging almost daily, and as the rigor of the metabolomics approach improves apace so too will the number of practical applications.

Steps for the development of diagnostic markers have been established but few studies follow these procedures [22], and consensus on what is needed to validate a diagnostic biomarker is still missing.

Metabolomics standardization

As study results still vary from laboratory to laboratory, the limitation of this metabolomics technology

has to be considered when trying to move it forward to the clinic.

Validation of analytical techniques should be based on methods established for all biological specimens and used in routine practice. Targeted studies such as enzyme activity measurement, gene analysis should be planned to validate metabolomics findings. Analysis of two independent sets of data, or external validation, is the minimum necessary and will be strengthened by confirmation of findings in an independent laboratory.

Combined methodologies

Combining analyses from different biological fluids, several analytical techniques, targeted approaches and clinical findings adds complexity but might be the currently most expeditious approach in a disease as complex as ALS.

The recommendations for pre-analytical steps and analytical methods used in metabolomics studies should be the same as those used in routine laboratories, particularly to ensure data reproducibility. They may be difficult to follow by some laboratories; e.g. the criterion of acceptable reproducibility according to standard guidelines may not be fulfilled for a metabolic profile analysed by mass spectrometry. The details about sample storage and validation of analyses are rarely reported. However, a coefficient of variation for replicated data showing that concentration variations are physiological and non-analytical [34] is requested. Importantly, data preprocessing and analysis are the foundation of a robust methodology but the greatest risk of high-throughput techniques is mishandling of multiple and complex data, leading to biased results. Given the size of the CSF metabolome and the broad range of molecular weights for compounds under study, as well as the variability of physical and chemical properties, no single method can identify and quantify all or even most compounds. NMR, GC-MS and LC-HRMS technologies have differing characteristics; each suffers from limited sensitivity, resolution or difficulties in identifying new metabolites and the combination of these methodologies may offer a better metabolome description.

A convincing mathematical tool that can integrate large quantities of data from many analytical techniques has yet to be developed. Metabolomics may be one of the ways to solve a biomarker quandary in ALS, but it is suggested that association with genomics, transcriptomics and /or proteomics would enhance the predictions of diagnosis and prognosis [35].

Implementation of metabolomics in clinical trials

A recent review [36] that outlines reasons underlying the lack of recent successes in ALS trials highlighted the need for reassessment of approaches to drug development.

A clinical trial is an ideal setting to examine the disease physiology in ALS, with large numbers of patients undergoing longitudinal follow-up. Metabolomics could provide a metabolic signature at baseline and over the course of the disease. Moreover, metabolomics profiling is ready for audition as a secondary outcome measure, also called a substitution marker [37,38].

The association between the CSF metabolomics profile and survival could be examined and correlations made between blood and CSF profiles to facilitate metabolomics transition to an end-point for clinical trials.

The determination of subgroups of patients based on clinical characteristics alone has proved too insensitive to discern any but the most obvious prognostic measures such as site of onset and for clinical measures cannot assess the underlying metabolic processes. Metabolomics is able to discriminate patient phenotype and, in combination with clinical information, could help stratify patients in clinical trials and separate participants who responded to an intervention from those who did not.

Pharmacometabolomics can be used to define a unique signature that represents changes in the metabolome induced by drug treatment, and could complement interactions, pharmacokinetics and pharmacodynamics studies to assess drug interactions. Given recent advances in the genetics of ALS, examination of the genetic–metabolism interaction may also be important.

Conclusion

Rapid advancement in the field of metabolomics is real progress for improved understanding of ALS pathophysiology. To date, no biomarker has been validated for diagnosis, principally due to the heterogeneity of the disease and the absence of applied standardized methodology for biomarker discovery. Once important methodological constraints are solved, the approach appears poised to advance rapidly toward identifying diagnostic biomarkers and could help more in improving clinical trial designs.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no financial or other conflicts of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Discriminant metabolites between ALS patients and controls revealed by the different metabolomics studies mapped onto a KEGG pathway (reference pathway).

Table S1. Detailed diagnosis of patients and controls from the main clinical metabolomics studies.

Table S2. Performances of diagnosis prediction from metabolomics studies (i.e. internal validation except the results in italic that correspond to external validation).

References

1. Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2009; **8**: 94–109.
2. Otto M, Bowser R, Turner M, *et al.* Roadmap and standard operating procedures for biobanking and discovery of neurochemical markers in ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2012; **13**: 1–10.
3. Menon P, Kiernan MC, Vucic S. Cortical hyperexcitability precedes lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clin Neurophysiol* 2015; **126**: 803–809.
4. Grieve SM, Menon P, Korgaonkar MS, *et al.* Potential structural and functional biomarkers of upper motor neuron dysfunction in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2015; **17**: 85–92.
5. Liu CH. Anatomical, functional and molecular biomarker applications of magnetic resonance neuroimaging. *Future Neurol* 2015; **10**: 49–65.
6. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 263–269.
7. Wang JH, Byun J, Pennathur S. Analytical approaches to metabolomics and applications to systems biology. *Semin Nephrol* 2010; **30**: 500–511.
8. Koek MM, Jellema RH, van der Greef J, Tas AC, Hankemeier T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics* 2011; **7**: 307–328.
9. Ganesalingam J, Bowser R. The application of biomarkers in clinical trials for motor neuron disease. *Biomark Med* 2010; **4**: 281–297.
10. Wuolikainen A, Hedenstrom M, Moritz T, Marklund SL, Antti H, Andersen PM. Optimization of procedures for collecting and storing of CSF for studying the metabolome in ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2009; **10**: 229–236.
11. Rozen S, Cudkowicz ME, Bogdanov M, *et al.* Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease. *Metabolomics* 2005; **1**: 101–108.
12. Kumar A, Bala L, Kalita J, *et al.* Metabolomic analysis of serum by ¹H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chim Acta* 2010; **411**: 563–567.
13. Blasco H, Corcia P, Moreau C, *et al.* ¹H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 2010; **5**: e13223.

14. Gray E, Larkin JR, Claridge TD, Talbot K, Sibson NR, Turner MR. The longitudinal cerebrospinal fluid metabolomic profile of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2015; **16**: 456–463.
15. Lawton KA, Cudkowicz ME, Brown MV, et al. Biochemical alterations associated with ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2012; **13**: 110–118.
16. Lawton KA, Brown MV, Alexander D, et al. Plasma metabolomic biomarker panel to distinguish patients with amyotrophic lateral sclerosis from disease mimics. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2014; **15**: 362–370.
17. Wuolikainen A, Moritz T, Marklund SL, Antti H, Andersen PM. Disease-related changes in the cerebrospinal fluid metabolome in amyotrophic lateral sclerosis detected by GC/TOFMS. *PLoS One* 2011; **6**: e17947.
18. Wuolikainen A, Andersen PM, Moritz T, Marklund SL, Antti H. ALS patients with mutations in the SOD1 gene have a unique metabolomic profile in the cerebrospinal fluid compared with ALS patients without mutations. *Mol Genet Metab* 2012; **105**: 472–478.
19. Blasco H, Nadal-Desbarats L, Pradat PF, et al. Untargeted 1H-NMR metabolomics in CSF: toward a diagnostic biomarker for motor neuron disease. *Neurology* 2014; **82**: 1167–1174.
20. Blasco H, Corcia P, Pradat PF, et al. Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. *J Proteome Res* 2013; **12**: 3746–3754.
21. Blasco H, Blaszczyński J, Billaut JC, et al. Comparative analysis of targeted metabolomics: dominance-based rough set approach versus orthogonal partial least square-discriminant analysis. *J Biomed Inform* 2015; **53**: 291–299.
22. Bowser R, Lacomis D. Applying proteomics to the diagnosis and treatment of ALS and related diseases. *Muscle Nerve* 2009; **40**: 753–762.
23. 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**: 73–78.
24. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1990; **28**: 18–25.
25. Hutson SM, Lieth E, LaNoue KF. Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *J Nutr* 2001; **131**: 846S–850S.
26. Contrucci V, Paradisi S, Matteucci A, Malchiodi-Albedi F. Branched-chain amino acids induce neurotoxicity in rat cortical cultures. *Neurotox Res* 2010; **17**: 392–398.
27. Hutson SM, Fenstermacher D, Mahar C. Role of mitochondrial transamination in branched chain amino acid metabolism. *J Biol Chem* 1988; **263**: 3618–3625.
28. Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr* 2006; **136**: 207S–211S.
29. Engskog MK, Karlsson O, Haglof J, et al. The cyanobacterial amino acid beta-N-methylamino-L-alanine perturbs the intermediary metabolism in neonatal rats. *Toxicology* 2013; **312**: 6–11.
30. Bame M, Grier RE, Needleman R, Brusilow WS. Amino acids as biomarkers in the SOD1(G93A) mouse model of ALS. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1842**: 79–87.
31. Valbuena GN, Rizzardini M, Cimini S, et al. Metabolomic analysis reveals increased aerobic glycolysis and amino acid deficit in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol* 2015; doi: 10.1007/s12035-015-9165-7.
32. Joardar A, Menz J, Podolsky TC, et al. PPAR gamma activation is neuroprotective in a Drosophila model of ALS based on TDP-43. *Hum Mol Genet* 2015; **24**: 1741–1754.
33. Tumani H, Teunissen C, Sussmuth S, Otto M, Ludolph AC, Brettschneider J. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurodegeneration in chronic neurological diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; **8**: 479–494.
34. Crews B, Wikoff WR, Patti GJ, et al. Variability analysis of human plasma and cerebral spinal fluid reveals statistical significance of changes in mass spectrometry-based metabolomics data. *Anal Chem* 2009; **81**: 8538–8544.
35. Shevchenko G, Konzer A, Musunuri S, Bergquist J. Neuroproteomics tools in clinical practice. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1854**: 705–717.
36. Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol* 2014; **13**: 1127–1138.
37. Beghi E, Pupillo E, Bonito V, et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of acetyl-L-carnitine for ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2013; **14**: 397–405.
38. Bozik ME, Mitsumoto H, Brooks BR, et al. A post hoc analysis of subgroup outcomes and creatinine in the phase III clinical trial (EMPOWER) of dexamipexole in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2014; **15**: 406–413.

IV.4. L'analyse métabolomique des cultures cellulaires

L'approche métabolomique dans des modèles cellulaires a émergé comme un outil prometteur avec des applications potentielles dans de nombreux domaines de la biotechnologie et de la recherche. Une étude métabolomique comprend classiquement quatre principales étapes : (i) conception expérimentale, (ii) collection et préparation des échantillons, (iii) analyse des échantillons, et (iv) traitement des données. Alors que ces étapes sont relativement standards pour la plupart des matrices biologiques, l'application de la métabolomique à l'étude des cellules implique des traitements spécifiques des échantillons. Parmi eux, la fixation «quenching» du métabolisme, l'extraction des métabolites et la préparation des échantillons en vue d'une analyse métabolomique sont des étapes délicates et indispensables qui vont conditionner la faisabilité de l'analyse, la reproductibilité du profil métabolique et la fiabilité de l'interprétation biologique des données.

Lors de ma thèse, j'ai effectué une revue de la littérature permettant de faire une synthèse des différentes méthodologies d'études métabolomiques sur des cultures cellulaires et de discuter des avantages et des limites de cette approche (Madji Hounoum et al. 2016a). Le métabolome cellulaire peut être classé en deux catégories : l'endométabolome qui regroupe tous les métabolites intracellulaires et l'exométabolome qui constitue l'ensemble des métabolites sécrétés ou présents dans le milieu extracellulaire (Dunn et al. 2011c). La présence ou l'absence, et les concentrations relatives des métabolites dans les échantillons cellulaires pourraient être considérées comme les indicateurs phénotypiques des cellules. Ainsi, l'analyse métabolomique des cellules s'est révélée comme une approche importante dans l'étude de la biochimie cellulaire et la physiopathologie de certaines maladies. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est devenue l'outil analytique privilégié pour ces types d'études, en raison de sa capacité à détecter une large gamme de concentration et de polarité de petites molécules (Gika et al. 2014).

La validité et la robustesse de l'interprétation biologique des données issues d'une étude métabolomique sur culture cellulaire dépendent principalement de la démarche expérimentale et de la méthodologie de préparation. Ces différents processus doivent être conçus, choisis de manière à permettre une couverture métabolique la plus large, à générer des données fiables et reproductibles, et avec la possibilité d'analyser un grand nombre d'échantillons.



Contents lists available at ScienceDirect

Trends in Analytical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/trac



Liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry-based cell metabolomics: Experimental design, recommendations, and applications



Blandine Madji Hounoum ^a, Hélène Blasco ^{a,b}, Patrick Emond ^a, Sylvie Mavel ^{a,*}

^a Université François-Rabelais, INSERM U930 'Imagerie et Cerveau', 10 BvTonnellé, 37044 Tours, France

^b Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHRU de Tours, Tours, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Cellular extract
Quenching
Extraction
LC–MS
Workflow
Sample pretreatment

ABSTRACT

Cell metabolomics is a comprehensive analytical approach to study small biological molecules involved in many fundamental intracellular functions, linking mechanistic biochemistry to cell phenotype. Metabolism is vital to every aspect of cell function, thus the collection of reliable metabolomic data sets, the culture and sampling conditions used, and the metabolic state of the cells are crucial. Cell-dependent methods, such as cellular quenching and extraction protocols, have been developed, but no universal methodology for sample pretreatment has been developed yet. In this article, various methods to study cell metabolomics are reviewed. High-resolution mass spectrometry can improve analysis, providing excellent mass accuracy and sensitivity. An overview of the sample processing methods commonly used in cell metabolomics based on liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry (LC–HRMS) is provided in this study, with details of the critical steps for cell metabolomics. Examples of applications for cellular metabolite profiling are described and perspectives in this field are discussed.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	119
1.1. Applications of cell metabolomics	119
1.2. Advantages of cell metabolomics	120
1.3. Challenges in cell metabolomics	120
2. Experimental design for cell metabolomics	120
2.1. Cell types used in metabolomics	120
2.2. Cell culture conditions	120
2.2.1. Formulation of the medium	120
2.2.2. Cell density	122
2.2.3. Cell passage	122
3. Sample processing methods in cell metabolomics	122
3.1. Sample collection and preparation in cell metabolomics	122
3.2. Methods for processing extracellular and intracellular metabolites	122
3.2.1. Intracellular metabolites	122
3.2.2. Extracellular metabolites	123
4. LC–HRMS-based cell metabolomics	124
4.1. Liquid chromatography	124
4.2. High-resolution mass spectrometry	124
4.3. Data preprocessing parameters	124
4.4. Data analysis	124

Abbreviations: ACN, acetonitrile; amu, atomic mass units; C18, octadecyl carbon chain; FTICR, Fourier transform ion cyclotron resonance; EI, electron impact; ESI, electrospray ionization; HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography; HRMS, high-resolution mass spectrometry; LC–MS, liquid chromatography–mass spectrometry; LN₂, liquid nitrogen; PBS, phosphate-buffered solution/saline; PFPP, pentafluorophenylpropyl; TOF, time of flight; UHPLC, ultrahigh-performance liquid chromatography.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 47 36 72 40; Fax: +33 2 47 36 72 24.

E-mail address: sylvie.mavel@univ-tours.fr (S. Mavel).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.003>

0165-9936/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

4.5.	Metabolite identification	125
4.6.	Validation method	125
4.7.	Data normalization	125
5.	LC-HRMS-based cell metabolomics applications	126
5.1.	Targeted cellular metabolomics	126
5.2.	Untargeted cellular metabolomics	126
6.	Perspectives	126
7.	Conclusion	126
	Acknowledgments	126
	References	126

1. Introduction

The metabolome is a collection of thousands of small molecules (<1000 Da) undergoing chemical transformation during metabolism, and is generated by every aspect of cell function. Metabolomics aims to provide a qualitative and quantitative description of the final products of cellular regulatory pathways (metabolites and metabolome) and provides important information about the biochemical phenotypes of living systems and the metabolic changes occurring in response to pathophysiological or drug stimuli, genetic modifications, or exposure to toxic environments [1]. Metabolomics studies are carried out using analytical techniques such as nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) coupled with gas chromatography (GC-MS) or liquid chromatography (LC-MS). High-resolution mass spectrometers (HRMS) can determine masses up to 3 ppm [2,3]. This technology can also be used to investigate unknown compounds by an LC-MS/MS strategy (fragmentation process), thereby allowing identification by accurate mass measurement and establishing relationships between parent ions and their fragments. Therefore, this methodology provides major advantages for untargeted metabolomics.

Metabolomics approaches are used extensively in many fields, including pharmaceuticals, toxicology, biotechnology, and pharmacology [4]. Studies on the applications of metabolomics reveal that those on cell cultures or cell lines are lagging behind the

metabolomic analysis of body fluids. The metabolome can be classified into endometabolome (all intracellular metabolites) and exometabolome (all the metabolites excreted into the extracellular fluid) [5]. The presence and relative concentrations of metabolites in samples may be regarded as the best indicators of any cell phenotype. Thus, the metabolomic analysis of cells has emerged as an important approach for studying cellular biochemistry and the pathophysiology of some diseases. LC-MS has become the first-choice method for cell metabolomics studies, because of its ability to rapidly separate and detect a broad range of small molecules [6]. Fig. 1 clearly indicates that the number of articles published annually on LC-MS-based cell metabolomics is increasing at an exponential rate, whereas that on NMR and GC-MS has remained stable over the last 3 years. Advantages and drawbacks of GC-MS over LC-MS are described elsewhere [7,8].

The initial focus of this study is on the experimental designs and common sample processing methods used in cell metabolomics approaches, which then shifts to the use of liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) for the validation, and analysis of biomarkers in cell cultures.

1.1. Applications of cell metabolomics

Cell metabolomics is a promising new field with potential applications in many research areas, including biotechnology [9], cell phenotyping [10], toxicology [11], the diagnosis of different diseases,

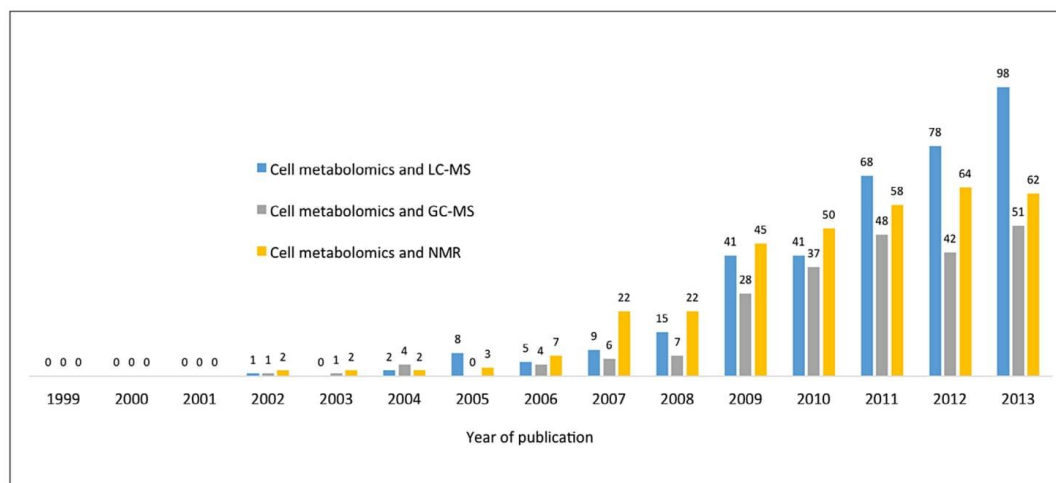


Fig. 1. Annual rate of publication on cell metabolomics over the last decade, as determined by PubMed analysis, in three categories: "cell metabolomics and LC-MS" (blue), "cell metabolomics and GC-MS" (gray), and "cell metabolomics and NMR" (yellow).

treatments and drug tests, the discovery of biomarkers [12] or drug targets, and an exciting range of studies of biological variation and functional heterogeneity between cells [13]. The metabolic activity of cells, including their central carbon metabolism, fatty acid, and lipid metabolism, has been shown to play an important role in cancer progression and drug response [14]. Moreover, different explorations on cell lines and metabolomics data can be directly correlated with genomic or proteomic data. The correlation of these biochemical parameters with changes in cell and organism biology can improve the understanding on the metabolic basis of various physiological and pathological states.

1.2. Advantages of cell metabolomics

The major advantage of *in vitro* cell-based models is their ability to replicate discrete stages of physiological development, for monitoring the analysis of protein expression, cell signaling, or metabolomics. Cell lines grown in identical conditions and population context should display lower levels of biological variability than animal models and human subjects, including interindividual variation and confounding factors, such as age, sex, overall health, and environmental exposures [4]. Cell-based studies are also cheap, fast, easy to standardize, and more reproducible, generating easy-to-interpret results. In studies based on *in vitro* cell cultures, the experimental conditions can be effectively controlled, requiring fewer samples than that needed for epidemiological studies of biological fluids. Cells can also be subjected to more extreme treatments or exposure conditions than humans, resulting in larger expected changes to the metabolome, yielding adequate statistical power for smaller number of samples [5]. Furthermore, cell culture-based studies raise no ethical considerations compared with applications involving animals or humans [4]. Knowledge of the complete set of metabolites is not sufficient for the prediction of phenotype, particularly for the most sophisticated cells, where the various metabolic processes involved in the production and degradation of metabolites are finely regulated and interconnected [15]. Cell metabolomics approaches can also be used to follow changes in metabolomics profile over time. Quantitative knowledge of intracellular fluxes is required for the comprehensive characterization of metabolic networks and their functional operation. These intracellular fluxes cannot be detected directly, but can be estimated by interpreting the stable isotope patterns of metabolites, by an approach called “fluxomics” [15]. Metabolomics has a particular advantage for cell culture systems over other “omics” technologies that it can be used to monitor both intracellular metabolic state and the composition of the extracellular medium. Such approaches can improve our understanding of metabolic network activity.

1.3. Challenges in cell metabolomics

The approaches to metabolite determinations for cell cultures do not differ from those for other metabolomics applications. A number of studies describing the workflow of metabolomics studies are available [4,5]. The generic workflow of such studies begins with the design of the experiment; followed by sample preparation and analysis, data processing, and interpretation; and ends with validation of the results [16] (Fig. 2). The use of cell lines produces additional issues related to sample preparation [17,18], and data interpretation, which may be dependent on several factors, including the variability of growth medium formulation and additives, differences in proliferation rates between cell lines and cultures of different ages (passage number), the quenching of cell cultures, and the extraction procedure used, which are time-consuming and may lead to the degradation of labile metabolites [4].

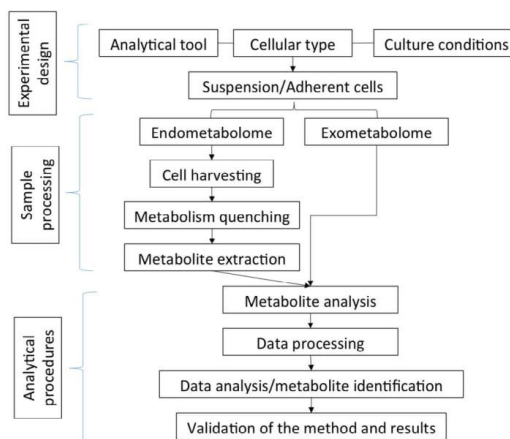


Fig. 2. Schematic workflow of general cell metabolomics studies.

2. Experimental design for cell metabolomics

2.1. Cell types used in metabolomics

Metabolomics has been applied to diverse cell types, from primary cells to cell lines obtained from various tumorigenic, nontumorigenic, and embryonic tissues, or induced pluripotent stem cells (Table 1). Primary cells are the most suitable *in vitro* model for studying the metabolic and biochemical pathways of a particular biological system, because they retain most of the phenotypic characteristics of the original tissue [37]. However, their use in metabolomics applications is limited because of the low yields and limited purity of primary tissues, leading to high variability.

2.2. Cell culture conditions

Several studies have shown that differences in optimized cell culture conditions induce changes in the metabolic profiles of cells, even in the absence of an observable effect on cell morphology [38,39]. Two types of culture system are used: (1) suspended nonadherent cells and (2) cells attached to the surface of the culture dish. Some adherent cell types may require untreated flasks or pre-treated (e.g., collagen-, polylysine-, or gelatin-coated) supports for growth. Cells can grow in various modes of culture (monoculture or coculture) in the presence of other cell types.

2.2.1. Formulation of the medium

Formulation of the growth medium (e.g., supplier, content in terms of nutrients, growth factors, serum, and other additives) may affect cell growth behavior, morphology, and metabolic profile. Zang et al. [40] showed that inadvertent exposure of the medium to light during preparation and storage may lead to slow growth and low density of viable cells during cell culture. A rich culture medium may be required for optimizing cell growth conditions, potentially making it harder to interpret the results [41], because of the high concentrations of metabolites available in the culture medium, potentially masking the system under investigation, through compensatory mechanisms. Hartmann and coworkers showed that the use of cell culture medium supplemented with serum substitute, low-serum medium, or serum-free medium influenced the metabolism of the SW-480 colon cancer cell line [42]. Variations

Table 1
Harvesting, quenching, and extraction protocols in various cell types for intracellular metabolite analysis with LC-HRMS tools

Cell type		Rinsing	Harvesting	Quenching	Extraction	LC-HRMS analytical tool	Reference
Adherent cells	* Human fibrosarcoma cells (HT1080M)	Cold PBS	Scraping	−80°C CH ₃ OH/H ₂ O (8:2)		LC-LTQ-Orbitrap-MS	RP IPC [19]
	* Myeloma cells (ANBL-6)	H ₂ O	Trypsinization	ACN/H ₂ O (8:2), glass bead vortexing		LC-Orbitrap-MS	RP C18 [20]
	* Human pancreatic cancer cell line (Panc-1)	Isotonic saline (37°C)	Trypsinization	Ice-cold H ₂ O/Frozen in LN ₂ , Freeze-thaw cycles	CH ₃ OH/ACN; CH ₃ OH/CHCl ₃ (9:1) or CHCl ₃ /CH ₃ OH/ACN (1:1:0.6)	LC-QTOF-MS	HILIC & RPC18 [17]
	* Human breast cancer cells (MCF-7 cells)	PBS	Scraping				
	* Human-induced pluripotent stem cells (iPSCs)	Ice-cold PBS	Scraping	H ₂ O freeze-thaw cycles	CH ₃ OH/CHCl ₃ (1:1)	LC-QTOF-MS	RP C18 [21]
		PBS	Trypsinization	HEPES/EDTA in H ₂ O, incubation in boiling H ₂ O and LN ₂		LC-QTOF-MS	RP C18 [22]
	* Human colon cancer cells (HT29 cells)	PBS	Trypsinization	Tris/EDTA/NaCl, protease inhibitor solution		LC-QTOF-MS	HILIC & RPC18 [23]
	* Chinese hamster ovary cells (CHO)	PBS	Trypsinization	Ice-cold NaCl (150 mM)	CH ₃ OH/CHCl ₃ (3:1)	LC-LTQ-Orbitrap-MS	RP C18 [24]
	* Human aortic endothelial cells (HAECs)	Warm PBS	Scraping	Ice-cold ACN/H ₂ O (7:3), Freezing at −70°C		LC-LTQ-Orbitrap-MS	RP C18 [25,26]
		PBS	Trypsinization	Ice-cold CH ₃ OH/H ₂ O (8:2), Freezing at −70°C		LC-QTOF-MS	RP C8 [27]
Suspension cells	* Prostate cell lines	PBS	Scraping	H ₂ O/CH ₃ OH/CHCl ₃ /H ₂ O (1:4:3:1), Sequential extractions		QTOF-MS	[28]
	* Murine embryonic stem cells (mESCs)	Ice-cold PBS	Scraping	Cell pellets stored at −80°C	CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O		
	* Bacteria (<i>Acinetobacter baylyi</i>)	No	Filtration	Cold (−30°C) ACN/CH ₃ OH (8:2)		LC-LTQ-Orbitrap-MS	HILIC & RPC18 [29]
	* Protozoa (<i>Trypanosoma brucei</i>)	No	Centrifugation	Sonication 4°C, freeze/thaw cycles in LN ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O (1:3:1)		LC-LTQ-Orbitrap-MS	HILIC [30]
	* Bacteria (<i>Sinorhizobium intermedium</i>)	PBS or NaCl aq.	Centrifugation	Ice-cold NaCl (0.9%) or PBS	CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O (2:2:1) or CH ₃ OH/C ₂ H ₅ OH/H ₂ O (1:1) or CH ₃ OH/C ₂ H ₅ OH/H ₂ O (2:2:1) or CH ₃ OH/H ₂ O (1:1) or ACN/H ₂ O (1:1) or CH ₃ OH/ACN/H ₂ O (2:2:1)	LC-TOF-MS	HILIC [31]
	* Bacteria (<i>Escherichia coli</i>)	H ₂ O NaCl (0.9%)	Centrifugation	Ice-cold H ₂ O NaCl/Frozen in ice/ethanol		LC-FTICR-MS	RP C18 [32]
		PBS	Centrifugation	Cold CHCl ₃ /CH ₃ OH (1:3)	CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O (1:3:1)	LC-LTQ-Orbitrap-MS	HILIC & RPC18 [33]
	* Protozoa (<i>Leishmania major</i>)	No	Filtration	Freezing in LN ₂	CH ₃ OH/H ₂ O pH 3.4 (1:1)	LC-LTQ-Orbitrap-MS	C18/PFPF [34]
	* Cyanobacteria (<i>Synechocystis</i>)	No	Filtration	Cold (−20°C) CH ₃ OH/ACN/H ₂ O (2:2:1)		LC-LTQ-Orbitrap-MS	RP IPC [35]
	* Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	No	Filtration	Cold or hot MeOH	CH ₃ OH/ACN/H ₂ O (2:2:1) or CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O (3:6:1) or CH ₃ OH/H ₂ O (7:3)	LC-TOF-MS	HILIC & RPC18 [36]
	* Platelets	No	Centrifugation				

ACN, acetonitrile; C18, octadecyl carbon chain; FTICR, Fourier transform ion cyclotron resonance; HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography; IPC, ion-pairing chromatography; LN₂, liquid nitrogen; LTQ, linear trap quadrupole; PBS, phosphate-buffered solution; PFPF, pentafluorophenylpropyl; Q, single quadrupole; RP, reverse-phase; TOF, time of flight.

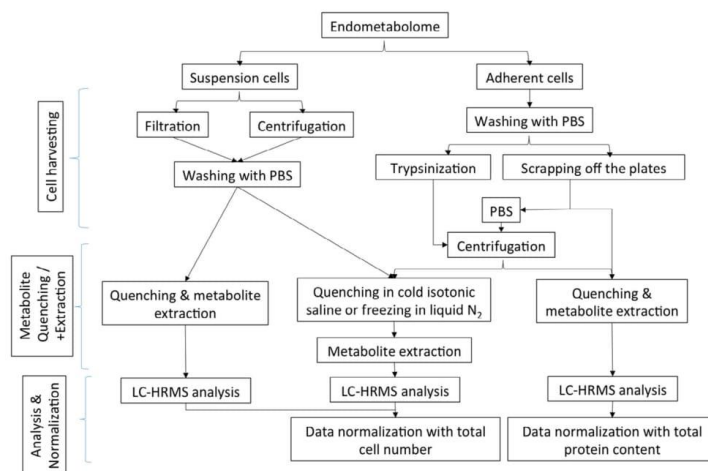


Fig. 3. Schematic diagram of sample preparation for LC-MS-based metabolomics studies on suspension cultures and adherent cells, together with the data normalization strategy.

in serum levels may also be associated with differences in the levels of endogenous cell metabolites and contamination of exogenous metabolites [43].

2.2.2. Cell density

Differences in cell density, which might modify the cell proliferation rate, may introduce variability into cell metabolomics data. Miccheli and coworkers reported differences in metabolite profiles between subconfluent and confluent HepG2 cell cultures [44]. A wide range of seeding densities is used for cell metabolomics; the seeding density used for a particular study being highly dependent on the growth characteristics of the cell type used (between 10^5 and 10^9 cells/m² for adherent cells and $2\text{--}50 \times 10^5$ cells/mL for cells growing in suspension culture). No general recommendations have been issued concerning the best cell density for cell metabolomics. Cell–cell interactions in cultures of adherent cells must be carefully monitored. Higher cell densities enhance these interactions, which may activate signal transduction, potentially influencing proliferation and leading to contact inhibition of cell growth.

2.2.3. Cell passage

The passage of highly diluted or highly confluent cultures should be avoided, as it may lead to genetic drift or overcrowding-dependent stress of the cell population, respectively [45]. Differences in the number of cells harvested may, therefore, result in differences in the cell exometabolome and endometabolome. It is highly recommended to use the same cell source and growth conditions to minimize differences in metabolic profile because of the increase in reproducibility of metabolomics data. In order to ensure accurate interpretation of observed differences in metabolite profile, randomization, replication, and local controls should be incorporated in the experimental design.

3. Sample processing methods in cell metabolomics

Typically, an untargeted cell metabolomics workflow involves sample collection (harvesting) and preparation (cell quenching and

metabolite extraction), followed by analysis on an appropriate platform (Fig. 3).

3.1. Sample collection and preparation in cell metabolomics

A rigorous workflow for sample collection and preparation ensures that the sample is acquired and analyzed with a high degree of reproducibility, which includes harvesting, cell quenching, and metabolite extraction. Any sample preparation method for cell metabolomics should a) be simple and rapid, to prevent the loss and/or degradation of metabolites during preparation and to facilitate high-throughput approaches; b) incorporate a metabolism-quenching step, to ensure that the true metabolome composition at the time of sampling is analyzed; and c) be reproducible [46]. The sampling step essentially involves separation of the cell culture medium from the cell material. For suspension cultures, a cell pellet can be obtained by centrifugation or filtration [47]. By contrast, adherent cells must be detached from the surface of the culture vessel [17,48] (Table 1).

3.2. Methods for processing extracellular and intracellular metabolites

3.2.1. Intracellular metabolites

Experimental procedures for the determination of intracellular metabolites include three major steps: quenching of metabolic activity in the cell, cell harvesting, and extraction of metabolites into an appropriate solvent for analysis. Additional steps, such as sample concentration after extraction (by evaporation to dryness or freeze-drying), sample storage, and resuspension (in a solvent compatible with the analytical technique), may also be performed before metabolite analysis, which may have an impact on the outcome. In recent years, several optimized protocols have been developed for cell quenching [49,50], harvesting [48], and extraction of intracellular metabolites with reliable and reproducible experimental protocols for all steps. However, most of these studies focused on a single cell type and attempted to identify the best protocol for

extracting the largest number of metabolites with the minimum amount of degradation products.

3.2.1.1. Cell quenching. The flux of metabolites is highly dependent on the metabolite, enzyme, and environmental conditions considered. It is therefore necessary to halt cellular metabolism at cell harvesting, to minimize changes in the levels and composition of metabolites. Quenching procedures aim to stop all enzymatic activities as quickly as possible, without the leakage of metabolites from the cell, to prevent metabolite degradation and the *ex vivo* alteration of sample composition, provided several metabolic reactions are known to occur quickly [50]. Metabolism is usually quenched by rapidly changing temperature or pH [50]. However, cell quenching is dependent on the sample and cell type (Table 1). Differences in the composition and size of cells may influence the efficiency of quenching and the rate of metabolite leakage [32].

For suspension cultures (Table 1), quenching is usually achieved by freezing or spraying into cold aqueous methanol solution (60%) or cold isotonic saline solutions, such as ice-cold aqueous NaCl solution [0.9% (w/v)], which prevents cell membrane damage more effectively [51]. In this case, the quenching procedure also removes the contaminating medium [52]. Three quenching protocols for bacterial cells have been compared by LC–HRMS procedure, which were described as less efficient: ultrasonication (with an ultrasonic cleaner), microwaving, and freeze–thaw cycle [32].

For adherent cells, the quenching procedure includes an additional step: the rinsing of cells with a cold or warm saline buffer, such as phosphate-buffered saline (PBS) or aqueous NaCl solution [0.9% (w/v)], before quenching. It is crucial to remove residual medium from the cells and the culture vessel to avoid its dissolution in the extraction solvent, which could cause contamination and impair analytical performance because of the suppression of ionization [31,32].

3.2.1.2. Cell harvesting. Cells can be detached after quenching, with either trypsin/EDTA solution (incubation with trypsin for 1–15 min, depending on the cell line considered, but a short incubation time (e.g., 1 min) might result in lower levels of metabolite leakage) or a rubber policeman [53]. Centrifugation or filtration before quenching with trypsinization has been shown to alter the metabolic profile of adherent cells [48,49]. And trypsin/EDTA treatment, in particular, has been shown to cause substantial metabolite leakage [17,48]. Cell samples collected by direct scraping after quenching with liquid nitrogen can be stored before extraction [17,48].

3.2.1.3. Metabolite extraction. Extraction methods for intracellular metabolite profiling should be highly efficient to recover the metabolites in their original state, quantity, and ratio. Each extraction method has advantages and limitations for different metabolite classes, caused by the very different chemical and physical properties of the metabolites concerned, including their structure and polarity (polar vs. nonpolar molecules) [53]. Furthermore, the performance of the LC system should be preserved by removing particles and macromolecules, thereby removing proteins with organic solvents.

The various procedures described to date for extracting intracellular metabolites from cells are based on the use of organic solvents, with or without water or other organic chlorinated solvents, at different temperatures (Table 1).

3.2.1.3.1. Extraction without chlorinated solvent. In their GC–MS-based study, Duportet et al. evaluated the efficiencies of four different methods for extracting intracellular metabolites on four different types of microbial cell [54]. For all the cell types tested, the number of compounds detected depended on the intracellular extraction method. Differences in metabolite levels were also observed,

potentially hindering the correct biological interpretation of the results. The authors showed that these differences between methods resulted in contradictory biological interpretations of the activity of the different metabolic pathways.

More recently, bacteria have been analyzed by C18 LC–FTICR (liquid chromatography–Fourier transform ion cyclotron resonance), by comparing extraction methods based on methanol, acetonitrile, and a mixture of methanol and acetonitrile [32]. Similar results were obtained for all the extraction solvents tested, and although the authors chose to use the methanol extraction method, extraction with acetonitrile was also efficient according to the criteria used.

3.2.1.3.2. Extraction with chlorinated solvent. Intracellular metabolite solvent extraction can involve a separation of lipophilic (chloroform or dichloromethane) and hydrophilic (water, alcohol, or acid) metabolites. Sellick and coworkers tested various extraction methods on Chinese hamster ovary (CHO) cells, with a GC–MS approach [52]. They found that metabolite extraction based on two rounds of extraction in 100% methanol followed by a final extraction in water recovered the broadest range of metabolites. Dietmair et al. performed a study by comparing various metabolite extraction protocols for mammalian cells in suspension [51]. They evaluated 12 extraction methods on a known mixture of a large number of standard metabolites, using LC for metabolite quantification. They found that extraction in cold 50% aqueous acetonitrile was superior to other methods. Similar studies with LC–HRMS, comparing four different methods for extracting intracellular metabolites from adherent cells were conducted [17,55]. They identified methanol/chloroform/water as the optimal extraction solvent for recovering the maximum intracellular features with optimal reproducibility. Furthermore, some authors concluded that dichloromethane (CH_2Cl_2) yielded better results than chloroform [56]. Given the hazards associated with the use of chloroform and the equal efficacy of CH_2Cl_2 for extracting lipids [57], it is recommended to use CH_2Cl_2 as an alternative to chloroform.

The number of extraction steps was studied. Most metabolites (80%) were recovered during the first extraction, and the second extraction recovered the remaining metabolites (10–15%), in most cases [31], for bacterial analyses.

3.2.1.4. Evaluation of quenching and extraction method. Published solvent-based extraction or quenching protocols were evaluated for their efficacy of extracting metabolites and the number of metabolites extracted and detected [54]. The breadth of the extraction and the number of metabolites recovered (reproducibility) were assessed by several strategies, including multivariate projection methods, calculation of the relative standard deviation (RSD%), and the construction of heat maps from the total set of signals.

3.2.2. Extracellular metabolites

In analyses of extracellular metabolites, the cell culture medium must be collected rapidly, preferably at low temperature, to minimize cell damage. For suspension cultures, this can be achieved by cold centrifugation or filtration [10,58]. For adherent cells, the procedure is much simpler: the medium is collected by pipetting and, subsequently, by centrifugation to eliminate cell debris [59]. Some procedures involve the addition of organic solvents for collection of the cell culture medium; this makes it possible to quench metabolic reactions and to precipitate cellular proteins [36,59,60]. Exometabolome analysis has been shown to be an effective method for the rapid classification of yeast mutants [10] or for obtaining an extracellular profile of human mitochondrial dysfunction in a cellular disease model [60]. Shaham and coworkers have illustrated how exometabolome analyses in cellular models of disease can provide insight into the biochemical disruptions occurring in human

plasma [60]. This approach could be extended to a range of complex diseases or other areas of research.

4. LC–HRMS-based cell metabolomics

4.1. Liquid chromatography

LC–MS can separate isomeric and isobaric compounds, providing a better identification and quantification of metabolites. Resolving power and peak widths depend on many factors, including column dimensions (internal diameter and length), stationary- and mobile-phase flow rate, and temperature. There are many possibilities for combining separation techniques with different mass analyzers, with different resolving and separation powers [61]. In untargeted metabolomics, the length of the analytical run should be specified, considering (i) column stability, (ii) the potential contamination of the ion source, and (iii) the stability of the prepared samples in the autosampler.

For cell metabolomics applications, different types of column chemistry can be used, such as reverse-phase (RP) C8- or C18-bonded stationary phases, hydrophilic interaction chromatography (HILIC), and pentafluorophenylpropyl (PFPP) columns (Table 1). RP separations are ideal for relatively nonpolar metabolites, including lipids, but are difficult to apply to polar or ionic metabolites, including sugars and some amino acids, because of their poor retention on such columns. HILIC separations are performed on hydrated silica columns, with elution solvent gradients beginning with a high proportion of the organic solvent and ending with a high proportion of water [6]. This method is becoming increasingly used widely [17,34]. Bi et al. evaluated the separation efficiencies of HILIC and RP–LC with ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time of flight–mass spectrometry (UPLC–QTOF–MS) on Panc-1 cell extracts, and showed that HILIC provided a better resolution for intracellular metabolites [17]. It has been argued that RP chromatography does not retain less- and high-polar metabolites present in the cell medium. Paglia et al. also used HILIC to analyze the composition of the extracellular medium [36]. Darren et al. demonstrated that a retention time prediction model improved metabolite identification in a HILIC–exactive approach, with a polarity switching–HRMS metabolomics platform [30]. The choice of stationary phase is based on the ability to dissolve small polar derivatives, such as amino acids, organic acids, vitamins, sugars, and nucleosides. However, HILIC separation is less tolerant to rapid solvent gradients, and requires a longer equilibrium time than RP–LC [31].

Paglia et al. demonstrated an impact of pH on the retention time and/or resolution of some metabolites (e.g., cystine) [36]. For each analysis, the best balance between a shorter gradient time (resulting in greater stability) and a higher flow rate must be determined, so as to obtain small peak widths (generally between 1 and 3 s).

C18 and PFPP chromatography have also been compared for the analysis of cyanobacteria before the detection and identification of metabolites by LC–HRMS [34]. The authors found that PFPP chromatography yielded better results (more sensitive and more efficient) than the C18–UHPLC system.

Cell samples contain highly polar salts, which may cause contamination of the ion source and of the column, leading to a drift between batches over time [31]. Thorough cleaning is thus required [36], but very few published studies have described the protocol used for cleaning. Paglia et al. [36] showed that it was necessary to inject quality controls (QCs) at least 10 times to equilibrate the column before injecting a batch of samples. Five QC injections were used in a standard procedure for bacteria sample analysis by HILIC–TOF–MS in one study [31], but with no justification of this choice.

4.2. High-resolution mass spectrometry

Electrospray ionization (ESI) is the most widely used method in LC–MS applications in cell metabolomics. MS provides specific chemical information, directly related to the chemical structure of the compound, such as accurate masses for the detected parent ions and isotope distribution patterns, which facilitate structure determinations according to their mass-to-charge ratio (m/z) [62]. MS² experiments can provide a more detailed characterization, with a spectrum showing the m/z values of all the fragments generated. LC–MS analyses must be run in both positive and negative ESI modes to ensure the detection of all compounds as a function of their ionization properties. The MS analyzers used in metabolomics studies can deliver a mass accuracy of a few parts per million or less. HRMS has a resolving power of between 60,000 for a standard trap and 280,000 for a high-field trap at m/z of 400. The accuracy of mass measurement depends on the ability to accurately deconvolute and centroid the peak profiles; thus, high resolution renders this process easier. It is possible to determine mass accuracy <3 ppm [2,3]. HRMS encompasses time of flight (TOF), Fourier transform Orbitrap approaches, and Fourier transform cyclotron resonance (FTICR) (Table 1). The equipment of HRMS is more expensive than low-resolution mass spectrometers (LRMS), which are also generally easier to maintain. Certain HRMSⁿ technologies such as Orbitrap and Q-TOF allow quantitative analysis using multireaction monitoring (MRM) mode, as done by triple quadrupole mass spectrometer, but LR–MS cannot provide a possible identification procedure based on accurate mass assignments. The cost difference between LR–MS and HRMSⁿ should disappear over time. Compared with Q-TOF, Orbitrap has the advantage of a high resolution at low m/z , but it suffers from a slower rate of data acquisition [62,63]. LC–HRMS detects the maximum intracellular metabolites [64] and requires minimum cells (<500,000) [65]. This approach is particularly advantageous for cell metabolomics profiling.

4.3. Data preprocessing parameters

A preprocessing step is required to align the data, thereby identifying the same metabolites or features for all samples analyzed. A “drift” in retention time is commonly observed for MS. Retention times may vary for each sample, caused by column degradation, sample carryover, small fluctuations in mobile-phase pH, and other variations that are not always characterized.

Data are firstly aligned to correct the observed time drift and then framed to provide responses for all ions within a defined mass range and time range (“frame”). The results are reported as a single response.

After data collection, the peaks representing metabolite data (molecular ion) are extracted with untargeted methods such as deconvolution [66] using bioinformatics software. Some of the programs used are instrument- or manufacturer-specific (SIEVE supplied by ThermoFisher Scientific® and MarkerLynx by Waters®), whereas others are available as open-source software, such as MathDAMP [67], MetAlign [68], MZMine [69], Metabolomic Analysis, and Visualization ENgine (MAVEN) [70] and XCMS [71]. These programs perform nonlinear retention time alignment and identify peaks differing between the groups of samples analyzed [72]. All these tasks involve computation of limitations and require collaboration of scientists and IT specialists.

4.4. Data analysis

Data from untargeted metabolomics studies are extremely complex, with file sizes of the order of gigabytes per sample for the

new HRMS methods. The data for the entire chromatographic run are visualized as a three-dimensional plot, where each peak represents a detected ion, and is characterized by its m/z , retention time (RT), and intensity.

Targeted approaches are less likely to produce false-positive peaks, and peak modeling can be optimized by isotope and adduct calculations. Target peak analysis is required to identify relevant compounds, which may be involved in the pathways implicated or identified from the available databases (e.g., Phenol-Explorer, Human Metabolome Database (HMDB), blood exposome, and HumanCyc), obtain information about compound classes (e.g., carbohydrates, fatty acids, and amino acids), and gain access to in-house MS/MS libraries, through comparisons of tandem mass spectrometry (MS/MS) data and retention time data with those for standard compounds (Section 4.5).

By contrast, untargeted data processing may lead to the detection of novel metabolites. The values of m/z and RT in metabolite databases are evaluated to obtain putative identifications. Fragmentation mass spectra can be obtained with many of the LC–MS instruments used in metabolomics, and can distinguish between metabolites with similar molecular structures. MS^n , where $n > 2$, can be combined with the annotation of spectral trees with specific trap-based instruments to increase the accuracy of identification and reduce the occurrence of false-positive peaks or misassignment.

4.5. Metabolite identification

For definitive metabolite identification, standard metabolites should be subjected to the same experimental conditions, requiring prior experiments that may be laborious and are not always possible. Putative metabolite identification is often used instead. Typically, only about 25% of the compounds observed can be tentatively identified. Many of the molecules detected are not currently included in databases and metabolite repositories. Libraries of standards can be bought and concern for the moment, around 600 compounds from MSMLS[®] (Mass Spectrometry Metabolite Library of Standards, IROA Technologies[™]) corresponding to a broad range of primary metabolism; or 200 endogenous metabolites of several metabolite classes in kit format, distributed by Biocrates Life Sciences[®]. Metabolomics data sets could be annotated with automatic peak detection software, such as MZSearcher [73] or MMD [74]. This annotation should identify and eliminate natural isotopes (e.g., ¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O, ³⁴S, and ³⁷Cl), adducts with cations (e.g., Na⁺, K⁺, and NH₄⁺) and anions (e.g., Cl[−]), fragment ions formed by spontaneous in-source fragmentation of the precursor ion with the release of small neutral compounds (loss of H₂O, CO₂, HCOOH, NH₃, etc.), and multimers (e.g., (2M + H)⁺, (2M − H)[−]) produced by ESI methods during desolvation [61]. It should also generate a shortened list of m/z values [74]. The redundancy of the MS signal (adducts and fragments) and artifacts are major difficulties in the identification process. Although MS/MS with collision-induced fragmentation is less reliable for structure elucidation when compared with electron impact (EI) ionization fragmentation, it is however very useful and is the only option for LC–MS with ESI ionization for a better metabolome coverage. However, in the case of HRMS/MS, as the elemental compositions of both the ions and corresponding neutrals lost can be deduced, the accurate mass assignments provide the best possible identifications within the limitations of MS/MS. Significant progress needs to be achieved in metabolite identification [5,75]. RT prediction models can improve metabolite identification. Creek and coworkers showed, by HILIC LC–HRMS on cell extracts with authentic metabolite standards, that the predicted retention time can be used to remove noise, MS artifacts, and 35% of false-positive peaks [30]. Unfortunately, this method is limited by the large number of isomers

(>78%) in cell extracts, with some of them having the same retention time.

4.6. Validation method

Most articles do not systematically describe the validation method (instrument reproducibility) used, as the number of samples injected is relatively small. The methodologies used should provide repeatable, robust, and high-quality data, particularly for LC–MS, which is very sensitive to the matrix effect and “machine drift.” Publications of methodology are available for the robust LC–MS metabolomics study of human serum [76], urine analysis [77], and yeast metabolomics [78]. Validation methods should check not only the analytical stability of LC–MS during prolonged analytical runs, but also the quality of sample preparation procedures for cell extractions. In cell metabolomics, reproducibility and repeatability (coefficient of variation, within and between days, for the same experiment) are the two major validation criteria [54]. A quick evaluation of ionization suppression effects by the analysis of 1:5, 1:10, 1:25, 1:100, and 1:1000 dilutions of a pooled QC sample would provide important information about the metabolites presenting suppression effects. QC of the data in the peak table is essential and should be checked during validation that the coefficient of variation for the QC samples is <30% for most of the peaks [6]. The consequences of matrix effects for the MS analysis should be evaluated, by identifying and quantifying any ion-suppressing (or ion-enhancing) agents in the sample matrix, solvent, or LC–MS system components and taking measures to eliminate or reduce the problem. There is no generic method to overcome ionic suppression. However, various corrective actions may be used to decrease the levels of sample matrix causing ionic suppression [79]. Furthermore, in its guide to quantitative bioanalytical method validation [80], the Food and Drug Administration (FDA) recommends that tolerance limits for single-analyte tests should be set such that the response detected in two-thirds of the QC samples is <15% of the QC mean, except for compounds with concentrations equal or close to the limit of quantification (LOQ), for which a tolerance of 20% is acceptable. For metabolic profiling on the basis of LC–MS, this threshold value of 20% seems to be appropriate [5].

4.7. Data normalization

There is no general ideal method of normalization in metabolomics. In some studies, the cross-sample comparison of metabolite signals was made possible by normalizing the observed signal with respect to the total protein content of the cells used, if the cells were harvested by scraping (ion counts/cell volume) [17] or with respect to cell number in cases of trypsinization (ion counts/cell volume) [81]. However, direct scraping from the culture dish in the presence of extraction solvent hinders cell counting. In this situation, the use of additional replicates, where the cells are counted after being detached by trypsinization, is recommended [53].

Protein content, rather than cell number, has been used for normalization in situations where cells display differential increases in volume [82] or where trypsinization leads to metabolite leakage or cell death.

Mean intensities for the complete data set have also been used as a scaling factor for each sample [23].

In other cases, the peak area of the labeled internal standards (IS), as a function of their retention time, has been used [31,32].

One recent study has reported a normalization method based on the use of dansylation labeling, to determine the total amount of labeled metabolites in a cell sample by calculating the peak ratios of individual pairs of peaks from LC–HRMS spectra [32].

5. LC–HRMS-based cell metabolomics applications

5.1. Targeted cellular metabolomics

Metabolites involved in specific metabolic pathways could be quantified by the isotopic detection of amino sugars with glutamine (IDAWG), via the incorporation of differential mass tags in the glycans of cultured cells [28]. In this method, LC–HRMS can be used as a tool in the glycomics toolbox, using amide- ^{15}N -Gln. An analytical approach, by LC coupled with Orbitrap mass spectrometry, for quantifying the methionine metabolic fluxes using ^{13}C methionine in mammalian cells has recently been reported [19]. It is worth noting that 32 standard amines have been used for quantitative metabolite determinations, on an Orbitrap mass spectrometer, for human aortic endothelial cells subjected to a glucose challenge [25]. Unfortunately, the limited availability of standard metabolites limits the use of this methodology.

5.2. Untargeted cellular metabolomics

Fei et al. described a protocol which they suggested all researchers should apply before studying new cell lines and new analytical material [31]. They studied the impact of washing cells, the number of extractions, and new mixtures of organic solvents on two bacterial cell lines and mammalian macrophages. Their goal was to apply a HILIC approach, with a single extraction, to the analysis of both polar metabolites and lipids. Within- and between-day precisions for the characterized metabolites should be reported in the future to confirm these good results.

Cell metabolomics approaches have been largely used to investigate the biochemistry of cancers (Table 1). The antiproliferative effect of dietary polyphenols on human colon cancer cells has been investigated, where CE, RP, and HILIC, all coupled to TOFMS, were combined to achieve this goal [23]. LC–HRMS has been also used to study drug-resistant and drug-sensitive multiple myeloma cells and to characterize the mitochondrial lipidome [20].

6. Perspectives

The sensitivity and selectivity of LC–HRMS make it a powerful tool for routine cell metabolomics, but its use remains challenging and further methodological development is required. Pretreatment is a key step for metabolite coverage and reproducibility. One of the techniques used for biological fluids is solid-phase extraction (SPE), whose advantages and limitations have recently been reviewed [83]. This pretreatment could improve the quality of the signal and minimize the potential matrix effect, but little is known about the loss of metabolites during these procedures. An alternative, matrix-free technique, called nanostructure-initiator mass spectrometry (NIMS), has been developed for the analysis of metabolites with high sensitivity and spatial resolution [84]. The separation efficiency of LC depends on the class of compound considered. For example, RP–MS may be less suitable for polar compounds than HILIC–MS. Metabolome coverage may be improved by using an alternative multicolumn approach, combining the RP and HILIC separation modes [17].

Another challenge for LC–HRMS-based metabolomics is the identification of metabolites. Advances in metabolite identification are required, to improve the standardization of metabolite naming (e.g., in HMDB, glucose has 23 synonyms) and to ensure that a standardized name is used regardless of charge state [5]. It is necessary to develop our own database of metabolites and to complete progressively these data from commercial kits and current studies. Furthermore, there is a real need to optimize processing strategies and standardize analytical methods to make the comparison of data sets between laboratories possible. Increasing numbers of

stable isotope-labeled metabolites are becoming available for use as IS, making it possible to improve untargeted profiling and to obtain results that are more consistent between laboratories.

There is no single technology to perform both quantitative and qualitative analyses for metabolomics, as each analytical tool has advantages and drawbacks. The ideal way is to use a multiplatform analytical approach such as LC and GC coupled to HR and/or LR–MS, which can provide complementary information. In the case of cell metabolomics, as intracellular metabolites are mostly small polar molecules, the use of LC–HRMS is suitable for large untargeted analysis related to the metabolome coverage and sample preparation (no derivatization step). EI ionization mode, used in GC–MS, provides more information than ESI, and makes a further step of metabolite identification easier because of the searching facility in GC–MS library.

Metabolic profiling yields results complementary to those of genomic sequencing and proteomic screening [85]. However, it may be difficult to interpret the amount of metabolites present and the type of regulation (down- or upregulation). In order to more accurately evaluate these mechanisms, a technique called kinetic fluxomics uses isotope-labeled precursors, such as ^{13}C glucose and ^{13}C – ^{15}N glutamine, to gauge the activities of particular pathways over time [86].

7. Conclusion

LC–HRMS can become the key technology in cell metabolic profiling. It is a powerful tool for the analysis of metabolites as direct signatures of biochemical activity, because of the recent improvements in chromatography and mass spectroscopy technologies. The success of cell metabolomics studies depends on care being taken to ensure that the analytical techniques and methods provide the broadest coverage, and generate reliable and reproducible data, with the possibility of analyzing large numbers of samples. The choice of culture conditions, cell quenching, and extraction protocols is extremely crucial, because it affects both the observed metabolite content and the biological interpretation of the data.

The choice of workflow should be based on performance characteristics and practical aspects. Ideally, for LC–HRMS-based cell metabolomics, the workflow should be robust and fast; user-friendly; and able to identify the metabolites of interest, with a hard-coded peak-finding algorithm, minimum false peak detection rates, and isotope and adduct grouping. Data validation is a major area requiring improvement in the future.

Cell metabolomics studies based on LC–HRMS should use a common workflow and data validation protocol to maximize their potential.

Acknowledgments

The authors thank “La Région Centre” for a PhD graduate grant (2013–10) and ARSLA (“Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique”) for a research grant (0.5 19/06/2014). They also thank the CHRU de Tours for supporting the language correction of this manuscript.

References

- [1] J.K. Nicholson, J.C. Lindon, E. Holmes, ‘Metabonomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica* 29 (1999) 1181–1189.
- [2] M. Krauss, H. Singer, J. Hollender, LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 943–951.
- [3] A. Roy-Lachapelle, M. Sollic, M. Sinotte, C. Deblois, S. Sauvé, High resolution/accurate mass (HRMS) detection of anatoxin-a in lake water using LDTD–APCI coupled to a Q-Exactive mass spectrometer, *Talanta* 132 (2015) 836–844.

- [4] M. Čuperlović-Culf, D.A. Barnett, A.S. Culf, I. Chute, Cell culture metabolomics: applications and future directions, *Drug Discov. Today* 15 (2010) 610–621.
- [5] W.B. Dunn, D.I. Broadhurst, H.J. Atherton, R. Goodacre, J.L. Griffin, Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 387–426.
- [6] H.G. Gika, G.A. Theodoridis, R.S. Plumb, I.D. Wilson, Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 12–25.
- [7] F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibáñez, E. Abad, T. Portolés, L. Mattioli, Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1251–1264.
- [8] M. Meyer, H. Maurer, Current applications of high-resolution mass spectrometry in drug metabolism studies, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1221–1231.
- [9] P.K. Chrysanthopoulos, C.T. Goudar, M.I. Klapa, Metabolomics for high-resolution monitoring of the cellular physiological state in cell culture engineering, *Metab. Eng.* 12 (2010) 212–222.
- [10] J. Allen, H.M. Davey, D. Broadhurst, J.K. Heald, J.J. Rowland, S.G. Oliver, et al., High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 692–696.
- [11] J.A. Palmer, A.M. Smith, L.A. Egnash, K.R. Conard, P.R. West, R.E. Burrier, et al., Establishment and assessment of a new human embryonic stem cell-based biomarker assay for developmental toxicity screening, *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 98 (2013) 343–363.
- [12] B. Cao, J. Aa, G. Wang, X. Wu, L. Liu, M. Li, et al., GC–TOFMS analysis of metabolites in adherent MDCK cells and a novel strategy for identifying intracellular metabolic markers for use as cell amount indicators in data normalization, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2983–2993.
- [13] A. Zhang, H. Sun, H. Xu, S. Qiu, X. Wang, Cell metabolomics, *OMICS* 17 (2013) 495–501.
- [14] E. Gottlieb, Cancer: the fat and the furious, *Nature* 461 (2009) 44–45.
- [15] M. Cascante, S. Marin, Metabolomics and fluxomics approaches, *Essays Biochem.* 45 (2008) 67–81.
- [16] Z. León, J.C. García-Cañaveras, M.T. Donato, A. Lahoz, Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation, *Electrophoresis* 34 (2013) 2762–2775.
- [17] H. Bi, K. Krausz, S. Manna, F. Li, C. Johnson, F. Gonzalez, Optimization of harvesting, extraction, and analytical protocols for UPLC–ESI–MS–based metabolomic analysis of adherent mammalian cancer cells, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 5279–5289.
- [18] E. Martineau, I. Tea, G. Loáč, P. Giraudeau, S. Akoka, Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2133–2142.
- [19] T. Shlomi, J. Fan, B. Tang, W.D. Kruger, J.D. Rabinowitz, Quantitation of cellular metabolic fluxes of methionine, *Anal. Chem.* 86 (2014) 1583–1591.
- [20] D.R. Jones, Z. Wu, D. Chauhan, K.C. Anderson, J. Peng, A. Nano, Ultra-performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry approach for global metabolomic profiling and case study on drug-resistant multiple myeloma, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3667–3675.
- [21] K.D. Sheikh, S. Khanna, S.W. Byers, A.J. Fornace, A.K. Cheema, Small molecule metabolite extraction strategy for improving LC/MS detection of cancer cell metabolome, *J. Biomol. Tech.* 22 (2011) 1–4.
- [22] A.D. Panopoulos, O. Yanes, S. Ruiz, Y.S. Kida, D. Diep, R. Tautenhahn, et al., The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming, *Cell Res.* 22 (2012) 168–177.
- [23] C. Ibáñez, C. Simó, V. García-Cañas, Á. Gómez-Martínez, J.A. Ferragut, A. Cifuentes, CE/LC–MS multiplatform for broad metabolomic analysis of dietary polyphenols effect on colon cancer cells proliferation, *Electrophoresis* 33 (2012) 2328–2336.
- [24] W.P.K. Chong, S.H. Thng, A.P. Hiu, D.-Y. Lee, E.C.Y. Chan, Y.S. Ho, LC–MS–based metabolic characterization of high monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 3103–3111.
- [25] W. Yuan, K.W. Anderson, S. Li, J.L. Edwards, Subsecond absolute quantitation of amine metabolites using isobaric tags for discovery of pathway activation in mammalian cells, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2892–2899.
- [26] W. Yuan, J.L. Edwards, Thiol metabolomics of endothelial cells using capillary liquid chromatography mass spectrometry with isotope coded affinity tags, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2561–2568.
- [27] N. Putluri, A. Shojaja, V.T. Vasu, S. Nalluri, S.K. Vared, V. Putluri, et al., Metabolomic profiling reveals a role for androgen in activating amino acid metabolism and methylation in prostate cancer cells, *PLoS ONE* 6 (2011) e21417.
- [28] R. Orlando, J.-M. Lim, J.A. Atwood, P.M. Angel, M. Fang, K. Aoki, et al., IDAWG: metabolic incorporation of stable isotope labels for quantitative glycomics of cultured cells, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 3816–3823.
- [29] L. Stuani, C. Lechaplais, A.V. Salminen, B. Ségurens, M. Durot, V. Castelli, et al., Novel metabolic features in *Acinetobacter baylyi* ADP1 revealed by a multiomics approach, *Metabolomics* 10 (2014) 1223–1238.
- [30] D.J. Creek, A. Jankevics, R. Breitling, D.G. Watson, M.P. Barrett, K.E.V. Burgess, Toward global metabolomics analysis with hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry: improved metabolite identification by retention time prediction, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8703–8710.
- [31] F. Fei, D.E. Bowditch, B. McCarry, Comprehensive and simultaneous coverage of lipid and polar metabolites for endogenous cellular metabolomics using HILIC–TOF–MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3723–3733.
- [32] Y. Wu, L. Li, Development of isotope labeling liquid chromatography–mass spectrometry for metabolic profiling of bacterial cells and its application for bacterial differentiation, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5755–5763.
- [33] R. Zhang, D.G. Watson, L. Wang, G.D. Westrop, G.H. Coombs, T. Zhang, Evaluation of mobile phase characteristics on three zwitterionic columns in hydrophilic interaction liquid chromatography mode for liquid chromatography–high resolution mass spectrometry based untargeted metabolite profiling of *Leishmania* parasites, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 168–179.
- [34] K. Narainsamy, C. Cassier-Chauvat, C. Junot, F. Chauvat, High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ–Orbitrap mass spectrometer: evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress, *Metabolomics* 9 (2013) 21–32.
- [35] W. Lu, M.F. Clascuin, E. Melamud, D. Amador-Noguez, A.A. Caudy, J.D. Rabinowitz, Metabolomic analysis via reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to a stand alone orbitrap mass spectrometer, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3212–3221.
- [36] G. Paglia, S. Hrafnisdóttir, M. Magnusdóttir, R.M. Fleming, S. Thorlacius, B.O. Palsson, et al., Monitoring metabolites consumption and secretion in cultured cells using ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC–Q–ToF–MS), *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1183–1198.
- [37] P. Schlaermann, B. Toelle, H. Berger, S.C. Schmidt, M. Glanemann, J. Ordemann, et al., A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection in vitro, *Gut* (2014) doi:10.1136/gutjnl-2014-307949.
- [38] M. Rehberg, A. Rath, J.B. Ritter, Y. Genzel, U. Reichl, Changes in intracellular metabolite pools during growth of adherent MDCK cells in two different media, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 385–397.
- [39] S. Selvarasu, Y.S. Ho, W.P.K. Chong, N.S.C. Wong, F.N.K. Yusufi, Y.Y. Lee, et al., Combined in silico modeling and metabolomics analysis to characterize fed-batch CHO cell culture, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1415–1429.
- [40] L. Zang, R. Frenkel, J. Simeone, M. Lanan, M. Byers, Y. Lyubarskaya, Metabolomics profiling of cell culture media leading to the identification of riboflavin photosensitized degradation of tryptophan causing slow growth in cell culture, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5422–5430.
- [41] N. Sienkiewicz, S. Jaroslawski, S. Wyllie, A.H. Fairlamb, Chemical and genetic validation of dihydrofolate reductase–thymidylate synthase as a drug target in African trypanosomes, *Mol. Microbiol.* 69 (2008) 520–533.
- [42] M. Hartmann, D. Zimmermann, J. Nolte, Changes of the metabolism of the colon cancer cell line SW-480 under serum-free and serum-reduced growth conditions, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 44 (2008) 458–463.
- [43] S.F. Shedd, N.W. Lutz, W.E. Hull, The influence of medium formulation on phosphomonoester and UDP-Hexose levels in cultured human colon tumor cells as observed by ³¹P NMR spectroscopy, *NMR Biomed.* 6 (1993) 254–263.
- [44] A.T. Miccheli, A. Miccheli, R. Di Clemente, M. Valerio, P. Coluccia, M. Bizzarri, et al., NMR-based metabolic profiling of human hepatoma cells in relation to cell growth by culture media analysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (2006) 1723–1731.
- [45] P. Hughes, D. Marshall, Y. Reid, H. Parkes, C. Gelber, The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?, *Biotechniques* 43 (2007) 575.
- [46] D. Vuckovic, Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1523–1548.
- [47] B.D. Bennett, J. Yuan, E.H. Kimball, J.D. Rabinowitz, Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1299–1311.
- [48] K. Dettmer, N. Nürnberger, H. Kaspar, M.A. Gruber, M.F. Altmstetter, P.J. Oefner, Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 1127–1139.
- [49] Q. Teng, W. Huang, T.W. Collette, D.R. Ekman, C. Tan, A direct cell quenching method for cell-culture based, *Metabolomics* 5 (2009) 199–208.
- [50] C.L. Winder, W.B. Dunn, S. Schuler, D. Broadhurst, R. Jarvis, G.M. Stephens, et al., Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2939–2948.
- [51] S. Dietmair, N.E. Timmins, P.P. Gray, L.K. Nielsen, J.O. Krömer, Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol, *Anal. Biochem.* 404 (2010) 155–164.
- [52] C.A. Sellick, D. Knight, A.S. Croxford, A.R. Maqsood, G.M. Stephens, R. Goodacre, et al., Evaluation of extraction processes for intracellular metabolite profiling of mammalian cells: matching extraction approaches to cell type and metabolite targets, *Metabolomics* 6 (2010) 427–438.
- [53] A. Ruiz-Aracama, A. Peijnenburg, J. Kleinjans, D. Jennen, J. van Delft, C. Hellfrisch, et al., An untargeted multi-technique metabolomics approach to studying intracellular metabolites of HepG2 cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *BMC Genomics* 12 (2011) 251.
- [54] X. Dupontet, R.B.M. Aggio, S. Carneiro, S.G. Villas-Bôas, The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used, *Metabolomics* 8 (2012) 410–421.
- [55] M.A. Lorenz, C.F. Burant, R.T. Kennedy, Reducing time and increasing sensitivity in sample preparation for adherent mammalian cell metabolomics, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3406–3414.
- [56] P. Masson, A.C. Alves, T.M.D. Ebbels, J.K. Nicholson, E.J. Want, Optimization and evaluation of metabolite extraction protocols for untargeted metabolic profiling of liver samples by UPLC–MS, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7779–7786.

- [57] E. Cequier-Sanchez, C. Rodriguez, A.G. Ravelo, R. Zarate, Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 4297–4303.
- [58] S. Dietmair, M.P. Hodson, L.-E. Quek, N.E. Timmins, P. Chrysanthopoulos, S.S. Jacob, et al., Metabolite profiling of CHO cells with different growth characteristics, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1404–1414.
- [59] M.-A. Maubert, E. Quévrain, E. Capton, J.P. Grill, G. Thomas, M. Bachelet, et al., High-resolution mass spectrometry and partial de novo sequencing constitute a useful approach for determining the profile of chemokine secretion following the stimulation of human intestinal epithelial cells, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 2179–2187.
- [60] O. Shaham, N.G. Slate, O. Goldberger, Q. Xu, A. Ramanathan, A.L. Souza, et al., A plasma signature of human mitochondrial disease revealed through metabolic profiling of spent media from cultured muscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 1571–1575.
- [61] S. Forcisi, F. Moritz, B. Kanawati, D. Tziotis, R. Lehmann, P. Schmitt-Kopplin, Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 51–65.
- [62] G. Glauser, N. Veyrat, B. Rochat, J.-L. Wolfender, T.C.J. Turlings, Ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry for plant metabolomics: a systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 151–159.
- [63] J.L. Jiwan, P. Wallemacq, M.F. Herent, HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory?, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 136–147.
- [64] J.M. Büscher, D. Czernik, J.C. Ewald, U. Sauer, N. Zamboni, Cross-platform comparison of methods for quantitative metabolomics of primary metabolism, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2135–2143.
- [65] Z. Ser, X. Liu, N.N. Tang, J.W. Locasale, Extraction parameters for metabolomics from cultured cells, *Anal. Biochem.* 475 (2015) 22–28.
- [66] S. Krishnan, E.E.R. Verheij, R.C. Bas, M.W.B. Hendriks, T. Hankemeier, U. Thissen, et al., Pre-processing liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry data: extracting pure mass spectra by deconvolution from the invariance of isotopic distribution, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 917–923.
- [67] R. Baran, H. Kochi, N. Saito, M. Suematsu, T. Soga, T. Nishioka, et al., MathDAMP: a package for differential analysis of metabolite profiles, *BMC Bioinformatics* 7 (2006) 530.
- [68] A. Lommen, H.J. Kools, MetAlign 3.0: performance enhancement by efficient use of advances in computer hardware, *Metabolomics* 8 (2012) 719–726.
- [69] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, M. Oresic, MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC Bioinformatics* 11 (2010) 395.
- [70] E. Melamud, L. Vastag, J.D. Rabinowitz, Metabolomic analysis and visualization engine for LC-MS Data, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9818–9826.
- [71] C.A. Smith, E.J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, G. Siuzdak, XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Anal. Chem.* 78 (2006) 779–787.
- [72] M. Sugimoto, M. Kawakami, M. Robert, T. Soga, M. Tomita, Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis, *Curr. Bioinform.* 7 (2012) 96–108.
- [73] R. Mohamed, E. Varesio, G. Ivosev, L. Burton, R. Bonner, G. Hopfgartner, Comprehensive analytical strategy for biomarker identification based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry and new candidate confirmation tools, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7677–7694.
- [74] M. Brown, W.B. Dunn, P. Dobson, Y. Patel, C.L. Winder, S. Francis-McIntyre, et al., Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics, *Analyst* 134 (2009) 1322–1332.
- [75] J. Draper, D. Enot, D. Parker, M. Beckmann, S. Snowdon, W. Lin, et al., Metabolite signal identification in accurate mass metabolomics data with MZedDB, an interactive m/z annotation tool utilising predicted ionisation behaviour 'rules', *BMC Bioinformatics* 10 (2009) 227.
- [76] E. Zelena, W.B. Dunn, D. Broadhurst, S. Francis-McIntyre, K.M. Carroll, P. Begley, et al., Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1357–1364.
- [77] T. Sangster, H. Major, R. Plumb, A.J. Wilson, I.D. Wilson, A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabolomic analysis, *Analyst* 131 (2006) 1075–1078.
- [78] A.B. Canelas, A. ten Pierick, C. Ras, R.M. Seifar, J.C. van Dam, W.M. van Gulik, et al., Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7379–7389.
- [79] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta* 115 (2013) 104–122.
- [80] J. Smeraglia, S. McDougall, K. Elsby, A. Companjen, S. White, M. Golob, et al., Conference report: AAPS and US FDA Crystal City V meeting on quantitative bioanalytical method validation and implementation: feedback from the EBF, *Bioanalysis* 6 (2014) 729–732.
- [81] C.A. Sellick, R. Hansen, G.M. Stephens, R. Goodacre, A.J. Dickson, Metabolite extraction from suspension-cultured mammalian cells for global metabolite profiling, *Nat. Protoc.* 6 (2011) 1241–1249.
- [82] J. Munger, S.U. Bajad, H.A. Collier, T. Shenk, J.D. Rabinowitz, Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection, *PLoS Pathog.* 2 (2006) e132.
- [83] R.-J. Raterink, P.W. Lindenburg, R.J. Vreeken, R. Ramautar, T. Hankemeier, Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics, *Trends Anal. Chem.* 61 (2014) 157–167.
- [84] T.R. Northen, O. Yanes, M.T. Northen, D. Marrinucci, W. Uritboonthai, J. Apon, et al., Clathrate nanostructures for mass spectrometry, *Nature* 449 (2007) 1033–1036.
- [85] G. Nicholson, M. Rantalainen, A.D. Maher, J.V. Li, D. Malmudin, K.R. Ahmadi, et al., Human metabolic profiles are stably controlled by genetic and environmental variation, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011) 525.
- [86] L.-E. Quek, S. Dietmair, J.O. Krömer, L.K. Nielsen, Metabolic flux analysis in mammalian cell culture, *Metab. Eng.* 12 (2010) 161–171.

Travaux de recherche

Objectif

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est caractérisée par une hétérogénéité phénotypique, sous tendue par plusieurs mécanismes physiopathologiques (excitotoxicité au glutamate, stress oxydant, dysfonction mitochondriale, altération du métabolisme etc...) conduisant à la mort sélective des motoneurones. Malgré les nombreuses découvertes (l'identification des facteurs génétiques, des voies physiopathologiques...) et les avancées technologiques, l'étiologie de la maladie reste encore inconnue. Aucun biomarqueur biologique de diagnostic, ni de pronostic fiable n'a été identifié à ce jour. La SLA reste malheureusement incurable, seul le riluzole, un anti-glutamatergique est autorisé pour le traitement. Il est capable de ralentir la progression de la SLA, mais toutefois, il n'augmenterait que très peu la durée de survie. Outre son rôle de neurotransmetteur, le glutamate semble jouer un rôle primordial dans les anomalies du métabolisme énergétique cérébral décrites dans la pathogénèse de la SLA. Devant ces incertitudes sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette maladie et de leurs liens, devant les multiples échecs thérapeutiques, de nouvelles approches intégratives d'exploration de la pathogénèse de cette maladie doivent être développées.

Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse a été d'approfondir la connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA, en particulier les altérations du métabolisme énergétique cérébral induites par le glutamate au niveau cellulaire en utilisant une approche métabolomique.

Nous avons dans un premier temps développé la méthodologie d'analyse métabolomique de cultures cellulaires. Nous avons mis au point les différentes méthodes de préparation et d'analyse du métabolome cellulaire par spectroscopie par résonance magnétique (RMN), par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) et par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Dans un deuxième temps, nous avons évalué du point de vue moléculaire et cellulaire la pertinence d'une lignée cellulaire hybride NSC-34 (issue de la fusion de motoneurones et des cellules du neuroblastome) comme modèle *in vitro* d'étude de l'excitotoxicité pour s'en servir par la suite comme modèle d'étude.

Enfin, nous avons mis au point un modèle de co-culture à partir des cultures primaires de motoneurones et des astrocytes et nous avons ensuite utilisé l'approche métabolomique pour étudier les altérations métaboliques pouvant se produire dans les astrocytes dans des conditions associées à la SLA.

**Partie I : Développement de
méthodologies d'analyse du
métabolome cellulaire par RMN,
GC-MS et LC-MS**

I. Résumé de l'étude

Cette partie du travail de thèse a pour objectif de mettre au point la méthodologie adéquate de préparation des échantillons cellulaires en fonction de ces trois techniques complémentaires : RMN, LC-HRMS et GC-MS et d'optimiser les méthodes d'analyse de chacune d'entre elles. Pour ce faire nous avons utilisé les cellules adhérentes NSC-34. Nous avons donc optimisé les principales étapes de la préparation des échantillons cellulaires pour les analyses métabolomiques, notamment la fixation des cellules « quenching », et l'extraction des métabolites. De plus, nous avons optimisé la dérivation des métabolites pour les analyses en GC-MS.

Nous avons dans un premier temps évalué par RMN ^1H trois méthodes de « quenching » : deux avec du méthanol à -20°C , et -40°C vs sans méthanol à -80°C et quatre méthodes différentes d'extraction dont deux monophasiques (méthanol/ eau et acétonitrile/ eau) et deux diphasiques (dichlorométhane/méthanol/eau, et dichlorométhane/acétonitrile/eau). Les critères d'évaluations de ces méthodes étaient basés sur le nombre de métabolites extraits et la reproductibilité de la méthode en calculant la déviation standard relative de ces métabolites. Pour l'analyse par GC-MS, nous avons évalué quatre méthodes de dérivation des métabolites dont trois composées d'une étape d'oximation (3h à température ambiante, 2h à 60°C et 1h à 60°C) suivie d'une étape de silylation (1h à 60°C) et une quatrième méthode composée uniquement de l'étape de silylation. En utilisant une colonne C18, nous avons également évalué cinq gradients d'élution différents pour l'analyse en LC-HRMS, dont trois utilisent comme solvants d'élution du méthanol/eau et les deux autres de l'acétonitrile/eau. Afin de juger les performances de ces différents gradients d'élution, nous avons analysé les paramètres suivants : qualité du chromatogramme (signal/bruit), nombre de pics détectés et la reproductibilité sur la base du coefficient de variation (CV) des pics.

Cette partie de travail de thèse a fait l'objet d'une publication scientifique présentée ci-dessous.

Madji Hounoum Blandine et al “*Analytical methodology for study of adherent mammalian cell metabolomics using NMR, GC-MS and LC-HRMS*” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2015) 407, pp.8861–8872

Informations supplémentaires en **annexe 2**

Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS

Blandine Madji Hounoum, Hélène Blasco, Lydie Nadal-Desbarats, Binta Diémé, Frédéric Montigny, Christian R. Andres, Patrick Emond, et al.

Analytical and Bioanalytical Chemistry

ISSN 1618-2642
Volume 407
Number 29

Anal Bioanal Chem (2015)
407:8861-8872
DOI 10.1007/s00216-015-9047-x



 Springer



Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS

Blandine Madji Hounoum¹ · Hélène Blasco¹ · Lydie Nadal-Desbarats¹ · Binta Diémé¹ · Frédéric Montigny¹ · Christian R. Andres¹ · Patrick Emond¹ · Sylvie Mavel¹

Received: 9 June 2015 / Revised: 3 September 2015 / Accepted: 14 September 2015 / Published online: 7 October 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract We developed a methodology for the analysis of intracellular metabolites using nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR), gas-chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), and liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). The main steps for analysis of adherent cells in order to recover the widest possible range of intracellular compounds are blocking metabolic activity by quenching and extraction of intracellular metabolites. We explored three protocols to quench NSC-34 cell metabolism and four different extraction methods, analyzed by NMR. On the basis of the number of metabolites extracted and their relative standard deviation (RSD) analyzed by NMR, the most reproducible protocol [quenching by MeOH at -40°C and extraction with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3:3:2)] was used to obtain intracellular media to be analyzed by GC-MS and LC-HRMS. GC-MS analysis was optimized by three oximation procedures followed by silylation derivatization and these were compared to silylation alone. Using reversed-phase liquid chromatography (C18), four different gradients for LC-MS were compared. The analytical protocols were determined to establish the reliability and suitability of sample treatments required to achieve the correct biological analysis of untargeted mammalian cell metabolomics.

Keywords Bioanalytical methods · NMR/ESR · Mass spectrometry/ICP-MS · Cell systems/single cell analysis

Introduction

The complementary data obtained by the various types of “omics” technology such as genomics, proteomics, and more recently metabolomics provide metabolic profiles of living organisms. Metabolomics may reflect physiological endpoints depending on genetic and environmental factors [1]. Metabolomics evaluates the collection of thousands of small molecules (i.e., metabolites lower than 1000 Da, the whole being called the metabolome) that are chemically transformed during metabolism (reactants, intermediates, and products of enzyme-mediated biochemical reactions). The metabolome is thought to be produced by every aspect of cell function. Cell metabolomics describes comprehensive analytical approaches to assess metabolites by linking mechanistic biochemistry and cellular phenotype. There are two types of approach: targeted or untargeted. Targeted analyses focus on a subset of known metabolites, while untargeted metabolomics (metabolic fingerprinting) analyses are global screening approaches. The metabolomics of cells is applied across many fields such as biotechnology [2], cell phenotype classification [3], toxicology [4] and drug-testing studies [5], tracking both pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles after treatment [6], and discovery of biomarkers [7]. The development of cell metabolomics has been hampered by several challenges including variability of growth medium formulations and additives, differential rates of proliferation of cell lines due to growth conditions and age (passage number) of culture, inactivation of metabolism via a “quenching” method of cell culture, harvesting, extraction procedures, and the development of robust analytical methods [8]. Metabolomics studies are performed out with several analytical

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-015-9047-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sylvie Mavel
mavel@univ-tours.fr

¹ INSERM U930 “Imagerie et Cerveau”, CHRU de Tours, Université François-Rabelais, 10 Bv Tonnellé, 37044 Tours, France

instruments [mostly nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) coupled with gas chromatography (GC-MS) or liquid chromatography (LC-MS)]. Some strategies for cell studies have been described for ^1H -NMR spectroscopy [9–11]. Mass spectrometry techniques such as GC-MS [5, 12, 13] and LC-MS [14, 15], and more recently, high resolution mass spectroscopy (HRMS), are becoming the most widely used ultra-sensitive methods, with only minimal amounts of sample. NMR and MS provide complementary information and their combined use extends metabolome coverage [16].

As there is currently no standardized operating procedure for cell metabolomics, almost every research team follows its in-house methodology, with or without validation of results. No previous study has reported a rigorous methodology to explore cellular metabolism using several analytical platforms, and therefore certain steps such as extraction of metabolites, quenching/extraction procedures, and analytical techniques [9, 10] require optimization to obtain the cellular metabolome. Due to the high diversity of chemical classes and abundance of metabolites (range from low ng/mL to mg/mL), no single analytical technique covers the entire spectrum of the metabolome. We therefore suggest that a multiplatform approach would provide more information to reach the widest possible range of metabolites. Few multiplatform metabolomics studies have been published, and some of them reported quantitative or qualitative analysis for tissue [17], serum [18], or urine samples [19], but no paper has yet described NMR plus GC-MS plus LC-HRMS instrumental techniques to explore cell metabolomes. In this study, we developed and suggest a fingerprinting analysis method based on complementary analytical techniques (NMR, GC-MS, and LC-HRMS), including analytical optimization (quenching, extraction, and analytical methods). The aim of such optimization was to cover a wide range of metabolites and to test this protocol on analysis of adherent mammalian cells (NSC-34).

Materials and methods

Chemicals

All authentic compounds were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) unless otherwise noted. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin sodium, and streptomycin solutions for cell cultures, Trypsin/EDTA (0.25 % trypsin/2.21 mM EDTA in HBSS), and phosphate-buffered saline (PBS) were purchased from Gibco®. Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Eurobio (Courtabouef, France).

NSC-34 cell cultures

The NSC-34 cell line was obtained from Cedarlane Laboratories (via Tebu-Bio in France) and grown in DMEM supplemented

with 10 % FBS, 100 U.mL⁻¹ penicillin, and 100 µg mL⁻¹ streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂. The cells were grown as monolayer cultures in T75 flasks with 10 mL of medium per flask at a density of 1×10^7 cells/75 cm² flask (approximately 90 % confluence) for metabolomics analysis.

Cell harvesting

The growth medium was removed for sample collection. In order to clear away residual extracellular metabolites, cells for NMR analysis were rapidly washed twice by gently dispersing 5.0 mL of PBS (pH 7.4) at 37 °C on the cell surface, or for MS analyses a water solution with 0.9 % (w/v) of NaCl. The residual PBS or 0.9 % (w/v) NaCl solution was removed by vacuum and then metabolism was quenched. The cells were detached using a cell scraper, and the cell suspensions were transferred into 50 mL centrifuge tubes for extraction of intracellular metabolites.

Optimization of quenching and extraction methods

Cell quenching methods

Three different quenching methods were evaluated ($n=4$ in each experiment) as described in Fig. 1a:

(1) Three milliliters of cold methanol at −40 °C, or (2) 3 mL of cold methanol at −20 °C, was added to the cell surface of the flask, or (3) flasks were frozen at −80 °C as follows: the flask was flash frozen in an ethanol bath at −80 °C, and then 3 mL of cold methanol (4 °C) was added to the cell surface of the flask.

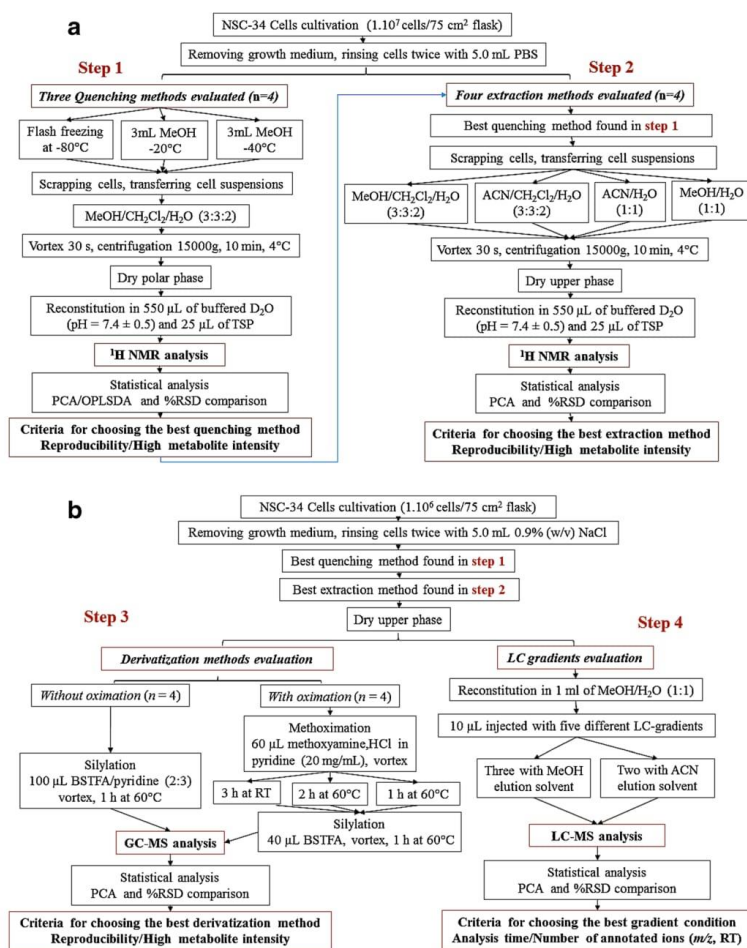
Cell extraction methods

For optimization of cell extraction, cells were quenched using 3 mL of cold MeOH at −40 °C. This solvent, used for the quenching, was collected and put together to the collected upper phase of the extraction process. Four extraction methods were evaluated: (1) MeOH/H₂O (1:1), (2) acetonitrile (ACN)/H₂O (1:1), (3) CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (3:3:2), and (4) CH₂Cl₂/ACN/H₂O (3:3:2). For evaluation of quenching methods, cells were extracted with the MeOH/CH₂Cl₂/water (3:3:2) method, adapted from the method of Martineau et al. [9].

Methanol/water and acetonitrile/water

After cell quenching, 3 mL of MeOH (or ACN) and 3 mL of cold milliQ water were added to the cell suspension in 50 mL centrifuge tubes. Samples were vortexed for 30 s, sonicated at 30 W for 10 min on ice using a sonicator, and centrifuged at 15,000×g at 4 °C for 10 min. The supernatant was removed and evaporated using a SpeedVac Concentrator.

Fig. 1 Workflow protocol for adherent cell preparation for **a** NMR analysis; **b** GC-MS and LC-MS analysis



Methanol/dichloromethane/water (3:3:2)
and acetonitrile/dichloromethane/water (3:3:2)

After cell quenching, 3 mL of MeOH (or ACN) and 3 mL of cold CH₂Cl₂ were added to the cell suspension in the centrifuge tubes. The samples were vortexed for 30 s and sonicated at 30 W for 10 min on ice using a sonicator. Then, 2 mL of cold milliQ water was added to the sample to generate two phases. The samples were vortexed for 30 s and centrifuged at 15,000×g for 10 min at 4 °C to separate the phases. The upper phase was isolated and evaporated using a SpeedVac Concentrator. Only the upper hydrophilic phase (aqueous phase) was used that contained water-soluble low-molecular weight endogenous metabolites, while non-polar metabolites

such as proteins and lipid molecules were in the lower organic phase (CH₂Cl₂).

¹H-NMR analysis

Prior to NMR analysis, each aqueous sample was reconstituted in 550 µL of 0.2 M potassium phosphate-buffered deuterium oxide (pH=7.4±0.5) and 25 µL of deuterium oxide (D₂O) with external reference [3-trimethylsilylpropionic acid (TSP), 0.05 wt% in D₂O], vortexed briefly, and centrifuged at 10,000×g for 15 min at 4 °C to remove any insoluble components. ¹H-NMR spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX-500 spectrometer, operating at 11.7 T, with a Broad Band Inverse (BBI)

probehead equipped with Z gradient coil. Standard ^1H -NMR spectra were acquired using a “noesypr1d” pulse sequence with a relaxation delay of 20 s, and a mixing time of 4 μs . Water suppression was achieved by presaturation during the relaxation delay and mixing time. ^1H -spectra were collected with 64 transients (and 8 dummy scans) into 32 k data points with a spectral width of 7500 Hz.

GC-MS experiment

Optimization of derivatization methods for GC-MS analysis

The medium was removed, and NSC-34 cells were swiftly washed with 5 mL of ice-cold NaCl 0.9 %. Quenching of metabolism was performed using the best quenching temperature (MeOH at -40°C) and intracellular metabolites were extracted with the best extraction method found [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3:3:2)] (Fig. 1b).

Sample derivatization

Evaporated intracellular metabolite extracts were prepared for GC-MS analysis using two derivatization procedures: with ($n=4$) and without ($n=4$) methoximation. 4-Phenylbutyric acid was used as internal standard (15 μL of a 2.5 mM solution).

Procedure without oximation

Intracellular metabolite extracts were suspended in *N,O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA)/pyridine (40:60; 100 μL) and incubated at 60°C for 1 h.

Procedure with oximation

Intracellular metabolite extracts were suspended in methoxyamine hydrochloride in pyridine (20 mg/mL; 60 μL) and incubated at 60°C for (i) 1 h, (ii) 2 h, or (iii) 3 h. BSTFA (40 μL) was then added, the mixture was vortexed for 1 min and incubated at 60°C for 1 h. For each derivatization method, the samples were cooled to room temperature and transferred into silanized GC vials for GC-MS analysis.

GC-MS analysis

GC-MS was used as previously described [20]. Briefly, a Shimadzu GC-MS system (Kyoto, Japan) was used, composed of an AOC-20S autosampler, an AOC-20i auto-injector, a gas chromatograph 2010, and a QP-2010-Plus mass spectrometer. The derivatized samples (3 μL , split ratio=10) were separated on a capillary CG column (Phenomenex, Zebron ZB-5, 30 $\text{m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$). The mass spectra of all GC peaks were generated by electron impact (EI) at 70 eV

and recorded in a positive total ion monitoring mode scanning the 50–500 m/z range.

LC-MS experiment

The NSC-34 cells were swiftly washed twice with 5 mL of ice-cold NaCl 0.9 %. Cells were quenched with MeOH at -40°C and extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3:3:2). The dry upper phase was reconstituted in 1 mL MeOH/ H_2O (1:1) followed by 15 min centrifugation at $13,000 \times g$ (4°C). The impact of filtration of cell extracts by pipette tip solid phase extraction (SPE) (Strata C18-E, 100 mg/3 mL, Phenomenex), by pushing through the tip the dissolved extracts as mentioned by the manufacturer, was measured on five replicates and compared to five non-filtered extracts. The intra- ($n=5$) and inter-day ($n=10$ on two consecutive days) precision of the chosen method was determined across the measurement range with quality control (QC) samples obtained from five freshly prepared independent extracted replicates. Instrumental stability was evaluated by multiple injections ($n=15$) of a QC sample.

LC-HRMS analysis

LC-HRMS analysis was performed on a UPLC Ultimate WPS-3000 system (Dionex, Germany), coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and operated in positive (ESI+) and negative (ESI-) electrospray ionization modes (one run for each mode). The system was controlled by Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific). Chromatography was carried out with a Phenomenex Kinetex 1.7 μm XB-C18 (150 $\text{mm} \times 2.10 \text{ mm}$) and 100 $\text{\AA}$ HPLC column maintained at 40°C . Five multistep gradients (preceded by a 3-min equilibration time) were evaluated (see Electronic Supplementary Material (ESM), Table S4), and full scan acquisition resulting in the typical total ion current plots (TICs) obtained from different LC gradients was provided in ESM (Fig. S4). The solvent system comprised mobile phase A [0.1 % (vol/vol) formic acid in water] and mobile phase B [0.1 % (vol/vol) formic acid in acetonitrile or methanol]. The UHPLC autosampler temperature was set at 4°C and the injection volume for each sample was 10 μL . The heated electrospray ionization (HESI) source was used for both modes, with a spray voltage of 3 kV, a capillary temperature of 325°C , a heater temperature of 350°C , a sheath gas flow of 25 arbitrary units (AU), an auxiliary gas flow of 8 AU, a spare gas flow of 3 AU, and a tube lens voltage of 100 V. During the full-scan acquisition, which ranged from 60 to 900 m/z , the instrument operated at 70,000 resolution ($m/z=200$), with an automatic gain control (AGC) target of 1×10^6 charges and a maximum injection time (IT) of 250 ms.

Data processing**NMR**

Spectra were processed as previously described [21]. Briefly, spectra were processed using Topspin version 2.1 software (Bruker Daltonik, Karlsruhe, Germany). Prior to Fourier transformation (FT), the FIDs were zero-filled to 64 k data points which provided sufficient data points for each resonance, and a line broadening factor of 0.3 Hz was applied. Each ^1H -NMR spectrum within a range of 0.8–9.4 ppm (excluding only the water region, $\delta=4.67$ –5.0 ppm) was reduced to 88 buckets of various width (from 0.01 to 0.15 ppm) using AMIX software (Analysis of MIXture, version 3.9.2, Bruker, Karlsruhe, Germany). These buckets corresponded to either singlets or multiplets of metabolites, although some buckets contained several metabolites due to a strong peak overlap. The signal intensity in each bucket was integrated and data were normalized in AMIX to the TSP peak (δ 0 ppm).

Spectra assignment ^1H -NMR spectra, referenced to the external TSP chemical shift reference, were assigned using spectra from our in-house database and/or online databases, including HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) and Chenomx Software (free version).

Semi-quantification The concentration of metabolites in the NMR samples was determined by the integrated buckets (corresponding to the metabolite) normalized to the TSP peak with known concentration (TSP 0.16 mM) and known number of cells (1×10^7 cells), providing the metabolite concentration per cell unit. The integrated intensities, obtained from relaxed spectra, were obtained with AMIX software (see ESM, Table S2).

GC-MS

After GC/MS analysis, the raw files were converted to mzXML format using the GC-MS Solution Postrun Analysis[®] software (Shimadzu, Japan), and subsequently the converted files were imported into the XCMS software (online version 20150123, Galaxy project Metabolomics, Roscoff, France) for feature detection, retention time (TR) correction, and preliminary statistical analysis. The GC/MS spectra processing was carried out automatically using the default parameters for GC/Single Quad (matched Filter). Thus, all chromatograms were analyzed simultaneously with identical settings. The resulting data table was exported to Excel to perform normalization to the total area. Compounds were identified from their electron impact mass spectra by comparison to the NIST spectral mass library (NIST 05) combined with our in-house library. Mass spectra of compounds were labeled according to the retention times as part of the identification

(Kovacs index obtained from an *n*-alkane standard mixture calibration). Spectral identification was done when the spectra and the library matched with a spectral similarity >90 %. Only metabolites identified in all four replicates of each extraction were taken into account.

LC-HRMS

SIEVE software (Thermo Fisher Scientific) was used to process raw data for peak alignments and framing in one batch. This process produced a table of detected features aligned by time, with columns for sample retention time, *m/z* ratio, and intensity (i.e., peak area). Only metabolites identified in all three replicates of each LC gradient used were taken into consideration. We used a low cutoff intensity value for sensitivity evaluations; the SIEVE framing algorithm considers all areas above the cutoff value as potential peaks, and so we also inspected each frame visually to confirm the shape. Only those frames that had a Gaussian conformation were retained in the analysis. Peaks with greater than 30 % variance in QC samples were rejected as unsuitable for further investigation as preconized to assess data quality [16]. The term “Ion annotated” was used to define a detected ion with a specific mass and a retention time corresponding (*m/z*, RT).

Statistical analysis

The data obtained from the different quenching methods, the different extraction methods, and the different analytical tools were analyzed by multivariate statistical data analysis [22]. The multivariate analysis was performed using Simca-P⁺-13 software (Umetrics, Umeå, Sweden). The data analyses were first conducted using principal component analysis (PCA), an unsupervised method where each point represents an NMR spectrum or a chromatogram allowing identification of the similarity or the differences between sample profiles. Grouping, trends, and outliers were revealed from the scatter plot. Discriminant metabolites, with a VIP value >1.0, were obtained by Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) using a method developed in our laboratory [23] (see ESM, Fig. S1 and Table S1). In parallel with multivariate analysis, the reliability of the results was assessed taking into account the relative standard deviation (RSD) of each metabolite. The RSD, expressed as a percentage, is defined as the ratio of the standard deviation to the average.

Results and discussion**Optimization of quenching and extraction methods**

As previously described [14], the impact of short water washing of cells to eliminate media and buffer residue prior to

quenching is substantial and leads to an increase in the number of high quality detectable features by LC-MS due to removal of salts that affect ESI [24]. In GC-MS, to avoid a large phosphate peak masking lower intensity metabolites, cells should be washed. Cells were therefore washed with 0.9 % NaCl water solution prior to quenching and extracting metabolites. Sample preparation for intracellular cell studies took account of two major problems by using wide range quenching and extraction methods used in the literature [8]. Different conditions described in the literature were experimented and used for blocking metabolic activity, e.g., rinsing, and temperature (freezing or heating) procedures [5, 10, 14], and also different solvents at different pH values were used to extract a wide variety of intracellular metabolites [9, 14, 25–28]. In this paper, we did not optimize the methodology to analyze lipids, which have also great interest in cellular process; lipidomics is described in different papers [29]. Each instrumental methods has its own advantages and disadvantages, and as NMR is the less sensitive but a robust analytical technique, easily done and analysed compared to GC-MS and LC-MS, and so consensually, we first evaluated the impact of quenching methods by comparing the reproducibility of ^1H -NMR spectra data and then we chose the most reliable procedure to investigate extraction methods (Fig. 1a).

Impact of quenching method

As NSC-34 cells are adherent, they can be isolated by manual detachment or by enzymatic reaction using trypsin/EDTA solution. The literature reports [10, 26] that the physiological stress of trypsinization and washing/centrifugation steps lead to a considerable loss of metabolites. Furthermore, we did not achieve (data not shown) good reproducibility with trypsin/EDTA solution. The experiments described below were therefore performed by mechanical detachment from the culture surface with cell scrapers.

We compared the intensity of 69 signals corresponding to 27 metabolites identified by ^1H -NMR (Fig. 2 and ESM Table S1), and analyzed the results by PCA. Multivariate analysis using PCA revealed that all three types of quenching gave single metabolome profiles. Figure 3 shows the first two principal components plotted against each other. The first component (PC1) explained 84 % of the total variance ($R^2\text{X}[1]=0.84$) and the second component (PC2) 6 % of the total variance ($R^2\text{X}[2]=0.06$). From this, we concluded that quenching with MeOH at -20°C was not enough cold and was the least reproducible (dispersion over the first axis), while quenching with MeOH at -40°C was shown to be the most reliable with regard to the clustering of the four dots in the PCA model at the center of the plot (Fig. 3). Quenching with a snap freezing of the cells at -80°C produced wide sample-to-sample variations.

Furthermore, using OPLS-DA, we compared the metabolites extracted more efficiently by quenching with MeOH at -20°C vs -40°C and by quenching at -80°C vs with MeOH at -40°C . Quenching with MeOH at -20°C yielded sugars at higher intensity, as for the organic acids (six signals out of nine), but quenching with MeOH at -40°C yielded 21/30 signals for the amino acids at higher intensities (see ESM, Table S1). As seen with the analysis of the total intensity of the ^1H -NMR signals (Table 1), higher concentrations with quenching at -80°C vs -40°C were shown by OPLS-DA for the majority of the signals (43/69 signals) (see ESM, Fig. S1).

The analysis of ^1H -NMR signals for each quenching method is represented in Table 1. The reproducibility of all quenching methods was examined by comparing the RSD value for buckets in all four replicate samples per quenching. The highest number of signals with $\text{RSD}<5\%$ was obtained for quenching with MeOH at -40°C (36/69 signals compared to 9/69 with quenching at -80°C and only 1/69 with quenching at -20°C).

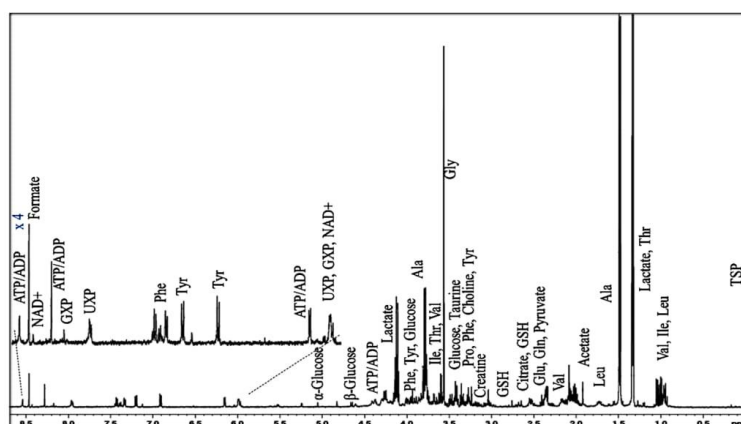
We also analyzed the total intensity, i.e., the mean of the sum of signals for all buckets for all four replicates, to compare the methods. Table 1 shows that extraction with methanol at -20°C seemed to be the more efficient in terms of quantity of metabolites extracted (highest total integral=23.7), but this technique was the least reproducible ($\text{RSD}=16.4\%$). Quenching with methanol at -40°C seemed the best protocol according to the literature (given without any comparison) [26, 30] with regard to its better reproducibility ($\text{RSD}=6.1\%$) and also the easier technical manipulation compared to snap freezing at -80°C .

From all these results (in particular the reproducibility), performed with only four replicates on adherent cells, we chose a quenching method with methanol at -40°C and tested various extraction solvents.

Impact of extraction method

Several reviews have compared various extraction strategies for analysis of cell metabolomics [8, 31]. Extraction is usually performed with a one- or two-phase liquid-liquid, with polar organic solvents such as methanol, ethanol, and acetonitrile, with or without a chlorinated solvent such as chloroform (which breaks the cell walls and denatures the enzymes), or with perchloric acid. Perchloric acid has been advised for high viscosity samples such as *Bacillus licheniformis* [32]. In our case, extraction in acidic conditions did not yield reliable results (data not shown) and, furthermore, the literature reports that perchloric acid extraction is not reproducible [9, 26]. Methanol-water extraction was reported to be the best method for metabolite profiling of Chinese hamster ovary cells [33], while a liquid-liquid extraction method (LLE) (methanol/chloroform/water) has been recommended at $\text{pH}=2$ and/or $\text{pH}=9$ by other teams [9, 34]. In this study, we focused on

Fig. 2 A typical annotated ^1H -NMR spectrum obtained from extracts of NSC-34 cells (10.10^6 cells). GXP (GTP/GDP/GMP), UXP (UTP/UDP/UMP), Phe (phenylalanine), Tyr (tyrosine), Ile (isoleucine), Pro (proline), GSH (glutathione), Thr (threonine), Glu (glutamate), Gln (glutamine), Leu (leucine), Val (valine), Ala (alanine), TSP (3-trimethylsilylpropionic)



comparing the extraction efficiency of polar metabolites with biphasic solvents such as dichloromethane (CH_2Cl_2)/MeOH/ H_2O (3:3:2) and CH_2Cl_2 /ACN/water (3:3:2) to that of two other extraction solvents, i.e., MeOH/water (1:1) and ACN/water (1:1). We used CH_2Cl_2 instead of chloroform because of its lower toxicity and because it is as good a lipid extracting solvent as chloroform [35]. All four extraction procedures were able to precipitate protein, DNA, and RNA and were able to provide good recovery for a wide range of hydrophilic metabolites.

The repeatability of the results was evaluated from the variability given by the RSD of each metabolite characterized by NMR spectral buckets. The highest number of signals with RSD < 10 % was obtained with the CH_2Cl_2 /MeOH/ H_2O extraction method (Table 2). Almost 32/69 signals presented an RSD < 10 % with MeOH/ H_2O

extraction, and 61/69 with CH_2Cl_2 /MeOH/ H_2O . These results are comparable with those described in the literature where three different cell lines were studied and where a similarity was found between MeOH/ H_2O and ACN/ H_2O (34/76 buckets with an RSD < 10 %) and better reproducibility with CHCl_3 /MeOH/ H_2O (30/76 buckets with an RSD < 5 %) [9].

The 27 metabolites listed in ESM (Table S2) were extracted by all extraction methods, but their relative concentrations varied considerably depending on the extraction method used.

After using four different extraction methods, we compared the intensity of 69 signals corresponding to 27 metabolites identified by ^1H -NMR, and analyzed the results by PCA (replicate samples, $n=4$). Figure 4 shows four well-separated clusters corresponding to the four extraction procedures. The first component explained 74 % of the total variance and divided extractions according to the type of solvent used (chlorinated solvent on the left of the plot, without dichloromethane on the right of the plot). Furthermore, separation can be seen over the second component (less impact with 13 % of the total variance explained). This component clustered the samples according to the use of ACN (experiments encircled in red, in the upper quadrant, in Fig. 4) compared to MeOH extraction (experiments encircled in green, under the axis).

Based on the PCA score plot (Fig. 4) and RSD table (Table 2), CH_2Cl_2 /MeOH/ H_2O and CH_2Cl_2 /ACN/ H_2O extraction methods were more reproducible. Interestingly, the two methods employing dichloromethane as the extracting solvent had similar profiles. Our study clearly showed that each extraction method generated a specific and unique profile of intracellular metabolites (Fig. 4). The polarity of the solvent

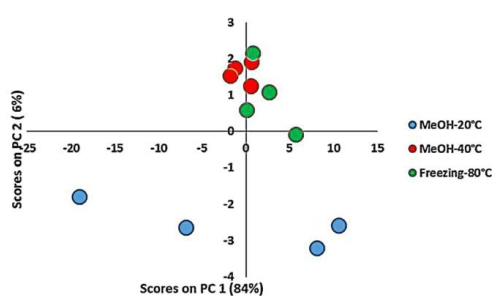


Fig. 3 Principal component analysis (PCA) scatter plot obtained from the 12 ^1H -NMR spectra of intracellular metabolites from cells quenched with MeOH at -20°C (blue dots), at -40°C (red dots) or frozen at -80°C (green dots)

Table 1 Analysis of chosen buckets for three different quenching methods: MeOH -20°C , MeOH -40°C , and flash freezing at -80°C ($n=4$ replicates)

Quenching methods	MeOH -20°C	MeOH -40°C	Freezing -80°C
Total intensity ^a	23.7	19.1	22.4
	Number of buckets obtained for each quenching method		
RSD < 5 % ^b	1/69*** ^β	36/69*** ^{α,***γ}	9/69*** ^β
RSD < 10 % ^b	1/69*** ^{β, ***γ}	61/69*** ^{α,***γ}	40/69*** ^{α, ***β}
Mean RSD	16.4 %	6.1 %	9.6 %

^a Total intensity of the integral of the 69 signals chosen, when the integral of the internal reference TSP was fixed at 1

^b Chi-squared test revealed that RSD differed significantly (*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$) when compared with (α) MeOH -20°C ; (β) MeOH -40°C ; (γ) freezing -80°C quenching methods

used to extract the metabolites seemed to be the main factor influencing the selectivity of each method.

GC-MS experiment

Silylation only versus oximation+silylation

We followed the flow chart in Fig. 1b to validate our GC-MS method. Cells were quenched with MeOH at -40°C and extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$. We studied the impact on the repeatability of a derivatization procedure in one or two steps, by analyzing annotated features (m/z , RT) with each method. The methoximation step (with methoxyamine hydrochloride) involves only the metabolites that contain ketone groups. Silylation affects the metabolites that contain labile hydrogen as hydroxyl (OH), carboxyl (COOH), and amine (NH_2). With methoximation prior to silylation, the number of sugar tautomers should be lower. With methoximation prior to silylation, we obtained better results compared to silylation alone [76 annotated features with a mean RSD = 11.0 % while prior oximation for 1 h led to a mean RSD < 10.6 %, Table 3]. Some metabolites are given as examples in the ESM (Table S3). In view of the repeatability, and as we studied cell extraction where a greater number of amino acids were present, we chose to optimize the two-stage chemical derivatization for GC-MS analysis.

Table 2 Analysis of chosen buckets for ACN/ H_2O (1:1), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (3:3:2), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3:3:2), and MeOH/ H_2O (1:1) extraction method ($n=4$ replicates)

Extraction methods	ACN/ H_2O	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$	MeOH/ H_2O
Total intensity ^a	47	33	32	56
	Number of buckets obtained for each extraction method			
RSD < 5 % ^b	20/69 δ***	36/69 δ***	36/69 δ***	3/69 β*** α*** γ***
RSD < 10 % ^b	48/69	50/69	61/69	32/69
Mean RSD	10.0 %	8.7 %	6.1 %	11.0 %

^a Total intensity of the integral of the 69 signals chosen, when the integral of the internal reference TSP was fixed at one

^b Chi-squared test revealed that RSD differ significantly (*** $p < 0.0001$) when compared with (α) ACN/ H_2O ; (β) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$; (γ) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, and (δ) MeOH/ H_2O extraction methods

Optimization of the oximation step

Experimental conditions reported in the literature are almost the same for silylation derivatization [36] (generally 60°C , 1 h). However, for cell analysis methods, they are very different for the methoximation process [37, 38]. Danielsson et al. described the greater impact of the duration and temperature of methoximation on the derivatization yield compared to those of silylation [12]. We therefore focused on two temperatures (60°C and room temperature) and three durations (1, 2, or 3 h) for the methoximation process.

PCA ($n=4$) was performed on replicate samples taking into account all the annotated features (73) for each methoximation method (ESM, Fig. S3). It showed a clear separation between 1, 2, and 3 h duration of methoximation. PC1 explained 54 % and PC2 explained 14 % of the total variance. In the PC1 score plot, samples derivatized using the heat methoximation process (60°C) were separated from samples derivatized using the methoximation process at room temperature. The plots corresponding to heating for 2 h were the closer together, and thus these methods seemed the more reproducible by PCA.

The best methoximation for cell analysis seemed to be 60°C for 2 h in view of the RSD for the three methods, and this method provided the lowest mean RSD (7.4 %) and the greatest number of metabolites with a RSD lower than 5 % (40/76 metabolites) (Table 3). Methoximation for 1 h was less reproducible (mean RSD = 10.6 %) although it provided the

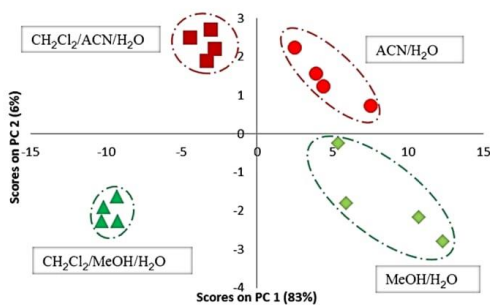


Fig. 4 Principal component analysis (PCA) resulting from the 20 standard ^1H -NMR spectra of intracellular metabolites extracted from NSC-34 cells using four different extraction methods: ACN/ H_2O (1:1) (circle), CH_2Cl_2 /ACN/ H_2O (3:3:2) (square), CH_2Cl_2 /MeOH/ H_2O (3:3:2) (triangle), and MeOH/ H_2O (1:1) (diamond)

same total intensity as methoximation at 60 °C for 2 h. Methoximation at room temperature for 3 h was the less reproducible (mean RSD=15.5 %). Literature reports that the repeatability of the sample workup and analysis should typically be between 7 and 15 % for GC-MS-based protocols [39].

In summary, the two-step derivatization including methoximation at 60 °C for 2 h followed by silylation is a reliable analytical method that fulfils the requirements for the study of cell metabolomics. It is the best trade-off between reproducibility (mean RSD=7.4 %) and derivatization efficiency (high signal intensity).

Optimization of LC-HRMS analysis

For LC-HRMS optimization, we studied the impact of gradient, stabilization, and reproducibility. Cell samples were prepared from the best protocol determined by the NMR study (MeOH at -40 °C and extracted with CH_2Cl_2 /MeOH/ H_2O). Liquid chromatography provides separation of metabolites prior to their detection and identification with a high resolution LTQ-Orbitrap mass spectrometer. This chromatographic separation step makes it possible to limit the “ion suppression effects”

(changes in analyte ionization caused by interfering substances occurring in biological matrices) [40]. One effective way to improve chromatographic resolution is to choose the appropriate mobile phase strength or gradient conditions. In this study, a reversed-phase column C18 was chosen to compare five different gradient conditions using methanol/water or acetonitrile/water as mobile phase (see ESM, Table S4).

Although the number of frames detected would provide a useful picture of the cell metabolome, analysts have to keep on mind that many signals detected by the system are due to fragments and adducts, and some signals might also come from background noise. For both ionization modes, we obtained 1009 and 588 ions in ESI+ and ESI- mode, respectively, after data preprocessing. The number of ions detected (total features without signals from background noise) and ions annotated [features which were characterized by m/z ratio and RT] for all gradient conditions investigated was showed in Fig. S5 (ESM). To choose the best gradient conditions, we compared signals that were annotated with their m/z ratio and RT, focusing mainly on the analysis time. In agreement with the number of annotated ions in positive mode, gradient conditions using MeOH provided a higher number of metabolites than with an acetonitrile gradient (1214 compared to 824, in the best conditions, a visualization of typical TICs from full scan acquisitions could be done from ESM, Fig. S4). More ions were also annotated with a methanol gradient than with an acetonitrile gradient. This could be explained by better detection due to better spread in the first minute of the chromatogram with methanol, and less ion-suppression effect, and thus better ionization of the metabolites. A greater number of polar metabolites, in weaker concentration, can be analyzed by this gradient. The MeOH-1 gradient condition recovered more metabolites compared to the other gradient conditions, but with a higher run time than with the MeOH-2 gradient (21 min compared to 26 min for MeOH-1, see ESM, Table S4). The MeOH-2 gradient condition provided slightly fewer annotated ions than the MeOH-1 gradient condition, but this gradient condition can represent a compromise between a shorter

Table 3 Analysis of chosen metabolites for three different methoximation methods ($n=4$ replicates) performed before silylation derivatization

	Without oximation	With oximation		
		Methoximation process		
	Silylation	60 °C, 1 h ^a	60 °C, 2 h ^a	RT, 3 h ^a
Total intensity	1.10×10^5	1.85×10^5	1.90×10^5	1.67×10^5
Mean RSD	11.0 %	10.6 %	7.4 %	15.5 %
RSD < 5 %	15/76 ^b	26/76 ^b	40/76 ^b	19/76 ^b
5 < RSD% < 10	28/76 ^b	30/76 ^b	17/76 ^b	17/76 ^b

^a Chi-squared test revealed that RSD did not differ significantly between these three methoximation processes

^b Number of metabolites detected

analysis time and good coverage for untargeted cell metabolomics.

The mass chromatogram (Fig. 5), obtained with the MeOH-2 gradient (ESM, Table S4), presented retention time windows for each chemical class. As expected, many polar compounds such as amino acids (lysine, arginine, histidine, glycine, glutamate, glutamine, etc.) showed poor retention time in the range of 0.73–1.0 min. Few amino acids (phenylalanine, tyrosine, tryptophan) and few organic compounds (dihydroxyphenylacetic acid, dihydroxyphenyl glycol, adrenaline) exhibited moderate retention time. The elution of fatty acids (linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, heptadecanoic acid, stearic acid) eluted after 11 min, the phenylpropanoic acid (phenyllactic acid) eluted at 12 min. As showed in Fig. 5, the C18 column allowed the analysis of moderately polar compounds but more difficult for polar compounds which coeluted close to the column dead volume. This methodology was applied to a reversed-phase column C18, but to have a more exhaustive metabolic printing, an analysis with a separation by hydrophilic interaction chromatography (HILIC) should be a plus as an alternative to compensate for the poor retention on C18 of highly polar compounds [41, 42]. Other chromatographic support (HILIC, PGC) should also be optimized as presented, in this paper, for C18.

As macromolecules, cell membrane fragments, or other undesirable particles can block the columns and create a

significant matrix effect, we compared cell extracts filtered and unfiltered, by in pipette tip SPE. As we used chlorinated extraction, we did not find any difference regarding the main RSD of the totality of validated peaks, and we did not improve the signal by prior filtration [RSD=5.42 % and 5.11 % without and with filtration, respectively ($n=5$)]; extraction of cell extracts with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ was efficient in the elimination of proteins/lipids.

With regard to adducts and cluster formation, LC-MS is highly dependent on the matrix effect and on samples with very different concentration ranges, so the analytical methodology should demonstrate that the analytical system remains stable throughout the analysis and should provide good validation data. To assess the quality of the data, we studied the stabilization of the system by injections of QC. As the conditioning is known to be matrix dependent, Gika et al. suggested five QC injections before analysis [43] while Paglia et al. required ten injections for equilibration [44]. In Fig. S6a in ESM, the PCA scores plot obtained from 1653 detected ions by ESI+ shows the projection of 15 QC injections. In our case, when we deleted the first five QC injections of the analysis, the PCA scores plot showed instability of the chromatographic column (ESM, Fig. S6b). More than 10 injections (in our case, for cell analysis) were needed for stabilization and the last four QC injections (QC_12–15) showed a mean RSD of 6.0 % compared to 11.4 % for 15 QC injections and 7.1 % for

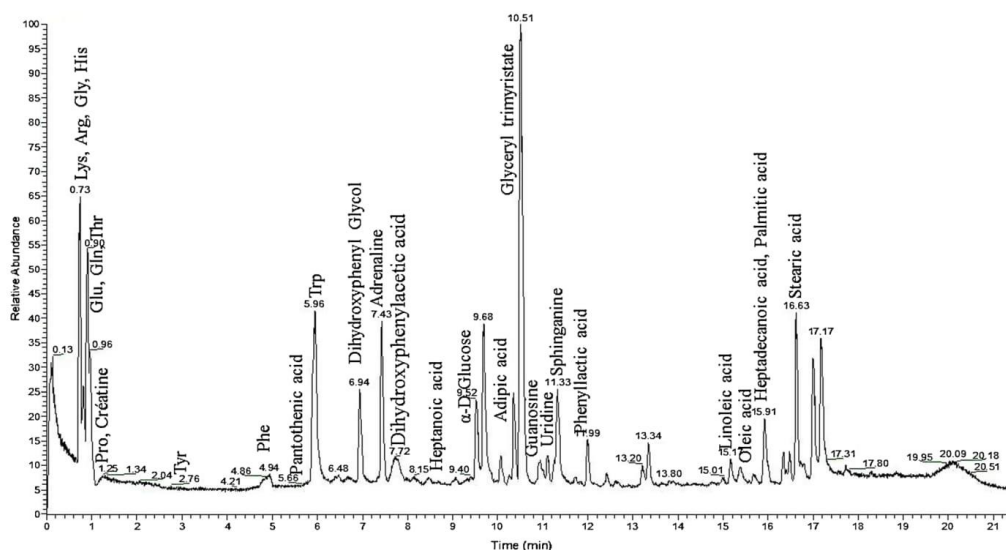


Fig. 5 Typical mass chromatogram of NSC-34 cell extracts acquired using ESI+ mode on C18 column. Lys (lysine), Arg (arginine), Gly (glycine), His (histidine), Glu (glutamic acid), Gln (glutamine), Thr (threonine), Pro (proline), Tyr (tyrosine), Phe (phenylalanine), Trp

(tryptophane). Tentative of identification based on m/z searches from Mass Spectrometry Metabolite Library of Standards (MSMLS®, IROA Technologies™)

the first 4 injections (QC_01-04). From these results, we stabilized the C18 chromatographic column by at least 15 prior QC injections before analyses.

Intra-day and inter-day precision was determined across the measurement range with QC samples and analyzed in five replicates. The results are given as percentage of relative standard deviation (%RSD).

For the LC-HRMS in positive ionization, we obtained intra-day precision of less than 20 % for 87 % of the totality of the measurements [1009 annotated ions (m/z , RT)] (ESM, Fig. S7). For the LC-HRMS in negative ionization, we obtained intra-day precision of less than 20 % for 94 % of the totality of the measurements (588 annotated ions, ESM, Fig. S7). Mean intra-assay precision was 9.4 and 8 % for ESI+ and ESI-, respectively. In comparison, the literature provided similar results, for cell study with a triple quadrupole mass spectrometer, a coefficient of variation of less than 15 % was reported [45]; 74 compounds (over 87 metabolites analyzed) shown an RSD<23 % for yeast analysis via an exactive orbitrap mass spectrometer [46]; and an RSD<25 %, evaluated for 48 metabolites with a less efficient mass spectrometer, was also reported for cell analysis [44]. After optimization of the gradient and stabilization of the column, we achieved good repeatability (RSD<20 %) compatible with metabolomics study.

Conclusions

As combining data from multiple analytical platforms is the best approach for comprehensive metabolomics, it is essential to optimize sample extraction, separation conditions, and instrumental parameters. As the analysis of adherent cells is highly dependent on the quenching/extraction methods, we showed with these results that methanol quenching at -40 °C with dual-phase extraction [MeOH/CH₂Cl₂/H₂O (3:3:2)] provides a reliable way to analyze intracellular metabolites (RSD<5 % for 52 % of the signals and 27 metabolites quantified by ¹H-NMR). For GC-MS analysis, oximation at 60 °C for 2 h followed by silylation derivatization gave the best results (mean RSD=6.6 % for 73 features) while the LC-HRMS method provided 1009 and 588 features from ESI-positive and ESI-negative of cell extract samples, respectively, and 87 and 94 % of them, respectively, showed an RSD<20 %. This strategy provided a reliable technique for a metabolomics study to analyze metabolites simultaneously using a combination of NMR, GC-MS, and LC-HRMS, which can be used for both targeted and untargeted metabolomics. Method standardization is essential for comparability of metabolomics data between experiments and laboratories in multi-disciplinary studies.

Acknowledgments We thank the "Département d'Analyses Chimiques et S.R.M. Biologique et Médicale" (PPF, Tours, France) for chemical analyses and especially Cinzia Bocca for LC-HRMS analyses.

Funding This study was funded by ARSLA ("Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres maladies du motoneurone") with a research grant and by "La Région Centre" with a PhD graduate grant. This work was supported by the "Institut National de la Santé et de la Recherche" INSERM and the University François-Rabelais.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G (2012) Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(4):263–269
- Chrysanthopoulos PK, Goudar CT, Klapa MI (2010) Metabolomics for high-resolution monitoring of the cellular physiological state in cell culture engineering. *Metab Eng* 12:212–222
- Allen J, Davey HM, Broadhurst D, Heald JK, Rowland JJ, Oliver SG, Kell DB (2003) High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat Biotechnol* 21:692–696
- Wang J-R, Zhang H, Yau LF, Mi J-N, Lee S, Lee KC, Hu P, Liu L, Jiang Z-H (2014) Improved sphingolipidomic approach based on ultra-high performance liquid chromatography and multiple mass spectrometries with application to cellular neurotoxicity. *Anal Chem* 86:5688–5696
- Winder CL, Dunn WB, Schuler S, Broadhurst D, Jarvis R, Stephens GM, Goodacre R (2008) Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Anal Chem* 80:2939–2948
- Bayet-Robert M, Morvan D, Chollet P, Barthomeuf C (2010) Pharmacometabolomics of docetaxel-treated human MCF7 breast cancer cells provides evidence of varying cellular responses at high and low doses. *Breast Cancer Res Treat* 120:613–626
- Cao B, Aa J, Wang G, Wu X, Liu L, Li M, Shi J, Wang X, Zhao C, Zheng T, Guo S, Duan J (2011) GC-TOFMS analysis of metabolites in adherent MDCK cells and a novel strategy for identifying intracellular metabolic markers for use as cell amount indicators in data normalization. *Anal Bioanal Chem* 400:2983–2993
- León Z, García-Cañaveras JC, Donato MT, Lahoz A (2013) Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis* 34:2762–2775
- Martineau E, Tea I, Loaëc G, Giraudeau P, Akoka S (2011) Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells. *Anal Bioanal Chem* 401(7):2133–2142
- Teng Q, Huang W, Collette T, Ekman D, Tan C (2009) A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics. *Metabolomics* 5(2):199–208
- Lane A, Fan TM (2007) Quantification and identification of isotopomer distributions of metabolites in crude cell extracts using ¹H TOCSY. *Metabolomics* 3(2):79–86
- Danielsson AP, Moritz T, Mulder H, Spiegel P (2010) Development and optimization of a metabolomic method for analysis of adherent cell cultures. *Anal Biochem* 404(1):30–39
- Sellick CA, Hansen R, Maqsood AR, Dunn WB, Stephens GM, Goodacre R, Dickson AJ (2009) Effective quenching processes for physiologically valid metabolite profiling of suspension cultured mammalian cells. *Anal Chem* 81(1):174–183

14. Lorenz MA, Burant CF, Kennedy RT (2011) Reducing time and increasing sensitivity in sample preparation for adherent mammalian cell metabolomics. *Anal Chem* 83(9):3406–3414
15. Vuckovic D (2012) Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 403(6):1523–1548
16. Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, Shookcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK (2013) Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat Protoc* 8(1):17–32
17. Naz S, García A, Barbas C (2013) Multiplatform analytical methodology for metabolic fingerprinting of lung tissue. *Anal Chem* 85(22):10941–10948
18. Vinaixa M, Rodríguez MA, Samino S, Díaz M, Beltran A, Mallol R, Bladé C, Ibañez L, Correig X, Yanes O (2011) Metabolomics reveals reduction of metabolic oxidation in women with polycystic ovary syndrome after pioglitazone-flutamide-metformin polytherapy. *PLoS One* 6(12):e29052
19. Goodpaster AM, Ramadas EH, Kennedy MA (2011) Potential effect of diaper and cotton ball contamination on NMR- and LC/MS-based metabolomics studies of urine from newborn babies. *Anal Chem* 83(3):896–902
20. Emond P, Mavel S, Aidoud N, Nadal-Desbarats L, Montigny F, Bonnet-Brilhault F, Barthélémy C, Merten M, Sarda P, Laumonnier F, Voure'h P, Blasco H, Andres C (2013) GC-MS-based urine metabolic profiling of autism spectrum disorders. *Anal Bioanal Chem* 405(15):5291–5300
21. Nadal-Desbarats L, Aidoud N, Emond P, Blasco H, Filipiak I, Sarda P, Bonnet-Brilhault F, Mavel S, Andres CR (2014) Combined ^1H -NMR and ^1H - ^{13}C HSQC-NMR to improve urinary screening in autism spectrum disorders. *Analyst* 139(13):3460–3468
22. Chan EC, Pasikanti KK, Nicholson JK (2011) Global urinary metabolic profiling procedures using gas chromatography-mass spectrometry. *Nat Protoc* 6(10):1483–1499
23. Mavel S, Nadal-Desbarats L, Blasco H, Bonnet-Brilhault F, Barthélémy C, Montigny F, Sarda P, Laumonnier F, Voure'h P, Andres CR, Emond P (2013) ^1H - ^{13}C NMR-based urine metabolic profiling in autism spectrum disorders. *Talanta* 114:95–102
24. Martano G, Delmotte N, Kiefer P, Christen P, Kentner D, Bumann D, Vorholt JA (2015) Fast sampling method for mammalian cell metabolic analyses using liquid chromatography-mass spectrometry. *Nat Protoc* 10(1):1–11
25. Le Belle JE, Harris NG, Williams SR, Bhakoo KK (2002) A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ^1H -NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 15(1):37–44
26. Dettmer K, Numberger N, Kaspar H, Gruber MA, Almetter MF, Oefner PJ (2011) Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. *Anal Bioanal Chem* 399(3):1127–1139
27. Ritter JB, Genzel Y, Reichl U (2008) Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: optimization using experimental design. *Anal Biochem* 373(2):349–369
28. Dietmair S, Timmins NE, Gray PP, Nielsen LK, Kromer JO (2010) Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol. *Anal Biochem* 404(2):155–164
29. Loizides-Mangold U (2013) On the future of mass-spectrometry-based lipidomics. *FEBS J* 280(12):2817–2829
30. Fan TM, Lane A, Higashi R, Yan J (2011) Stable isotope resolved metabolomics of lung cancer in a SCID mouse model. *Metabolomics* 7(2):257–269
31. Čuperlović-Culf M, Barnett DA, Culf AS, Chute I (2010) Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discov Today* 15:610–621
32. Li X, Long D, Ji J, Yang W, Zeng Z, Guo S, Ji Z, Qi G, Chen S (2013) Sample preparation for the metabolomics investigation of poly-gamma-glutamate-producing *Bacillus licheniformis* by GC-MS. *J Microbiol Meth* 94(1):61–67
33. Sellick C, Knight D, Croxford A, Maqsood A, Stephens G, Goodacre R, Dickson A (2010) Evaluation of extraction processes for intracellular metabolite profiling of mammalian cells: matching extraction approaches to cell type and metabolite targets. *Metabolomics* 6(3):427–438
34. Sana TR, Waddell K, Fischer SM (2008) A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 871(2):314–321
35. Cequier-Sanchez E, Rodriguez C, Ravelo AG, Zarate R (2008) Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *J Agric Food Chem* 56(12):4297–4303
36. Kanani H, Chrysanthopoulos PK, Klapa MI (2008) Standardizing GC-MS metabolomics. *J Chromatogr B* 871:191–201
37. Hu X, Li H, Tang P, Sun J, Yuan Q, Li C (2013) GC-MS-based metabolomics study of the responses to arachidonic acid in *Blakeslea trispora*. *Fungal Genet Biol* 57:33–41
38. Gullberg J, Jonsson P, Nordström A, Sjöström M, Moritz T (2004) Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 331(2):283–295
39. Koek M, Jellema R, van der Greef J, Tas A, Hankemeier T (2011) Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics* 7(3):307–328
40. Bi H, Krausz KW, Manna SK, Li F, Johnson CH, Gonzalez FJ (2013) Optimization of harvesting, extraction, and analytical protocols for UPLC-ESI-MS-based metabolomic analysis of adherent mammalian cancer cells. *Anal Bioanal Chem* 405(15):5279–5289
41. Fei F, Bowdish DME, McCarry BE (2014) Comprehensive and simultaneous coverage of lipid and polar metabolites for endogenous cellular metabolomics using HILIC-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem* 406(15):3723–3733
42. Gangl ET, Annan M, Spooner N, Vouros P (2001) Reduction of signal suppression effects in ESI-MS using a nanosplitting device. *Anal Chem* 73(23):5635–5644
43. Gika HG, Theodoridis GA, Plumb RS, Wilson ID (2014) Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabolomics. *J Pharm Biomed* 87:12–25
44. Paglia G, Hrafnisdóttir S, Magnúsdóttir M, Fleming RT, Thorlacius S, Pálsson B, Thiele I (2012) Monitoring metabolites consumption and secretion in cultured cells using ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-ToF-MS). *Anal Bioanal Chem* 402(3):1183–1198
45. Abdel Rahman AM, Pawling J, Ryczko M, Caudy AA, Dennis JW (2014) Targeted metabolomics in cultured cells and tissues by mass spectrometry: method development and validation. *Anal Chim Acta* 845:53–61
46. Lu W, Clasquin MF, Melamud E, Amador-Noguez D, Caudy AA, Rabinowitz JD (2010) Metabolomic analysis via reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to a stand alone orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* 82(8):3212–3221

II. Discussion & conclusion

La préparation des cultures cellulaires pour les études métabolomiques représente un défi considérable dans le développement des méthodologies d'analyse. Le « quenching » est une étape primordiale car elle consiste à inactiver les enzymes permettant ainsi d'obtenir une empreinte métabolique la plus proche possible de l'état physiologique de la cellule à un instant donné. L'extraction a pour objectif de perméabiliser la cellule et d'en extraire les métabolites avec des solvants appropriés. De ce fait, l'analyse des cellules adhérentes est fortement dépendante des méthodes de « quenching » et d'extraction choisies. Le choix de la technique analytique est primordial et dépend de la qualité et de la quantité du matériel biologique à analyser et également des objectifs fixés pour l'étude, d'où l'intérêt de mettre au point et de standardiser toute la méthodologie pour assurer la reproductibilité et la fiabilité de l'interprétation biologique des données obtenues.

Dans cette étude, nous avons utilisé des cellules adhérentes et avons montré que le « quenching » avec du méthanol à -40°C avec une extraction diphasique CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (3 :3 :2) permet d'obtenir une empreinte métabolique intracellulaire fiable et reproductible (CV < 5% pour 52% des signaux et 27 métabolites identifiés en RMN ¹H). Pour l'analyse GC-MS, l'oximation à 60°C pendant 2h suivie de la silylation apporte un meilleur rendement de dérivation des métabolites (CV moyen = 6,6% pour 73 métabolites). Nous avons optimisé la méthode d'analyse (gradient et solvant d'élution, la stabilisation du système) en LC-HRMS pour le métabolome cellulaire. Nous avons donc obtenu 1009 et 588 signaux en mode d'ionisation positive et négative, respectivement, avec 87 et 97% des signaux, respectivement, présentant un CV < 20%.

Cette partie du travail nous a permis de choisir sur des critères de reproductibilité et de nombre de métabolites extraits, les méthodes de préparation des cellules adhérentes les plus appropriées pour la suite de notre projet.

**Partie II : Evaluation des
caractéristiques motoneuronales des
cellules NSC-34 comme modèle *in
vitro* d'étude de l'excitotoxicité dans
la SLA**

I. Résumé de l'étude

La lignée cellulaire hybride NSC-34, est issue de la fusion des motoneurones de la moelle épinière et des cellules du neuroblastome N18TG2. Elle est couramment utilisée comme modèle cellulaire dans les études des mécanismes physiopathologiques de la SLA et a été initialement décrite comme possédant la plupart des propriétés morphologiques et physiologiques des motoneurones (Cashman et al. 1992) lorsqu'elle est soumise aux protocoles de différenciation et de maturation (Benkler et al. 2013; Eggett et al. 2000). Cependant, la réponse physiologique des NSC-34 au glutamate comparée à celle des motoneurones est très peu décrite.

Dans cette étude, nous avons évalué la pertinence des NSC-34 différenciée (NSC-34_D) comme modèle *in vitro* d'étude de l'excitotoxicité induite par le glutamate, afin de l'utiliser comme modèle dans notre étude de l'altération du métabolisme associée à la SLA. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps différencié les NSC-34 en réduisant la quantité du sérum dans le milieu de culture et en utilisant ou pas un agent de différenciation : l'acide trans-rétinoïque. Nous avons évalué ensuite l'expression des récepteurs du glutamate et leur fonctionnalité *via* le flux calcique. Nous avons comparé pour la première fois les NSC-34 (en utilisant différents protocoles de différenciation) comme modèle d'étude de l'excitotoxicité aux motoneurones (cellules de référence).

Cette partie de travail de thèse a fait l'objet d'une publication scientifique présentée ci-dessous.

Madji Hounoum Blandine et al. “*NSC-34 motor neuron-like cells are unsuitable as experimental model for glutamate-mediated excitotoxicity*” *Frontiers in Molecular Neuroscience*, (2016)10:11, pp118

Informations supplémentaires en **annexe 3**

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire « Nutrition, croissance, cancer » Inserm U1069 de Tours.



NSC-34 Motor Neuron-Like Cells Are Unsuitable as Experimental Model for Glutamate-Mediated Excitotoxicity

Blandine Madji Hounoum¹, Patrick Vourc'h^{1,2}, Romain Felix³, Philippe Corcia^{1,4}, Franck Patin^{1,2}, Maxime Guéguinou³, Marie Potier-Cartereau³, Christophe Vandier³, Cédric Raoul⁵, Christian R. Andres^{1,2}, Sylvie Mavel¹ and Hélène Blasco^{1,2*}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U930) "Imagerie et Cerveau", CHRU de Tours, Université François-Rabelais, Tours, France, ² Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Hôpital Bretonneau, CHRU de Tours, Tours, France, ³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U1069) "Nutrition, Growth and Cancer", Université François-Rabelais de Tours, Tours, France, ⁴ Centre SLA, Service de Neurologie, CHRU de Tours, Tours, France, ⁵ The Neuroscience Institute Montpellier, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM UMR1051), Saint Eloi Hospital, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Manoj Kumar Jaiswal,
Columbia University Medical Center,
USA

Reviewed by:

Joe Tauskela,
National Research Council Canada,
Canada
Tatsuro Mutoh,
Fujita Health University School
of Medicine, Japan
Andrea Nistri,
Scuola Internazionale Superiore di
Studi Avanzati (SISSA), Italy

*Correspondence:

Hélène Blasco
helene.blasco@univ-tours.fr

Received: 16 February 2016

Accepted: 25 April 2016

Published: 09 May 2016

Citation:

Madji Hounoum B, Vourc'h P, Felix R, Corcia P, Patin F, Guéguinou M, Potier-Cartereau M, Vandier C, Raoul C, Andres CR, Mavel S and Blasco H (2016) NSC-34 Motor Neuron-Like Cells Are Unsuitable as Experimental Model for Glutamate-Mediated Excitotoxicity. *Front. Cell. Neurosci.* 10:118. doi: 10.3389/fncel.2016.00118

Glutamate-induced excitotoxicity is a major contributor to motor neuron degeneration in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The spinal cord × Neuroblastoma hybrid cell line (NSC-34) is often used as a *bona fide* cellular model to investigate the physiopathological mechanisms of ALS. However, the physiological response of NSC-34 to glutamate remains insufficiently described. In this study, we evaluated the relevance of differentiated NSC-34 (NSC-34_D) as an *in vitro* model for glutamate excitotoxicity studies. NSC-34_D showed morphological and physiological properties of motor neuron-like cells and expressed glutamate receptor subunits GluA1–4, GluN1 and GluN2A/D. Despite these diverse characteristics, no specific effect of glutamate was observed on cultured NSC-34_D survival and morphology, in contrast to what has been described in primary culture of motor neurons (MN). Moreover, a small non sustained increase in the concentration of intracellular calcium was observed in NSC-34_D after exposure to glutamate compared to primary MN. Our findings, together with the inability to obtain cultures containing only differentiated cells, suggest that the motor neuron-like NSC-34 cell line is not a suitable *in vitro* model to study glutamate-induced excitotoxicity. We suggest that the use of primary cultures of MN is more suitable than NSC-34 cell line to explore the pathogenesis of glutamate-mediated excitotoxicity at the cellular level in ALS and other motor neuron diseases.

Keywords: ALS, Ca²⁺ influx, differentiation, NSC34, glutamate receptors, NMDA

Abbreviations: α-MEM, Alpha-modified Eagle's medium; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid; Ca²⁺, Calcium ion; DAPI, 4,6-diamino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; KA, kainite; MEM-NEAA, modified Eagle's medium non-essential amino acids; NSC, Neuroblastoma × Spinal Cord; NSC-34_D, differentiated NSC-34; MN, motor neurons; NTFs, neurotrophic factors; PBS, phosphate buffered saline; P/S, penicillin/streptomycin; RA, *all-trans* retinoic acid.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is one of the most common neurodegenerative diseases in adults, caused by the selective death of motor neurons (MN). Studies of the physiology of ALS support the involvement of genetic factors and micro-environmental factors with mechanisms such as glutamate excitotoxicity and oxidative stress, but these mechanisms await elucidation. Glutamate excitotoxicity is a major contributor to dysfunction and death of MN in the pathogenesis of ALS (Heath and Shaw, 2002; Van Den Bosch et al., 2006; Spalloni et al., 2013; Blasco et al., 2014). Among the many drugs targeting this pathogenic mechanism tested in clinical trials (Blasco et al., 2014), one treatment (riluzole) is used in common practice to slow the progression of the disease by blocking glutamatergic neurotransmission in the central nervous system. However, the mechanisms of toxicity caused by glutamate and their links with other physiopathological pathways remain poorly understood.

Overstimulation of glutamate receptors facilitates the entry and consequently the excess of calcium (Ca^{2+}) in cell compartments, leading to a cascade of destructive events by calcium-dependent enzymatic pathways and mitochondrial dysfunction with the generation of free radicals (Van Den Bosch et al., 2000; Blasco et al., 2014). Glutamate receptors are divided into two families: the ligand-gated cation channels (ionotropic; Lodge, 2009) and G protein-coupled receptors (metabotropic; Niswender and Conn, 2010). Ionotropic receptors are further divided into three categories according to their non-natural preferred agonists, i.e., AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid), NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) and kainate (AK; Lodge, 2009). AMPA and NMDA receptors are largely responsible for calcium flux across neuronal cell membranes (Hollmann et al., 1991; Van Den Bosch et al., 2000).

Primary cultures of MN (Krugman et al., 1999) and cultures of different cell lines are used to study the molecular mechanisms of neurotoxicity induced by glutamate in MN. The most common cell line used in ALS research is the spinal cord neuron $\times$ neuroblastoma hybrid cell line (NSC-34), which was originally described as having several morphological and physiological properties of MN (Eggett et al., 2000; Rembach et al., 2004; Benkler et al., 2013; Maier et al., 2013; Valbuena et al., 2015). We required validation of this model to study the metabolic effects of glutamate excitotoxicity in a neurological disease. NSC-34 is an hybrid cell line produced by the fusion of MN from the spinal cords of mouse embryos with mouse neuroblastoma cells N18TG2 (Cashman et al., 1992). These cells exhibit properties of MN when subjected to protocols of differentiation and maturation. Although NSC-34 cells share many features with MN such as long processes and S-laminin with leucine-arginine-glutamate (LRE) adhesion motif (a specific basal lamina glycoprotein concentrated at the neuromuscular synapse; Hunter et al., 1991), the formation of contacts with myotubes in culture (Cashman et al., 1992) and increased survival in the presence of neurotrophic factors (NTFs; Turner et al., 2004), their

functional properties when stimulated by glutamate have rarely been studied (Durham et al., 1993; Eggett et al., 2000).

The selective motor neuronal cell death in ALS is highly dependent on intracellular Ca^{2+} and is insensitive to inhibitors of voltage-operated Ca^{2+} and Na^{+} channels (MacDermott et al., 1986; Van Den Bosch et al., 2000, 2006; Heath and Shaw, 2002). Thus, the permeability of glutamate receptors to Ca^{2+} seems crucial to validate the NSC-34 model as appropriate for the exploration of glutamate excitotoxicity. In order to evaluate whether NSC34 represents a relevant model for studies on glutamate-induced neurotoxicity, we differentiated the NSC-34 cells by serum depletion in the presence or absence of all-trans retinoic acid (RA; Clagett-Dame et al., 2006; Maden, 2007), and analyzed the expression and functionality of glutamate receptors. We compared for the first time the usefulness of NSC-34 cells (using various differentiation protocols) and primary motor neuron cultures (used as the reference) as models for glutamate induced-excitotoxicity in the same study.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco), DMEM-Ham's F12 and Alpha-modified Eagle's medium (α -MEM), modified Eagle's medium non-essential amino acid (MEM-NEAA), penicillin/streptomycin (P/S), Trizol, Superscript II reverse transcriptase kit and Fura-2 acetoxymethyl ester were all obtained from Invitrogen (Life Technologies, Saint Aubin, France), L-glutamic acid and *all-trans* RA from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and fetal calf serum (FCS) from Eurobio (Courtaboeuf, France).

Culture of NSC-34

The NSC-34 was obtained from Cedarlane Laboratories (*via* Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Cells were cultured as described previously (Madji Hounoum et al., 2015). Cultures were used 5–15 passages. Each type of experiment was performed on the same passage. No sub-culture passage was performed for differentiated NSC-34.

For differentiation, NSC-34 cells were grown to confluence and the proliferation medium (DMEM plus 10% FCS) was exchanged for fresh differentiation medium every 3 days. Cells were allowed to differentiate for up to 4 weeks. Three differentiation media were investigated: (1) 1:1 DMEM/Ham's F12 plus 1% FCS, 1% P/S and 1% MEM-NEAA, the most commonly used medium for NSC-34 differentiation (Krugman et al., 1999; Eggett et al., 2000; Rembach et al., 2004; Benkler et al., 2013); (2) α -MEM [the medium used for another neuron-like cell line (P19; MacPherson et al., 1997)] plus 1% FCS, 1% P/S and 1% MEM-NEAA; and (3) DMEM (the classic medium for NSC-34 culture) plus 1% FCS and 1% P/S.

Two conditions were investigated for all differentiation media, i.e., with or without RA [$1 \mu\text{M}$, as used previously (Johann et al., 2011; Maier et al., 2013)]. NSC-34 cells, maintained on

proliferation medium, served as the undifferentiated control group. The average length of neurites in the differentiation media was quantified using Sholl's method for quantification of dendritic branching in hippocampal neurons (Sholl, 1956). Briefly, concentric circles at 25 μm intervals between adjacent circles were drawn on Powerpoint, at the same magnification of cell pictures. The center of the circle centered on the soma of the cell, the lengths of the processes were measured from the soma by multiplying the number of intersections (neurite-circle) every 25 μm . Cells with neurites longer than 50 μm were considered as differentiated. Neurite length was analyzed by imaging a minimum of 10 cells per experiment, four experiments for each condition.

Primary Motor Neuron Cultures

Studies were conducted using primary cultures of motor neuron from the spinal cords of C57BL/6 mice at embryonic day 12.5 (Centre d'Élevage Roger Janvier, France). Cultures were grown as described previously (Camu et al., 2014; Dangoumau et al., 2015). MN were plated on poly-ornithine/laminin-treated wells in the presence of NTFs (0.1 ng/mL GDNF, 1 ng/mL BDNF, and 10 ng/mL CNTF in supplemented neurobasal medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)). Supplemented neurobasal medium contained 2% horse serum, L-glutamate (25 mM), β -mercaptoethanol (25 mM), L-glutamine (0.5 mM), and 2% B-27 supplement (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, France). The use of appropriate culture medium combined with multiple purification steps using density gradient (BSA cushion and Optiprep density centrifugation) and magnetic cell sorting with an indirect microbeads technique promoted the enrichment of MN as well as the elimination of astrocytes and microglia cells from the culture (Arce et al., 1999).

Immunocytochemistry

To assess morphological characterization of primary motor neuron culture derived from embryonic spinal cord, expression of β III-tubulin and p75 neurotrophic receptor were analyzed (Rembach et al., 2004). Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and then incubated in a blocking and permeabilizing solution (10% donkey serum and 2% Triton X-100) for 1 h. The cells were stained with rabbit anti- β III-tubulin (1:200, Covance, Princeton, NJ, USA) and mouse anti-nerve growth factor receptor (p75^{NTR} 1:60, Chemicon MAB357) for 1 h. After being washed with phosphate buffered saline (PBS), the cells were incubated with secondary antibodies for 1 h. The secondary antibodies used were donkey anti-rabbit Alexa-488 (1:300, Life Technologies, Saint Aubin, France) and donkey anti-mouse Alexa-594 (1:300, Life Technologies, Saint Aubin, France). Nuclear DNA was observed by 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) contained in ProLong[®] (Life Technologies, Saint Aubin, France). Cells were photographed using a confocal microscope (Olympus FV500).

Cell Viability Assay

To assess the effect of glutamate-induced excitotoxicity in NSC-34_p, cells were exposed to glutamate at different concentrations (100 μM , 500 μM , 1 mM and 10 mM) for

48 h (Eggett et al., 2000; Rembach et al., 2004; Maier et al., 2013) before determination of cell viability by trypan blue assay. A control condition with no excitotoxic agent (PBS) was included for comparison. Four replicates per condition were obtained. The cells were harvested with trypsin and re-suspended in culture medium before addition of trypan blue (0.4% w/v; Molecular Probes-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Living and dead cells were counted accurately with a Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Motor neuron survival was assessed by direct counting after exposing cells to 100 μM glutamate for 48 h.

RNA Extraction, Reverse Transcription PCR (RT-PCR) and Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Following a wash in PBS, RNA samples were extracted from NSC-34 cells and primary MN using Trizol and treated with DNase I (Proteogene[®]). Reverse transcription was performed on 2.5 μg of treated RNA using the superscript II reverse transcriptase kit according to the manufacturer's instructions. cDNA samples were analyzed using primers for subunits of AMPA receptors (GluA1–4), NMDA receptors (GluN1, GluN2A-D, GluN3A), and standard markers for MN such as choline acetyltransferase (ChAT), p75 (Cashman et al., 1992; Matusica et al., 2008; Maier et al., 2013; see Table A1 in Supplementary Material). Actin was used as internal standard. cDNA samples were amplified using GoTaq[®] Flexi DNA polymerase (Promega) in 25 μL reaction mixture containing 125 ng cDNA following the manufacturer's protocol. Amplification consisted of 34 cycles at 95°C for 1 min, 59°C for 1 min and 72°C for 1.5 min. Aliquots of 10 μL of these products underwent electrophoresis on 1.5% agarose gel before capture with a ChemiDoc XRS camera and quantification by Quantity One Software (BioRad). Mouse brain extract was used as positive control for amplifications.

The gene expression of glutamate receptor subunits, ChAT and p75^{NTR}, was measured by semi quantitative real-time PCR (RT-qPCR) using the Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] QPCR MM kit (AgilentTM) and the same primers as for conventional RT-PCR (see Table A1 in Supplementary Material). The reaction was performed in a LightCycler 480 (Roche Diagnostic, Meylan, France) at T_m 60–62°C. The efficiency of amplification was calculated on cDNA at concentrations ranging from 3.75 to 60 ng/mL. To ensure the absence of genomic DNA contamination, a control sample of non-reverse-transcribed RNA was run for each set of RNA extractions. The expression's stability of reference genes was determined following MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). We showed that β -actin and GAPDH genes were stably expressed (data not shown). Relative quantification was obtained by calculating the ratio between the values obtained for each gene of interest and the reference genes (β -actin, GAPDH). Melting curves were routinely performed to determine the specificity of the qPCR reaction. The $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method was used for analysis.

Measurement of Calcium Influx

Cells were seeded on coverslips at a density of 3×10^4 cells/mL and allowed to grow for 2 days. They were loaded with a fluorescent probe (1 μ M Fura-2 AM) in culture medium for 45 min at 37°C. Cells were then washed with medium and allowed to de-esterify for at least 15 min at room temperature. The dish was then placed on the stage of a Nikon Eclipse TE2000-S inverted fluorescence microscope (Nikon, France) equipped with a 75 W Xenon Arc Lamp (Ushio, Japan), an Optoscan Monochromator (Cairn Optoscan, Kent, UK), and an ORCA-03G (CCD) camera (Hamamatsu, Japan). The coverslips were placed in a perfusion chamber containing physiological solution with 2 mM calcium (see Table A2 in Supplementary Material).

Excitation light was chopped by the monochromator at the two excitation wavelength maxima of fura-2 (340/380 nm). The excitation protocol used was a 500 ms excitation at each wavelength every 4 s. Fluorescence emission at 510 was detected by the CCD digital camera. The software (Imaging workbench 6) excited cells and allowed acquisition of images. The acute effects of glutamate at 100 μ M and 1 mM (for primary MN and NSC-34_D, respectively) on calcium entry were measured in physiological solution for 200 s. For primary motor neuron cells, we first determined the optimal time window allowing the experiment by measuring calcium entry every 2 days on independent replicates (cells that had not been exposed to fura-2 experiment before).

Statistical Analysis

Data was expressed as the mean $\pm$ SEM values. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test or one-way Anova. For multiple comparisons, Tukey's tests were used as *post hoc* tests or Kruskal-wallis test for appropriate analyses. For all analyses, *p* values < 0.05 were considered significant. The type of statistical test is specified in each figure legend.

RESULTS

Efficient Differentiation of NSC-34 Cells into Motor Neuron-Like Cells

When NSC-34 cells were cultured in the differentiation media (NSC-34_D), we distinguished two morphologically distinct populations: cells with short neurites, and cells with phenotypic characterization of MN with long processes (Figure 1A). However, this differentiation was preceded by a massive loss of cells (>50%) as described by Eggett et al. (2000), with surviving cells sprouting extensive neuron-like projections.

We next investigated whether the potent morphogen RA could enhance differentiation of NSC-34 into motor neuron-like cells. We found that addition of RA (1 μ M) in differentiation medium resulted in a significant decrease (60–70%) in proliferation at 4 days. Surviving cells showed a very low rate of proliferation compared to conditions without RA, as previously shown (Johann et al., 2011). However, we observed that a

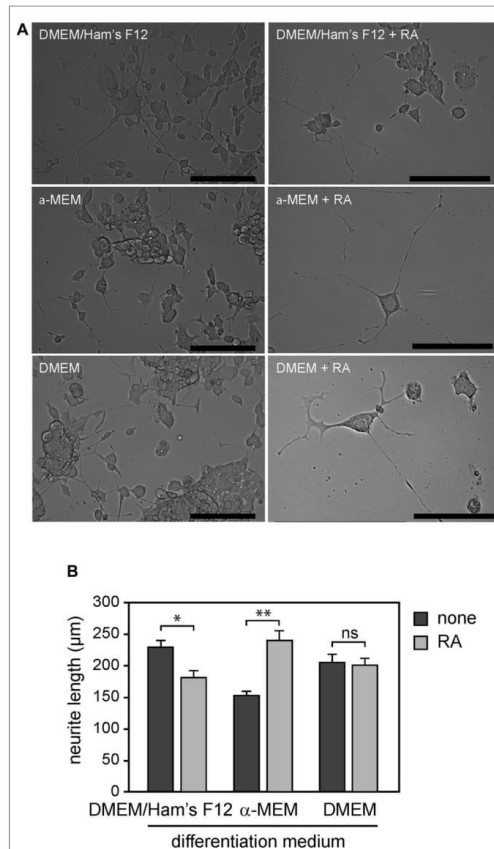


FIGURE 1 | (A) NSC-34 cells grown for 4 weeks in differentiation media with or without addition of *all-trans* retinoic acid (RA): DMEM/Ham's F12, α -MEM and DMEM. **(B)** Morphological differentiation of NSC-34 cells determined by measurement of neurite length. Statistically significant difference from differentiated cells without addition of RA was defined using Mann-Whitney test, according to the different media: DMEM/Ham's F12, α -MEM and DMEM. Values are means $\pm$ SEM (10–11 cells per experiment and four experiments for each condition), **p* < 0.001, ***p* < 0.0001, ns = not significant, Mann-Whitney test + RA vs. none.

significant proportion of surviving cells had a motor neuron-like phenotype (~80%) in the presence of RA as determined by morphological criteria (Figure 1A).

We then assessed whether differentiation conditions could potentiate the effects of RA on process outgrowth of NSC-34 cells. We determined the average neurite length of NSC-34 cells when they are maintained for 4 weeks in three differentiation media (α -MEM, DMEM/Ham's F12 and DMEM) in the presence or absence of RA. We found that the average neurite length has increased by 55% when they are cultured in α -MEM media with

RA compared to α -MEM media without RA (240.00 ± 15.89 and 154.16 ± 7.01 , respectively, $p < 0.0001$). While it has decreased by 20% when cells were cultured in DMEM/Ham's F12 media with RA compared to media without RA (181.82 ± 11.29 and 229.69 ± 12.09 , respectively, $p < 0.001$; **Figure 1B**). We did not find any significant change when NSC-34 cells were cultured in DMEM with or without RA (200.45 ± 11.95 and 206.25 ± 13.13 , respectively, $p = 0.46$). Therefore, the effects of RA on NSC-34_D cell morphology were highly dependent on the differentiation medium (**Figure 1B**).

Differentiated NSC-34 Cells Expressed Glutamate Receptor Subunits

We first set up conditions for optimal and specific amplification of glutamate receptor subunits GluA1–4, GluN1, GluN2A–D and GluN3A using total RNA obtained from mouse brain extract (see Figure A1 in Supplementary Material). We next studied the expression profiles of all glutamate receptors promoted by NSC-34 differentiation (up for 4 weeks) and in primary MN. We found that the differentiation of NSC-34 in the conditions that we had previously described induced a significant increase in mRNA expression of glutamate receptor subunits GluN1, GluN2A and GluN2D compared to undifferentiated cells (**Figures 2B–I**). The example of GluN2A protein confirms this statement: the result obtained by western blot analysis showed that the GluN2A protein level in NSC-34_D was higher than in undifferentiated NSC-34 (see Figure A2 in Supplementary Material). Levels of GluA4 subunits mRNA have increased in DMEM without RA compared to the other conditions without RA (**Figures 2C,E,G**). At more discrete levels, we also observed increases of GluA2 and GluA3 mRNA in DMEM/Ham's F12 and α -MEM but not in DMEM. We noted the expression of all glutamate subunits in primary MN, as observed in mouse brain extracts (**Figure 2A** and Figure A1, see Supplementary Material).

We found that the presence of RA promoted the expression of GluA4 mRNA in every differentiation medium (**Figures 2C–H**). However, mRNA expression of the other subunits of glutamate receptors was not modified by the presence of RA in the culture medium. The differentiation condition that promoted most of the glutamate receptors and that generated less heterogeneity bias was thus DMEM-Ham's F12 without RA. Indeed, this differentiation condition led to expression of all AMPR subunits (GluA1–4) and half of the NMDAR subunits (GluN1, GluN2A, and GluN2D), as summarized in Table A3 (see Supplementary Material). However, expression of AMPR subunits was lower compared to primary MN (**Figures 2A,C,I,J**). DMEM-Ham's F12 without RA medium is used for further explorations. Our results also showed that NSC-34_D cells expressed many motor neuron properties such as ChAT and p75^{NTR} (**Figures 2C–H**). RA-differentiated NSC-34 did not express more receptor subunits than NSC-34_D without RA (**Figures 2C–H** and Table A3 in Supplementary Material). We next semi quantified expression of glutamate receptor subunits in NSC-34_D differentiated in DMEM-Ham's F12 without RA condition compared to MN.

Expression of Receptor Subunits

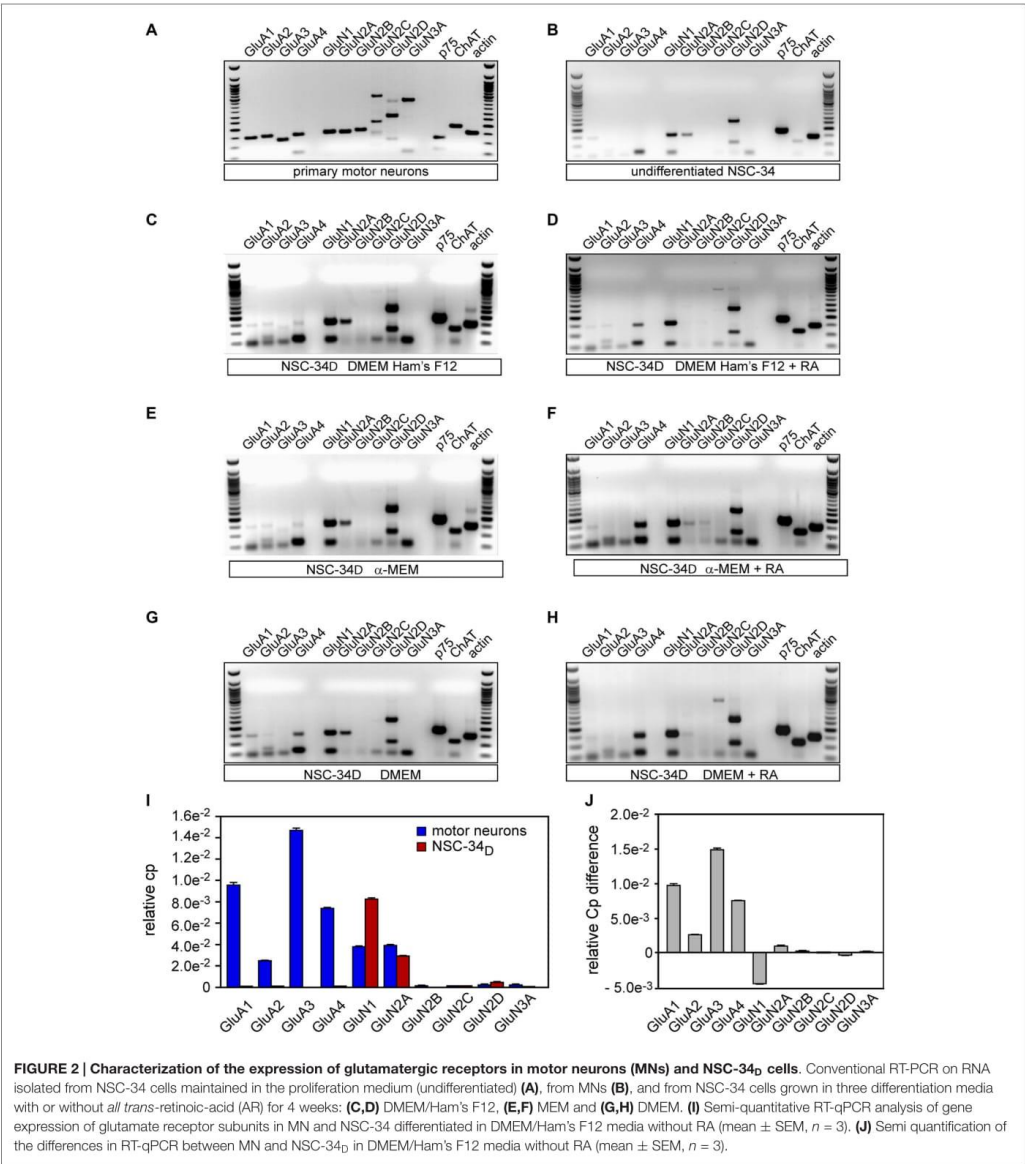
RT-qPCR analysis revealed high levels of expression of GluN1, GluN2A and GluN2D mRNA (CP values were $8.35 \times 10^{-3} \pm 4.96 \times 10^{-5}$, $3.02 \times 10^{-3} \pm 6.30 \times 10^{-8}$ and $4.95 \times 10^{-4} \pm 1.83 \times 10^{-6}$, respectively) in NSC-34 differentiated in DMEM/Ham's F12 without RA, while expression of GluA1, GluA2, GluA4, GluN2C and GluN3A mRNA ($9.85 \times 10^{-7} \pm 4.02 \times 10^{-9}$, $4.45 \times 10^{-7} \pm 5.78 \times 10^{-9}$, $7.45 \times 10^{-6} \pm 5.77 \times 10^{-9}$, $3.22 \times 10^{-6} \pm 1.80 \times 10^{-7}$ and $9.74 \times 10^{-6} \pm 2.01 \times 10^{-8}$, respectively) was low in NSC-34_D (**Figures 2I,J**), i.e., as for the results of conventional RT-PCR (**Figure 2C**). GluA3, and GluN2B mRNA levels were almost zero in NSC-34_D (**Figures 2I,J**). It is of note that only 20% of the cells did not express motor neuron-like morphology. The results showed that primary MN expressed all glutamate receptor subunits at different levels, unlike to NSC-34_D. Consistently with RT-PCR data, the transcript profile of NSC-34_D glutamate receptor subunits is different from that of MN.

Differentiated NSC-34 Cells did not Show Susceptibility to Glutamate-Induced Death

We investigated whether glutamate could trigger death of differentiated NSC-34 cells. NSC-34_D cells were exposed to increasing concentrations of glutamate ranging from 0.1 to 10 mM. We found $102.04 \pm 3.63\%$, $104.08 \pm 8.03\%$, $94.90 \pm 1.44\%$, $86.73 \pm 4.17\%$ and $64.28 \pm 2.89\%$ of relative cell viability when cells exposed to 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM and 10 mM glutamate, respectively (**Figure 3A**). We also evaluated excitotoxicity death of MN at 8 DIV (Days *In Vitro*) exposed to 0.1 mM glutamate and we found $53.99 \pm 3.04\%$ of relative cell viability (**Figure 3B**). We observed that 48 h exposure to 0–5 mM glutamate did not elicit any toxic response to NSC-34_D, and a non-specific effect of about 30% on cells survival was found when glutamate was added at 100-fold higher concentrations (10 mM; **Figure 3A**) than that necessary to induce 50% death of primary MN (0.1 mM; **Figure 3B**). The results show that NSC-34_D cells do not show the same susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity compared to MN.

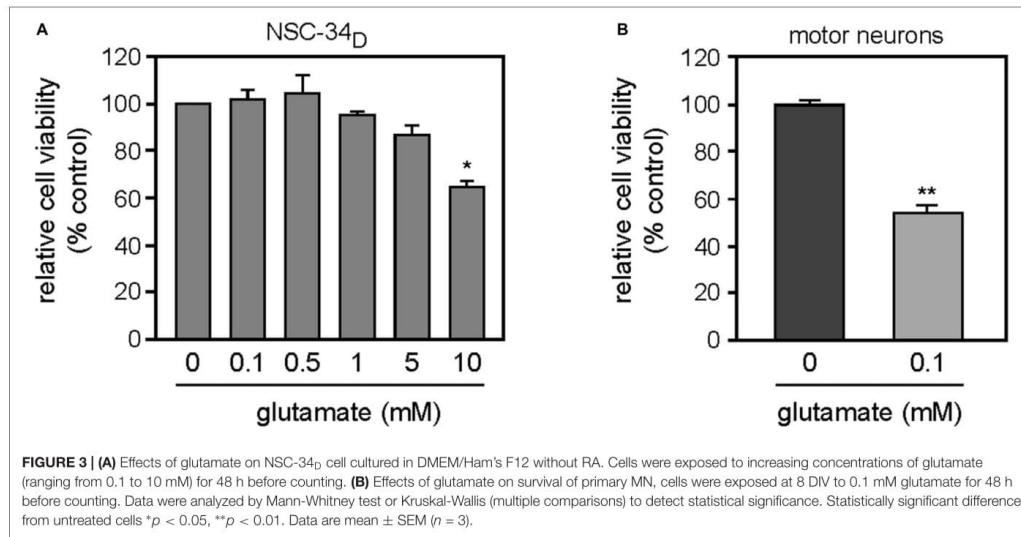
Glutamate did not Elicit Sustained Calcium Entry into NSC-34_D

Glutamate-induced excitotoxicity resulted in elevated intracellular calcium levels *via* ionotropic glutamate receptors and activation of cell death signaling pathways. To address the effects of glutamate on Ca^{2+} transients in NSC-34_D, we used ratiometric Ca^{2+} measurement with the imaging dye Fura-2AM. To establish sensitive and accurate measurement of intracellular Ca^{2+} , we used motor neuron-enriched cultures. When MN were purified from E12.5 embryos as described above, a culture containing about 70% MN was identified using the p75^{NTR} generic marker (Figure A3-A see Supplementary Material). The phase-bright soma with long motor neuron processes made them clearly distinguishable from other cells (Figure A3 see Supplementary Material). Their maturity was tested every 2 days by measuring $[\text{Ca}^{2+}]$ influx to determine the optimal time window allowing the experiment. We found



that younger MN did not efficiently load Fura-2AM before 5 DIV (data not shown). We observed that MN showed robust fluorescence signal from 5 DIV and glutamate induced a robust Ca^{2+} influx in MN at 12 DIV (Figure A3-B, see Supplementary Material). The maximum fura-2 fluorescence intensity relative

to baseline was significantly higher ($p < 0.005$) in MN at 12 DIV (0.0293 ± 0.0026) and 13 DIV (0.0320 ± 0.0004) compared to those at 5 DIV (0.0019 ± 0.0002). There was no significant difference between MN at 12 DIV and 13 DIV. Subsequent experiments were therefore performed using 13-day-old cultures



(Figure A3-B, see Supplementary Material). At 13 DIV, the MN are fully mature with electrical activity (Jackson et al., 1982; Nicola et al., 1992; Chang and Martin, 2011).

We then investigated the functionality of glutamate receptors expressed in NSC-34_D growing in DMEM/Ham's F12 medium without RA for 4 weeks through Ca^{2+} permeability. The baseline recordings (first 0.5 min in all trace graphs) demonstrate stable cytosolic calcium levels in both MN and NSC-34_D cells before treatment with glutamate. The addition of glutamate immediately increased the fluorescence intensity of the calcium-sensitive dye Fura-2, indicating increased cytosolic Ca^{2+} flux in MN (Figure 4A). Whereas MN presented a sustained calcium entry following acute stimulation by glutamate (0.1 mM), glutamate stimulation in NSC34_D resulted in a small transient calcium entry (Figure 4B). However, in the presence of glutamate, Ca^{2+} entry into MN was significantly higher than in NSC-34_D cells, and the signal was as consistent as that obtained by fura-2 fluorescence intensity relative to baseline (0.032 ± 0.0004 vs. 0.009 ± 0.0012 ; * $p < 0.001$; Figure 4C). Taken together, these results showed that an increased extracellular glutamate concentration (1 mM) did not elicit the same calcium response in NSC-34_D cells (Figure 4C) as in MN.

DISCUSSION

Although glutamate-mediated excitotoxicity is known to be involved in ALS pathogenesis (Beal, 1992; Mattson et al., 1992), the precise mechanisms leading to electrical, metabolic or signaling dysfunction in the motor neuron diseases remain to be determined. Excitotoxicity mechanisms have been described following *in vitro* studies using either primary motor neuron

cultures (Kruman et al., 1999; Van Den Bosch et al., 2000; Dolga et al., 2011; Joshi et al., 2011) or cell lines (Rembach et al., 2004; Benkler et al., 2013). The advantage of primary cultures is the development of similar *in situ* counterpart morphology and physiology over time. The neurotoxicity of a variety of toxins *in situ* has also been reported (Durham et al., 1993). However, due to the low yields of motor neuron cultures, the NSC-34 cell line has been widely used and tacitly considered to be the most stable motor neuron cell line to model ALS pathophysiology (Veyrat-Durebex et al., 2014). Indeed, many studies have shown that the differentiation process can induce NSC-34 cells to express certain motor neuron properties and have shown some toxic effects following exposure to glutamate (Eggett et al., 2000; Benkler et al., 2013; Maier et al., 2013). The differentiation and the maturation of NSC-34 cells are generally characterized by extension of neurites and expression of certain motor neuron-specific proteins. In this study, we investigated the reliability of these cells as an *in vitro* model to study glutamate-mediated neurotoxicity, using an approach from receptor expression to the Ca^{2+} influx.

Differentiation of NSC-34 Cells into Motor Neuron-Like Cells

Differentiation of cell lines frequently requires modification of the culture medium through serum depletion and/or use of chemical reagents or metabolites such as RA to obtain more neuron-like properties, including neurite outgrowth and morphological changes (MacPherson et al., 1997; Eggett et al., 2000; Maier et al., 2013). As reported in the literature, we found that the differentiation process induced NSC-34 cells to express phenotypic MN with long processes (Figure 1A and

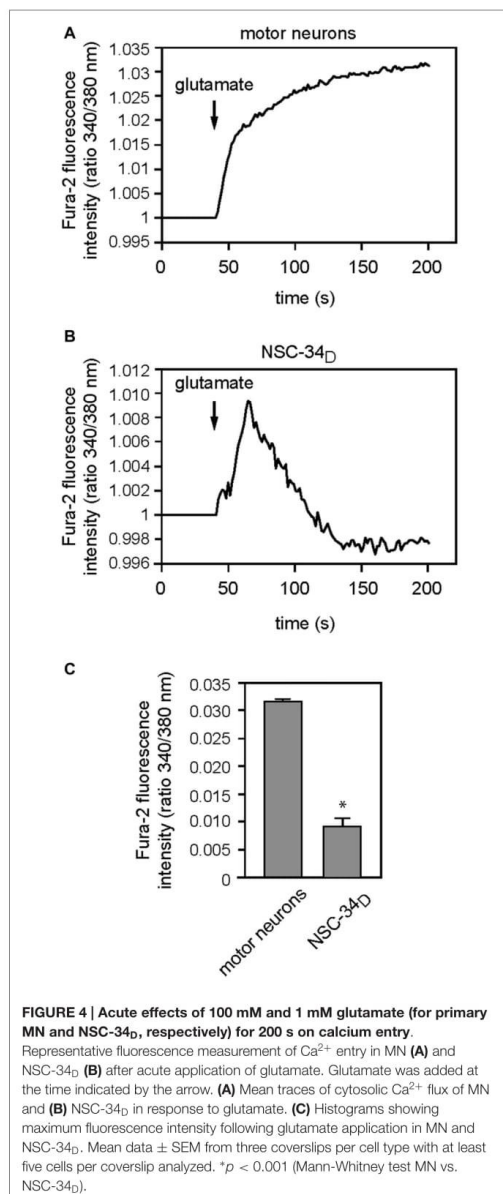


Figure A3-A, see Supplementary Material). We found that the RA effects on NSC-34_D cell morphology were highly dependent on the differentiation medium (Figure 1B). Importantly, we did not observe any effect on undifferentiated NSC-34 cells as

previously demonstrated (Cashman et al., 1992; Maier et al., 2013). We also evaluated the RA effects on the expression of genes encoding certain specific motor neuron proteins and glutamate receptor subunits, and we found that RA-differentiated NSC-34 did not express more receptor subunits than NSC-34_D without RA (Figures 2C–H and Table A3, see Supplementary Material), thus suggesting that using RA is not required in NSC-34 differentiation processes in the context of excitotoxicity studies. This conclusion is supported by the results obtained by Cheung et al. (2009) who showed that RA differentiation conferred higher tolerance of SH-SY5Y cells to neurotoxin (6-hydroxydopamine) compared to undifferentiated SH-SY5Y cells, and they suggested that RA-differentiated SH-SY5Y was not appropriate for neurotoxicity or neuroprotection studies.

The Receptor Subunits Expressed by NSC-34_D

NMDARs and AMPARs have critical roles in excitatory synaptic transmission, plasticity and excitotoxicity in the CNS. We found that NSC-34_D expressed more receptor subunits in DMEM/Ham's F12 medium without RA than in other media (Figures 2C–H and Table A3, see Supplementary Material). NSC-34_D expressed all AMPAR (GluA1–4) and some NMDAR (GluN1, GluN2A/B) subunits, as reported in the literature (Eggett et al., 2000; Rembach et al., 2004). We therefore chose DMEM/Ham's F12 medium without RA for further experiments. Then we compared expression of glutamate receptor subunits on primary MN and NSC-34_D using RT-qPCR (Figures 2I,J). The results showed that primary MN expressed all glutamate receptor subunits at different levels, in contrast to NSC-34_D which expressed some of them at times and in very small quantities. This clearly showed that the transcript profile of NSC-34_D glutamate receptor subunits was different from that of MN and very consistent with RT-PCR and RT-qPCR data, indicating that NSC-34_D could not be used as a model of primary MN for glutamate-mediated excitotoxicity.

No Glutamate-Induced Toxicity in NSC-34_D

Glutamate concentrations in the extracellular fluid are normally around 0.8–2.9 μM (Lerma et al., 1986). A rise in the extracellular glutamate concentration to 2–5 μM is considered sufficient to cause degeneration of neurons through excessive stimulation of glutamate receptors (Rosenberg et al., 1992). When investigating glutamate-induced excitotoxicity at the cellular level, the glutamate concentrations used to obtain effects varied according to the *in vitro* models investigated and exposure times. For primary cultures, the range of glutamate concentrations used to act on ionotropic glutamate receptors (Van Den Bosch et al., 2000) was between 10 μM–1 mM, and cultures were exposed for less than 24 h (Mattson et al., 1995; Kruman et al., 1999; Sen et al., 2008). As in our study (Figure 3B), it had previously been demonstrated that exposure of primary embryonic MN to glutamate (0.1 mM) for 24 or 48 h led to approximately 50% cell death (Metzger et al., 1998; Urushitani et al., 1998), whereas for

cell lines, this glutamate concentration range was increased to 10 mM with longer exposure times (24–72 h; Eggett et al., 2000; Rembach et al., 2004; Benkler et al., 2013; Maier et al., 2013). In our study, we investigated the toxicity of glutamate on NSC-34_D and motor neuron survival. The results showed approximately 50% cell death at 100 μ M glutamate for primary MN (Figure 3B), as described in the literature (Metzger et al., 1998; Urushitani et al., 1998). For NSC-34_D cells, we found a significant loss of viable cells at a concentration of only 10 mM glutamate (Figure 3A). This result is consistent with previous excitotoxicity studies on NSC-34_D where treatment with glutamate (up to 1 mM) failed to induce vacuolation of NSC-34_D, in contrast to the effects on primary MN (Durham et al., 1993).

Among the different neuroprotective mechanisms in neurons, neurotrophin factors may play a key role. Literature reported that NTFs and glutamate interact to regulate developmental and adult neuroplasticity (Mattson et al., 1995; Mattson, 2008). Consequently, neurotrophin factors attenuated elevation of intracellular calcium concentrations induced by glutamate (Mattson et al., 1995), thus promoting the survival of neurons (McKay et al., 1996; Giménez y Ribotta et al., 1997; Vincent et al., 2004; Mattson, 2008) via the MAPK and PI-3K/Akt pathways (Vincent et al., 2004).

To validate the glutamate-sensitive motor neuron NSC-34 cell line, many studies have used modified growth conditions through serum depletion to induce differentiated NSC-34 cells and to investigate the cytotoxicity of glutamate or other excitotoxins (AMPA, 5-fluorowillardiine, H₂O₂, TNF- α , etc.) in the presence or absence of receptor antagonists by using viability tests (Rembach et al., 2004; Hemendinger et al., 2012; Benkler et al., 2013; Maier et al., 2013). In some cases, they evaluated the expression of certain genes which encode cholinergic phenotype-related proteins (ChAT, acetylcholine esterase and vesicular acetylcholine transferase; Maier et al., 2013). It should be emphasized that most studies that used cell line models to investigate glutamate neurotoxicity focused predominantly on its toxic action and not on the functional properties of glutamatergic receptors such as Ca²⁺ permeability (Rembach et al., 2004; Hemendinger et al., 2012; Benkler et al., 2013; Maier et al., 2013).

No Sustained Calcium Entry in NSC-34_D

The stoichiometry of the receptor complexes in mammalian cells seems to be largely controlled by the level of the individual subunits expression that determine their functional properties including Ca²⁺ permeability via glutamate receptors (Hollmann et al., 1991; Monyer et al., 1992; Das et al., 1998; Dingledine et al., 1999; Sobolevsky et al., 2009). According to the literature evidence, the expression of GluA1–4, GluN1 and GluN2A or GluN2B subunits induces functional receptors. Surprisingly, in our study, despite the expression of GluA, GluN1 and GluN2A/D subunits in NSC-34_D (Figure 2I), we did not observe a significant sustained calcium entry as demonstrated in MN (Figure 4C). In this study, we globally evaluated the intracellular calcium concentrations (including the interplay between extracellular and intracellular origin) provoked by glutamate, through glutamate receptors by using

the Fura-2-AM. However, we cannot exclude the possibility that part of the increase of cytosolic calcium could come from internal stores. Using SH-SY5Y cells line and measurement of calcium release from different compartments, Jaiswal et al. (2009) provided evidences of the existence of two separate intracellular Ca²⁺ stores (endoplasmic reticulum (ER) and mitochondrial intracellular pools) which may participate in the generation of intracellular Ca²⁺ signals. Calcium permeability via glutamate receptors has also been shown to initiate a self-perpetuating process of intracellular Ca²⁺ dysregulation with consecutive ER Ca²⁺ release and mitochondrial Ca²⁺ overload (Jahn et al., 2006; Grosskreutz et al., 2007, 2010). The ER and mitochondria form a highly dynamic interconnected network that is involved in the generation of Ca²⁺ signals (Tadic et al., 2014). A recent article reported a Ca²⁺ influx in NSC-34_D cells compared to a “negative control” undifferentiated NSC-34 (Liu et al., 2015), but authors did not compare calcium influx of these NSC-34_D to that of MN (as “positive control”) which are the parent motor neuron for NSC-34, as performed here in our study. We postulate that this shift of Ca²⁺ entry in NSC-34_D could be due to the fact that some glutamate receptor subunits were not expressed or very weakly expressed, in contrast to MN which showed a sustained calcium entry following glutamate application.

Limitations in the Use of the NSC-34 Cell Line

As mentioned above, Eggett et al. (2000) evaluated the use of NSC-34 cells as a glutamate-sensitive motor neuron model. Using immunocytochemistry, they demonstrated the presence of glutamate receptor proteins GluN1, GluN2A/B, GluA1–4, GluK2/3 and GluK5. Exposure to glutamate (1 mM) for 24 h induced significant cell death (~30%), and changes in calcium cytosolic levels were observed. As in many other studies (Eggett et al., 2000; Rembach et al., 2004; Benkler et al., 2013; Maier et al., 2013; Liu et al., 2015) authors suggested that, because of their motor neuron origin, the NSC-34 cell line could be used to investigate excitotoxicity mechanisms. However, as reported by Durham et al. (1993), in our study we found limitations in the use of the NSC-34 cell line for neurotoxicity testing. Durham et al. (1993) have evaluated the value of these cells by following exposure of cultures to chemicals known to be neurotoxic for MN. Authors showed that NSC-34 responded to agents that affect voltage-gated ion channels, cytoskeleton organization and axonal transport. However, no electrophysiological evidence was shown, and exposure to glutamate (1 mM) had no effect on cell morphology or potential production. They concluded that the NSC-34 cell line was not a good model to investigate agents that affect synaptic transmission (Durham et al., 1993). Hemendinger et al. (2012) have demonstrated that riluzole in the neurorescue paradigm was unable to reduce cell death induced by neurotoxins that increased intracellular calcium levels independently of ER stress in NSC-34_D cells, but they did not provide information on the molecular basis. This finding may potentially be explained by the fact that NSC-34 is not a suitable *in vitro* model to investigate excitotoxicity. All these results together suggest that NSC-34 cells may not be appropriate as an *in vitro* model to study glutamatergic toxicity in motor neuron degeneration. Motor

neuronal properties evaluated on differentiated NSC-34 cells and literature findings were summarized in the Appendix (Table A4, see Supplementary Material).

Importantly, the phenotypes of NSC-34 may vary, according to the repeated culture passage or to the origin of the cell line [provided by Dr Neil Cashman (Durham et al., 1993; Maier et al., 2013; Liu et al., 2015) or purchased (Hemendinger et al., 2012)]. So, results may not be reproducible over time, from one laboratory to another, and even within the same laboratory. We cannot exclude the possibility that this contradictory findings may be explained by the differences between basal features of NSC-34 cells, rarely detailed in the studies (Eggett et al., 2000; Rembach et al., 2004; Benkler et al., 2013). There may be various differentiation processes with various media and chemicals known to induce various NSC-34-expressed motor neuron properties, and the culture conditions were not systematically explored to seek optimal toxicity to glutamate. However, in agreement with the literature, in our study we did not find any condition which promoted expression of all glutamatergic properties. The aim of this work was not to focus on optimization of differentiation processes which should involve several parameters (medium composition, differentiation time, time of changing medium, cell density, cell passage, etc.) but rather to evaluate the versatility of the NSC-34 cell line to model motor neuron susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. Reliable validation is a crucial step before using a cell line as an *in vitro* model in glutamate-induced excitotoxicity studies. Such validation requires the evaluation of the biochemical and electrophysiological processes of MN that are targets of glutamate such as glutamate receptors and Ca^{2+} influx with a “positive control”.

We could not exclude the possibility that the maturity was insufficient to induce calcium influx in NSC-34_D cells under the present experimental conditions. Even if organotypic spinal cord cultures remain the models that closely reflect *in situ* reality, we suggest that the use of primary motor neuron culture is more suitable than NSC-34 cell line to explore the pathogenesis of glutamate-mediated excitotoxicity at the cellular level, in ALS

and other motor neuron diseases. However, different authors have shown that NSC-34 cells remain a suitable model of vulnerability to neurotoxins (Maier et al., 2013) and to investigate the effects of cerebrolisin (Keilhoff et al., 2014). NSC-34 cells line is a viable *in vitro* cell model for screening therapeutic candidates against nerve agents (Kanjilal et al., 2014), investigating the expression of transcription factors (Prell et al., 2012) and could thus be a relevant model for some specific experiments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BMH, RF, FP and MG conducted all experiments, analyzed the data and BMH wrote the manuscript. HB, SM, PV, CR and CRA designed the project, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors listed, have made substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This work was supported by the “Institut National de la Santé et de la Recherche” INSERM, the University François-Rabelais de Tours, and ARSLA (“Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres maladies du motoneurone”). BMH was supported by “La Région Centre” with a PhD graduate grant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the PPF ASB platform of the Université François-Rabelais de Tours, France, and Catherine Cherpi-Antar for technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2016.00118/abstract>

REFERENCES

- Arce, V., Garcés, A., de Bovis, B., Filippi, P., Henderson, C., Pettmann, B., et al. (1999). Cardiotrophin-1 requires LIFR β to promote survival of mouse motoneurons purified by a novel technique. *J. Neurosci. Res.* 55, 119–126. doi: 10.1002/(sici)1097-4547(19990101)55:1<119::aid-jnr13>3.0.co;2-6
- Beal, M. F. (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* 31, 119–130. doi: 10.1002/ana.410310202
- Benkler, C., Ben-Zur, T., Barhum, Y., and Offen, D. (2013). Altered astrocytic response to activation in SOD1G93A mice and its implications on amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Glia* 61, 312–326. doi: 10.1002/glia.22428
- Blasco, H., Mavel, S., Corcia, P., and Gordon, P. H. (2014). The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr. Med. Chem.* 21, 3551–3575. doi: 10.2174/0929867321666140916120118
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Camu, W., Tremblier, B., Plassot, C., Alphandery, S., Salsac, C., Pageot, N., et al. (2014). Vitamin D confers protection to motoneurons and is a prognostic factor of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* 35, 1198–1205. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.005
- Cashman, N. R., Durham, H. D., Blusztajn, J. K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I. T., et al. (1992). Neuroblastoma $\times$ spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev. Dyn.* 194, 209–221.
- Chang, Q., and Martin, L. J. (2011). Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 31, 2815–2827. doi: 10.1523/jneurosci.2475-10.2011
- Cheung, Y.-T., Lau, W. K.-W., Yu, M.-S., Lai, C. S.-W., Yeung, S.-C., So, K.-F., et al. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 30, 127–135. doi: 10.1016/j.neuro.2008.11.001
- Clagett-Dame, M., McNeill, E. M., and Muley, P. D. (2006). Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *J. Neurobiol.* 66, 739–756. doi: 10.1002/neu.20241
- Dangoumau, A., Deschamps, R., Veyrat-Durebex, C., Pettmann, B., Corcia, P., Andres, C. R., et al. (2015). A novel p.E121G SOD1 mutation in slowly progressive form of amyotrophic lateral sclerosis induces cytoplasmic

- aggregates in cultured motor neurons and reduces cell viability. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 16, 131–134. doi: 10.3109/21678421.2014.965179
- Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., et al. (1998). Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393, 377–381. doi: 10.1016/s0168-0102(98)82331-6
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7–62.
- Dolga, A. M., Terpolilli, N., Kepura, F., Nijholt, I. M., Knaus, H. G., D'Orsi, B., et al. (2011). KCa2 channels activation prevents Ca²⁺ deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia. *Cell Death Dis.* 2:e147. doi: 10.1038/cddis.2011.30
- Durham, H. D., Dahrouge, S., and Cashman, N. R. (1993). Evaluation of the spinal cord neuron × neuroblastoma hybrid cell line NSC-34 as a model for neurotoxicity testing. *Neurotoxicology* 14, 387–395.
- Eggett, C. J., Crosier, S., Manning, P., Cookson, M. R., Menzies, F. M., McNeil, C. J., et al. (2000). Development and characterisation of a glutamate-sensitive motor neurone cell line. *J. Neurochem.* 74, 1895–1902. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741895.x
- Giménez y Ribotta, M., Revah, F., Pradier, L., Loquet, I., Mallet, J., and Privat, A. (1997). Prevention of motoneuron death by adenovirus-mediated neurotrophic factors. *J. Neurosci. Res.* 48, 281–285. doi: 10.1002/(sici)1097-4547(19970501)48:3<281::aid-jnrl1>3.0.co;2-4
- Grosskreutz, J., Haastert, K., Dewil, M., Van Damme, P., Callewaert, G., Robberecht, W., et al. (2007). Role of mitochondria in kainate-induced fast Ca²⁺ transients in cultured spinal motor neurons. *Cell Calcium* 42, 59–69. doi: 10.1016/j.cecc.2006.11.010
- Grosskreutz, J., Van Den Bosch, L., and Keller, B. U. (2010). Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium* 47, 165–174. doi: 10.1016/j.cecc.2009.12.002
- Heath, P. R., and Shaw, P. J. (2002). Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26, 438–458. doi: 10.1002/mus.10186
- Hemendinger, R. A., Armstrong Iii, E. J., Radio, N., and Brooks, B. R. (2012). Neurotoxic injury pathways in differentiated mouse motor neuron-neuroblastoma hybrid (NSC-34D) cells *in vitro*—Limited effect of riluzole on thapsigargin, but not staurosporine, hydrogen peroxide and homocysteine neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharm.* 258, 208–215. doi: 10.1016/j.taap.2011.10.022
- Hollmann, M., Hartley, M., and Heinemann, S. (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252, 851–853. doi: 10.1126/science.1709304
- Hunter, D. D., Cashman, N., Morris-Valero, R., Bullock, J. W., Adams, S. P., and Sanes, J. R. (1991). An LRE (leucine-arginine-glutamate)-dependent mechanism for adhesion of neurons to S-laminin. *J. Neurosci.* 11, 3960–3971.
- Jackson, M. B., Lecar, H., Brenneman, D. E., Fitzgerald, S., and Nelson, P. G. (1982). Electrical development in spinal cord cell culture. *J. Neurosci.* 2, 1052–1061.
- Jahn, K., Grosskreutz, J., Haastert, K., Ziegler, E., Schlesinger, F., Grothe, C., et al. (2006). Temporospatial coupling of networked synaptic activation of AMPA-type glutamate receptor channels and calcium transients in cultured motoneurons. *Neuroscience* 142, 1019–1029. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.07.034
- Jaiswal, M. K., Zech, W.-D., Goos, M., Leutbecher, C., Ferri, A., Zippelius, A., et al. (2009). Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci.* 10:64. doi: 10.1186/1471-2202-10-64
- Johann, S., Dahm, M., Kipp, M., Zahn, U., and Beyer, C. (2011). Regulation of choline acetyltransferase expression by 17 β -oestradiol in NSC-34 cells and in the spinal cord. *J. Neuroendocrinol.* 23, 839–848. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02192.x
- Joshi, D. C., Singh, M., Krishnamurthy, K., Joshi, P. G., and Joshi, N. B. (2011). AMPA induced Ca²⁺ influx in motor neurons occurs through voltage gated Ca²⁺ channel and Ca²⁺ permeable AMPA receptor. *Neurochem. Int.* 59, 913–921. doi: 10.1016/j.neuint.2011.06.023
- Kanjilal, B., Keyser, B. M., Andres, D. K., Nealley, E., Benton, B., Melber, A. A., et al. (2014). Differentiated NSC-34 cells as an *in vitro* cell model for VX. *Toxicol. Mech. Methods* 24, 488–494. doi: 10.3109/15376516.2014.943442
- Keilhoff, G., Lucas, B., Pinkernelle, J., Steiner, M., and Fansa, H. (2014). Effects of cerebrolisin on motor-neuron-like NSC-34 cells. *Exp. Cell Res.* 327, 234–255. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.06.020
- Kruman, I. I., Pedersen, W. A., Springer, J. E., and Mattson, M. P. (1999). 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.* 160, 28–39. doi: 10.1006/exnr.1999.7190
- Lerma, J., Herranz, A. S., Herreras, O., Abraira, V., and Martin del Rio, R. (1986). *In vivo* determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res.* 384, 145–155. doi: 10.1016/0006-8993(86)91230-8
- Liu, X., Xu, S., Wang, P., and Wang, W. (2015). Transient mitochondrial permeability transition mediates excitotoxicity in glutamate-sensitive NSC34 motor neuron-like cells. *Exp. Neurol.* 271, 122–130. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.05.010
- Lodge, D. (2009). The history of the pharmacology and cloning of ionotropic glutamate receptors and the development of idiosyncratic nomenclature. *Neuropharmacology* 56, 6–21. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.006
- MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., and Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321, 519–522. doi: 10.1038/321519a0
- MacPherson, P. A., Jones, S., Pawson, P. A., Marshall, K. C., and McBurney, M. W. (1997). P19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons *in vitro*. *Neuroscience* 80, 487–499. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00102-4
- Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 755–765. doi: 10.1038/nrn2212
- Madji Hounoum, B., Blasco, H., Nadal-Desbarats, L., Diémé, B., Montigny, F., Andres, C., et al. (2015). Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 8861–8872. doi: 10.1007/s00216-015-9047-x
- Maier, O., Böhm, J., Dahm, M., Brück, S., Beyer, C., and Johann, S. (2013). Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 62, 1029–1038. doi: 10.1016/j.neuint.2013.03.008
- Mattson, M., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberberg, I., and Rydel, R. (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12, 376–389.
- Mattson, M. P. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1144, 97–112. doi: 10.1196/annals.1418.005
- Mattson, M. P., Lovell, M. A., Furukawa, K., and Markesbery, W. R. (1995). Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 65, 1740–1751. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.65041740.x
- Matusica, D., Fenech, M. P., Rogers, M.-L., and Rush, R. A. (2008). Characterization and use of the NSC-34 cell line for study of neurotrophin receptor trafficking. *J. Neurosci. Res.* 86, 553–565. doi: 10.1002/jnr.21507
- McKay, S. E., Garner, A., Caldero, J., Tucker, R. P., Large, T., and Oppenheim, R. W. (1996). The expression of trkB and p75 and the role of BDNF in the developing neuromuscular system of the chick embryo. *Development* 122, 715–724. doi: 10.1007/bf02532343
- Metzger, F., Wiese, S., and Sendtner, M. (1998). Effect of glutamate on dendritic growth in embryonic rat motoneurons. *J. Neurosci.* 18, 1735–1742.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., et al. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256, 1217–1221. doi: 10.1126/science.256.5060.1217
- Nicola, M. A., Becker, C. M., and Triller, A. (1992). Development of glycine receptor alpha subunit in cultivated rat spinal neurons: an immunocytochemical study. *Neurosci. Lett.* 138, 173–178. doi: 10.1016/0304-3940(92)90499-w

- Niswender, C. M., and Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol.* 50, 295–322. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
- Prell, T., Lautenschlager, J., Witte, O. W., Carri, M. T., and Grosskreutz, J. (2012). The unfolded protein response in models of human mutant G93A amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 35, 652–660. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08008.x
- Rembach, A., Turner, B. J., Bruce, S., Cheah, I. K., Scott, R. L., Lopes, E. C., et al. (2004). Antisense peptide nucleic acid targeting GluR3 delays disease onset and progression in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J. Neurosci. Res.* 77, 573–582. doi: 10.1002/jnr.20191
- Rosenberg, P. A., Amin, S., and Leitner, M. (1992). Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *J. Neurosci.* 12, 56–61.
- Sen, I., Joshi, D. C., Joshi, P. G., and Joshi, N. B. (2008). NMDA and non-NMDA receptor-mediated differential Ca^{2+} load and greater vulnerability of motor neurons in spinal cord cultures. *Neurochem. Int.* 52, 247–255. doi: 10.1016/j.neuint.2007.06.028
- Sholl, D. A. (1956). The measurable parameters of the cerebral cortex and their significance in its organization. *Prog. Neurobiol.* 2, 324–333. doi: 10.1016/s0079-6123(08)62112-3
- Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P., and Gouaux, E. (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462, 745–756. doi: 10.1038/nature08624
- Spalloni, A., Nutini, M., and Longone, P. (2013). Role of the N-methyl-D-aspartate receptors complex in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 312–322. doi: 10.1016/j.bbdis.2012.11.013
- Tadic, V., Prell, T., Lautenschlaeger, J., and Grosskreutz, J. (2014). The ER mitochondrial calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell Neurosci.* 8:147. doi: 10.3389/fncel.2014.00147
- Turner, B. J., Murray, S. S., Piccenna, L. G., Lopes, E. C., Kilpatrick, T. J., and Cheema, S. S. (2004). Effect of p75 neurotrophin receptor antagonist on disease progression in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *J. Neurosci. Res.* 78, 193–199. doi: 10.1002/jnr.20256
- Urushitani, M., Shimohama, S., Kihara, T., Sawada, H., Akaike, A., Ibi, M., et al. (1998). Mechanism of selective motor neuronal death after exposure of spinal cord to glutamate: involvement of glutamate-induced nitric oxide in motor neuron toxicity and nonmotor neuron protection. *Ann. Neurol.* 44, 796–807. doi: 10.1002/ana.410440514
- Valbuena, G. N., Rizzardini, M., Cimini, S., Siskos, A. P., Bendotti, C., Cantoni, L., et al. (2015). Metabolomic analysis reveals increased aerobic glycolysis and amino acid deficit in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 53, 2222–2240. doi: 10.1007/s12035-015-9165-7
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., and Robberecht, W. (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 1068–1082. doi: 10.1016/j.bbdis.2006.05.002
- Van Den Bosch, L., Vandenberghe, W., Klaassen, H., Van Houtte, E., and Robberecht, W. (2000). Ca^{2+} -permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J. Neurol. Sci.* 180, 29–34. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00414-7
- Veyrat-Durebex, C., Corcia, P., Dangoumau, A., Laumonnier, F., Piver, E., Gordon, P. H., et al. (2014). Advances in cellular models to explore the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 49, 966–983. doi: 10.1007/s12035-013-8573-9
- Vincent, A. M., Mobley, B. C., Hiller, A., and Feldman, E. L. (2004). IGF-I prevents glutamate-induced motor neuron programmed cell death. *Neurobiol. Dis.* 16, 407–416. doi: 10.1016/j.nbd.2004.03.001

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

Copyright © 2016 Madji Hounoum, Vourc'h, Felix, Corcia, Patin, Guéguinou, Potier-Cartreau, Vandier, Raoul, Andres, Mavel and Blasco. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II. Discussion & conclusion

Pour explorer les mécanismes de l'excitotoxicité dans la pathogénèse de la SLA, plusieurs études *in vitro* utilisent soit les motoneurones primaires (Dolga et al. 2011; Kruman et al. 1999; Van Den Bosch et al. 2000) soit les lignées cellulaires (Benkler et al. 2013; Liu et al. 2015). L'avantage des cultures primaires est qu'elles présentent un développement morphologique et physiologique similaire qu'en *in situ*. Cependant dû à la complexité de la culture des motoneurones primaires et leur très faible rendement, les lignées cellulaires sont régulièrement utilisées comme modèle *in vitro* dans les études de la physiopathologie de la SLA. Parmi les différentes lignées cellulaires couramment utilisées, les cellules NSC-34 sont les plus utilisées car elles sont considérées comme étant la lignée motoneuronale la plus stable. En effet beaucoup d'études ont montré que la différenciation des NSC-34 entraîne un phénotype très semblable à celui des motoneurones (Eggett et al. 2000; Hemendinger et al. 2012; Maier et al. 2013).

Du fait de leur origine cancéreuse, les NSC-34 se multiplient assez rapidement et permettent ainsi d'avoir un grand nombre de cellules en très peu de temps. Ce caractère prolifératif des cellules NSC-34 est intéressant pour notre étude métabolomique car les techniques d'analyse nécessitent un très grand nombre de cellules (5.10^6 cellules pour la RMN ^1H et 250 000 cellules pour la LC-HRMS). L'objectif de cette étude était d'évaluer la pertinence de ces cellules NSC-34 comme modèle des motoneurones dans notre étude métabolomique associée à l'excitotoxicité. Cette étape de validation du modèle est primordiale pour juger de la pertinence des résultats, et elle nécessite donc d'évaluer dans ce modèle les propriétés biochimiques et électrophysiologiques des motoneurones ciblées par le glutamate, telles que les récepteurs du glutamate et le flux calcique. Nous avons comparé pour la première fois dans la même étude les cellules NSC-34 et les motoneurones comme modèle *in vitro* pour étudier l'excitotoxicité.

Nous avons montré que malgré les nombreuses propriétés motoneuronales que peuvent présenter les cellules NSC-34 différenciées (NSC-34_D) (Cashman et al. 1992; Maier et al. 2013), le profil des transcrits des sous unités des récepteurs du glutamate des NSC-34_D était différent de celui des motoneurones primaires. Nous avons montré que les NSC-34_D sont beaucoup moins sensibles au glutamate et présentaient un faible flux calcique contrairement aux motoneurones primaires. Nous supposons que ces différences de sensibilité au glutamate et de flux calcique entre les NSC-34_D et les motoneurones primaires seraient dues à la différence des profils des transcrits des sous unités des récepteurs du glutamate observés, car certaines

sous unités sont exprimées en très faible quantité (GluR1-4) et d'autres complètement absentes (GluN2B, GluN2C et GluN3A) dans les NSC-34_D contrairement aux motoneurones primaires qui expriment la totalité des sous unités des récepteurs. Tous ces résultats associés à l'hétérogénéité des cultures différenciées, nous amènent à suggérer que la lignée cellulaire NSC-34 n'est pas appropriée comme modèle *in vitro* pour étudier l'excitotoxicité induite par le glutamate. Cette conclusion est renforcée par des précédentes études qui avaient montré que les cellules NSC-34 ne présentaient pas toutes les propriétés requises pour son utilisation comme modèle *in vitro* de l'excitotoxicité induite par le glutamate (Durham et al. 1993; Hemendinger et al. 2012).

L'idéale pour un modèle d'étude serait d'avoir une structure histologique préservée comme par exemple les cultures de tissus de moelle épinière qui ont l'avantage d'avoir les connexions synaptiques, l'interaction neurone-glie et de reproduire au plus près possible les propriétés structurales et fonctionnelles observées *in situ*. Cependant, les cultures primaires de motoneurones pourraient être utilisées pour étudier les caractéristiques spécifiques de la maladie au niveau cellulaire. Dans notre étude, bien que les cultures primaires de motoneurones ne soient pas les meilleurs modèles, nous suggérons que leur utilisation serait plus appropriée que celle des NSC-34 pour l'étude *in vitro* des mécanismes de l'excitotoxicité induite par le glutamate dans la SLA et les autres maladies des motoneurones. Toutefois il a également été montré que les cellules NSC-34 seraient un bon modèle pour étudier d'autres mécanismes physiopathologiques de la SLA tels que le stress oxydant et l'agrégation protéique (Dangoumau et al. 2014; Kanjilal et al. 2014; Veyrat-Durebex et al. 2015). Nous recommandons l'utilisation de cultures primaires de motoneurones au lieu des cellules NSC-34 pour explorer *in vitro* la pathogenèse liée à l'excitotoxicité dans la SLA et dans les autres maladies des motoneurones.

Au vu de la conclusion de cette étude, nous avons décidé d'utiliser les motoneurones primaires (malgré la complexité de leur culture) pour notre projet d'étude des altérations du métabolisme induite par l'excitotoxicité dans la SLA par l'approche métabolomique.

**Partie III : Etude des modifications
des profils métaboliques de cultures
primaires d'astrocytes induites par
l'expression de la mutation *SOD1*^{G93A},
la présence des motoneurones
primaires sauvages et l'exposition au
glutamate**

I. Résumé de l'étude

La mort sélective des motoneurones dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) nécessite la contribution des cellules non neuronales notamment les astrocytes. Afin de mieux comprendre la contribution de ces astrocytes dans la dysfonction du métabolisme énergétique cérébrale décrite dans la SLA, nous avons utilisé l'approche métabolomique pour explorer les empreintes métaboliques des astrocytes primaires dans des conditions associées à la SLA telles que l'expression de la mutation *SOD1*^{G93A}, la présence des motoneurones et l'exposition au glutamate. Pour ce faire, nous avons utilisé la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) pour analyser le métabolome intracellulaire et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H) pour l'analyse du métabolome extracellulaire.

Nous avons comparé les profils métaboliques des astrocytes *SOD1*^{G93A} en monoculture et en co-culture avec les motoneurones sauvages afin de mettre en évidence les altérations métaboliques induites par la présence des motoneurones.

Ensuite, nous avons étudié l'impact du glutamate sur le métabolisme des astrocytes portant ou pas la mutation *SOD1*^{G93A} et en co-culture avec des motoneurones sauvages, afin de mettre en lumière la réponse métabolique des astrocytes au glutamate en condition physiologique et pathologique. Nous avons observé que la réponse des astrocytes au glutamate est dépendante de leur contexte génétique.

Enfin, nous avons étudié l'effet cumulé de l'expression de la mutation *SOD1*^{G93A}, de la présence en co-culture des motoneurones sauvages et l'exposition au glutamate sur le métabolisme des astrocytes. Pour ce faire nous avons comparé les empreintes métaboliques des astrocytes dans les conditions associées à la SLA (citées ci-dessus) à celles des astrocytes sauvages en co-culture avec des motoneurones sauvages et non exposés au glutamate (condition contrôle). Nous avons révélé d'importantes modifications des métabolites dans les astrocytes induites par l'effet cumulé des conditions associées à la SLA.

Grâce à l'approche métabolomique, cette étude contribue à la compréhension des altérations métaboliques dans les astrocytes dans les conditions associées à la SLA, elle donne un aperçu des interactions métaboliques astrocyte-motoneurone et permet d'appréhender de nouvelles cibles thérapeutiques dans la voie du métabolisme énergétique.

Partie III : Analyses métabolomiques de cultures primaires d'astrocytes

Madji Hounoum Blandine *et al.* “*Wildtype motoneurons, ALS-linked SOD1 mutation and glutamate profoundly modify astrocytes metabolism and lactate shuttling*” Soumis à Glia

Informations supplémentaires en annexe 5

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'institut de Neurosciences de Montpellier, INSERM U1051, Montpellier.

II. Article en soumis à Glia

Wildtype motoneurons, ALS-linked *SOD1* mutation and glutamate profoundly modify astrocytes metabolism and lactate shuttling

Madji Hounoum Blandine ¹; Mavel Sylvie ¹, Coque Emmanuelle ⁴, Patin Franck ^{1,2}, Vourc'h Patrick^{1,2}; Marouillat Sylviane ¹; Nadal-Desbarats Lydie ^{1,5}; Emond Patrick^{1,5}; Corcia Philippe ^{1,3}; Andres Christian R ^{1,2}; Raoul Cédric ⁴; Blasco Hélène ^{1,2}

1. Université François-Rabelais, INSERM U930 "Imagerie et Cerveau", CHRU de Tours, Tours France

2. Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Hôpital Bretonneau, CHRU de Tours, France

3. Centre SLA, Service de Neurologie, CHRU de Tours, France

4. The Neuroscience Institute Montpellier, INSERM U1051, Saint Eloi Hospital, Montpellier, France

5. Université François-Rabelais, PPF "Analyses des Systèmes Biologiques", Département d'Analyse Chimique Biologique et Médicale. 37032 Tours Cedex 1- France

***Corresponding author**

Hélène Blasco pharmD PhD

Dr Hélène BLASCO, Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire, Hôpital Bretonneau, CHRU de Tours ; 2, Bd Tonnellé, 37044 - Tours cedex 1, France

Tel: + 33 2 47 47 37 95

Fax: + 33 2 47 47 86 13

e-mail: address helene.blasco@univ-tours.fr

Abstract

The selective degeneration of motoneuron that typifies amyotrophic lateral sclerosis (ALS), implicates non-cell-autonomous effects of astrocytes. However, the mechanisms underlying astrocyte-mediated neurotoxicity remain largely unknown. According to the determinant role of astrocyte metabolism in supporting neuronal function, we propose to explore the metabolic status of astrocytes exposed to ALS-associated conditions, using metabolomics approach. We found a significant metabolic dysregulation including purine, pyrimidine, lysine and glycerophospholipid metabolism pathways in astrocytes expressing an ALS-causing mutated superoxide dismutase-1 (*SOD1*) when co-cultured with wildtype motoneurons. *SOD1* astrocytes exposed to glutamate revealed a significant modification of astrocyte metabolic fingerprint. More importantly, we observed that *SOD1* mutation and glutamate impact the cellular shuttling of lactate between astrocytes and motoneurons with a decreased extra- and intra-cellular lactate levels in astrocytes. Based on the emergent strategy of metabolomics, this work provides novel insight for understanding the metabolic dysfunction of astrocytes in ALS conditions and opens perspective of therapeutics targets through focus on these metabolic ways

Keywords: Metabolomics, excitotoxicity, NMR, LC-HRMS, co-culture, *in vitro* model, cross-talk

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a late-onset neurodegenerative disease that predominantly affects survival of upper and lower motoneurons (Geser et al. 2008). Astrocyte and microglia activation as well as skeletal muscle atrophy, are other typical hallmarks of the disease. Approximately 90% of ALS cases are sporadic (sALS), with the remaining 10 % being inherited familial ALS (fALS). About 10 to 20 % (1 %-2 % of total) of fALS cases are linked to various dominantly inherited mutations in the gene encoding the superoxide dismutase 1 (*SOD1*) (Rosen 1993). A wealth of studies have demonstrated that non-cell-autonomous effects of *SOD1* contribute to the pathogenic process (Ilieva et al. 2009). Notably, a strong astroglial reaction precedes motoneuron death and is proposed to actively contribute to the degenerative process (Di Giorgio et al. 2007; Ilieva et al. 2009). However, few is known about the mechanisms implicated in astrocyte dysfunction and subsequent motoneuron degeneration. Non-cell-autonomous toxicity of *SOD1* mutant in astrocytes implicates the release of factors or cell-contact mechanisms that can trigger death of motoneurons (Aebischer et al. 2011; Almad et al. 2016; Bowerman et al. 2015; Rojas et al. 2014). Astrocytes also play a crucial role in the survival and function of motoneurons through numerous aspects, such as maintenance of synaptic glutamate homeostasis and modulation of neuronal susceptibility to glutamate excitotoxicity, or lactate-mediated metabolic coupling. Thus, it suggests that additional mechanisms consecutive to the dysfunction of astrocyte might also contribute to the astrocytic neurotoxicity towards motoneurons (Castro et al. 2009; Staats and Van Den Bosch 2009; Van Den Bosch and Robberecht 2008).

Excess of glutamate appears to drive excitotoxicity through abnormal flow of calcium ions into neurons that may activates multiple enzyme cascades (phospholipases, endonucleases,

proteases...) damaging components of the cytoskeleton, cells membrane, mitochondria, and DNA, leading to neuron death. This glutamate-induced excitotoxicity represents one of the prominent pathophysiological hypothesis of ALS (Blasco et al. 2014b; Heath and Shaw 2002). Excitatory amino-acid transporter in astrocytes (EAAT2) plays a major role in keeping extracellular glutamate concentration below neurotoxic levels. Neuronal excitotoxicity in ALS has been associated with loss of EAAT2 protein and function (Rothstein et al. 1995). Consistently, the only therapeutic agent approved in ALS is riluzole, an anti-glutamatergic agent (Bensimon et al. 1994).

Metabolic alteration is a prominent feature of ALS pathogenesis (Dupuis et al. 2011), and we hypothesize that glutamate might play a decisive role by disturbing the metabolic coupling between astrocytes and motoneurons. Metabolomics (Dunn et al. 2011b; Madji Hounoum et al. 2016a; Nicholson et al. 2002) may represent a pertinent approach to further understand the pathophysiological mechanisms that underly motoneuron degeneration in ALS.

The aim of this work was to determine the metabolic changes that take place in astrocytes expressing a *SOD1* mutation, co-cultured with wildtype motoneurons and after exposed to glutamate. We used liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) to determine intracellular metabolic profiles, and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) to analyze the extracellular medium. We assessed metabolic profiles of astrocytes in three conditions explained below:

- 1- Metabolomics profiles analysis of *SOD1*^{G93A} astrocytes in mono- and co-culture with wildtype motoneurons to reveal the main changes of metabolism induced by the presence of motoneurons;

- 2- Metabolomics profiles analysis of cells in co-culture to explore the impact of glutamate exposure on the metabolism of astrocytes expressing (or not) mutated *SOD1*;
- 3- Metabolomics profiles analysis of cells in co-culture under both, glutamate exposure and mutant *SOD1* expression in astrocytes, and comparison with profiles of cells in co-culture under control condition (wildtype astrocyte-motorneuron co-cultures).

MATERIALS AND METHODS

Animals

All animal experiments were approved by the national ethics committee on animal experimentation, and were performed in compliance with national directives for the care and use of laboratory animals. Wildtype and transgenic *SOD1*^{G93A} mice were obtained from Jackson laboratory. *SOD1*^{G93A} mice were maintained as hemizygotes by crossing transgenic males with non-transgenic females of the same C57BL/6 genetic background. Progeny were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) as previously described (Raoul et al. 2002).

Primary astrocyte cell cultures

Primary cultures of spinal astrocytes were prepared from transgenic *SOD1*^{G93A} newborn mice (2-3 days of age) and their non-transgenic littermates as previously described (Aebischer et al. 2011). Each spinal cord was treated individually and pups screened for *SOD1* transgene using PCR (Aebischer et al. 2011). Briefly, following trypsin treatment, cells were mechanically dissociated and after centrifugation, cells were seeded in DMEM containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin at 37°C, 7.5% CO₂ (3-4 spinal cords of each genotype were seeded in T75 flask). Isolated astrocytes were then grown to confluence and separated from contaminating microglia through shaking. Cells were then split and plated onto 6-well

transwell® system with 0.4 µm pore polycarbonate membrane insert (Corning) at the density of 100, 000 cells per well.

Primary motoneuron preparations and separated co-cultures

Primary motoneuron cultures were established from spinal cords of C57BL/6 mice at embryonic day 12.5. Motoneuron enrichment was performed by mechanical dissociation after trypsin treatment, followed by iodixanol (Sigma-Aldrich) density gradient as previously described (Madji Hounoum et al. 2016c; Raoul et al. 2002). The motoneuron-enriched fraction was seeded onto poly-ornithine/laminin-treated 6-well plates at the density of 15, 000 cells per well in the presence of neurotrophic factors (0.1 ng/ml GDNF, 1 ng/ml BDNF, and 10 ng/ml CNTF) in supplemented neurobasal medium (Invitrogen). Supplemented neurobasal medium contained 2% horse serum, 0.5% penicillin/streptomycin, 25 µM L-glutamate, 25 µM β-mercaptoethanol, 0.5 mM L-glutamine, and 2% B-27 supplement (Life Technologies). Motoneurons were plated in triplicate for each culture condition. Cells were maintained at 37°C, 7.5% CO₂ for 8 days before performing co-culture by inserting transwells containing astrocytes (**Figure 1**).

Astrocytes were either cultured in the presence (co-cultures) or absence (mono-cultures) of wildtype motoneurons, which were physically separated using a transwell system (**Figure 1**).

Glutamate treatment and cell sampling

After 48 h of co-culturing, glutamate (Sigma Aldrich) was added in culture medium at the final concentration of 100 µM, the dose of glutamate that leads to excitotoxicity (Madji Hounoum et al. 2016c) while control cells were treated with the same volume of PBS. Co-culture and mono-culture cells were exposed to glutamate over the night. Transwells containing astrocytes were then removed to allow harvesting of astrocytes.

Before cell sampling for LC-HRMS analysis, 1 mL of culture media was removed and centrifuged (16,000g, 10 minutes). The supernatants were stored at -80°C until their preparation for ^1H -NMR analysis.

^1H -NMR analysis

500 μL of ice-cold methanol was added to 250 μL of culture media. The mixture was vigorously agitated for 20 s, left at -20°C for 15 min, agitated again under the same conditions, and centrifuged at 16,000g for 5 min. Then 700 μL of supernatant was evaporated using a SpeedVac Concentrator (ThermoScientific). The dried culture media were reconstituted with 208 μL of 0.2 M potassium phosphate buffered deuterium oxide (D_2O) ($\text{pH}=7.4 \pm 0.5$) with 123 μM of 3-trimethylsilylpropionic acid (TSP) as an external reference. The solution was vortexed briefly, and centrifuged at 10,000g for 15 min at 4°C . The supernatant was transferred to 3 mm NMR tubes for ^1H -NMR analysis.

^1H -NMR spectra were acquired at 298 K on a Bruker Ascend 600 MHz spectrometer (Bruker, Sadis, Wissembourg, France), equipped with a TCI cryoprobe. Standard ^1H -NMR spectra were acquired using a "noesypr1d" pulse sequence with a relaxation delay of 20 s, and a mixing time of 10 ms. Water suppression was achieved by presaturation during the relaxation delay and mixing time. ^1H -spectra were collected with 32 transients (and 8 dummy scans) into 64 k data points with a spectral width of 7500 Hz.

LC-HRMS analysis

Sample preparation and analysis were performed as described previously (Madji Hounoum et al. 2015). Briefly, metabolism was quenched with 1 ml of cold methanol at -40°C and 1 mL of cold water was added to the cell suspension for metabolites extraction. Then, the samples were centrifuged at 15,000g for 10 min at 4°C , the supernatant was evaporated, the dry residue was dissolved by 50 μL of methanol/water (50:50 v/v), and 10 μL were injected into

the LC-HRMS system. LC-HRMS analysis was performed on a UPLC Ultimate WPS-3000 system (Dionex, Germany), coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and operated in positive (ESI+) and negative (ESI-) electrospray ionization modes (one run for each mode).

Data processing

NMR spectra were processed as previously described (Madji Hounoum et al. 2015). Briefly, spectra were processed using Topspin version 2.1 software (Bruker Daltonik, Karlsruhe, Germany). Each ^1H -NMR spectrum within a range of 0.8–9.4 ppm (excluding only the water region, $\delta=4.67\text{--}5.0$ ppm) was then reduced to 71 buckets of variable width (from 0.01 to 0.15 ppm) using AMIX software (Analysis of MIXture, version 3.9.2, Bruker, Karlsruhe, Germany). Spectral intensities were scaled to the internal reference regions corresponding to TSP (-0.03 - 0.03 ppm) trimethylsilyl propionate region. Spectra annotations were performed using Chenomx 7.1 software (Chenomx Inc, Edmonton, Canada), and in house data base and HMDB. For the LC-HRMS analysis, a library of standard compounds (Mass Spectroscopy Metabolite Library of standards MSML[®], IROA Technologies[™]) were analyzed with the same gradient of mobile phases and in the same conditions than those used to analyze metabolites extracted from cells. In order to validate the identity of each detected metabolite, several criteria were required: (1) the retention time of the metabolite detected must be within ± 20 s of the standard reference, (2) the measured molecular exact mass of the metabolite must be within 10 ppm of the known mass of the reference compound, and (3) the isotope ratios of the metabolite must match the standard reference. The signal was calculated using Xcalibur[®] software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) by integrating selected ion chromatographic peak area. The data output provides only metabolites for which standard compounds have been analyzed. The metabolites identified after positive and negative electro spray ionization

(ESI) mode analysis were combined to provide a non-redundant list of metabolites useful for multivariate analysis. Metabolites with relative standard deviation (RSD) in control quality (QCs) higher than that in samples were excluded. Only metabolites with RSD in QCs below 30 % and identified in all cell lysate samples were kept for further multivariate analysis. Metabolites greater than 30 % variance in QCs were not considered, except if significant variance was observed between groups, meaning that biological variability may exceed analytical variability (Want et al. 2013)

Statistical analysis

The data obtained from LC-HRMS and ^1H -NMR analysis were analyzed by multivariate approach using Simca-P+-13.0 software (Umetrics, Umeå, Sweden). Data analysis was preceded by log transformation and unit variance (UV) scaling. The data analysis, including QC, were first conducted using principal component analysis (PCA). Discriminant metabolites were obtained by Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA), a supervised model of classes as previously described (Mavel et al. 2013; Westerhuis et al. 2010). A cross-validation analysis of variance was applied to further evaluate the significance of the contribution plot and provides information about the variables that influence the cluster of samples. The most discriminating metabolites [variable importance on projection (VIP) representing a value >1] obtained from OPLS-DA analysis and determined by a fold change ≥ 2 (and this for each comparison) were used to analyze the potential impacted pathways.

For univariate analysis, statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test or student's test using JMP statistical software version 7.0.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). A statistical correction for multiple tests was applied in order to adjust the p-value for significance by accounting for the number of metabolites evaluated (Bonferonni adjustment).

Differences were deemed significant when $p < 0.05/n$ (n is the number of compounds analyzed by univariate analysis).

Pathway analysis

The pathway analysis was conducted by using the free web software Metaboanalyst (www.Metaboanalyst.ca) (Xia et al. 2015) to map pathways corresponding to the metabolites significantly highlighted in the models. The pathway plots were based on the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database, and the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database was searched to define gene functions. For ID conversions, the Chemical Translation Service (CTS:<http://cts.fiehnlab.ucdavis.edu/conversion/batch>) was used to convert the common chemical names into their KEGG, HMDB, and InChiKeys.

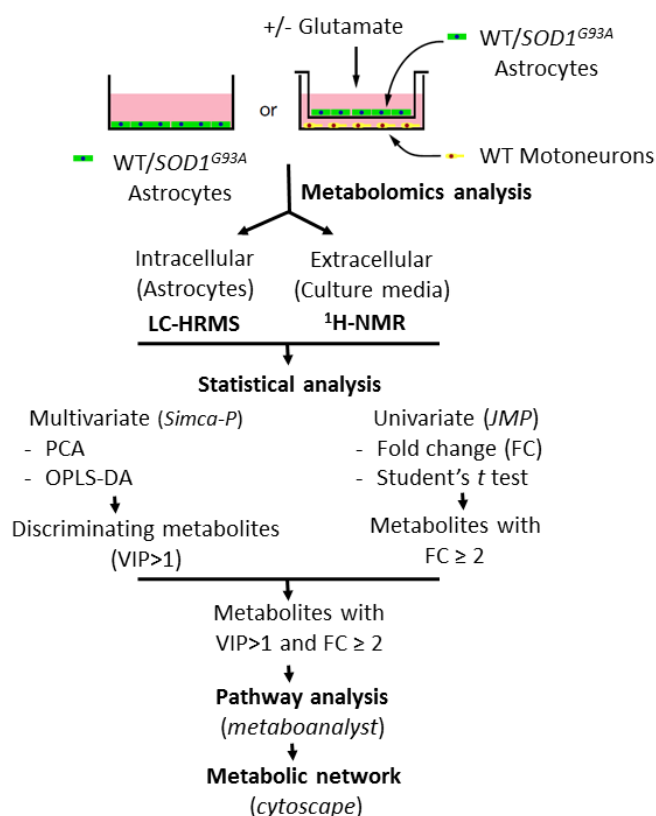


Figure 1: Workflow representing the different steps of the experimental design and data analysis

RESULTATS

The LC-HRMS analysis of intracellular astrocyte medium yielded 100 metabolites (carnitines, amino acids, fatty acids, and organic acids) and ^1H -NMR analysis of culture provided 23 metabolites (see **Table S1**). The non-supervised multivariate analysis visualized by the principal component analysis (PCA) score plot revealed grouped and differential responses of astrocytes to different culture conditions (wildtype motoneurons presence, *SOD1* mutation and glutamate exposition) (**Figure S1**).

***SOD1*^{G93A} mutation induces metabolic changes in astrocyte**

We first assessed metabolic changes in astrocytes metabolism in presence of *SOD1*^{G93A} expression. PCA score plot showed a clear discrimination between wildtype and *SOD1*^{G93A} expressing astrocytes, both in monoculture and co-culture (**Figure S1**). Comparison between metabolic profiles of wildtype astrocytes in monoculture and those of *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes highlighted 15 discriminating metabolites (8 were down-regulated and 7 up-regulated). These metabolites were involved in 13 metabolic pathways, pyrimidine metabolism and lysine metabolism pathways being the most prominent (**Table S2**) showing that expression of ALS-linked mutated *SOD1* notably altered astrocytes metabolome. OPLS-DA performed from ^1H -NMR data of extracellular media associated with wildtype and *SOD1*^{G93A} astrocytes cultures revealed that nicotinic acid, lactate, phosphocholine and 3-hydroxybutyric acid were the most discriminating metabolites between the two groups of media. These metabolites were decreased (at the exception of nicotinic acid) in the medium of *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes cultures compared to those of wildtype astrocytes cultures (**Table S3**).

Wildtype motoneurons induce metabolic changes in *SOD1^{G93A}* astrocyte

We then explored whether the presence of motoneurons significantly influenced astrocytes metabolome. For this purpose, the metabolic profile of *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes cultured alone was compared to that of *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes cultured in the presence of wildtype motoneurons. PCA score plot showed that *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes were highly distinguishable from those expressing *SOD1^{G93A}* mutant in the presence of wildtype motoneurons (**Figure S1**). OPLS-DA identified 34 metabolites discriminating between these two groups of astrocytes, all were up-regulated (at the exception of palmitate and urocanate) in *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes cultured in the presence of wildtype motoneurons compared to *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes cultured alone (**Figure 2, Table S4**).

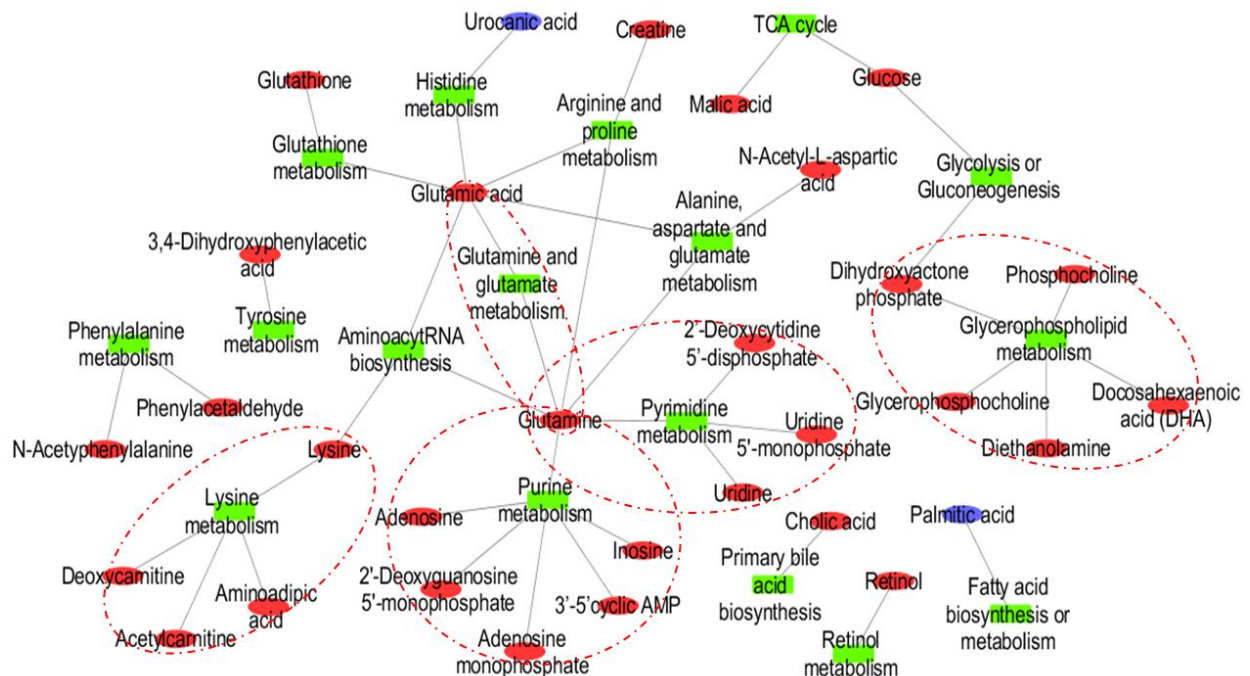


Figure 2: Network of intracellular metabolites of *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes altered by the presence of wildtype motoneurons. Discriminating and altered metabolites were determined

by OPLS-DA (VIP >1 and univariate fold change ≥ 2). Green rectangle nodes represent pathways, ellipse nodes represent metabolites: up-regulated (red) and down-regulated (blue) in *SOD1*^{G93A} astrocytes in co-culture with wildtype motoneurons compared to *SOD1*^{G93A} astrocytes in mono-culture.

Metabolic pathway analysis revealed that these discriminating metabolites were involved in 17 pathways, purine metabolism, pyrimidine metabolism, lysine metabolism, glutamine and glutamate metabolism, and glycerophospholipids metabolism pathways were the most prominent (**Figure 2**). Therefore, the presence of wildtype motoneurons in the culture led to significant changes in the metabolic status of astrocytes expressing mutated *SOD1*. Thus further experiments were focused on these kinds of models, associating both types of cells.

Glutamate leads to metabolic changes in astrocytes cultured with wildtype motoneurons

We first explored the metabolic changes that take place in wildtype astrocytes when co-cultured with wildtype motoneurons and exposed to a dose of glutamate that leads to excitotoxicity. The metabolic profile of wildtype astrocyte-motoneuron co-cultures treated with glutamate was compared to that of untreated wildtype astrocyte-motoneuron co-cultures (**Figure S2-A**). Six discriminating metabolites were found and involved in five metabolic pathways: pyrimidine, purine, biotin and riboflavin metabolisms, as well as fatty acid metabolism (**Table S5**). The extra-cellular metabolome profile (**Figure S2-B**) showed a clear discrimination between conditioned medium of glutamate-treated and untreated wildtype astrocyte-motoneuron cultures. Data analysis revealed that valine, tryptophan, pyroglutamic acid, phosphocholine and 3-hydroxybutyric acid were the most discriminating metabolites between these two conditions. These metabolites were all decreased in the

medium of glutamate treated wildtype astrocyte-motoneuron cultures compared to that of untreated co-cultures (**Table S2**).

We then assessed glutamate effects on the metabolome of mutant astrocytes cultured in the presence of wildtype motoneurons. PCA score plot showed a clear discrimination between metabolome of *SOD1^{G93A}* astrocytes cultured with wildtype motoneurons and exposed or not to glutamate (**Figure S2-A**). Metabolic profile analysis identified 8 discriminating metabolites (uridine, phenylacetaldehyde, creatine, creatinine, L-acetylcarnitine, deoxycarnitine, lactate and glutamate), which were down-regulated in astrocytes expressing *SOD1^{G93A}* at the exception of glutamate (**Table S5, Figure 3**).

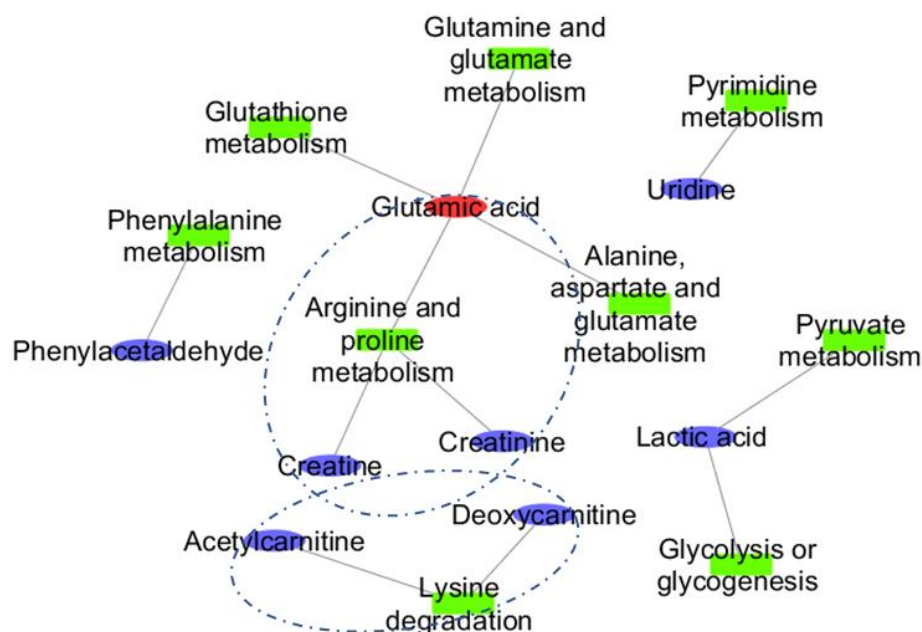


Figure 3: Network of intracellular metabolites altered by the glutamate exposure in *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons. Discriminating and altered metabolites were determined by OPLS-DA (VIP >1 and univariate fold change ≥ 2). Green rectangle nodes represent pathways, ellipse nodes represent metabolites: up-regulated (red)

and down-regulated (blue) in *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes in co-culture and treated with glutamate compared to untreated *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes in co-culture.

Metabolic pathways analysis indicated that discriminating metabolites were involved in 9 metabolic pathways, of which, arginine, proline and lysine metabolism were the most pronounced pathways (**Figure 3**). PCA score plot performed from ¹H-NMR data showed that conditioned medium of treated *SOD1^{G93A}* astrocyte-motoneuron co-cultures was significantly different from medium of untreated co-cultures (**Figure S2-B**). Nicotinic acid and 3-hydroxybutyric acid were the most discriminating metabolites and were both increased in the medium of *SOD1^{G93A}* astrocyte-motoneuron cultures exposed to glutamate (**Table S2**).

We found that astrocytes responded differently to glutamate exposure according to genetic context. *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes metabolism was more affected by glutamate exposure compared to wildtype astrocytes (**Figure S2-A**). Glutamate, lactate, creatine, creatinine, L-acetylcarnitine and deoxycarnitine were specifically modified in astrocytes when glutamate exposure was related to *SOD1^{G93A}* expression (**Table S5**).

Astrocytic metabolic changes associated with ALS genetic and exogenous factors

To determine the global metabolic changes that occur in astrocytes placed in ALS associated condition, we compared the metabolic profile of *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons and exposed to glutamate (referred as ALS condition) to the metabolic profile of untreated wildtype astrocytes co-cultured with motoneurons (referred as control condition). Metabolic profile of astrocytes in ALS condition was clearly discriminated from that in control conditions (**Figure S2-A**). OPLS-DA identified 22 discriminating metabolites, 14 were down-regulated and 8 up-regulated in astrocytes in ALS condition compared to those in control conditions (**Table 1**). The metabolic changes that take place in astrocytes in genetic

and glutamate ALS conditions involved various metabolic pathways, including that of glutamate and glutamine metabolism, arginine and proline metabolism, purine metabolism, pyrimidine metabolism, lysine metabolism, glycerophospholipid metabolism, and glycolysis or gluconeogenesis pathways (**Figure 4, Table 1**). Extra-cellular metabolic profile displayed a clear discrimination between culture media of these two groups (**Figure S2-B**). OPLS-DA and univariate analysis of ^1H -NMR media data showed that lactate and 3-hydroxybutyric acid were discriminating metabolites and decreased in culture media of astrocytes in ALS condition compared to those of astrocytes in control condition (**Table S4**). Consistent with the decrease of extra-cellular levels of lactate, astrocytes showed a decreased of intracellular level of lactate levels in ALS conditions (**Figure 4**).

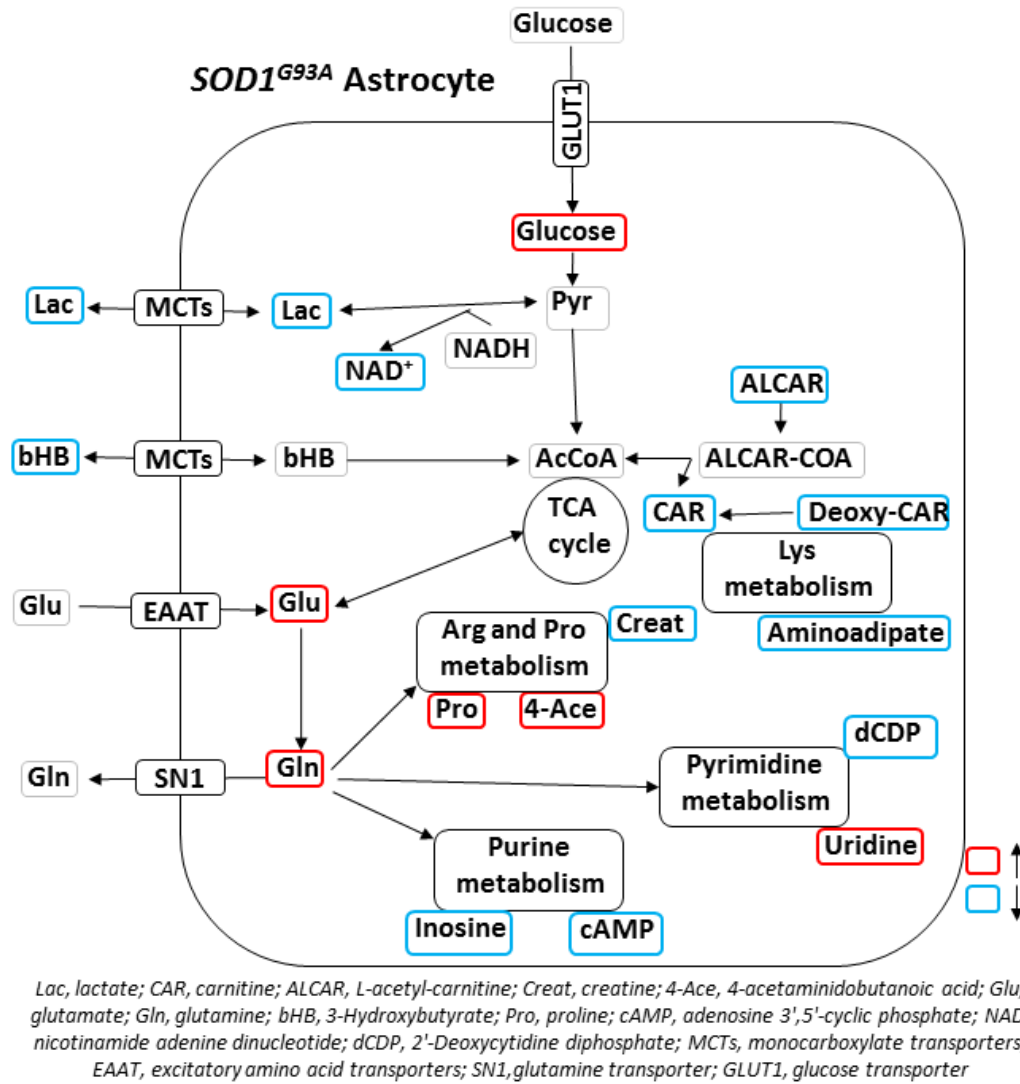


Figure 4: Schematic representation of astrocytes metabolic coupling mechanisms and related pathways in ALS condition. Pathways (surrounded by a black circle), ALS condition (co-cultured *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes and glutamate exposure), metabolites up-regulated (red square), and down-regulated (blue square).

We then aimed to compare these findings on astrocytes and extra-cellular metabolic ALS signature with findings obtained from mouse model of ALS [data not shown from a previously study (Patin et al. 2016)]. An OPLS-DA models and univariate analysis performed on cortex metabolites obtained from symptomatic transgenic *SOD1^{G93A}* mice that revealed common discriminating metabolites between this *in vivo* model and our *in vitro* models (**Table 1**).

Table 1: Metabolic alterations by ALS-associated conditions in astrocytes, mice and the literature about human metabolomics studies in ALS.

Pathways	Metabolites ^a	<i>SOD1</i> Astrocytes ^b	<i>SOD1</i> mice ^c	ALS Patients ^d
Acetyl CoA transfer	L-Acetylcarnitine	↓	↑	-
	Carnitine	↓	-	-
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	Glutamic acid	↑	↓	[1]
	Glutamine	↑	↑	[1]
	Proline	↑	↑	[1]
Arginine and proline metabolism	4-Acetamidobutanoic acid	↑	-	-
	Creatine	↓	↓	[1]
	Glutamic acid	↑	↓	[1]
	Glutamine	↑	↑	[1]
	Proline	↑	↑	[1]
Fatty acid metabolism	Palmitic acid	↑	-	-
Glutamine and glutamate metabolism	Glutamic acid	↑	↓	[1]
	Glutamine	↑	↑	[1]
Glutathione metabolism	Glutamic acid	↑	↓	[1]
Glycerophospholipid metabolism	Diethanolamine	↑	-	-
	Docosahexaenoic acid (DHA)	↓	-	-
	Glycerophosphocholine	↓	↓	-
Glycolysis or Gluconeogenesis	Glucose	↑	-	[2]
	Lactic acid	↓	-	-
Lysine metabolism	Aminoadipic acid	↓	↓	[2]
	Carnitine	↓	-	-
	Deoxycarnitine	↓	-	-
Nicotinate and nicotinamide metabolism	NAD+	↓	↓	-
Pantothenic and CoA biosynthesis	Pantothenic acid	↓	-	[1]
Pentose phosphate pathway	Glucose	↑	-	[2]
Phenylalanine metabolism	Phenylacetaldehyde	↓	-	[1]
Purine metabolism	Adenosine 3',5'-cyclic phosphate	↓	↓	-
	Glutamine	↑	↑	[1]
	Inosine	↓	-	[2]
Pyrimidine metabolism	2'-Deoxycytidine diphosphate	↓	-	-
	Glutamine	↑	↑	[1]
	Uridine	↑	↓	-

- a) Metabolites were determined by OPLS-DA VIP>1 and a univariate fold change ≥ 2 , and pathways in which they were involved.
- b) Metabolites altered by ALS conditions (co-cultured *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes and glutamate exposure) and discriminating astrocytes in ALS condition from those in control condition (untreated wildtype astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons). ↑ and ↓ indicate higher and lower levels, respectively in astrocytes in ALS condition relative to those in control condition,
- c) Discriminating metabolites found in *SOD1*^{G93A} mice relative to wildtype mice [data not shown from a previously study (Patin et al. 2016)]. ↑ and ↓ indicate higher and lower levels, respectively in *SOD1*^{G93A} mice relative to wildtype mice.
- d) Discriminating metabolites reported in the literature about human metabolomics in ALS: [1], (Blasco et al. 2016c); [2], (Wuolikainen et al. 2016)

DISCUSSION

Astrocytes play a fundamental role by providing metabolic support to neurons and increasing evidences indicate that they are implicated in the degeneration of motoneuron in ALS (Clement et al. 2003b; Ferraiuolo et al. 2011; Papadeas et al. 2011; Van Den Bosch and Robberecht 2008). We suggest that metabolism alteration largely described in ALS may play a key role in the pathogenesis of motoneuron degeneration, in particular through metabolism disturbance in astrocytes. In this study, we focused on the effects of the expression of a human *SOD1* mutation in astrocytes as well as excitotoxicity induced by glutamate on intra- and extra-cellular metabolism of astrocytes in monoculture or co-cultured with wildtype motoneurons.

Wildtype motoneurons induce pyrimidine, purine, lysine and glycerophospholipid metabolism pathways changes in *SOD1*^{G93A} astrocyte

Several studies have shown that astrocytic energy metabolism plays a pivotal role in the regulation of neurotransmission and energy supply for neurons (Bouzier-Sore and Pellerin 2013; Brown and Ransom 2007; Pellerin et al. 2007). In the present study, we observed that glutamate and glutamine were up-regulated in *SOD1*^{G93A} astrocytes co-cultured with

motoneurons compared to those that were cultured alone (**Table S3**). Co-culturing astrocytes with neurons has been shown to induce the expression of glutamate transporter (GLT/EAAT2) and increase the levels of glutamate/aspartate transporter (GLAST/EAAT1) (Gegelashvili and Schousboe 1997; Swanson et al. 1997), which may increase glutamate and glutamine levels observed in co-cultured astrocytes.

We also observed that most of the metabolites involved in purine and pyrimidine metabolic pathways were up-regulated. We found that adenosine 3',5'-cyclic phosphate (cAMP), adenosine monophosphate (AMP), adenosine and inosine which derive from each other, as well as uridine and uridine monophosphate (UMP) were all up-regulated (**Figure 2**), suggesting the existence of an inflammatory circuit where the presence of motoneurons induced up-regulation of purinergic machinery in *SOD1^{G93A}* astrocytes (Volonte et al. 2016). This result suggests strongly that astrocytes-motoneurons co-cultures, and especially the presence of motoneuron is necessary to explore metabolism alteration in astrocytes in ALS pathophysiology.

Glutamate leads to metabolic changes in astrocytes cultured with motoneurons

Astrocytes regulate extracellular glutamate concentration specifically through glutamate transporters GLT-1 and GLAST (Lehre et al. 1995), which scavenge excess of released glutamate from synaptic cleft to prevent excitotoxicity neuronal death (Danbolt 2001a; Van Den Bosch and Robberecht 2008). We show here that astrocytes respond differently to glutamate according to expression (or not) of a *SOD1* mutation. *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons were most sensitive to glutamate with prominent impact on arginine and proline metabolism, and lysine metabolism pathways compared to wildtype astrocytes (**Figure 3**). The accumulation of glutamate in *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes

exposed to glutamate suggests a dysfunction of the glutamate-glutamine cycle (Massucci et al. 2013; Pellerin and Magistretti 1994; Tani et al. 2014). *SOD1*^{G93A} astrocytes treated with glutamate displayed decreased levels of lactate, creatine, creatinine, deoxycarnitine and L-acetylcarnitine (**Table S5**), which could be associated with mitochondrial dysfunction in ALS pathophysiology. This study highlighted the influence of a *SOD1* mutation on the sensitivity of astrocytes to glutamate.

Metabolic changes in astrocytes with ALS-like conditions

We have shown that astrocytes displayed increased level of glutamine and glutamate in ALS condition (**Table 1**). This is consistent with changes in glutamine and glutamate metabolism in ALS patients (Blasco et al. 2014b; Blasco et al. 2016c; D'Alessandro et al. 2011; Rothstein et al. 1990; Van Den Bosch et al. 2006). In ALS conditions, carnitine and its acetic acid ester (L-acetylcarnitine) were down-regulated in astrocytes (**Figure 4, Table 1**), and are consistent with the alteration in mitochondrial functions and oxidative metabolism disturbances associated with the disease. In addition to their energetic role, these metabolites are both antioxidants and neuroprotective agents (Silva-Adaya et al. 2008). Carnitine is synthesized in brain from lysine and methionine, interestingly, we found that metabolites involved in lysine metabolism pathway, such as deoxycarnitine and aminoadipic acid were also down-regulated (**Figure 4, Table 1**). Astrocytes in ALS conditions also displayed a decreased creatine level and creatine is important to mitochondrial function.

An interesting finding from this study is that ALS condition induced the decrease of lactate and increase of glucose levels in astrocytes (**Table 1**). In accordance with intracellular lactate down-regulation, we found that co-culture media of ALS conditions also displayed also lower lactate levels compared to control co-culture media. These findings suggest that the

decreased lactate levels associated with ALS conditions might impair the lactate shuttling between astrocytes and motoneurons. Our results are consistent with an impairment of the astrocyte-motoneuron lactate shuttle hypothesis as previously suggested (Ferraiuolo et al. 2011; Martinez 2012). In addition, we observed a down-regulation of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) in astrocytes in ALS conditions. Indeed, since both glycolysis (at the glyceraldehyde phosphate dehydrogenase-catalyzed step) and lactate dehydrogenase (LDH) required NAD^+ (Kane 2014), the decreased level of NAD^+ observed in astrocytes in ALS conditions could explain this lactate decrease and the glucose increase (induced by impaired glycolysis) levels in astrocytes in ALS. A recent study demonstrated that an increase of total and mitochondrial NAD^+ contents in ALS astrocytes increased oxidative stress resistance and reverted toxicity effects toward co-cultured motoneurons (Harlan et al. 2016). A decrease of NAD^+ could make astrocytes vulnerable. Previously, an increase in cAMP concentration in cultured astrocytes has been shown to stimulate glycogen mobilization, glycolysis and lactate output (Pellerin et al. 1998; Pellerin et al. 1997). According to this observation, we found a decrease in astrocytes cAMP levels but an increase in intra-cellular glucose levels and the decrease in extra-cellular lactate levels (**Table 1 and Figure 4**). Altogether, these findings strongly support our hypothesis that the lactate shuttle impairment in ALS is associated to impaired glycolysis, and consequently, to a lower production of lactate in astrocytes. In addition to the down-regulation of the lactate transporter reported in the literature (Ferraiuolo et al. 2011), impaired anaerobic glycolysis induced by NAD^+ down-regulation in astrocytes could be a determinant factor inducing astrocyte-motoneuron lactate shuttle dysfunctions in *SOD1* mutant-associated context. We also observed the decrease in extra-cellular of 3-hydroxybutyrate levels in ALS conditions. Astrocytes are known to consume ketone bodies and may provide them to neighboring neurons as oxidative substrate. Our

results suggest that the astrocyte–neuron ketone body shuttle may also be impaired in ALS (Guzmán and Blázquez 2001)..

We have compared metabolites altered in this *in vitro* ALS model to those found in ALS mouse model (Patin et al. 2016) and ALS patients (Blasco et al. 2016c; Wuolikainen et al. 2016) (**Table 1**). We observed that in ALS conditions, astrocytes displayed low level of glycerophosphocholine as found in *SOD1*^{G93A} transgenic mice, and additionally showed a decreased level of docosahexaenoic acid (DHA) as previously reported in *SOD1*^{G93A} mice (Arima et al. 2015). Phospholipids are used to synthesize sphingomyelins, and are involved in the production of membranes (Moore et al. 1996). Low levels of phospholipids might limit the production of cell membranes and impair oxidative phosphorylation and cell growth (Tasseva et al. 2013). This study strongly supports the crucial roles of astrocytes in neurotransmission and overall homeostasis in brain and spinal cord. They have a flexible and perhaps opportunistic metabolism that can use, synthesize and release many metabolites (McKenna 2012). Moreover, the pertinence of our findings was further validated by showing that these altered metabolites in astrocytes under ALS conditions were retrospectively found in human ALS data (Blasco et al. 2016c; Wuolikainen et al. 2016) (**Table 1**).

In summary, this work is the first metabolomics study performed on primary astrocytes and motoneurons which allowed us to better understand the metabolic role of astrocytes in ALS conditions. We highlighted the main metabolic pathways linked with pathophysiology ways of ALS, including excitotoxicity, mitochondrial dysfunction and oxidative stress, and more importantly we characterized the astrocytic metabolism in these dysfunctions. We have correlated for the first time the impairment of astrocytes lactate efflux in ALS related *SOD1* model to the down regulation of intracellular lactate in astrocytes. This work opens

perspective of therapeutics targets through focus on these metabolic pathways. This study needs to be completed by fluxomics and proteomics studies in order to highlight the enzymes and transporters regulations at origin of these metabolic alterations.

Acknowledgments

We thank the staff of the PPF ASB platform of the University François-Rabelais of Tours, France, for technical assistance.

Author contribution

S.M, C.R, B.M, E.C, P.E, P.V, CR. A, and H.B conceived the experiments and wrote the manuscript. H.B and S.M. directed the project. B.M, F.P, S.M, E.C and C.R performed experiments. L.ND performed NMR analysis.

Conflict of interest statement

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

REFERENCES

Aebischer J, Cassina P, Otsmane B, Moumen A, Seilhean D, Meininger V, Barbeito L, Pettmann B, Raoul C. 2011. IFN γ triggers a LIGHT-dependent selective death of motoneurons contributing to the non-cell-autonomous effects of mutant SOD1. *Cell Death Differ* 18:754-68.

Almad AA, Doreswamy A, Gross SK, Richard JP, Huo Y, Haughey N, Maragakis NJ. 2016. Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 64:1154-69.

Arima H, Omura T, Hayasaka T, Masaki N, Hanada M, Xu D, Banno T, Kobayashi K, Takeuchi H, Kadomatsu K and others. 2015. Reductions of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in the anterior horn of an ALS mouse model. *Neuroscience* 297:127-36.

Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V, Group tARS. 1994. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 330:585-591.

Blasco H, Mavel S, Corcia P, Gordon PH. 2014. The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr Med Chem* 21:3551-75.

Blasco H, Patin F, Madji Hounoum B, Gordon PH, Vourc'h P, Andres CR, Corcia P. 2016. Metabolomics in amyotrophic lateral sclerosis: how far can it take us? *Eur J Neurol* 23:447-54.

Bouzier-Sore AK, Pellerin L. 2013. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front Cell Neurosci* 7:179.

Bowerman M, Salsac C, Coque E, Eiselt E, Deschaumes RG, Brodovitch A, Burkly LC, Scamps F, Raoul C. 2015. Tweak regulates astrogliosis, microgliosis and skeletal muscle atrophy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 24:3440-56.

Brown AM, Ransom BR. 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-71.

Castro MA, Beltrán FA, Brauchi S, Concha II. 2009. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *Journal of Neurochemistry* 110:423-440.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ and others. 2003. Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science* 302:113-117.

D'Alessandro G, Calcagno E, Tartari S, Rizzardini M, Invernizzi RW, Cantoni L. 2011. Glutamate and glutathione interplay in a motor neuronal model of amyotrophic lateral sclerosis reveals altered energy metabolism. *Neurobiol Dis* 43:346-55.

Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.

Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. 2007. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10:608-14.

Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. 2011. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society Reviews* 40:387-426.

Dupuis L, Pradat P-F, Ludolph AC, Loeffler J-P. 2011. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology* 10:75-82.

Ferraiuolo L, Higginbottom A, Heath PR, Barber S, Greenald D, Kirby J, Shaw PJ. 2011. Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134:2627-41.

Gegelashvili G, Schousboe A. 1997. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol* 52:6-15.

Geser F, Brandmeir NJ, Kwong LK, Martinez-Lage M, Elman L, McCluskey L, Xie SX, Lee VM, Trojanowski JQ. 2008. Evidence of multisystem disorder in whole-brain map of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 65:636-41.

Guzmán M, Blázquez C. 2001. Is there an astrocyte–neuron ketone body shuttle? *Trends in Endocrinology & Metabolism* 12:169-173.

Harlan BA, Pehar M, Sharma DR, Beeson G, Beeson CC, Vargas MR. 2016. Enhancing NAD⁺ Salvage Pathway Reverts the Toxicity of Primary Astrocytes Expressing Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked Mutant Superoxide Dismutase 1 (SOD1). *J Biol Chem* 291:10836-46.

Heath PR, Shaw PJ. 2002. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26:438-58.

Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. 2009. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187:761-72.

Kane DA. 2014. Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. *Frontiers in Neuroscience* 8.

Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835-53.

Madji Hounoum B, Blasco H, Emond P, Mavel S. 2016a. Liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry-based cell metabolomics: Experimental design, recommendations, and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 75:118-128.

Madji Hounoum B, Blasco H, Nadal-Desbarats L, Dieme B, Montigny F, Andres CR, Emond P, Mavel S. 2015. Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS. *Anal Bioanal Chem* 407:8861-72.

Madji Hounoum B, Vourc'h P, Romain F, Corcia P, Patin F, Gueguinou M, Potier-cartereau M, VANDIER C, Raoul C, Andres C and others. 2016b. NSC-34 motor neuron-like cells are unsuitable as experimental model for glutamate-mediated excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10.

Martinez BA. 2012. Lactate-starved neurons in ALS. *Dis Model Mech* 5:711-2.

Massucci FA, DiNuzzo M, Giove F, Maraviglia B, Castillo IP, Marinari E, De Martino A. 2013. Energy metabolism and glutamate-glutamine cycle in the brain: a stoichiometric modeling perspective. *BMC Syst Biol* 7:103.

Mavel S, Nadal-Desbarats L, Blasco H, Bonnet-Brilhault F, Barthélémy C, Montigny F, Sarda P, Laumonnier F, Vourc'h P, Andres CR and others. 2013. 1H – ^{13}C NMR-based urine metabolic profiling in autism spectrum disorders. *Talanta* 114:95-102.

McKenna MC. 2012. Substrate competition studies demonstrate oxidative metabolism of glucose, glutamate, glutamine, lactate and 3-hydroxybutyrate in cortical astrocytes from rat brain. *Neurochem Res* 37:2613-26.

Moore C, Perry ACF, Love S, Hall L. 1996. Sequence analysis and immunolocalisation of phosphatidylethanolamine binding protein (PBP) in human brain tissue. *Molecular Brain Research* 37:74-78.

Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. 2002. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* 1:153-61.

Papadeas ST, Kraig SE, O'Banion C, Lepore AC, Maragakis NJ. 2011. Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17803-8.

Patin F, Baranek T, Vourc'h P, Nadal-Desbarats L, Goossens JF, Marouillat S, Dessein AF, Descat A, Hounoum BM, Bruno C and others. 2016. Combined Metabolomics and Transcriptomics Approaches to Assess the IL-6 Blockade as a Therapeutic of ALS: Deleterious Alteration of Lipid Metabolism. *Neurotherapeutics*.

Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55:1251-62.

Pellerin L, Magistretti PJ. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-9.

Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ. 1998. Evidence Supporting the Existence of an Activity-Dependent Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle. *Developmental Neuroscience* 20:291-299.

Pellerin L, Stolz M, Sorg O, Martin J-L, Deschepper CF, Magistretti PJ. 1997. Regulation of energy metabolism by neurotransmitters in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line. *Glia* 21:74-83.

Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. 2002. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067-83.

Rojas F, Cortes N, Abarzua S, Dyrda A, van Zundert B. 2014. Astrocytes expressing mutant SOD1 and TDP43 trigger motoneuron death that is mediated via sodium channels and nitroxidative stress. *Front Cell Neurosci* 8:24.

Rosen DR. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364:362.

Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. 1990. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28:18-25.

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73-84.

Silva-Adaya D, Perez-De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernandez J, Binienda Z, Ali SF, Santamaria A. 2008. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem* 105:677-89.

Staats KA, Van Den Bosch L. 2009. Astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis: direct effects on motor neuron survival. *Journal of Biological Physics* 35:337-346.

Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC. 1997. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* 17:932-40.

Tani H, Dulla CG, Farzampour Z, Taylor-Weiner A, Huguenard JR, Reimer RJ. 2014. A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release. *Neuron* 81:888-900.

Tasseva G, Bai HD, Davidescu M, Haromy A, Michelakis E, Vance JE. 2013. Phosphatidylethanolamine Deficiency in Mammalian Mitochondria Impairs Oxidative Phosphorylation and Alters Mitochondrial Morphology. *Journal of Biological Chemistry* 288:4158-4173.

Van Den Bosch L, Robberecht W. 2008. Crosstalk between astrocytes and motor neurons: what is the message? *Exp Neurol* 211:1-6.

Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1068-82.

Volonte C, Apolloni S, Parisi C, Amadio S. 2016. Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology* 104:180-93.

Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK. 2013. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat Protocols* 8:17-32.

Westerhuis JA, van Velzen EJ, Hoefsloot HC, Smilde AK. 2010. Multivariate paired data analysis: multilevel PLSDA versus OPLSDA. *Metabolomics* 6:119-128.

Wuolikainen A, Jonsson P, Ahnlund M, Antti H, Marklund SL, Moritz T, Forsgren L, Andersen PM, Trupp M. 2016. Multi-platform mass spectrometry analysis of the CSF and plasma metabolomes of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. *Mol Biosyst* 12:1287-98.

Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. 2015. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res* 43:W251-7.

III. Discussion & conclusion

De nombreuses études ont suggéré que la SLA serait une conséquence des perturbations des interactions bilatérales entre les motoneurones et les astrocytes. Ces études ont également révélé l'importance et la complexité de ces interactions entre les deux types cellulaires, toutefois il est difficile de déterminer les mécanismes par lesquels les astrocytes interfèrent dans le fonctionnement et/ou la survie des motoneurones *in vivo*. D'autre part, l'utilisation des modèles *in vitro* pour étudier les effets fonctionnels pourrait être une alternative même s'ils ne représentent pas parfaitement les conditions *in situ*. Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle *in vitro* (co-culture astrocyte-motoneurone) et suggérons que les altérations métaboliques cérébrales pourraient jouer un rôle crucial dans la pathogénèse de la mort des motoneurones et particulièrement au travers des modifications du métabolisme des astrocytes. Afin de comprendre ces altérations métaboliques dans les astrocytes, nous avons utilisé l'approche métabolomique pour explorer le métabolome intracellulaire des astrocytes et le métabolome extracellulaire. Nous nous sommes principalement intéressés aux effets de la mutation *SOD1*, de la présence des motoneurones sauvages et à l'excitotoxicité induite par le glutamate sur le métabolisme des co-cultures primaires astrocyte-motoneurone en utilisant une approche métabolomique. Pour évaluer la pertinence de notre modèle *in vitro*, nous avons comparé nos résultats avec des données d'une précédente étude de métabolomique réalisée dans notre équipe sur un modèle murin de la SLA (Patin et al. 2016) ainsi que les données de la littérature concernant des résultats cliniques.

III.1. Choix de la méthodologie expérimentale

III.1.1. Modèle cellulaire

Pour la mise au point du modèle cellulaire de cette étude, nous avons utilisé les cultures primaires d'astrocytes portant ou non la copie humaine de la mutation *SOD1* et des motoneurones sauvages. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux astrocytes car nous cherchons à étudier l'influence du glutamate sur le métabolisme des astrocytes dans les conditions de la SLA. Sachant que les motoneurones ont un impact sur les astrocytes, nous avons choisi de faire la co-culture pour préserver un environnement le plus proche possible des conditions *in situ*. Bien que l'idéal serait d'avoir également des motoneurones portant la mutation *SOD1*^{G93A}, cette première étude de modèle de co-culture avec les motoneurones

sauvages est suffisante pour étudier la neurotoxicité des astrocytes dans la SLA. En effet, il a été montré que la neurotoxicité des astrocytes sur les motoneurones dans la SLA est indépendante de la présence de la mutation *SOD1* dans les motoneurones (Di Giorgio et al. 2007; Ferraiuolo et al. 2011; Nagai et al. 2007).

Nous avons choisi le modèle génétique *SOD1*^{G93A} car la mutation du gène *SOD1* est la principale base des modèles dans la SLA. Elle est la plus décrite dans la littérature même si elle ne reflète qu'une petite fraction (1 à 2%) des cas de la SLA. Les souris transgéniques *SOD1*^{G93A} représentent le modèle murin de la SLA le plus utilisé et considéré comme étant le modèle standard pour étudier les mécanismes étiologiques de la maladie et réaliser des tests thérapeutiques (Gurney 1997). Comme chez les patients atteints de la SLA, aucun autre agent thérapeutique autre que le riluzole n'a montré une efficacité clinique sur les souris transgéniques *SOD1*^{G93A} (Scott et al. 2008). Dans cette étude, nous avons réalisé des mono- et co-cultures d'astrocytes et de motoneurones primaires. Pour la co-culture, nous avons donc privilégié l'utilisation du système d'insert Transwell® pour la co-culture car il a été précédemment montré (Ferraiuolo et al. 2011; Veyrat-Durebex et al. 2015) que ce système permettait de séparer physiquement les deux types cellulaires mais autorise le passage des facteurs solubles à travers la membrane poreuse. Ce système est très utile pour les analyses métabolomiques car il permet et facilite l'échantillonnage de chaque type cellulaire séparément et de pouvoir ainsi analyser le métabolome de chacun. L'inconvénient majeur à l'utilisation des cultures primaires pour les études métabolomiques est le nombre limité de cellules obtenues et donc les concentrations des métabolites intracellulaires extraits de ces cultures primaires sont à la limite de sensibilité de certaines techniques analytiques telles que la RMN ou la GC-MS. Pour pallier cet inconvénient, nous avons développé des méthodes de préparation et d'analyse du métabolome intracellulaire sur des petites quantités de cellules (100 000 à 500 000 cellules) en LC-HRMS qui est la méthode la plus sensible à notre disposition.

III.1.2. Techniques analytiques

L'approche métabolomique nous a permis d'explorer à la fois l'endométabolome (correspondant à l'ensemble des métabolites intracellulaires) et l'exométabolome (représentant l'ensemble des métabolites présents dans le milieu extracellulaire et reflétant au mieux les échanges cellulaires avec l'environnement). Nous avons choisi la RMN pour l'analyse des milieux de culture, car ces milieux sont très riches et donc facilement détectables en RMN et donnent suffisamment de signaux pour l'exploitation des données. Cependant, la RMN ne

détecte que très peu de métabolites (environ 23 métabolites identifiés dans notre cas), il serait donc intéressant de mettre au point l'analyse du milieu extracellulaire par LC-HRMS pour détecter plus de métabolites. En raison du faible rendement des cultures primaires (environ 100 000 cellules par échantillon pour les astrocytes) pour l'analyse du métabolome intracellulaire, le choix était porté sur la LC-HRMS qui est plus sensible.

Pour s'assurer de la bonne reproductibilité des expériences, nous avons utilisé les mêmes lots de produits pour toutes les expériences. Pour chaque type cellulaire, nous avons utilisé des cellules provenant des embryons de la même portée et toutes les cultures ont été réalisées au même moment afin d'introduire le moins de biais possible dans les différentes conditions de l'étude (Madji Hounoum et al. 2016a). Pour la préparation et l'analyse des cultures cellulaires nous avons utilisé la méthodologie mise au point au début de mes travaux de thèse (Madji Hounoum et al. 2015).

Bien que les cellules aient la même origine et soient cultivées dans les mêmes conditions, elles ne répondent pas de manière homogène au stress. De manière générale, les études métabolomiques sont faites sur des mélanges de cellules et ne permettent donc pas d'identifier des mécanismes moléculaires spécifiques des différents phénotypes dans la population cellulaire. Depuis quelques années l'étude métabolomique de la cellule unique est rendue possible grâce au progrès technologiques en spectrométrie de masse (Masujima 2009; Tsuyama et al. 2012). Dans le cas de notre étude, une telle technologie nous permettrait d'obtenir une empreinte métabolique de l'hétérogénéité phénotypique de la population des astrocytes et des motoneurones dans les conditions de la SLA et la répartition des métabolites dans les différents compartiments cellulaires.

III.2. Altérations observées du métabolisme des astrocytes

III.2.1. Influence de la mutation *SOD1*^{G93A} sur le métabolisme des astrocytes

Nous avons analysé pour la première fois de manière globale les modifications métaboliques dans les astrocytes induites par l'expression de la mutation *SOD1*^{G93A}. Nous avons observé que l'expression de la mutation *SOD1*^{G93A} dans les astrocytes entraîne un changement important du profil métabolique des astrocytes et met en évidence une altération importante de plusieurs

métabolites (intra- et extra-cellulaires) induite par l'expression de la *SOD1*^{G93A} dans les astrocytes.

Nous avons observé une réduction de la quantité de glutathion dans les astrocytes exprimant la mutation *SOD1*^{G93A}. Le glutathion joue un rôle important dans la défense antioxydante car il est le substrat de la glutathion peroxydase, enzyme clé dans la réduction du peroxyde d'hydrogène libre pouvant être produit par la protéine *SOD1*. Plusieurs études ont montré que l'expression de la mutation *SOD1* dans les astrocytes est un facteur majeur dans l'apparition et la progression de la maladie (Boillee et al. 2006; Garcia-Escudero et al. 2015; Ilieva et al. 2009). En effet, il a été rapporté que les astrocytes pourraient protéger les motoneurones du stress oxydant en sécrétant du glutathion (Vargas and Johnson 2010). La diminution de la quantité de glutathion observée dans les astrocytes portant la mutation *SOD1*^{G93A} suggère que cette mutation induirait une diminution du pouvoir antioxydant des astrocytes. Nous avons également observé une diminution de la quantité de lactate et du 3-hydroxybutyrate extracellulaire dans la culture des astrocytes portant la mutation *SOD1*^{G93A} comparé aux sauvages. Ce résultat est cohérent avec les analyses de transcrit réalisée par Ferraiuolo et ses collaborateurs qui avaient montré une réduction de l'expression du transporteur des monocarboxylate (MCT) dans les astrocytes isolées des souris transgéniques *SOD1*^{G93A} et également dans les astrocytes isolés des patients SLA (Ferraiuolo et al. 2011). Ainsi, nous suggérons donc que la réduction de la quantité de lactate et du 3-hydroxybutyrate dans le milieu extracellulaire pourrait être liée à une faible sécrétion à cause du faible taux de transcrit de leur transporteur (MCT) dans les astrocytes *SOD1*^{G93A}. Ceci pourrait expliquer le défaut d'apport énergétique des astrocytes aux motoneurones suggéré dans la SLA.

III.2.2. Influence des motoneurones sauvages sur le métabolisme des astrocytes *SOD1*^{G93A}

Nous avons voulu évaluer l'influence des motoneurones sur les astrocytes *SOD1*^{G93A} au niveau métabolique. Dans cette étude, nous avons observé des profils métaboliques très différents entre les astrocytes *SOD1*^{G93A} cultivés seuls et ceux en co-culture avec les motoneurones sauvages. Nous avons observé une augmentation de la quantité du glutamate et de la glutamine dans les astrocytes *SOD1*^{G93A} en co-culture comparé aux astrocytes *SOD1*^{G93A} cultivés seuls. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la présence des motoneurones pourrait réguler l'expression des transporteurs du glutamate au niveau des astrocytes et favorisant ainsi une

augmentation de la capture du glutamate et par conséquent une augmentation de la production de la glutamine par la glutamine synthétase (enzyme spécifique des astrocytes) (Magistretti 2009). Il a été rapporté que la co-culture astrocyte-neurone induisait l'expression du transporteur du glutamate (GLT1/EAAT2) et augmentait la quantité du transporteur glutamate/aspartate (GLAST/EAAT1) dans les astrocytes (Gegelashvili and Schousboe 1997; Swanson et al. 1997).

Nous avons également observé dans les astrocytes *SOD1*^{G93A} en co-culture, une augmentation de la quantité de plusieurs métabolites impliqués dans la voie métabolique des pyrimidines et des purines, notamment l'adénosine monophosphate (AMP) et sa forme cyclique (AMPc), l'adénosine et l'inosine qui dérivent tous les uns des autres, ainsi que l'uridine et l'uridine monophosphate (UMP). Ces molécules jouent des rôles divers dans les cellules et sont utilisées comme des molécules énergétiques (participe à la synthèse de l'ATP) et sont des éléments clé de la transduction de certains signaux (AMPc). Il a été rapporté que la quantité d'adénosine dans les synapses était majoritairement régulée par les astrocytes (Martin et al. 2007). Dans les conditions physiologiques, les astrocytes libèrent l'ATP qui est ensuite hydrolysé en adénosine dans le milieu extracellulaire. L'adénosine joue un rôle crucial dans la neurotransmission, car elle inhibe l'excitabilité neuronale et protège ainsi les neurones de l'hyperexcitabilité. L'adénosine exerce cette propriété inhibitrice en agissant sur les récepteurs d'adénosine pré- et post synaptiques et de ce fait elle est considérée comme étant un neuromodulateur (Pascual et al. 2005). L'augmentation de la quantité de ces intermédiaires de la voie purinergique (AMP, AMPc, adénosine et l'inosine) dans les astrocytes en présence des motoneurones conforte l'hypothèse que les astrocytes soient étroitement liés à la régulation de l'activité neuronale au travers des interactions synaptiques et qu'ils représentent un support énergétique majeur pour les motoneurones (Bouzier-Sore and Pellerin 2013; Brown and Ransom 2007; Pellerin et al. 2007).

Ces résultats montrent un impact important de la présence des motoneurones sur le métabolisme des astrocytes même s'il n'y a pas de contact direct entre les deux types cellulaires. Ceci met en évidence les interactions métaboliques astrocyte-motoneurone probablement *via* le milieu extracellulaire. Nous suggérons dans cette étude que la co-culture astrocyte-motoneurone et particulièrement la présence des motoneurones est nécessaire pour explorer les altérations métaboliques dans les astrocytes dans le contexte de la SLA.

III.2.3. Influence du glutamate sur le métabolisme des astrocytes *SOD1*^{G93A} en co-culture avec les motoneurones sauvages

Nous avons également cherché à savoir si le glutamate affecte de la même manière les astrocytes sauvages et *SOD1*^{G93A} en co-culture avec les motoneurones sauvages. Nous avons observé que les astrocytes répondaient différemment au glutamate en fonction de leur statut génétique. Les astrocytes portant la mutation *SOD1*^{G93A} semblent être plus sensibles au glutamate comparé aux astrocytes sauvages. De plus, les métabolites discriminants les astrocytes traités et non traités au glutamate sont très différents lorsqu'il s'agit des astrocytes sauvages ou des astrocytes portant la mutation *SOD1*^{G93A} (excepté l'uridine qu'on retrouve dans les deux cas). Nous avons observé une diminution du lactate, de la créatine, de la créatinine, de la déoxycartine et la L-acétylcarnitine, et une augmentation du glutamate dans les astrocytes portant la mutation *SOD1*^{G93A} et traités au glutamate comparés à ceux non traités. La diminution de ces métabolites énergétiques pourrait être associée à une dysfonction mitochondriale (Cassina et al. 2008). Cette étude nous a permis de montrer que le glutamate affecte particulièrement le métabolisme énergétique des astrocytes lorsque ceux-ci portent la mutation *SOD1*^{G93A}.

III.2.4. Altérations du métabolisme des astrocytes dans les conditions de la SLA

Nous avons analysé le profil métabolique des astrocytes dans des conditions de la SLA (l'expression de la mutation *SOD1*^{G93A}, la présence des motoneurones et l'exposition au glutamate). Nous avons observé plusieurs voies métaboliques modifiées qui confortent les différentes hypothèses physiopathologiques décrites dans la SLA, par exemple : l'excitotoxicité avec l'altération des taux de glutamate et glutamine dans les astrocytes, le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant avec la dérégulation de la déoxycarnitine, la carnitine et de l'acétylcarnitine connus pour leur rôle énergétique et leur pouvoir antioxydant. Nous avons mis en évidence une diminution du lactate intra- et ex-tracellulaire dans les astrocytes en condition de la SLA, ce résultat vient appuyer l'hypothèse de la dérégulation de la navette du lactate décrite dans la SLA. Le lactate est un produit glycolytique connu pour être une source énergétique importante pour le métabolisme des motoneurones, et, les astrocytes sont les principaux fournisseurs de ce substrat (Pellerin and Magistretti 1994). Il s'avère que les motoneurones stimulent la glycolyse dans les astrocytes en libérant du glutamate. Le glutamate libéré est alors capturé par les astrocytes *via* la pompe Na⁺/K⁺-ATPase qui consomme de l'ATP

grâce à la phosphoglycérate Kinase (Pgk). Ceci déclenche l'absorption du glucose et de son métabolisme *via* la glycolyse dans les astrocytes, conduisant ensuite à la libération du lactate par les astrocytes. Le lactate peut alors servir à répondre aux besoins énergétiques des motoneurones associés à la transmission synaptique (Pellerin et al. 2007).

Nous avons comparé les métabolites modifiés dans les astrocytes en condition de la SLA avec ceux identifiés comme étant modifiés dans le modèle murin de la SLA ainsi que chez les patients atteints de la SLA. Nous avons trouvé que plusieurs métabolites modifiés étaient communs (confortant ainsi les résultats de notre modèle et de notre étude) et nous avons également identifié de nouveaux métabolites modifiés non identifiés encore chez les patients SLA tels que la carnitine, la L-acétylcarnitine, la deoxycarnitine, l'AMPc, l'uridine, la diéthanolamine, *etc.* Ceci pourrait apporter de nouvelles pistes d'études en ce qui concerne les altérations métaboliques dans la SLA. Il serait donc intéressant de vérifier les quantités de ces nouveaux métabolites modifiés identifiés dans notre modèle *in vitro* dans des études cliniques chez l'homme pour confirmer leur dérégulation dans la SLA. Cette étude nous a permis de montrer que le modèle *in vitro* de coculture astrocytes-motoneurone primaires est utilisable pour répondre à des questions, vérifier et/ou émettre des hypothèses étiologiques de la SLA.

Conclusions & perspectives

Conclusions & perspectives

Dans la perspective d'étudier les altérations métaboliques associées au glutamate dans la SLA, nous avons choisi dans un premier temps de mettre au point un modèle *in vitro* à partir des astrocytes et de motoneurones primaires et d'analyser les modifications métaboliques dans les astrocytes induites par différentes conditions (facteur génétique, stress glutamatergique) associées à la SLA.

La première partie de ce travail est consacrée à la mise au point de la méthodologie d'analyse du métabolome cellulaire par RMN, GC-MS et LC-HRMS, méthodologie qui devrait être développée pour toute nouvelle matrice étudiée en métabolomique. La méthode de « quenching » des cellules avec du méthanol à -40°C améliore la répétabilité d'extraction comparativement au « quenching » au méthanol à -20°C ou encore sans méthanol à -80°C. Ensuite, l'extraction des métabolites en utilisant le mélange de solvant diphasique CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (3 :3 :2) est la méthode la plus reproductible même si elle ne permet pas l'extraction du plus grand nombre de métabolites. Cette étude nous a permis de montrer que la dérivation des métabolites par la méthode d'oximation suivie par une méthode de silylation est la plus efficace et reproductible pour les analyses des extraits cellulaires en GC-MS. Nous avons également optimisé le gradient d'élution et la stabilisation du système pour l'analyse du métabolome cellulaire en LC-HRMS avec un coefficient de variation moyen des QC inférieur à 20%.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à l'invalidation de la lignée cellulaire hybride (motoneurone-neuroblastome) NSC-34 comme modèle *in vitro* pour l'étude de l'excitotoxicité au glutamate. Cette partie nous a permis de montrer que malgré les nombreuses caractéristiques motoneuronales que possèdent les cellules NSC-34, elles présentent un profil de transcrit des sous unités des récepteurs du glutamate différent de celui des motoneurones et par conséquent elles sont beaucoup moins sensibles au glutamate que les motoneurones primaires. Cette étude montre l'importance de l'étape de validation d'un modèle *in vitro* avant son utilisation dans une étude car elle permet de juger la pertinence du modèle et la robustesse des résultats qu'on pourrait obtenir à partir du modèle. Cette partie du travail nous a conduit à changer de modèle cellulaire et d'opter pour les cultures primaires pour la suite de notre projet.

Enfin, la troisième partie de ce travail rapporte l'analyse du métabolome intracellulaire et extracellulaire des astrocytes portant la mutation *SOD1*^{G93A} (ou non) dans différentes conditions associées à la SLA. Cette étude nous a permis de montrer qu'il est important d'étudier les altérations du métabolisme dans la SLA en mimant le plus possible l'environnement complexe

d'interactions entre les astrocytes et les motoneurons dans le SNC. Nous avons mis en évidence les perturbations métaboliques dans les astrocytes induites par l'expression de la mutation *SOD1*^{G93A}, par la présence des motoneurons sauvages et par l'exposition au glutamate, mais aussi par l'effet cumulé de ces trois conditions qui représente une condition SLA. L'approche métabolomique nous a permis de montrer une diminution de la quantité de lactate à la fois dans le métabolome intra- et extracellulaire des astrocytes dans la condition SLA et de confirmer ainsi l'hypothèse de la dérégulation de la navette du lactate entre les astrocytes et les motoneurons décrite dans la SLA. Nous avons observé que la plupart des voies métaboliques perturbées dans les astrocytes en condition de SLA étaient identiques à celles décrites dans un modèle murin et chez des patients atteints de la SLA. Ce qui nous laisse supposer que même si, ces résultats *in vitro* ne sont pas transposables au modèle *in vivo* et à l'homme, le modèle de co-culture astrocyte-motoneurone permet néanmoins de mieux comprendre les altérations métaboliques associées au glutamate dans chaque type cellulaire dans la SLA et représente donc un modèle pertinent pour ce type d'expériences.

L'obtention d'une image complète des voies biochimiques qui sont modifiées dans les astrocytes et les motoneurons et l'identification du stade de la maladie auquel ces changements se produisent représentent un défi intéressant, qui peut aider à la compréhension de la physiopathologie de la SLA et à l'identification des cibles thérapeutiques pour une prise en charge à un stade précoce de la maladie.

Perspectives

Dans un deuxième temps, et cette activité est en cours de traitement, nous étudierons en suivant une démarche analogue à celle présentée dans ce travail de thèse, les altérations métaboliques dans les motoneurons sauvages induites par la présence des astrocytes portant ou non la mutation *SOD1*^{G93A} et par l'exposition au glutamate, ainsi que l'effet cumulé des deux traitements mimant la condition SLA. Sachant que le gène *SOD1* ne représente qu'une faible partie de la population SLA, il serait intéressant d'étudier par la même méthodologie les trois autres gènes couramment impliqués dans la SLA qui sont la *TDP-43*, *C9orf72* et *FUS* et déterminer s'il existe une signature métabolique commune associée au glutamate.

L'objectif principal de cette recherche est d'analyser, de manière quantitative, le métabolisme du glutamate dans chacun des types cellulaires afin de mieux comprendre les altérations métaboliques associées au glutamate dans la SLA et proposer des hypothèses thérapeutiques.

Aux expériences de faisabilité rapportées dans ce travail de thèse, montrant que l'approche métabolomique est utilisable sur des cultures primaires des astrocytes et des motoneurons pour ce type d'étude, succéderont des expériences où l'analyse quantitative des flux métaboliques pourra être réalisée sur ce modèle cellulaire. Pour ce faire, la mise au point de la méthodologie d'analyse de flux par RMN et LC-MS est en cours d'élaboration au laboratoire en collaboration avec la plateforme MetaToul à Toulouse. Cette mise au point sera suivie par le développement d'un modèle mathématique qui permettrait d'évaluer la taille des pools de glutamate et des intermédiaires du métabolisme du glutamate dans les différents compartiments cellulaires. En parallèle, nous envisageons d'analyser en temps réel les deux principales voies productrices d'énergie que sont la respiration mitochondriale et la glycolyse dans les types cellulaires en utilisant les analyseurs métaboliques de Seahorse Bioscience et en la collaboration avec le Pr Hérault (GICC) à Tours.

A long terme, et sur la base de toutes les données des expériences citées ci-dessus, il serait intéressant d'effectuer des études transcriptomique et protéomique ciblant les différentes voies métaboliques identifiées comme modifiées afin de dresser un tableau plus complet des perturbations des interactions métaboliques entre les astrocytes et les motoneurons et d'avancer des hypothèses physiopathologiques et thérapeutiques fiables et robustes. Ces hypothèses pourraient être validées en mesurant directement l'activité des enzymes impliquées dans les voies ciblées. Le prolongement naturel de cette recherche serait de tester les différentes hypothèses et de réaliser les expérimentations pharmacologiques sur des modèles murins. En fonction des hypothèses thérapeutiques émises, plusieurs stratégies pharmacologiques pourraient être envisagées : soit administrer directement les métabolites en carence tels que les acides aminés, soit inhiber ou booster l'action de certaines enzymes responsables des dérégulations métaboliques par des anticorps ou des cofacteurs respectivement, ou encore détourner une voie métabolique au profit d'une autre (ceci grâce à l'outil de modélisation du flux). Il serait également intéressant de rechercher ces altérations métaboliques identifiées dans le cerveau (ou dans les cellules du SNC) dans d'autres matrices telles que le sang ou le muscle (protocole d'analyse en cours d'élaboration dans le laboratoire), ceci permettrait d'intervenir soit par voie orale, soit par injection intraveineuse ou encore intramusculaire et donc pas besoin ainsi d'avoir à accéder au cerveau. Et l'objectif final serait de mener des études cliniques sur l'homme sur la base des données des expérimentations pharmacologiques obtenues dans les modèles murins.

Bibliographie

Bibliographie

Bibliographie

- Aebischer J, Cassina P, Otsmane B, Moumen A, Seilhean D, Meininger V, Barbeito L, Pettmann B, Raoul C. 2011. IFN γ triggers a LIGHT-dependent selective death of motoneurons contributing to the non-cell-autonomous effects of mutant SOD1. *Cell Death Differ* 18:754-68.
- Aggarwal SP, Zinman L, Simpson E, McKinley J, Jackson KE, Pinto H, Kaufman P, Conwit RA, Schoenfeld D, Shefner J and others. 2010. Safety and efficacy of lithium in combination with riluzole for treatment of amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 9:481-8.
- Al-Chalabi A, Hardiman O. 2013. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* 9:617-628.
- Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ. 2011. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 34:76-87.
- Almad AA, Doreswamy A, Gross SK, Richard JP, Huo Y, Haughey N, Maragakis NJ. 2016. Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 64:1154-69.
- Almer G, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, Hays AP, Chen C, Przedborski S. 2001. Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 49:176-85.
- Andersen PM. 2004. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Suppl Clin Neurophysiol* 57:211-27.
- Anneser JM, Horstmann S, Weydt P, Borasio GD. 1998. Activation of metabotropic glutamate receptors delays apoptosis of chick embryonic motor neurons in vitro. *Neuroreport* 9:2039-43.
- Argyriou AA, Polychronopoulos P, Papapetropoulos S, Ellul J, Andriopoulos I, Katsoulas G, Salakou S, Chroni E. 2005. Clinical and epidemiological features of motor neuron disease in south-western Greece. *Acta Neurol Scand* 111:108-13.
- Arima H, Omura T, Hayasaka T, Masaki N, Hanada M, Xu D, Banno T, Kobayashi K, Takeuchi H, Kadomatsu K and others. 2015. Reductions of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in the anterior horn of an ALS mouse model. *Neuroscience* 297:127-36.
- Attwell D, Laughlin SB. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1133-45.
- Avemaria F, Lunetta C, Tarlarini C, Mosca L, Maestri E, Marocchi A, Melazzini M, Penco S, Corbo M. 2011. Mutation in the senataxin gene found in a patient affected by familial ALS with juvenile onset and slow progression. *Amyotroph Lateral Scler* 12:228-30.
- Bach JR. 2002. Amyotrophic lateral sclerosis: prolongation of life by noninvasive respiratory AID. *Chest* 122:92-8.
- Barber SC, Shaw PJ. 2010. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* 48:629-41.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH. 2008. CD4⁺ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15558-63.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Huang A, Wen S, Liao B, Appel SH. 2011. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134:1293-314.
- Beghi E, Pupillo E, Bonito V, Buzzi P, Caponnetto C, Chio A, Corbo M, Giannini F, Inghilleri M, Bella VL and others. 2013. Randomized double-blind placebo-controlled trial of acetyl-L-carnitine for ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14:397-405.

Bibliographie

- Bellingham MC. 2011. A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade? *CNS Neurosci Ther* 17:4-31.
- Benkler C, Ben-Zur T, Barhum Y, Offen D. 2013. Altered astrocytic response to activation in SOD1(G93A) mice and its implications on amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Glia* 61:312-26.
- Benmohamed R, Arvanites AC, Kim J, Ferrante RJ, Silverman RB, Morimoto RI, Kirsch DR. 2011. Identification of compounds protective against G93A-SOD1 toxicity for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 12:87-96.
- Benoit E, Escande D. 1991. Riluzole specifically blocks inactivated Na channels in myelinated nerve fibre. *Pflugers Arch* 419:603-9.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 330:585-91.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V, Group tARS. 1994. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 330:585-591.
- Berry JD, Shefner JM, Conwit R, Schoenfeld D, Keroack M, Felsenstein D, Krivickas L, David WS, Vriesendorp F, Pestronk A and others. 2013. Design and initial results of a multi-phase randomized trial of ceftriaxone in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 8:e61177.
- Bettler B, Mulle C. 1995. Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34:123-39.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. 1973. Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Research* 33:2643-2652.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38:3751-7.
- Bilsland LG, Nirmalananthan N, Yip J, Greensmith L, Duchen MR. 2008. Expression of mutant SOD1 in astrocytes induces functional deficits in motoneuron mitochondria. *J Neurochem* 107:1271-83.
- Blasco H, Corcia P, Moreau C, Veau S, Fournier C, Vourc'h P, Emond P, Gordon P, Pradat PF, Praline J and others. 2010. 1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 5:e13223.
- Blasco H, Corcia P, Pradat PF. 2014a. [What are the applications of biomarkers in ALS today?]. *Presse Med* 43:569-79.
- Blasco H, Corcia P, Pradat PF, Bocca C, Gordon PH, Veyrat-Durebex C, Mavel S, Nadal-Desbarats L, Moreau C, Devos D and others. 2013. Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. *J Proteome Res* 12:3746-54.
- Blasco H, Mavel S, Corcia P, Gordon PH. 2014b. The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr Med Chem* 21:3551-75.
- Blasco H, Nadal-Desbarats L, Pradat PF, Gordon PH, Madji Hounoum B, Patin F, Veyrat-Durebex C, Mavel S, Beltran S, Emond P and others. 2016a. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: combining metabolomic and clinical parameters to define disease progression. *Eur J Neurol* 23:346-53.
- Blasco H, Patin F, Andres CR, Corcia P, Gordon PH. 2016b. Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2016: existing therapies and the ongoing search for neuroprotection. *Expert Opin Pharmacother*:1-14.
- Blasco H, Patin F, Madji Hounoum B, Gordon PH, Vourc'h P, Andres CR, Corcia P. 2016c. Metabolomics in amyotrophic lateral sclerosis: how far can it take us? *Eur J Neurol* 23:447-54.

Bibliographie

- Blasco H, Vourc'h P, Pradat PF, Gordon PH, Andres CR, Corcia P. 2016d. Further development of biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Mol Diagn* 16:853-68.
- Bogaert E, d'Ydewalle C, Van Den Bosch L. 2010. Amyotrophic lateral sclerosis and excitotoxicity: from pathological mechanism to therapeutic target. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:297-304.
- Bogdanov M, Brown RH, Matson W, Smart R, Hayden D, O'Donnell H, Flint Beal M, Cudkowicz M. 2000. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic Biol Med* 29:652-8.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312:1389-92.
- Bonansco C, Couve A, Perea G, Ferradas CA, Roncagliolo M, Fuenzalida M. 2011. Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* 33:1483-92.
- Borchelt DR, Lee MK, Slunt HS, Guarnieri M, Xu ZS, Wong PC, Brown RH, Jr., Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW. 1994. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8292-6.
- Borthwick GM, Taylor RW, Walls TJ, Tonska K, Taylor GA, Shaw PJ, Ince PG, Turnbull DM. 2006. Motor neuron disease in a patient with a mitochondrial tRNA^{Ile} mutation. *Ann Neurol* 59:570-4.
- Bouzier-Sore AK, Pellerin L. 2013. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front Cell Neurosci* 7:179.
- Bowerman M, Salsac C, Coque E, Eiselt E, Deschaumes RG, Brodovitch A, Burkly LC, Scamps F, Raoul C. 2015. Tweak regulates astrogliosis, microgliosis and skeletal muscle atrophy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 24:3440-56.
- Brettschneider J, Toledo JB, Van Deerlin VM, Elman L, McCluskey L, Lee VM, Trojanowski JQ. 2012. Microglial activation correlates with disease progression and upper motor neuron clinical symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7:e39216.
- Brooks BR. 1994. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* 124.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. 2000. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1:293-9.
- Brown AM, Ransom BR. 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-71.
- Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL and others. 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327-38.
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. 1992. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8:189-98.
- Byrne S, Elamin M, Bede P, Shatunov A, Walsh C, Corr B, Heverin M, Jordan N, Kenna K, Lynch C and others. 2012. Cognitive and clinical characteristics of patients with

- amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: a population-based cohort study. *Lancet Neurol* 11:232-40.
- Byrne S, Walsh C, Lynch C, Bede P, Elamin M, Kenna K, McLaughlin R, Hardiman O. 2011. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 82:623-627.
- Cacabelos D, Ramírez-Núñez O, Granado-Serrano AB, Torres P, Ayala V, Moiseeva V, Povedano M, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M. 2016. Early and gender-specific differences in spinal cord mitochondrial function and oxidative stress markers in a mouse model of ALS. *Acta neuropathologica communications* 4:1.
- Camu W, Henderson CE. 1992. Purification of embryonic rat motoneurons by panning on a monoclonal antibody to the low-affinity NGF receptor. *J Neurosci Methods* 44:59-70.
- Carbone M, Duty S, Rattray M. 2012. Riluzole elevates GLT-1 activity and levels in striatal astrocytes. *Neurochem Int* 60:31-8.
- Carri MT, Ferri A, Cozzolino M, Calabrese L, Rotilio G. 2003. Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Res Bull* 61:365-74.
- Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP. 1992. Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn* 194:209-21.
- Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de Leon A, Robinson KM, Mason RP, Beckman JS, Barbeito L and others. 2008. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci* 28:4115-22.
- Castro MA, Beltrán FA, Brauchi S, Concha II. 2009. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *Journal of Neurochemistry* 110:423-440.
- Charcot J-M. 1874. De la sclérose latérale amyotrophique. *Prog Med* 23; 24; 29.
- Chen S, Sayana P, Zhang X, Le W. 2013. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol Neurodegener* 8:28.
- Chiang PM, Ling J, Jeong YH, Price DL, Aja SM, Wong PC. 2010. Deletion of TDP-43 down-regulates Tbc1d1, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16320-4.
- Chio A, Borghero G, Calvo A, Capasso M, Caponnetto C, Corbo M, Giannini F, Logroscino G, Mandrioli J, Marcello N and others. 2010. Lithium carbonate in amyotrophic lateral sclerosis: lack of efficacy in a dose-finding trial. *Neurology* 75:619-25.
- Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, White LA. 2013. Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. *Neuroepidemiology* 41:118-130.
- Chio A, Mora G, Leone M, Mazzini L, Cocito D, Giordana MT, Bottacchi E, Mutani R. 2002. Early symptom progression rate is related to ALS outcome: a prospective population-based study. *Neurology* 59:99-103.
- Cholet N, Pellerin L, Welker E, Lacombe P, Seylaz J, Magistretti P, Bonvento G. 2001. Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:404-12.
- Chow CY, Landers JE, Bergren SK, Sapp PC, Grant AE, Jones JM, Everett L, Lenk GM, McKenna-Yasek DM, Weisman LS and others. 2009. Deleterious Variants of FIG4, a Phosphoinositide Phosphatase, in Patients with ALS. *The American Journal of Human Genetics* 84:85-88.

Bibliographie

- Chowdhury GM, Banasr M, de Graaf RA, Rothman DL, Behar KL, Sanacora G. 2008. Chronic riluzole treatment increases glucose metabolism in rat prefrontal cortex and hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1892-7.
- Cistaro A, Pagani M, Montuschi A, Calvo A, Moglia C, Canosa A, Restagno G, Brunetti M, Traynor BJ, Nobili F and others. 2014. The metabolic signature of C9ORF72-related ALS: FDG PET comparison with nonmutated patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 41:844-52.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ and others. 2003a. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113-7.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boill  e S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ and others. 2003b. Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science* 302:113-117.
- Cleveland DW. 1999. From Charcot to SOD1: Mechanisms of Selective Motor Neuron Death in ALS. *Neuron* 24:515-520.
- Cleveland DW, Rothstein JD. 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2:806-19.
- Collingridge GL, Lester RA. 1989a. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41:143-210.
- Collingridge GL, Lester RA. 1989b. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacological Reviews* 41:143-210.
- Comi GP, Bordoni A, Salani S, Franceschina L, Sciacco M, Prella A, Fortunato F, Zeviani M, Napoli L, Bresolin N and others. 1998. Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol* 43:110-6.
- Corcia P, Blasco H, Camu W. 2014. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Presse Med* 43:555-62.
- Corcia P, Mayeux-Portas V, Khoris J, de Toffol B, Autret A, M  h J-P, Camu W, Andres C, the French ALSRG. 2002a. Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 51:243-246.
- Corcia P, Mayeux-Portas V, Khoris J, de Toffol B, Autret A, Muh JP, Camu W, Andres C. 2002b. Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 51:243-6.
- Corcia P, Valdmanis P, Millecamps S, Lionnet C, Blasco H, Mouzat K, Daoud H, Belzil V, Morales R, Pageot N and others. 2012. Phenotype and genotype analysis in amyotrophic lateral sclerosis with TARDBP gene mutations. *Neurology* 78:1519-26.
- Couratier P, Corcia P, Lautrette G, Nicol M, Preux PM, Marin B. 2016. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Rev Neurol (Paris)* 172:37-45.
- Couratier P, Hugon J, Sindou P, Vallat JM, Dumas M. 1993. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet* 341:265-8.
- Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-95.
- Cozzolino M, Ferri A, Carri MT. 2008. Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications. *Antioxid Redox Signal* 10:405-43.
- Cozzolino M, Ferri A, Valle C, Carri MT. 2013. Mitochondria and ALS: implications from novel genes and pathways. *Mol Cell Neurosci* 55:44-9.
- Cudkovic ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE, Chin W, Geller B, Hayden DL, Schoenfeld DA, Hosler BA, Horvitz HR, Brown RH. 1997. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 41:210-221.

Bibliographie

- Cudkowicz ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, Zhang H, Andreasson KI, Rothstein JD, Drachman DB. 2006. Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 60:22-31.
- Cudkowicz ME, van den Berg LH, Shefner JM, Mitsumoto H, Mora JS, Ludolph A, Hardiman O, Bozik ME, Ingersoll EW, Archibald D and others. 2013. Dexpramipexole versus placebo for patients with amyotrophic lateral sclerosis (EMPOWER): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 12:1059-67.
- Curtis DR, Watkins JC. 1960. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem* 6:117-41.
- D'Alessandro G, Calcagno E, Tartari S, Rizzardini M, Invernizzi RW, Cantoni L. 2011. Glutamate and glutathione interplay in a motor neuronal model of amyotrophic lateral sclerosis reveals altered energy metabolism. *Neurobiol Dis* 43:346-55.
- Dall'Igna OP, Bobermin LD, Souza DO, Quincozes-Santos A. 2013. Riluzole increases glutamate uptake by cultured C6 astroglial cells. *Int J Dev Neurosci* 31:482-6.
- Danbolt NC. 2001a. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Danbolt NC. 2001b. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65:1-105.
- Dangoumau A, Marouillat S, Burlaud Gaillard J, Uzbekov R, Veyrat-Durebex C, Blasco H, Arnoult C, Corcia P, Andres CR, Vourc'h P. 2016. Inhibition of Pathogenic Mutant SOD1 Aggregation in Cultured Motor Neuronal Cells by Prevention of Its SUMOylation on Lysine 75. *Neurodegener Dis* 16:161-71.
- Dangoumau A, Verschueren A, Hammouche E, Papon MA, Blasco H, Cherpi-Antar C, Pouget J, Corcia P, Andres CR, Vourc'h P. 2014. Novel SOD1 mutation p.V31A identified with a slowly progressive form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 35:266.e1-4.
- Daniel B, Green O, Viskind O, Gruzman A. 2013. Riluzole increases the rate of glucose transport in L6 myotubes and NSC-34 motor neuron-like cells via AMPK pathway activation. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14:434-43.
- de Haan JB, Newman JD, Kola I. 1992. Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Brain Res Mol Brain Res* 13:179-87.
- De Meyer T, Sinnaeve D, Van Gasse B, Tsiorkova E, Rietzschel ER, De Buyzere ML, Gillebert TC, Bekaert S, Martins JC, Van Criekinge W. 2008. NMR-based characterization of metabolic alterations in hypertension using an adaptive, intelligent binning algorithm. *Analytical Chemistry* 80:3783-3790.
- Dedic SI, Stevic Z, Dedic V, Stojanovic VR, Milicev M, Lavrnjic D. 2012. Is hyperlipidemia correlated with longer survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis? *Neurol Res* 34:576-80.
- Deflorio C, Palma E, Conti L, Roseti C, Manteca A, Giacomelli E, Catalano M, Limatola C, Inghilleri M, Grassi F. 2012. Riluzole blocks human muscle acetylcholine receptors. *J Physiol* 590:2519-28.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J and others. 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72:245-56.
- Delestree N, Manuel M, Iglesias C, Elbasiouny SM, Heckman CJ, Zytnicki D. 2014. Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 592:1687-703.
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H and others. 2011. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477:211-5.

Bibliographie

- Desport JC, Preux PM, Magy L, Boirie Y, Vallat JM, Beaufriere B, Couratier P. 2001. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr* 74:328-34.
- Desport JC, Torny F, Lacoste M, Preux PM, Couratier P. 2005. Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegener Dis* 2:202-7.
- Devenney E, Hornberger M, Irish M, Mioshi E, Burrell J, Tan R, Kiernan MC, Hodges JR. 2014. Frontotemporal dementia associated with the C9ORF72 mutation: a unique clinical profile. *JAMA Neurol* 71:331-9.
- Devos D, Moreau C, Lassalle P, Perez T, De Seze J, Brunaud-Danel V, Destee A, Tonnel AB, Just N. 2004. Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients. *Neurology* 62:2127-9.
- Dhaliwal GK, Grewal RP. 2000. Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains. *Neuroreport* 11:2507-9.
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. 2007. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10:608-14.
- Dienel GA, Cruz NF. 2006. Astrocyte activation in working brain: energy supplied by minor substrates. *Neurochem Int* 48:586-95.
- Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. 2006. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal Chem* 78:4281-90.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R and others. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321:1218-21.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews* 51:7-62.
- Doble A. 1996. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 47:S233-41.
- Doble A. 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81:163-221.
- Dolga AM, Terpolilli N, Kepura F, Nijholt IM, Knaus HG, D'Orsi B, Prehn JH, Eisel UL, Plant T, Plesnila N and others. 2011. KCa2 channels activation prevents [Ca²⁺]_i deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia. *Cell Death Dis* 2:e147.
- Dorst J, Kuhnlein P, Hendrich C, Kassubek J, Sperfeld AD, Ludolph AC. 2011. Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 258:613-7.
- Douville R, Liu J, Rothstein J, Nath A. 2011. Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 69:141-151.
- Du J, Suzuki K, Wei Y, Wang Y, Blumenthal R, Chen Z, Falke C, Zarate CA, Jr., Manji HK. 2007. The anticonvulsants lamotrigine, riluzole, and valproate differentially regulate AMPA receptor membrane localization: relationship to clinical effects in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 32:793-802.
- Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN and others. 2011a. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc* 6:1060-83.

Bibliographie

- Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. 2011b. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society Reviews* 40:387-426.
- Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. 2011c. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society Reviews* 40:387-426.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Seilhean D, Hauw JJ, Lacomblez L, Loeffler JP and others. 2008. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70:1004-9.
- Dupuis L, Dengler R, Heneka MT, Meyer T, Zierz S, Kassubek J, Fischer W, Steiner F, Lindauer E, Otto M and others. 2012. A randomized, double blind, placebo-controlled trial of pioglitazone in combination with riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7:e37885.
- Dupuis L, Oudart H, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. 2004. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11159-64.
- Dupuis L, Pradat P-F, Ludolph AC, Loeffler J-P. 2011. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology* 10:75-82.
- Durham HD, Dahrouge S, Cashman NR. 1993. Evaluation of the spinal cord neuron X neuroblastoma hybrid cell line NSC-34 as a model for neurotoxicity testing. *Neurotoxicology* 14:387-95.
- Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I and others. 2012. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 4:145ra104.
- Eggett CJ, Crosier S, Manning P, Cookson MR, Menzies FM, McNeil CJ, Shaw PJ. 2000. Development and characterisation of a glutamate-sensitive motor neurone cell line. *J Neurochem* 74:1895-902.
- Euceda LR, Giskeødegård GF, Bathen TF. 2015. Preprocessing of NMR metabolomics data. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 75:193-203.
- Ezzi SA, Urushitani M, Julien JP. 2007. Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J Neurochem* 102:170-8.
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375:599-603.
- Fang F, Bellocchio R, Hernan MA, Ye W. 2006. Smoking, snuff dipping and the risk of amyotrophic lateral sclerosis--a prospective cohort study. *Neuroepidemiology* 27:217-21.
- Fergani A, Eschbach J, Oudart H, Larmet Y, Schwalenstocker B, Ludolph AC, Loeffler JP, Dupuis L. 2011. A mutation in the dynein heavy chain gene compensates for energy deficit of mutant SOD1 mice and increases potentially neuroprotective IGF-1. *Mol Neurodegener* 6:26.
- Fergani A, Oudart H, Gonzalez De Aguilar JL, Fricker B, Rene F, Hocquette JF, Meininger V, Dupuis L, Loeffler JP. 2007. Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Lipid Res* 48:1571-80.
- Ferraiuolo L, Higginbottom A, Heath PR, Barber S, Greenald D, Kirby J, Shaw PJ. 2011. Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134:2627-41.

Bibliographie

- Ferri A, Cozzolino M, Crosio C, Nencini M, Casciati A, Gralla EB, Rotilio G, Valentine JS, Carri MT. 2006. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13860-5.
- Fitzgerald KC, O'Reilly EJ, Falcone GJ, McCullough ML, Park Y, Kolonel LN, Ascherio A. 2014. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and risk for amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol* 71:1102-10.
- Fonnum F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42:1-11.
- Foran E, Bogush A, Goffredo M, Roncaglia P, Gustincich S, Pasinelli P, Trotti D. 2011. Motor neuron impairment mediated by a sumoylated fragment of the glial glutamate transporter EAAT2. *Glia* 59:1719-31.
- Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, Ladner KJ, Bevan AK, Foust KD, Godbout JP and others. 2014. Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 81:1009-23.
- Fray AE, Ince PG, Banner SJ, Milton ID, Usher PA, Cookson MR, Shaw PJ. 1998. The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 10:2481-9.
- Fumagalli E, Funicello M, Rauen T, Gobbi M, Mennini T. 2008. Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *European Journal of Pharmacology* 578:171-176.
- Funalot B, Desport JC, Sturtz F, Camu W, Couratier P. 2009. High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 10:113-7.
- Gallo V, Wark PA, Jenab M, Pearce N, Brayne C, Vermeulen R, Andersen PM, Hallmans G, Kyrozi A, Vanacore N and others. 2013. Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis: the EPIC cohort. *Neurology* 80:829-38.
- Gao L, Zhou S, Cai H, Gong Z, Zang D. 2014. VEGF levels in CSF and serum in mild ALS patients. *J Neurol Sci* 346:216-20.
- Garcia-Escudero V, Rosales M, Munoz JL, Scola E, Medina J, Khalique H, Garaulet G, Rodriguez A, Lim F. 2015. Patient-derived olfactory mucosa for study of the non-neuronal contribution to amyotrophic lateral sclerosis pathology. *J Cell Mol Med* 19:1284-95.
- Gegelashvili G, Schousboe A. 1997. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol* 52:6-15.
- Geser F, Brandmeir NJ, Kwong LK, Martinez-Lage M, Elman L, McCluskey L, Xie SX, Lee VM, Trojanowski JQ. 2008. Evidence of multisystem disorder in whole-brain map of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 65:636-41.
- Ghiasi P, Hosseinkhani S, Noori A, Nafissi S, Khajeh K. 2012. Mitochondrial complex I deficiency and ATP/ADP ratio in lymphocytes of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Res* 34:297-303.
- Gika HG, Theodoridis GA, Plumb RS, Wilson ID. 2014. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 87:12-25.
- Gil J, Funalot B, Torny F, Lacoste M, Couratier P. 2007. [Exogenous risk factors in sporadic ALS: a review of the literature]. *Rev Neurol (Paris)* 163:1021-30.
- Giribaldi F, Milanese M, Bonifacino T, Anna Rossi PI, Di Prisco S, Pittaluga A, Tacchetti C, Puliti A, Usai C, Bonanno G. 2013. Group I metabotropic glutamate autoreceptors induce abnormal glutamate exocytosis in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology* 66:253-63.

- Giulivi C, Davies KJ. 2001. Mechanism of the formation and proteolytic release of H₂O₂-induced dityrosine and tyrosine oxidation products in hemoglobin and red blood cells. *J Biol Chem* 276:24129-36.
- Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, Oudart H, Loeffler JP. 2005. The metabolic hypothesis in amyotrophic lateral sclerosis: insights from mutant Cu/Zn-superoxide dismutase mice. *Biomed Pharmacother* 59:190-6.
- Gordon PH, Meininger V. 2011. How can we improve clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis? *Nat Rev Neurol* 7:650-4.
- Gordon PH, Moore DH, Miller RG, Florence JM, Verheijde JL, Doorish C, Hilton JF, Spitalny GM, MacArthur RB, Mitsumoto H and others. 2007. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol* 6:1045-53.
- Graf M, Ecker D, Horowski R, Kramer B, Riederer P, Gerlach M, Hager C, Ludolph AC, Becker G, Osterhage J and others. 2005. High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study. *J Neural Transm (Vienna)* 112:649-60.
- Greene LA, Tischler AS. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73:2424-2428.
- Greig A, Donevan SD, Mujtaba TJ, Parks TN, Rao MS. 2000. Characterization of the AMPA-activated receptors present on motoneurons. *J Neurochem* 74:179-91.
- Gros-Louis F, Gaspar C, Rouleau GA. 2006. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:956-72.
- Grossman AB, Woolley-Levine S, Bradley WG, Miller RG. 2007. Detecting neurobehavioral changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 8:56-61.
- Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin CL. 2003. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet* 12:2519-32.
- Gurney ME. 1997. The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J Neurol Sci* 152 Suppl 1:S67-73.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX and others. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-5.
- Guzmán M, Blázquez C. 2001. Is there an astrocyte–neuron ketone body shuttle? *Trends in Endocrinology & Metabolism* 12:169-173.
- Haastert K, Grosskreutz J, Jaeckel M, Laderer C, Bufler J, Grothe C, Claus P. 2005. Rat embryonic motoneurons in long-term co-culture with Schwann cells--a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level in vitro. *J Neurosci Methods* 142:275-84.
- Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R and others. 2001. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29:166-73.
- Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD and others. 2011. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* 29:824-8.
- Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA. 2006. Transient caloric restriction in early adulthood hastens disease endpoint in male, but not female, Cu/Zn-SOD mutant G93A mice. *Muscle Nerve* 34:709-19.

Bibliographie

- Hamasaki H, Takeuchi Y, Masui Y, Ohta Y, Abe K, Yoshino H, Yanai H. 2015. Development of diabetes in a familial amyotrophic lateral sclerosis patient carrying the I113T SOD1 mutation. Case Report. *Neuro Endocrinol Lett* 36:414-6.
- Hargett SR, Walker NN, Hussain SS, Hoehn KL, Keller SR. 2015. Deletion of the Rab GAP Tbc1d1 modifies glucose, lipid, and energy homeostasis in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 309:E233-E245.
- Harlan BA, Pehar M, Sharma DR, Beeson G, Beeson CC, Vargas MR. 2016. Enhancing NAD⁺ Salvage Pathway Reverts the Toxicity of Primary Astrocytes Expressing Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked Mutant Superoxide Dismutase 1 (SOD1). *J Biol Chem* 291:10836-46.
- Harno K, Rissanen A, Palo J. 1984. Glucose tolerance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 70:451-5.
- Has. 2006. Prise en charge des personnes atteinte de sclérose latérale amyotrophique – texte des recommandations (version longue): 23 et 24 novembre 2005, Centre universitaire méditerranéen — Nice. *Revue Neurologique* 162, Supplement 2:363-393.
- Hatazawa J, Brooks RA, Dalakas MC, Mansi L, Di Chiro G. 1988. Cortical motor-sensory hypometabolism in amyotrophic lateral sclerosis: a PET study. *J Comput Assist Tomogr* 12:630-6.
- Haverkamp LJ, Appel V, Appel SH. 1995. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 118 (Pt 3):707-19.
- Hawkins RA. 2009. The blood-brain barrier and glutamate. *Am J Clin Nutr* 90:867s-874s.
- Hayashi T. 1952. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn J Physiol* 3:46-64.
- Heath PR, Shaw PJ. 2002. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26:438-58.
- Hemendinger RA, Armstrong EJ, 3rd, Radio N, Brooks BR. 2012. Neurotoxic injury pathways in differentiated mouse motor neuron-neuroblastoma hybrid (NSC-34D) cells in vitro--limited effect of riluzole on thapsigargin, but not staurosporine, hydrogen peroxide and homocysteine neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 258:208-15.
- Henkel JS, Beers DR, Wen S, Rivera AL, Toennis KM, Appel JE, Zhao W, Moore DH, Powell SZ, Appel SH. 2013. Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med* 5:64-79.
- Hertz L. 2006. Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III. *Neurochem Int* 48:416-25.
- Hertz L, Dienel GA. 2002. Energy metabolism in the brain. *Int Rev Neurobiol* 51:1-102.
- Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G. 1984. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:471-80.
- Hodges J. 2012. Familial frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis associated with the C9ORF72 hexanucleotide repeat. *Brain* 135:652-655.
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. 1991. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-3.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G and others. 2002. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1604-9.
- Hubert JP, Delumeau JC, Glowinski J, Premont J, Doble A. 1994. Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanism of action. *Br J Pharmacol* 113:261-7.

Bibliographie

- Huisman MHB, Seelen M, de Jong SW, Dorresteyn KRIS, van Doormaal PTC, van der Kooi AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, van den Berg LH, Veldink JH. 2013. Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 84:976-981.
- Hume RI, Dingleline R, Heinemann SF. 1991. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253:1028-31.
- Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. 2009. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187:761-72.
- Ince P, Stout N, Shaw P, Slade J, Hunziker W, Heizmann CW, Baimbridge KG. 1993. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19:291-9.
- Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, Cleveland DW. 2010. Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron* 67:575-87.
- Jahn K, Schlesinger F, Jin LJ, Dengler R, Bufler J, Krampfl K. 2008. Molecular mechanisms of interaction between the neuroprotective substance riluzole and GABA(A)-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378:53-63.
- Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Gibbs JR, Brunetti M, Gronka S, Wu J and others. 2010. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68:857-64.
- Jung C, Higgins CM, Xu Z. 2002. Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 83:535-45.
- Just N, Moreau C, Lassalle P, Gosset P, Perez T, Brunaud-Danel V, Wallaert B, Destee A, Defebvre L, Tonnel AB and others. 2007. High erythropoietin and low vascular endothelial growth factor levels in cerebrospinal fluid from hypoxemic ALS patients suggest an abnormal response to hypoxia. *Neuromuscul Disord* 17:169-73.
- Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, Bourgouin P, Rochefort D, Bel Hadj S, Durham HD, Vande Velde C and others. 2010. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet* 19:671-83.
- Kamel F, Umbach DM, Hu H, Munsat TL, Shefner JM, Taylor JA, Sandler DP. 2005. Lead exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2:195-201.
- Kanai Y, Hediger MA. 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360:467-71.
- Kane DA. 2014. Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. *Frontiers in Neuroscience* 8.
- Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothstein JD, Bergles DE. 2013. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 16:571-9.
- Kanjilal B, Keyser BM, Andres DK, Nealley E, Benton B, Melber AA, Andres JF, Letukas VA, Clark O, Ray R. 2014. Differentiated NSC-34 cells as an in vitro cell model for VX. *Toxicol Mech Methods* 24:488-94.
- Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE. 2010. Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 33:409-40.
- Kaufmann P, Thompson JL, Levy G, Buchsbaum R, Shefner J, Krivickas LS, Katz J, Rollins Y, Barohn RJ, Jackson CE and others. 2009. Phase II trial of CoQ10 for ALS finds insufficient evidence to justify phase III. *Ann Neurol* 66:235-44.
- Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Jeong SY, Kanazawa I. 2003. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 85:680-9.

Bibliographie

- Kawamata H, Manfredi G. 2010. Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of Ageing and Development* 131:517-526.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. 1992. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140:691-707.
- Kim SM, Kim H, Kim JE, Park KS, Sung JJ, Kim SH, Lee KW. 2011. Amyotrophic lateral sclerosis is associated with hypolipidemia at the presymptomatic stage in mice. *PLoS One* 6:e17985.
- King AE, Woodhouse A, Kirkcaldie MT, Vickers JC. 2016. Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? *Exp Neurol* 275 Pt 1:162-71.
- Kiskinis E, Sandoe J, Williams Luis A, Boulting Gabriella L, Moccia R, Wainger Brian J, Han S, Peng T, Thams S, Mikkilineni S and others. 2014. Pathways Disrupted in Human ALS Motor Neurons Identified through Genetic Correction of Mutant SOD1. *Cell Stem Cell* 14:781-795.
- Klebe R, Ruddle R. Neuroblastoma-Cell culture analysis of a differentiating stem cell system; 1969. ROCKEFELLER UNIV PRESS 1114 FIRST AVE, 4TH FL, NEW YORK, NY 10021. p A69-&.
- Kleopa KA, Sherman M, Neal B, Romano GJ, Heiman-Patterson T. 1999. Bipap improves survival and rate of pulmonary function decline in patients with ALS. *J Neurol Sci* 164:82-8.
- Koerner DR. 1976. Abnormal carbohydrate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia on Guam. *Diabetes* 25:1055-65.
- Komuro H, Rakic P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260:95-7.
- Kostandy BB. 2012. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci* 33:223-37.
- Krebs HA. 1935. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J* 29:1951-69.
- Kreft M, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A. 2012. Aspects of astrocyte energy metabolism, amino acid neurotransmitter homeostasis and metabolic compartmentation. *ASN Neuro* 4.
- Kritis A, Stamoula E, Paniskaki K, Vavilis T. 2015. Researching glutamate – induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/, collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9.
- Kruman, II, Pedersen WA, Springer JE, Mattson MP. 1999. 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* 160:28-39.
- Kuo JJ, Siddique T, Fu R, Heckman CJ. 2005. Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J Physiol* 563:843-54.
- Kurahashi T, Konno T, Otsuki N, Kwon M, Tsunoda S, Ito J, Fujii J. 2012. A malfunction in triglyceride transfer from the intracellular lipid pool to apoB in enterocytes of SOD1-deficient mice. *FEBS Lett* 586:4289-95.
- Kurland LT, Mulder DW. 1955. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 2. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. II. *Neurology* 5:249-68.
- Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T and others. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323:1205-8.

Bibliographie

- Laake JH, Slyngstad TA, Haug FM, Ottersen OP. 1995. Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *J Neurochem* 65:871-81.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. 1996. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 347:1425-31.
- Lamanauskas N, Nistri A. 2008. Riluzole blocks persistent Na⁺ and Ca²⁺ currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Eur J Neurosci* 27:2501-14.
- Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I and others. 2003. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 34:383-94.
- Laslo P, Lipski J, Nicholson LF, Miles GB, Funk GD. 2001. GluR2 AMPA receptor subunit expression in motoneurons at low and high risk for degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 169:461-71.
- Lauria G, Dalla Bella E, Antonini G, Borghero G, Capasso M, Caponnetto C, Chio A, Corbo M, Eleopra R, Fazio R and others. 2015. Erythropoietin in amyotrophic lateral sclerosis: a multicentre, randomised, double blind, placebo controlled, phase III study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86:879-86.
- Lawton KA, Brown MV, Alexander D, Li Z, Wulff JE, Lawson R, Jaffa M, Milburn MV, Ryals JA, Bowser R and others. 2014. Plasma metabolomic biomarker panel to distinguish patients with amyotrophic lateral sclerosis from disease mimics. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 15:362-70.
- Lee J, Park J, Lim MS, Seong SJ, Seo JJ, Park SM, Lee HW, Yoon YR. 2012a. Quantile normalization approach for liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic data from healthy human volunteers. *Anal Sci* 28:801-5.
- Lee MK, Cleveland DW. 1996. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19:187-217.
- Lee T, Li YR, Ingre C, Weber M, Grehl T, Gredal O, de Carvalho M, Meyer T, Tysnes OB, Auburger G and others. 2011. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Hum Mol Genet* 20:1697-700.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang P-W and others. 2012b. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487:443-448.
- Lees GJ. 1993. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54:287-322.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835-53.
- Lekoubou A, Matsha TE, Sobngwi E, Kengne AP. 2014. Effects of diabetes mellitus on amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *BMC Res Notes* 7:171.
- Lenglet T, Lacomblez L, Abitbol JL, Ludolph A, Mora JS, Robberecht W, Shaw PJ, Pruss RM, Cuvier V, Meininger V. 2014. A phase II-III trial of olesoxime in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 21:529-36.
- Lerma J, Marques JM. 2013. Kainate receptors in health and disease. *Neuron* 80:292-311.
- Leroy F, Lamotte d'Incamps B, Imhoff-Manuel RD, Zytnicki D. 2014. Early intrinsic hyperexcitability does not contribute to motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Elife* 3.

Bibliographie

- Levine JB, Kong J, Nadler M, Xu Z. 1999. Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* 28:215-24.
- Lewis CA, Manning J, Rossi F, Krieger C. 2012. The Neuroinflammatory Response in ALS: The Roles of Microglia and T Cells. *Neurol Res Int* 2012:803701.
- Lino MM, Schneider C, Caroni P. 2002. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 22:4825-32.
- Liochev SI. 1999. The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst* 36:1-39.
- Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM and others. 2004. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* 43:5-17.
- Liu X, Xu S, Wang P, Wang W. 2015. Transient mitochondrial permeability transition mediates excitotoxicity in glutamate-sensitive NSC34D motor neuron-like cells. *Exp Neurol* 271:122-30.
- Loaiza A, Porras OH, Barros LF. 2003. Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* 23:7337-42.
- Lucas DR, Newhouse JP. 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58:193-201.
- Mackenzie IR, Ansorge O, Strong M, Bilbao J, Zinman L, Ang LC, Baker M, Stewart H, Eisen A, Rademakers R and others. 2011. Pathological heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations: two distinct patterns correlating with disease severity and mutation. *Acta Neuropathol* 122:87-98.
- Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H. 2007a. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 61.
- Mackenzie IRA, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H and others. 2007b. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of Neurology* 61:427-434.
- Madji Hounoum B, Blasco H, Emond P, Mavel S. 2016a. Liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry-based cell metabolomics: Experimental design, recommendations, and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 75:118-128.
- Madji Hounoum B, Blasco H, Nadal-Desbarats L, Dieme B, Montigny F, Andres CR, Emond P, Mavel S. 2015. Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS. *Anal Bioanal Chem* 407:8861-72.
- Madji Hounoum B, Vourc'h P, Felix R, Corcia P, Patin F, Gueguinou M, Potier-Cartereau M, Vandier C, Raoul C, Andres CR and others. 2016b. NSC-34 Motor Neuron-Like Cells Are Unsuitable as Experimental Model for Glutamate-Mediated Excitotoxicity. *Front Cell Neurosci* 10:118.
- Madji Hounoum B, Vourc'h P, Romain F, Corcia P, Patin F, Gueguinou M, Potier-cartereau M, VANDIER C, Raoul C, Andres C and others. 2016c. NSC-34 motor neuron-like cells are unsuitable as experimental model for glutamate-mediated excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10.
- Magistretti PJ. 2006. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 209:2304-11.
- Magistretti PJ. 2009. Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am J Clin Nutr* 90:875s-880s.

Bibliographie

- Magistretti PJ, Allaman I. 2015. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron* 86:883-901.
- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. 1994. Glucose transporter proteins in brain. *Faseb j* 8:1003-11.
- Maier O, Bohm J, Dahm M, Bruck S, Beyer C, Johann S. 2013. Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. *Neurochem Int* 62:1029-38.
- Malek AM, Barchowsky A, Bowser R, Youk A, Talbott EO. 2012. Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis of epidemiological studies: Pesticide exposure as a risk factor for ALS. *Environmental Research* 117:112-119.
- Mancuso R, Navarro X. 2015. Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Prog Neurobiol* 133:1-26.
- Manjaly ZR, Scott KM, Abhinav K, Wijesekera L, Ganesalingam J, Goldstein LH, Janssen A, Dougherty A, Willey E, Stanton BR and others. 2010. The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Amyotroph Lateral Scler* 11:439-42.
- Marin B, Beghi E, Vial C, Bernard E, Lautrette G, Clavelou P, Guy N, Lemasson G, Debruxelles S, Cintas P and others. 2016a. Evaluation of the application of the European guidelines for the diagnosis and clinical care of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients in six French ALS centres. *Eur J Neurol* 23:787-95.
- Marin B, Boumediene F, Logroscino G, Couratier P, Babron MC, Leutenegger AL, Copetti M, Preux PM, Beghi E. 2016b. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*.
- Marin B, Gil J, Preux PM, Funalot B, Couratier P. 2009. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the Limousin region of France, 1997-2007. *Amyotroph Lateral Scler* 10:216-20.
- Mariosa D, Kamel F, Bellocco R, Ye W, Fang F. 2015. Association between diabetes and amyotrophic lateral sclerosis in Sweden. *Eur J Neurol* 22:1436-42.
- Marques VD, Barreira AA, Davis MB, Abou-Sleiman PM, Silva WA, Jr., Zago MA, Sobreira C, Fazan V, Marques W, Jr. 2006. Expanding the phenotypes of the Pro56Ser VAPB mutation: proximal SMA with dysautonomia. *Muscle Nerve* 34:731-9.
- Martin D, Thompson MA, Nadler JV. 1993. The neuroprotective agent riluzole inhibits release of glutamate and aspartate from slices of hippocampal area CA1. *European Journal of Pharmacology* 250:473-476.
- Martin ED, Fernandez M, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, Cena V. 2007. Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia* 55:36-45.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. 1977. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195:1356-8.
- Martinez BA. 2012. Lactate-starved neurons in ALS. *Dis Model Mech* 5:711-2.
- Massucci FA, DiNuzzo M, Giove F, Maraviglia B, Castillo IP, Marinari E, De Martino A. 2013. Energy metabolism and glutamate-glutamine cycle in the brain: a stoichiometric modeling perspective. *BMC Syst Biol* 7:103.
- Masujima T. 2009. Live single-cell mass spectrometry. *Anal Sci*. 2009/08/12 ed. p 953-60.
- Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, Manfredi G. 2002. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277:29626-33.
- Mavel S, Nadal-Desbarats L, Blasco H, Bonnet-Brilhault F, Barthélémy C, Montigny F, Sarda P, Laumonnier F, Vourc'h P, Andres CR and others. 2013. ¹H-¹³C NMR-based urine metabolic profiling in autism spectrum disorders. *Talanta* 114:95-102.

Bibliographie

- McCombe PA, Henderson RD. 2010. Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gender Medicine* 7:557-570.
- McIlwain DL. 1991. Nuclear and cell body size in spinal motor neurons. *Adv Neurol* 56:67-74.
- McKenna MC. 2012. Substrate competition studies demonstrate oxidative metabolism of glucose, glutamate, glutamine, lactate and 3-hydroxybutyrate in cortical astrocytes from rat brain. *Neurochem Res* 37:2613-26.
- McKenna MC, Tildon JT, Stevenson JH, Huang X. 1996. New Insights into the Compartmentation of Glutamate and Glutamine in Cultured Rat Brain Astrocytes. *Developmental Neuroscience* 18:380-390.
- McMullan SM, Phanavanh B, Li GG, Barger SW. 2012. Metabotropic glutamate receptors inhibit microglial glutamate release. *ASN Neuro* 4.
- Meininger V, Asselain B, Guillet P, Leigh PN, Ludolph A, Lacomblez L, Robberecht W. 2006. Pentoxifylline in ALS: a double-blind, randomized, multicenter, placebo-controlled trial. *Neurology* 66:88-92.
- Meininger V, Bensimon G, Bradley WR, Brooks B, Douillet P, Eisen AA, Lacomblez L, Leigh PN, Robberecht W. 2004. Efficacy and safety of xaliproden in amyotrophic lateral sclerosis: results of two phase III trials. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 5:107-17.
- Meininger V, Drory VE, Leigh PN, Ludolph A, Robberecht W, Silani V. 2009. Glatiramer acetate has no impact on disease progression in ALS at 40 mg/day: a double-blind, randomized, multicentre, placebo-controlled trial. *Amyotroph Lateral Scler* 10:378-83.
- Meldrum BS. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130:1007s-15s.
- Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Dong L, Figlewicz DA, Shaw PJ. 2002. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 125:1522-33.
- Meyer K, Ferraiuolo L, Miranda CJ, Likhite S, McElroy S, Renusch S, Ditsworth D, Lagier-Tourenne C, Smith RA, Ravits J and others. 2014. Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:829-32.
- Milanese M, Zappettini S, Onofri F, Musazzi L, Tardito D, Bonifacino T, Messa M, Racagni G, Usai C, Benfenati F and others. 2011. Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 116:1028-42.
- Millecamps S, Boillee S, Chabrol E, Camu W, Cazeneuve C, Salachas F, Pradat PF, Danel-Brunaud V, Vandenberghe N, Corcia P and others. 2011. Screening of OPTN in French familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 32:557.e11-3.
- Millecamps S, Corcia P, Cazeneuve C, Boillee S, Seilhean D, Danel-Brunaud V, Vandenberghe N, Pradat PF, Le Forestier N, Lacomblez L and others. 2012. Mutations in UBQLN2 are rare in French amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 33:839.e1-3.
- Millecamps S, Salachas F, Cazeneuve C, Gordon P, Bricka B, Camuzat A, Guillot-Noel L, Russaouen O, Bruneteau G, Pradat PF and others. 2010. SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 47:554-60.
- Miller R, Bradley W, Cudkowicz M, Hubble J, Meininger V, Mitsumoto H, Moore D, Pohlmann H, Sauer D, Silani V and others. 2007a. Phase II/III randomized trial of TCH346 in patients with ALS. *Neurology* 69:776-84.
- Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH. 2007b. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*:Cd001447.
- Miller RG, Moore DH, Forsshew DA, Katz JS, Barohn RJ, Valan M, Bromberg MB, Goslin KL, Graves MC, McCluskey LF and others. 2011. Phase II screening trial of lithium

- carbonate in amyotrophic lateral sclerosis: examining a more efficient trial design. *Neurology* 77:973-9.
- Milosevic M, Bataveljic D, Nikolic L, Bijelic D, Andjus P. 2016. The effect of amyotrophic lateral sclerosis-linked exogenous SOD1-G93A on electrophysiological properties and intracellular calcium in cultured rat astrocytes. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 17:443-51.
- Miquel E, Cassina A, Martinez-Palma L, Souza JM, Bolatto C, Rodriguez-Bottero S, Logan A, Smith RA, Murphy MP, Barbeito L and others. 2014. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 70:204-13.
- Mitchell J, Paul P, Chen H-J, Morris A, Payling M, Falchi M, Habgood J, Panoutsou S, Winkler S, Tisato V and others. 2010. Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:7556-7561.
- Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V. 2014. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol* 13:1127-38.
- Mitsumoto H, Santella RM, Liu X, Bogdanov M, Zipprich J, Wu HC, Mahata J, Kilty M, Bednarz K, Bell D and others. 2008. Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 9:177-83.
- Mohammadi B, Lang N, Dengler R, Bufler J. 2002. Interaction of high concentrations of riluzole with recombinant skeletal muscle sodium channels and adult-type nicotinic receptor channels. *Muscle Nerve* 26:539-45.
- Moisse K, Strong MJ. 2006. Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1083-93.
- Moore C, Perry ACF, Love S, Hall L. 1996. Sequence analysis and immunolocalisation of phosphatidylethanolamine binding protein (PBP) in human brain tissue. *Molecular Brain Research* 37:74-78.
- Moreau C, Devos D, Gosset P, Brunaud-Danel V, Tonnel AB, Lassalle P, Defebvre L, Destee A. 2010. [Mechanisms of deregulated response to hypoxia in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a clinical study]. *Rev Neurol (Paris)* 166:279-83.
- Moreau C, Gosset P, Kluza J, Brunaud-Danel V, Lassalle P, Marchetti P, Defebvre L, Destee A, Devos D. 2011. Deregulation of the hypoxia inducible factor-1alpha pathway in monocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neuroscience* 172:110-7.
- Moreno-Ortega AJ, Al-Achbili LM, Alonso E, de Los Rios C, Garcia AG, Ruiz-Nuno A, Cano-Abad MF. 2016. Neuroprotective Effect of the Novel Compound ITH33/IQM9.21 Against Oxidative Stress and Na⁺ and Ca²⁺ Overload in Motor Neuron-like NSC-34 Cells. *Neurotox Res*.
- Morrison KE, Dhariwal S, Hornabrook R, Savage L, Burn DJ, Khoo TK, Kelly J, Murphy CL, Al-Chalabi A, Dougherty A and others. 2013. Lithium in patients with amyotrophic lateral sclerosis (LiCALS): a phase 3 multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 12:339-45.
- Moujalled D, White AR. 2016. Advances in the Development of Disease-Modifying Treatments for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *CNS Drugs* 30:227-43.
- Murphy J, Henry R, Lomen-Hoerth C. 2007. Establishing subtypes of the continuum of frontal lobe impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 64:330-4.
- Myszczyńska M, Ferraiuolo L. 2016. New In Vitro Models to Study Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathol* 26:258-65.

- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. 2007. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10:615-22.
- Nagata E, Ogino M, Iwamoto K, Kitagawa Y, Iwasaki Y, Yoshii F, Ikeda J-E, Investigators ALSC. 2016. Bromocriptine Mesylate Attenuates Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Phase 2a, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Research in Japanese Patients. *PLoS ONE* 11:e0149509.
- Nagata T, Nagano I, Shiote M, Narai H, Murakami T, Hayashi T, Shoji M, Abe K. 2007. Elevation of MCP-1 and MCP-1/VEGF ratio in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Res* 29:772-6.
- Nagoshi N, Nakashima H, Fehlings MG. 2015. Riluzole as a neuroprotective drug for spinal cord injury: from bench to bedside. *Molecules* 20:7775-89.
- Nanou A, Higginbottom A, Valori CF, Wyles M, Ning K, Shaw P, Azzouz M. 2013. Viral Delivery of Antioxidant Genes as a Therapeutic Strategy in Experimental Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Ther* 21:1486-1496.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-30.
- Nicholson JK, Connolly J, Lindon JC, Holmes E. 2002. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* 1:153-61.
- Nicoll RA, Malenka RC. 1999. Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann N Y Acad Sci* 868:515-25.
- Noh KM, Hwang JY, Shin HC, Koh JY. 2000. A novel neuroprotective mechanism of riluzole: direct inhibition of protein kinase C. *Neurobiol Dis* 7:375-83.
- Nonneman A, Robberecht W, Van Den Bosch L. 2014. The role of oligodendroglial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis Manag* 4:223-39.
- O'Doherty LJ, Hickey A, Hardiman O. 2010. Measuring life quality, physical function and psychological well-being in neurological illness. *Amyotroph Lateral Scler* 11:461-8.
- O'Reilly SA, Roedica J, Nagy D, Hallewell RA, Alderson K, Marklund SL, Kuby J, Kushner PD. 1995. Motor neuron-astrocyte interactions and levels of Cu,Zn superoxide dismutase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 131:203-10.
- Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddell F, Rosenbaum J. 1970. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65:129-36.
- Olney JW. 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids. Kainic acid as a tool in neurobiology: Raven Press New York. p 95-121.
- Oluwole SOA, Yao Y, Conradi S, Kristensson K, Karlsson H. 2007. Elevated levels of transcripts encoding a human retroviral envelope protein (syncytin) in muscles from patients with motor neuron disease. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 8:67-72.
- Orrell RW, Schapira AH. 2002. Mitochondria and amyotrophic lateral sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 53:411-26.
- Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, Cowan CA, Chien KR, Melton DA. 2008. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26:313-5.
- Paganoni S, Deng J, Jaffa M, Cudkowicz ME, Wills AM. 2011. Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 44:20-4.
- Palamiuc L, Schlagowski A, Ngo ST, Vernay A, Dirrig-Grosch S, Henriques A, Boutillier AL, Zoll J, Echaniz-Laguna A, Loeffler JP and others. 2015. A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol Med* 7:526-46.

- Pambo-Pambo A, Durand J, Gueritaud JP. 2009. Early excitability changes in lumbar motoneurons of transgenic SOD1G85R and SOD1G(93A-Low) mice. *J Neurophysiol* 102:3627-42.
- Papadeas ST, Kraig SE, O'Banion C, Lepore AC, Maragakis NJ. 2011. Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17803-8.
- Parakh S, Spencer DM, Halloran MA, Soo KY, Atkin JD. 2013. Redox Regulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013:12.
- Park SB, Vucic S, Cheah BC, Lin CSY, Kirby A, Mann KP, Zoing MC, Winhammar J, Kiernan MC. 2015. Flecainide in Amyotrophic Lateral Sclerosis as a Neuroprotective Strategy (FANS): A Randomized Placebo-Controlled Trial. *EBioMedicine* 2:1916-1922.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113-6.
- Pascuzzi RM, Shefner J, Chappell AS, Bjerke JS, Tamura R, Chaudhry V, Clawson L, Haas L, Rothstein JD. 2010. A phase II trial of talampanel in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 11:266-71.
- Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskaï BJ, Hyman BT, Trotti D, Brown Jr RH. 2004. Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated SOD1 Mutant Proteins Bind and Aggregate with Bcl-2 in Spinal Cord Mitochondria. *Neuron* 43:19-30.
- Pasinelli P, Brown RH. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7:710-723.
- Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. 2010. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PLoS One* 5:e9386.
- Patin F, Baranek T, Vourc'h P, Nadal-Desbarats L, Goossens JF, Marouillat S, Dessein AF, Descat A, Hounoum BM, Bruno C and others. 2016. Combined Metabolomics and Transcriptomics Approaches to Assess the IL-6 Blockade as a Therapeutic of ALS: Deleterious Alteration of Lipid Metabolism. *Neurotherapeutics*.
- Patin F, Corcia P, Madji Hounoum B, Veyrat-Durebex C, Respaud E, Piver E, Benz-de Bretagne I, Vourc'h P, Andres CR, Blasco H. 2015. Biological follow-up in amyotrophic lateral sclerosis: decrease in creatinine levels and increase in ferritin levels predict poor prognosis. *Eur J Neurol* 22:1385-90.
- Pedrini S, Sau D, Guareschi S, Bogush M, Brown RH, Jr., Nanche N, Kia A, Trotti D, Pasinelli P. 2010. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Hum Mol Genet* 19:2974-86.
- Pellegrini-Giampietro DE. 1994. Free radicals and the pathogenesis of neuronal death: cooperative role of excitatory amino acids. *Adv Exp Med Biol* 366:59-71.
- Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS. 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20:464-70.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55:1251-62.
- Pellerin L, Magistretti PJ. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-9.
- Pellerin L, Magistretti PJ. 2003. How to balance the brain energy budget while spending glucose differently. *J Physiol* 546:325.

Bibliographie

- Pellerin L, Magistretti PJ. 2004. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist* 10:53-62.
- Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ. 1998. Evidence Supporting the Existence of an Activity-Dependent Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle. *Developmental Neuroscience* 20:291-299.
- Pellerin L, Stolz M, Sorg O, Martin J-L, Deschêpper CF, Magistretti PJ. 1997. Regulation of energy metabolism by neurotransmitters in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line. *Glia* 21:74-83.
- Perea G, Araque A. 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-6.
- Perlson E, Maday S, Fu MM, Moughamian AJ, Holzbaur EL. 2010. Retrograde axonal transport: pathways to cell death? *Trends Neurosci* 33:335-44.
- Perry TL, Krieger C, Hansen S, Eisen A. 1990. Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 28:12-7.
- Perurena OH, Festoff BW. 1987. Reduction in insulin receptors in amyotrophic lateral sclerosis correlates with reduced insulin sensitivity. *Neurology* 37:1375-9.
- Peters TL, Fang F, Weibull CE, Sandler DP, Kamel F, Ye W. 2013. Severe head injury and amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14:267-72.
- Petit JM, Magistretti PJ. 2016. Regulation of neuron-astrocyte metabolic coupling across the sleep-wake cycle. *Neuroscience* 323:135-56.
- Petralia RS, Wang YX, Mayat E, Wenthold RJ. 1997. Glutamate receptor subunit 2-selective antibody shows a differential distribution of calcium-impermeable AMPA receptors among populations of neurons. *J Comp Neurol* 385:456-76.
- Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, Gotkine M, Levy YS, Kassis I, Vaknin-Dembinsky A, Ben-Hur T, Offen D, Abramsky O and others. 2016. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials. *JAMA Neurol* 73:337-44.
- Philips T, Bento-Abreu A, Nonneman A, Haeck W, Staats K, Geelen V, Hersmus N, Kusters B, Van Den Bosch L, Van Damme P and others. 2013a. Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 136:471-82.
- Philips T, Bento-Abreu A, Nonneman A, Haeck W, Staats K, Geelen V, Hersmus N, Küsters B, Van Den Bosch L, Van Damme P and others. 2013b. Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*.
- Philips T, Robberecht W. 2011. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 10:253-63.
- Phukan J, Elamin M, Bede P, Jordan N, Gallagher L, Byrne S, Lynch C, Pender N, Hardiman O. 2012. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 83:102-108.
- Phukan J, Pender NP, Hardiman O. 2007. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 6:994-1003.
- Pieri M, Carunchio I, Curcio L, Mercuri NB, Zona C. 2009. Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 215:368-79.
- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI. 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464-7.
- Pioro EP. 1997. MR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *J Neurol Sci* 152 Suppl 1:S49-53.

Bibliographie

- Pizzi M, Benarese M, Boroni F, Goffi F, Valerio A, Spano PF. 2000. Neuroprotection by metabotropic glutamate receptor agonists on kainate-induced degeneration of motor neurons in spinal cord slices from adult rat. *Neuropharmacology* 39:903-10.
- Plaitakis A, Caroscio JT. 1987. Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 22:575-9.
- Poitry-Yamate CL, Poitry S, Tsacopoulos M. 1995. Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci* 15:5179-91.
- Pradat PF, Bruneteau G, Gordon PH, Dupuis L, Bonnefont-Rousselot D, Simon D, Salachas F, Corcia P, Frochet V, Lacorte JM and others. 2010. Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 11:166-71.
- Pramatarova A, Laganier J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. 2001. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21:3369-74.
- Pratt J, Rataud J, Bardot F, Roux M, Blanchard JC, Laduron PM, Stutzmann JM. 1992. Neuroprotective actions of riluzole in rodent models of global and focal cerebral ischaemia. *Neurosci Lett* 140:225-30.
- Puentes F, Malaspina A, van Noort JM, Amor S. 2016. Non-neuronal Cells in ALS: Role of Glial, Immune cells and Blood-CNS Barriers. *Brain Pathol* 26:248-57.
- Pugliatti M, Parish LD, Cossu P, Leoni S, Ticca A, Saddi MV, Ortu E, Traccis S, Borghero G, Puddu R and others. 2013. Amyotrophic lateral sclerosis in Sardinia, insular Italy, 1995-2009. *J Neurol* 260:572-9.
- Pupillo E, Messina P, Giussani G, Logroscino G, Zoccolella S, Chiò A, Calvo A, Corbo M, Lunetta C, Marin B and others. 2014. Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: A European population-based case-control study. *Annals of Neurology* 75:708-716.
- Qureshi MM, Hayden D, Urbinelli L, Ferrante K, Newhall K, Myers D, Hilgenberg S, Smart R, Brown RH, Cudkovic ME. 2006. Analysis of factors that modify susceptibility and rate of progression in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotroph Lateral Scler* 7:173-82.
- Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ. 2001. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature biotechnology* 19:45-50.
- Rafiq MK, Lee E, Bradburn M, McDermott CJ, Shaw PJ. 2015. Effect of lipid profile on prognosis in the patients with amyotrophic lateral sclerosis: Insights from the olesoxime clinical trial. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 16:478-484.
- Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. 2002. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067-83.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DR, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH and others. 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13:43-47.
- Redestig H, Fukushima A, Stenlund H, Moritz T, Arita M, Saito K, Kusano M. 2009. Compensation for systematic cross-contribution improves normalization of mass spectrometry based metabolomics data. *Anal Chem* 81:7974-80.
- Reich-Slotky R, Andrews J, Cheng B, Buchsbaum R, Levy D, Kaufmann P, Thompson JL. 2013. Body mass index (BMI) as predictor of ALSFRS-R score decline in ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14:212-6.

Bibliographie

- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L and others. 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72:257-68.
- Reyes ET, Perurena OH, Festoff BW, Jorgensen R, Moore WV. 1984. Insulin resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 63:317-24.
- Reynolds IJ, Hastings TG. 1995. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci* 15:3318-27.
- Robertson J, Beaulieu JM, Doroudchi MM, Durham HD, Julien JP, Mushynski WE. 2001. Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biol* 155:217-26.
- Rodriguez-Rodriguez P, Almeida A, Bolanos JP. 2013. Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. *Neurochem Int* 62:750-6.
- Roisen FJ, Bartfeld H, Donnenfeld H, Baxter J. 1982. Neuron specific in vitro cytotoxicity of sera from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 5:48-53.
- Rojas F, Cortes N, Abarzua S, Dyrda A, van Zundert B. 2014. Astrocytes expressing mutant SOD1 and TDP43 trigger motoneuron death that is mediated via sodium channels and nitrooxidative stress. *Front Cell Neurosci* 8:24.
- Rojas F, Gonzalez D, Cortes N, Ampuero E, Hernandez DE, Fritz E, Abarzua S, Martinez A, Elorza AA, Alvarez A and others. 2015. Reactive oxygen species trigger motoneuron death in non-cell-autonomous models of ALS through activation of c-Abl signaling. *Front Cell Neurosci* 9:203.
- Rosen DR. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364:362.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X and others. 1993a. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. 1993b. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362.
- Rosenfeld J, King RM, Jackson CE, Bedlack RS, Barohn RJ, Dick A, Phillips LH, Chapin J, Gelinas DF, Lou JS. 2008. Creatine monohydrate in ALS: effects on strength, fatigue, respiratory status and ALSFRS. *Amyotroph Lateral Scler* 9:266-72.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP and others. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-86.
- Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW. 1993. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6591-5.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326:1464-8.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS and others. 2005. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-7.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. 1990. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28:18-25.

Bibliographie

- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncel RW. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73-84.
- Roux A, Lison D, Junot C, Heilier J-F. 2011. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical biochemistry* 44:119-135.
- Rowland LP. 2001. How Amyotrophic Lateral Sclerosis Got Its Name: The Clinical-Pathologic Genius of Jean-Martin Charcot. *Arch Neurol* 58.
- Rowland LP, Shneider NA. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344.
- Samarasinghe S, Virgo L, de Belleruche J. 1996. Distribution of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunit NR2A in control and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *Brain Res* 727:233-7.
- Sanjak M, Paulson D, Sufit R, Reddan W, Beaulieu D, Erickson L, Shug A, Brooks BR. 1987. Physiologic and metabolic response to progressive and prolonged exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 37:1217-20.
- Sargsyan SA, Monk PN, Shaw PJ. 2005. Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 51:241-53.
- Sasaki S, Iwata M. 1999. Ultrastructural change of synapses of Betz cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 268:29-32.
- Sasaki S, Komori T, Iwata M. 2000. Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 100:138-44.
- Scarmeas N, Shih T, Stern Y, Ottman R, Rowland LP. 2002. Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. *Neurology* 59:773-5.
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. 1995. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3948-52.
- Schiffer D, Cordera S, Cavalla P, Migheli A. 1996. Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 139 Suppl:27-33.
- Schiffer D, Fiano V. 2004. Astrogliosis in ALS: possible interpretations according to pathogenetic hypotheses. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 5:22-5.
- Schymick JC, Talbot K, Traynor BJ. 2007. Genetics of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics* 16:R233-R242.
- Scott S, Kranz JE, Cole J, Lincecum JM, Thompson K, Kelly N, Bostrom A, Theodoss J, Al-Nakhala BM, Vieira FG and others. 2008. Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 9:4-15.
- Shaw PJ, Chinnery RM, Thagesen H, Borthwick GM, Ince PG. 1997. Immunocytochemical study of the distribution of the free radical scavenging enzymes Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1); Mn superoxide dismutase (Mn SOD) and catalase in the normal human spinal cord and in motor neuron disease. *J Neurol Sci* 147:115-25.
- Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ. 1995a. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4:209-16.
- Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, Mantle D. 1995b. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Annals of Neurology* 38:691-695.
- Shaw PJ, Ince PG, Johnson M, Perry EK, Candy J. 1991. The quantitative autoradiographic distribution of [3H]MK-801 binding sites in the normal human spinal cord. *Brain Res* 539:164-8.
- Shaw PJ, Williams TL, Slade JY, Eggett CJ, Ince PG. 1999. Low expression of GluR2 AMPA receptor subunit protein by human motor neurons. *Neuroreport* 10:261-5.

- Shefner JM, Cudkowicz ME, Schoenfeld D, Conrad T, Taft J, Chilton M, Urbinelli L, Qureshi M, Zhang H, Pestronk A and others. 2004. A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology* 63:1656-61.
- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S, Kobayashi M. 2001. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* 917:97-104.
- Shimizu T, Nagaoka U, Nakayama Y, Kawata A, Kugimoto C, Kuroiwa Y, Kawai M, Shimohata T, Nishizawa M, Mihara B and others. 2012. Reduction rate of body mass index predicts prognosis for survival in amyotrophic lateral sclerosis: a multicenter study in Japan. *Amyotroph Lateral Scler* 13:363-6.
- Sickmann HM, Schousboe A, Fosgerau K, Waagepetersen HS. 2005. Compartmentation of lactate originating from glycogen and glucose in cultured astrocytes. *Neurochem Res* 30:1295-304.
- Siddique T, Figlewicz DA, Pericak-Vance MA, Haines JL, Rouleau G, Jeffers AJ, Sapp P, Hung W-Y, Bebout J, McKenna-Yasek D and others. 1991. Linkage of a Gene Causing Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis to Chromosome 21 and Evidence of Genetic-Locus Heterogeneity. *New England Journal of Medicine* 324:1381-1384.
- Siddique T, Pericak-Vance AM, Caliendo J, Hong S-T, Hung W-Y, Kaplan J, McKenna-Yasek D, Rimmler BJ, Sapp P, Saunders MA and others. 1998. Lack of association between apolipoprotein E genotype and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* 1:213-216.
- Sidorova MV, Molokoedov AS, Az'muko AA, Kudriavtseva EV, Krause E, Ovchinnikov MV, Bespalova Zh D. 2004. [Use of hydrogen peroxide for closing disulfide bridges in peptides]. *Bioorg Khim* 30:115-25.
- Silva-Adaya D, Perez-De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernandez J, Binienda Z, Ali SF, Santamaria A. 2008. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem* 105:677-89.
- Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. 2004. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 62:1758-65.
- Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. 2006. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry* 78:779-787.
- Smittkamp SE, Morris JK, Bomhoff GL, Chertoff ME, Geiger PC, Stanford JA. 2014. SOD1-G93A Mice Exhibit Muscle-Fiber-Type-Specific Decreases in Glucose Uptake in the Absence of Whole-Body Changes in Metabolism. *Neurodegenerative Diseases* 13:29-37.
- Sommer B, Seeburg PH. 1992. Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends in Pharmacological Sciences* 13:291-296.
- Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, Toma JS, Rafuse VF, Woolf CJ, Eggan K. 2011. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* 9:205-18.
- Sorenson EJ, Windbank AJ, Mandrekar JN, Bamlet WR, Appel SH, Armon C, Barkhaus PE, Bosch P, Boylan K, David WS and others. 2008. Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. *Neurology* 71:1770-5.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E and others. 2008. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319:1668-72.

Bibliographie

- Staats KA, Van Den Bosch L. 2009. Astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis: direct effects on motor neuron survival. *Journal of Biological Physics* 35:337-346.
- Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62:817-36.
- Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S. 2006. Slow and selective death of spinal motor neurons in vivo by intrathecal infusion of kainic acid: implications for AMPA receptor-mediated excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 98:782-91.
- Sun Y, Lu CJ, Chen RC, Hou WH, Li CY. 2015. Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Patients With Diabetes: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *J Epidemiol* 25:445-51.
- Sundar PD, Yu CE, Sieh W, Steinbart E, Garruto RM, Oyanagi K, Craig UK, Bird TD, Wijsman EM, Galasko DR and others. 2007. Two sites in the MAPT region confer genetic risk for Guam ALS/PDC and dementia. *Hum Mol Genet* 16:295-306.
- Sutedja NA, Fischer K, Veldink JH, van der Heijden GJMG, Kromhout H, Heederik D, Huisman MHB, Wokke JJH, van den Berg LH. 2009. What we truly know about occupation as a risk factor for ALS: A critical and systematic review. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10:295-301.
- Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC. 1997. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* 17:932-40.
- Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2:3081-9.
- Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, Kanazawa I. 1999. 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* 46:806-15.
- Tan W, Nanche N, Bogush A, Pedrini S, Trotti D, Pasinelli P. 2013. Small peptides against the mutant SOD1/Bcl-2 toxic mitochondrial complex restore mitochondrial function and cell viability in mutant SOD1-mediated ALS. *J Neurosci* 33:11588-98.
- Tan W, Pasinelli P, Trotti D. 2014. Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et biophysica acta* 1842:1295-1301.
- Tani H, Dulla CG, Farzampour Z, Taylor-Weiner A, Huguenard JR, Reimer RJ. 2014. A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release. *Neuron* 81:888-900.
- Tankersley CG, Haenggeli C, Rothstein JD. 2007. Respiratory impairment in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Appl Physiol* (1985) 102:926-32.
- Tasseva G, Bai HD, Davidescu M, Haromy A, Michelakis E, Vance JE. 2013. Phosphatidylethanolamine Deficiency in Mammalian Mitochondria Impairs Oxidative Phosphorylation and Alters Mitochondrial Morphology. *Journal of Biological Chemistry* 288:4158-4173.
- Taura D, Noguchi M, Sone M, Hosoda K, Mori E, Okada Y, Takahashi K, Homma K, Oyamada N, Inuzuka M and others. 2009. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 583:1029-33.
- Thatava T, Kudva YC, Edukulla R, Squillace K, De Lamo JG, Khan YK, Sakuma T, Ohmine S, Terzic A, Ikeda Y. 2013. Inpatient variations in type 1 diabetes-specific iPS cell differentiation into insulin-producing cells. *Mol Ther* 21:228-39.
- Ticozzi N, LeClerc AL, Keagle PJ, Glass JD, Wills AM, van Blitterswijk M, Bosco DA, Rodriguez-Leyva I, Gellera C, Ratti A and others. 2010. Paraoxonase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 68:102-7.

Bibliographie

- Tomiyama M, Rodriguez-Puertas R, Cortes R, Christnacher A, Sommer B, Pazos A, Palacios JM, Mengod G. 1996. Differential regional distribution of AMPA receptor subunit messenger RNAs in the human spinal cord as visualized by in situ hybridization. *Neuroscience* 75:901-15.
- Tornvall U, Hedstrom M, Schillen K, Hatti-Kaul R. 2010. Structural, functional and chemical changes in *Pseudozyma antarctica* lipase B on exposure to hydrogen peroxide. *Biochimie* 92:1867-75.
- Trippier PC, Benmohamed R, Kirsch DR, Silverman RB. 2012. Substituted pyrazolones require N2 hydrogen bond donating ability to protect against cytotoxicity from protein aggregation of mutant superoxide dismutase 1. *Bioorg Med Chem Lett* 22:6647-50.
- Tsacopoulos M, Evequoz-Mercier V, Perrottet P, Buchner E. 1988. Honeybee retinal glial cells transform glucose and supply the neurons with metabolic substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8727-31.
- Tsuyama N, Mizuno H, Masujima T. 2012. Molecular and functional analysis of cellular phenomena using single-cell mass spectrometry. *Biol Pharm Bull* 35:1425-31.
- Turner MR, Bowser R, Bruijn L, Dupuis L, Ludolph A, McGrath M, Manfredi G, Maragakis N, Miller RG, Pullman SL and others. 2013a. Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14 Suppl 1:19-32.
- Turner MR, Hardiman O, Benatar M, Brooks BR, Chio A, de Carvalho M, Ince PG, Lin C, Miller RG, Mitsumoto H and others. 2013b. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 12:310-22.
- Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K. 2009. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology* 8:94-109.
- Urbani A, Belluzzi O. 2000. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur J Neurosci* 12:3567-74.
- Valdmanis PN, Rouleau GA. 2008. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70:144-52.
- Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S. 2005. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem* 74:563-93.
- Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Bockx I, Braeken D, Verpoorten N, Verhoeven K and others. 2007. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14825-30.
- Van Damme P, Robberecht W. 2009. Recent advances in motor neuron disease. *Curr Opin Neurol* 22:486-92.
- Van Damme P, Van Den Bosch L, Van Houtte E, Callewaert G, Robberecht W. 2002. GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity. *J Neurophysiol* 88:1279-87.
- Van den Berg JP, Kalmijn S, Lindeman E, Veldink JH, de Visser M, Van der Graaff MM, Wokke JH, Van den Berg LH. 2005. Multidisciplinary ALS care improves quality of life in patients with ALS. *Neurology* 65:1264-7.
- Van den Bergh R, Swerts L, Hendrikx A, Boni L, Meulepas E. 1978. Adipose tissue cellularity in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 80:226-240.
- Van Den Bosch L, Robberecht W. 2008. Crosstalk between astrocytes and motor neurons: what is the message? *Exp Neurol* 211:1-6.
- Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1068-82.

Bibliographie

- Van Den Bosch L, Vandenberghe W, Klaassen H, Van Houtte E, Robberecht W. 2000. Ca²⁺-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *Journal of the neurological sciences* 180:29-34.
- van der Wijk T, Overvoorde J, den Hertog J. 2004. H₂O₂-induced intermolecular disulfide bond formation between receptor protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 279:44355-61.
- van Es MA, Schelhaas HJ, van Vught PWJ, Ticozzi N, Andersen PM, Groen EJN, Schulte C, Blauw HM, Koppers M, Diekstra FP and others. 2011. Angiogenin variants in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 70:964-973.
- van Es MA, Veldink JH, Saris CG, Blauw HM, van Vught PW, Birve A, Lemmens R, Schelhaas HJ, Groen EJ, Huisman MH and others. 2009. Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 41:1083-7.
- van Zundert B, Peuscher MH, Hynynen M, Chen A, Neve RL, Brown RH, Jr., Constantine-Paton M, Bellingham MC. 2008. Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 28:10864-74.
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P and others. 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323:1208-11.
- Vande Velde C, Miller TM, Cashman NR, Cleveland DW. 2008. Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4022-7.
- Vargas MR, Johnson JA. 2010. Astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics* 7:471-81.
- Vega C, Martiel JL, Drouhault D, Burckhart MF, Coles JA. 2003. Uptake of locally applied deoxyglucose, glucose and lactate by axons and Schwann cells of rat vagus nerve. *J Physiol* 546:551-64.
- Velasco I, Tapia R, Massieu L. 1996. Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J Neurosci Res* 44:551-61.
- Venugopal S, Hsiao CF, Sonoda T, Wiedau-Pazos M, Chandler SH. 2015. Homeostatic dysregulation in membrane properties of masticatory motoneurons compared with oculomotor neurons in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 35:707-20.
- Veyrat-Durebex C, Corcia P, Dangoumau A, Laumonnier F, Piver E, Gordon PH, Andres CR, Vourc'h P, Blasco H. 2014. Advances in cellular models to explore the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol* 49:966-83.
- Veyrat-Durebex C, Corcia P, Piver E, Devos D, Dangoumau A, Gouel F, Vourc'h P, Emond P, Laumonnier F, Nadal-Desbarats L and others. 2015. Disruption of TCA Cycle and Glutamate Metabolism Identified by Metabolomics in an In Vitro Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurobiol*.
- Vijayvergiya C, Beal MF, Buck J, Manfredi G. 2005. Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci* 25:2463-70.
- Vinceti M, Bonvicini F, Rothman KJ, Vescovi L, Wang F. 2010. The relation between amyotrophic lateral sclerosis and inorganic selenium in drinking water: a population-based case-control study. *Environ Health* 9:77.

Bibliographie

- Virgo L, de Bellerocche J. 1995. Induction of the immediate early gene c-jun in human spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis with concomitant loss of NMDA receptor NR-1 and glycine transporter mRNA. *Brain Res* 676:196-204.
- Volonte C, Apolloni S, Parisi C, Amadio S. 2016. Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology* 104:180-93.
- Voutsinos-Porche B, Knott G, Tanaka K, Quairiaux C, Welker E, Bonvento G. 2003. Glial glutamate transporters and maturation of the mouse somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 13:1110-21.
- Vucic S, Kiernan MC. 2013. Utility of transcranial magnetic stimulation in delineating amyotrophic lateral sclerosis pathophysiology. *Handb Clin Neurol* 116:561-75.
- Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC. 2014. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci* 37:433-42.
- Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SS, Sandoe J, Perez NP, Williams LA, Lee S, Boulting G and others. 2014. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep* 7:1-11.
- Walz W, Mukerji S. 1988. Lactate production and release in cultured astrocytes. *Neurosci Lett* 86:296-300.
- Wang L, Jiang Z, Lei XG. 2012. Knockout of SOD1 alters murine hepatic glycolysis, gluconeogenesis, and lipogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 53:1689-1696.
- Wang T, Jiang X, Chen G, Xu J. Interaction of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration with associated fused-in-sarcoma with proteins involved in metabolic and protein degradation pathways. *Neurobiology of Aging* 36:527-535.
- Wang X, Zhou S, Ding X, Ma M, Zhang J, Zhou Y, Wu E, Teng J. 2015. Activation of ER Stress and Autophagy Induced by TDP-43 A315T as Pathogenic Mechanism and the Corresponding Histological Changes in Skin as Potential Biomarker for ALS with the Mutation. *Int J Biol Sci* 11:1140-9.
- Waniewski RA, Martin DL. 1986. Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *J Neurochem* 47:304-13.
- Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK. 2013. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat Protocols* 8:17-32.
- Westerhuis JA, van Velzen EJ, Hoefsloot HC, Smilde AK. 2010. Multivariate paired data analysis: multilevel PLSDA versus OPLSDA. *Metabolomics* 6:119-128.
- Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. 2002. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem* 80:616-25.
- Wijesekera LC, Leigh PN. 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 4:1-22.
- Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Djoumbou Y, Mandal R, Aziat F, Dong E and others. 2013. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res* 41:D801-7.
- Wishart DS, Mandal R, Stanislaus A, Ramirez-Gaona M. 2016. Cancer Metabolomics and the Human Metabolome Database. *Metabolites* 6.
- Wittendorp-Rechenmann E, Lam CD, Steibel J, Lasbennes F, Nehlig A. 2002. HIGH RESOLUTION TRACER TARGETING COMBINING MICROAUTORADIOGRAPHIC IMAGING BY CELLULAR 14C-TRAJECTOGRAPHY WITH IMMUNOHISTOCHEMISTRY: A NOVEL PROTOCOL TO DEMONSTRATE METABOLISM OF [14C]2-DEOXYGLUCOSE BY NEURONS AND ASTROCYTES. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* 20:505-515.

- Wootz H, Enjin A, Wallen-Mackenzie A, Lindholm D, Kullander K. 2010. Reduced VGLUT2 expression increases motor neuron viability in Sod1(G93A) mice. *Neurobiol Dis* 37:58-66.
- Wuolikainen A, Jonsson P, Ahnlund M, Antti H, Marklund SL, Moritz T, Forsgren L, Andersen PM, Trupp M. 2016. Multi-platform mass spectrometry analysis of the CSF and plasma metabolomes of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. *Mol Biosyst* 12:1287-98.
- Wuolikainen A, Moritz T, Marklund SL, Antti H, Andersen PM. 2011. Disease-related changes in the cerebrospinal fluid metabolome in amyotrophic lateral sclerosis detected by GC/TOFMS. *PLoS One* 6:e17947.
- Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. 2015. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res* 43:W251-7.
- Xu L, Enyeart JA, Enyeart JJ. 2001. Neuroprotective agent riluzole dramatically slows inactivation of Kv1.4 potassium channels by a voltage-dependent oxidative mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 299:227-37.
- Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LS. 2008. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7594-9.
- Yan J, Ahmeti K, Siddique N, Ryan EB, Lukas TJ, Deng H-X, Kinsley LM, Yong S, Yang Y, Yongchao M. 2016. Evaluation of Mitochondrial Function in CHCHD10 Mutation (P5. 001). *Neurology* 86:P5. 001.
- Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC and others. 2001. 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* 29:160-5.
- Yasojima K, Tourtellotte WW, McGeer EG, McGeer PL. 2001. Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy. *Neurology* 57:952-6.
- Yin HZ, Hsu CI, Yu S, Rao SD, Sorkin LS, Weiss JH. 2012. TNF-alpha triggers rapid membrane insertion of Ca(2+) permeable AMPA receptors into adult motor neurons and enhances their susceptibility to slow excitotoxic injury. *Exp Neurol* 238:93-102.
- Yin HZ, Weiss JH. 2012. Marked synergism between mutant SOD1 and glutamate transport inhibition in the induction of motor neuronal degeneration in spinal cord slice cultures. *Brain Res* 1448:153-62.
- Yu AC, Schousboe A, Hertz L. 1982. Metabolic fate of 14C-labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *J Neurochem* 39:954-60.
- Zhao W, Beers DR, Appel SH. 2013. Immune-mediated mechanisms in the pathoprosgression of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:888-99.
- Zhao W, Varghese M, Vempati P, Dzhun A, Cheng A, Wang J, Lange D, Bilski A, Faravelli I, Pasinetti GM. 2012. Caprylic triglyceride as a novel therapeutic approach to effectively improve the performance and attenuate the symptoms due to the motor neuron loss in ALS disease. *PLoS One* 7:e49191.
- Zhou J, Yi J, Fu R, Liu E, Siddique T, Rios E, Deng HX. 2010. Hyperactive intracellular calcium signaling associated with localized mitochondrial defects in skeletal muscle of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 285:705-12.
- Zhu M, Li A, Chen J, Zhang S, Wu J. 2016. Effects of optineurin mutants on SH-SY5Y cell survival. *Mol Cell Neurosci* 74:18-24.
- Zinman L, Cudkovic M. 2011. Emerging targets and treatments in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 10:481-90.

Bibliographie

- Zona C, Siniscalchi A, Mercuri NB, Bernardi G. 1998. Riluzole interacts with voltage-activated sodium and potassium currents in cultured rat cortical neurons. *Neuroscience* 85:931-8.
- Zufiria M, Gil-Bea FJ, Fernandez-Torron R, Poza JJ, Munoz-Blanco JL, Rojas-Garcia R, Riancho J, de Munain AL. 2016. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Prog Neurobiol*.

Bibliographie

Annexes

Annexe 1 : Historique de la SLA

Tableau 1 : Historique de la SLA

SLA : Maladie bicentenaire		
1869:	Jean-Martin Charcot associe les symptômes aux anomalies neurologiques	(Rowland 2001)
1874:	Jean-Martin Charcot introduit le terme « sclérose latérale amyotrophique »	(Rowland 2001)
1941:	Mort du célèbre joueur de baseball Lou Gehrig de la SLA	–
1950:	SLA devient épidémique dans la population de l'île de Guam dans l'océan Pacifique	–
1955:	Concept de formes Familiales de SLA	(Kurland and Mulder 1955)
1991:	Association du chromosome 21 à la SLA familiale	(Siddique et al. 1991)
1993:	Implication du gène SOD1 sur le chromosome 21 dans la SLA familiale	(Rosen et al. 1993b)
1994:	Mise en place des critères (El Escorial) diagnostiques de la SLA	(Brooks 1994)
1994:	Etablissement de modèle souris SOD1-G93A de la SLA	(Gurney et al. 1994)
1995:	Rilutek® (Riluzole) devient le premier médicament approuvé par la FDA contre la SLA	(Bensimon et al. 1994)
1995:	Premières preuves de l'implication des astrocytes dans la SLA	(O'Reilly et al. 1995)
1997:	Utilisation de SRM pour étudier le SNC dans la SLA	(Pioro 1997)
2001:	Déficiency du gène <i>alsin</i> défectueux peut provoquer une forme infantile de la SLA	(Hadano et al. 2001)
2003:	Stress oxydatif associé à la pathologie de SLA	(Carri et al. 2003)
2007:	<i>TDP-43</i> discrimine la SLA sporadique de la SLA familiale	(Mackenzie et al. 2007a; Sreedharan et al. 2008)
2009:	Etudes du génome entier identifient 19p13.3 et 9p21.2 comme loci de susceptibilité dans la SLA sporadique	(van Es et al. 2009)
2011:	Expansions répétées dans la région non codante du C9ORF72 semble être une cause majeure de la SLA	(DeJesus-Hernandez et al. 2011; Renton et al. 2011)
2013:	Implication du système immunitaire dans la SLA	(Zhao et al. 2013)
2013:	Affirmation de l'implication des astrocytes, oligodendrocytes et microglies dans la SLA	(Nonneman et al. 2014; Philips et al. 2013a)

Annexe 2 : Informations supplémentaires de l'article n°2

Madji Hounoum Blandine *et al.* “*Analytical methodology for study of adherent mammalian cell metabolomics using NMR, GC-MS and LC-HRMS*” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2015) 407, pp.8861-8872

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS

Blandine Madji Hounoum, Hélène Blasco, Lydie Nadal-Desbarats, Binta Diémé, Frédéric Montigny, Christian R. Andres, Patrick Emond, Sylvie Mavel

TABLE OF CONTENTS :

I- Quenching optimization by ¹H-NMR studies

Fig. S1: Regression coefficients of variables p 3

Table S1: List of coefficients of variables for OPLS-DA model from NMR data p 4

Fig. S2: Effects of quenching method (MeOH -20°C, MeOH -40°C, and freezing -80°C) on recovery of metabolites p 6

II- Semi-quantification by ¹H-NMR studies

Table S2: Intracellular metabolite concentration from NSC-34 cells using four different extraction methods p 7

III- GC-MS Optimization

Table S3: Repeatability of GC-MS analysis of Metabolites p 9

Fig. S3: Principal component analysis (PCA) scatter plot obtained from the 12 CG-MS chromatograms p 9

IV- LC-HRMS optimisation

Table S4: Five gradients LC evaluated p 10

Fig. S4: Full scan acquisition resulting in the typical total ion current plot (TIC) chromatograms obtained from LC-MS using different LC-gradients p 11

Fig. S5: Number of ions detected and ions annotated in positive mode for each gradient condition. The mobile phases were 0.1% (vol/vol) formic acid in water (mobile phase A) and 0.1% (vol/vol) formic acid in methanol (MeOH-1, MeOH-2) or acetonitrile (ACN-1, ACN-2, ACN-3) (mobile phase B) p 14

Fig. S6: Stability of chromatographic C18 column, after 15 QC injections studied by PCA score plot p 15

Fig. S7 Comparison of distribution of relative standard deviations of peak areas for 15 injections of QC sample: Intra-day precision p 16

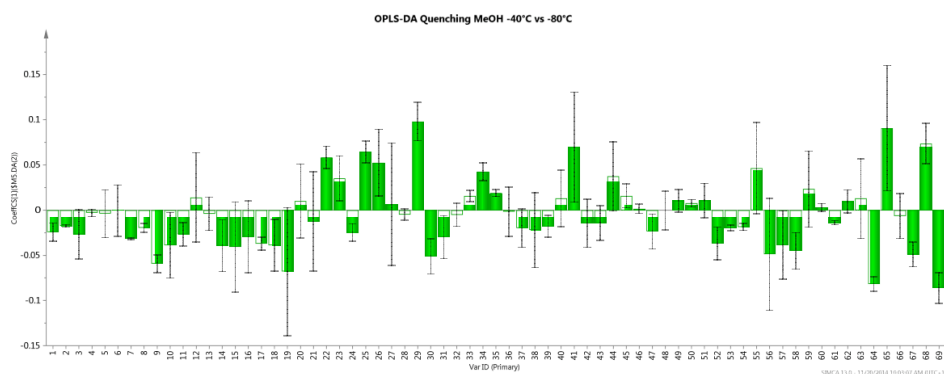
I- Quenching optimization by ^1H -NMR studies

Fig. S1 Regression coefficients of variables: the size and sign of the coefficients indicate the influence of the variables (the divers metabolites) in the model of discrimination by quenching with MeOH at -40°C (positive coefficient: metabolites in higher intensity) vs -80°C (metabolites in higher intensity with negative coefficient: below the axis). The details of the interpretation of the buckets (numbers of the divers variables given on the X axis: chemical shifts) are given in the following Table S1

Annexes

Table S1 List of coefficients of variables for OPLS-DA model from NMR data obtained after quenching with MeOH at -20°C (the first buckets correspond to metabolites in higher intensity, with a negative coefficient) *vs* -40°C (positive coefficient: metabolites in higher intensity in grey)

Variable identity	δ	Identification	CoeffCS[1]
19	2.6661	Citrate	-0.000669338
2	0.9653	Leucine	-0.000682514
43	3.6185	Valine	-0.000928583
1	0.93615	Isoleucine	-0.0012558
62	7.3804	Phenylalanine	-0.00317894
4	1.01635	Isoleucine	-0.00595284
12	1.9213	Acetate	-0.00674806
40	3.5647	Glycine	-0.00675922
61	7.3337	Phenylalanine	-0.00778952
41	3.58085	Taurine	-0.00844165
14	2.15275	homoserine/Glu	-0.00886328
8	1.4853	Alanine	-0.00955749
10	1.613	ND	-0.0116168
24	3.0208	Cadaverine	-0.0130549
11	1.71755	Cadaverine/Leucine	-0.0166441
52	4.0002	Phenylalanine	-0.0174456
33	3.3072	Phenylalanine	-0.0175053
15	2.2795	Valine	-0.0183407
13	2.0279	Pro/Glu/homoserine	-0.0208447
16	2.35325	Pyruvate/Glu	-0.0220073
32	3.29015	Taurine	-0.0224331
54	4.15545	ND	-0.0254856
34	3.31995	ND	-0.0269929
35	3.3398	ND	-0.0296699
42	3.59495	Threonine	-0.039276
28	3.1858	Tyrosine	-0.0578633
20	2.71115	ND	-0.0618349
21	2.75805	ND	-0.0664921
23	2.8311	ND	-0.0760567
25	3.04955	Tyrosine	-0.0777894
29	3.2075	ND	-0.0865588
27	3.13805	Phenylalanine	-0.0867407
36	3.36415	ND	-0.0867528
26	3.0808	Tyrosine	-0.0991333
68	8.53995	ATP/ADP	-0.128256
30	3.22355	Choline	-0.129262

Annexes

22	2.796	ND	-0.131937
63	7.4324	Phenylalanine	0.000385078
48	3.788	Alanine	0.00126908
5	1.0471	Valine	0.00362859
59	6.9097	Tyrosine	0.00434467
55	4.25645	ATP/ADP/UDP/Thr	0.00450411
60	7.19925	Tyrosine	0.00517929
67	8.4633	Formate	0.00571909
18	2.535	Glutathion/citrate	0.0103754
3	0.99455	Valine	0.0104042
51	3.95065	Tyrosine	0.0111896
45	3.675	Isoleucine/Unk	0.0118101
6	1.20145	3OHbutyrate	0.0119275
31	3.2564	Glucose	0.0148479
44	3.6444	Glycerol	0.0212726
69	8.6088	ND	0.0269205
65	8.276	ATP/ADP	0.029988
66	8.42655	ND	0.0308072
58	6.1559	ATP/ADP	0.0352437
37	3.413	Glucose	0.0392633
17	2.4052	Pyroglutamate	0.0421778
50	3.9004	Glucose	0.0562915
49	3.8421	Glucose	0.0628564
47	3.74455	Glucose	0.0641606
64	8.2477	Adenine	0.0652185
53	4.1172	Lactate	0.0705657
39	3.53325	Glucose	0.0736814
46	3.7114	Glucose	0.0750777
7	1.33235	Lactate/Threonine	0.0819863
9	1.55255	ND	0.0941168
38	3.479	Glucose	0.103355
56	4.65575	Glucose	0.145171
57	5.2422	Glucose	0.159867

ND: non determinate

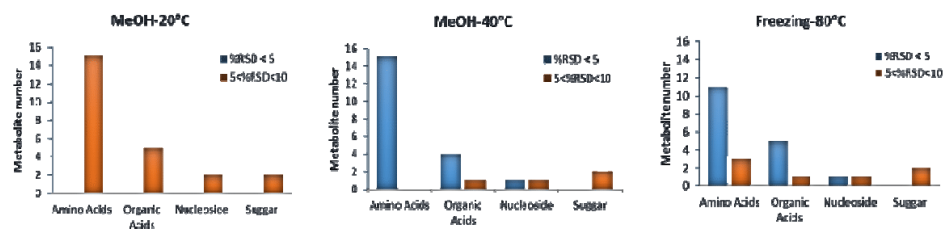


Fig. S2 Effects of quenching method (MeOH -20°C, MeOH -40°C, and freezing -80°C) on recovery of metabolites: number of metabolites *versus* their % RSD (<5% in blue and > 5 to 10% in red) depending on biochemical class

II- Semi-quantification by ¹H-NMR studies**Table S2** Intracellular metabolite concentration from NSC-34 cells using four different extraction methods: ACN/H₂O (1:1), CH₂Cl₂/ACN/H₂O (3:3:2), CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (3:3:2), MeOH/H₂O (1:1)

Metabolites	Intracellular metabolites concentration (μmol/10 ⁶ cell) (n=4)			
	Extraction methods			
	ACN	CH ₂ Cl ₂ /ACN	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	MeOH
α-Glucose	20.6 ± 2.8 ^β	9.4 ± 0.7 ^{δ α}	14.2 ± 1.3 ^δ	23.2 ± 0.9 ^{γβ}
β-Glucose	17.1 ± 2.7	7.9 ± 0.6 ^δ	12.2 ± 1.3	16.3 ± 1.2 ^β
Acetate	196.4 ± 34.3 ^{β γ}	15.7 ± 4.3 ^{α δ}	10.2 ± 1.6 ^{δ α}	428.3 ± 143.5 ^{γ α}
Alanine	236.7 ± 7.0 ^{β γ}	192.9 ± 23.5 ^{δ α}	187.9 ± 18.3 ^{δ α}	249.1 ± 21.8 ^{β γ}
AMP	5.2 ± 0.5 ^γ	2.7 ± 0.3 ^γ	0.6 ± 0.1 ^{αβδ}	2.6 ± 0.1 ^γ
ATP/ADP	17.6 ± 1.5 ^{γβ}	12.4 ± 0.7 ^{δ α}	14.7 ± 0.5 ^{δ α}	22.3 ± 0.5 ^{γβ}
Cadaverine	9.3 ± 0.6 ^{β γ}	5.3 ± 0.6 ^{δ α}	5.1 ± 0.4 ^{δ α}	10.8 ± 1.1 ^{β γ}
Choline	2.0 ± 0.7 ^{β γ}	1.0 ± 0.4 ^{δ α γ}	0.7 ± 0.2 ^{δ α β}	1.9 ± 0.6 ^{β γ}
Citrate	17.3 ± 0.5 ^{β γ}	9.7 ± 0.7 ^{δ α}	8.9 ± 0.6 ^{δ α}	18.8 ± 1.3 ^{β γ}
Formate	13.1 ± 0.7 ^{β δ}	64.8 ± 4.1 ^{α γ δ}	21.2 ± 2.0 ^β	22.6 ± 1.2 ^{α β}
Fumarate	0.6 ± 0.1 ^β	0.1 ± 0.0 ^{δ α}	0.3 ± 0.0 ^δ	0.8 ± 0.1 ^{β γ}
Glutamate	44.2 ± 2.6 ^{β γ}	32.1 ± 4.8 ^{δ α}	28.3 ± 3.3 ^{δ α}	37.1 ± 4.7 ^{β γ}
Gluthation	17.8 ± 0.4 ^{β γ δ}	2.6 ± 0.3 ^{δ α}	3.4 ± 0.1 ^{δ α}	14.1 ± 1.3 ^{β γ α}
Glycine	142.8 ± 3.3 ^{β γ}	116.2 ± 9.4 ^{δ α}	114.9 ± 7.3 ^{δ α}	145.8 ± 8.2 ^{β γ}
Isoleucine	17.4 ± 1.3 ^{β γ}	11.4 ± 1.5 ^{δ α}	12.2 ± 1.1 ^{δ α}	17.1 ± 1.8 ^{β γ}
Lactate	443.3 ± 28.1 ^{β γ}	285.2 ± 47.9 ^{δ α}	343.7 ± 18.0 ^{δ α}	454.9 ± 48.4 ^{β γ}
Leucine	17.5 ± 1.9 ^{β γ}	10.8 ± 1.9 ^{δ α}	11.4 ± 1.5 ^{δ α}	16.3 ± 2.0 ^{β γ}
NAD ⁺ /NADP	2.4 ± 0.2 ^γ	1.2 ± 0.2	2.6 ± 0.1 ^{δ α}	3.9 ± 0.1 ^γ

Annexes

Phenylalanine	19.1 ± 0.5 ^{γβ}	12.8 ± 0.7 ^{δ α}	14.7 ± 0.3 ^{δ α}	20.3 ± 0.5 ^{γβ}
Proline	38.7 ± 0.2 ^{β γ δ}	28.4 ± 1.2 ^{δ α}	29.1 ± 0.6 ^{δ α}	47.3 ± 1.3 ^{β γ α}
Pyroglutamate	20.4 ± 1.3 ^{δ β γ}	12.1 ± 0.7 ^{γ α δ}	14.7 ± 0.8 ^{δ β α}	24.6 ± 1.7 ^{α γ β}
Tyrosine	16.6 ± 0.7 ^{γβ}	11.9 ± 1.1 ^{δ α}	12.5 ± 0.7 ^{δ α}	16.3 ± 0.6 ^{γβ}
UDP-X	7.7 ± 0.8 ^δ	6.4 ± 0.6 ^{γ δ}	9.5 ± 0.7 ^{β δ}	12.2 ± 0.8 ^{α β γ}
Valine	21.4 ± 1.6 ^{β γ}	13.7 ± 1.8 ^{δ α}	14.5 ± 1.4 ^{δ α}	21.0 ± 2.2 ^{β γ}
2-OH-Butyrate	3.8 ± 0.3 ^{β γ}	1.3 ± 0.2 ^{δ α}	1.5 ± 0.1 ^{δ α}	3.7 ± 0.5 ^{β γ}
3-OH-Butyrate	5.7 ± 0.8 ^{β γ}	2.4 ± 0.5 ^{δ α}	2.5 ± 0.2 ^{δ α}	4.9 ± 0.8 ^{β γ}
3-OH-Isovalerate	2.5 ± 0.9 ^{β γ}	0.9 ± 0.4 ^{δ α}	1.0 ± 0.3 ^{δ α}	1.9 ± 0.7 ^{β γ}
Total amount	1254.6	875.0	891.5	1634.5

Data represent the average of four replicates ± SE.

One-way ANOVA (Kruskal Wallis) test revealed significant sample-to-sample variability ($p < 0.05$) when compared with α) ACN/H₂O; β) CH₂Cl₂/ACN/H₂O; γ) CH₂Cl₂/MeOH/H₂O and δ) MeOH/H₂O extraction methods.

III- GC-MS Optimization

Table S3 Repeatability of GC-MS analysis of metabolites extracted from NSC-34 cells profiled by silylation and by methoximation (60°-1h)- silylation derivatization

	silylation	Oximation+silylation
	RSD%	RSD%
Aminomalonic acid	9.4	10.9
Aspartic Acid	7.6	15.3
betSalanine	20.3	3.9
Glutamic acid	10.2	12.2
Glycerol	13.1	3.0
Glycine	20.7	4.0
Glycolic acid	3.6	3.6
L-isoleucine	4.8	4.4
L-Leucine	5.6	8.1
L-proline	3.0	5.0
L-Threonine	18.4	32.3
Lactic acid	4.1	5.6
Malic acid	15.7	3.1
Phosphoric acid	8.5	10.3

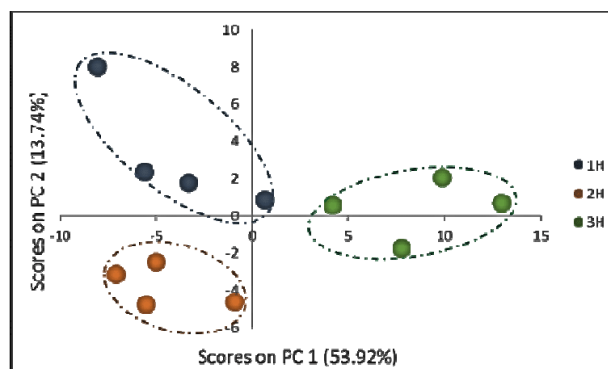


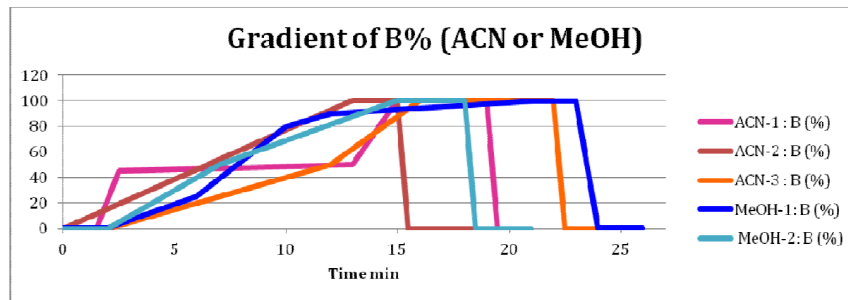
Fig. S3 Principal component analysis (PCA) scatter plot obtained from the 12 CG-MS chromatograms of intracellular metabolites after an oximation at 60°C during 1h (blue dot), at 60°C for 2h (orange dot) and at room temperature for 3h (green dot)

Annexes

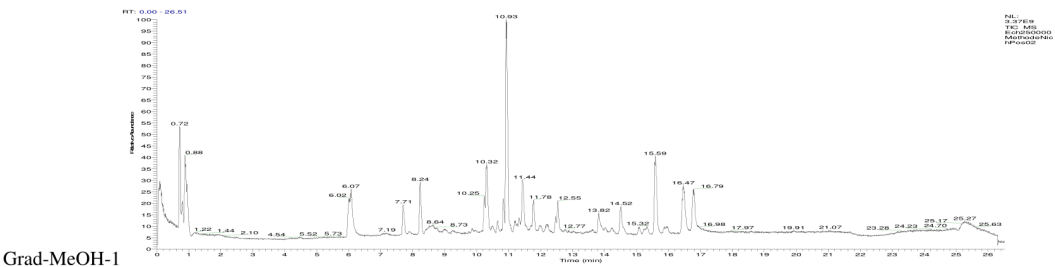
IV- LC-HRMS optimisation :

Table S4 Five gradients LC evaluated were performed at 0.4 mL min⁻¹ and 45°C. The mobile phase are 0.1% in water or 0.1% (vol/vol) in water (mobile phase A) and 0.1% (vol/vol) formic acid in methanol or acetonitrile (mobile phase B). The injection volume was 10 µL and the sample temperature was 4°C

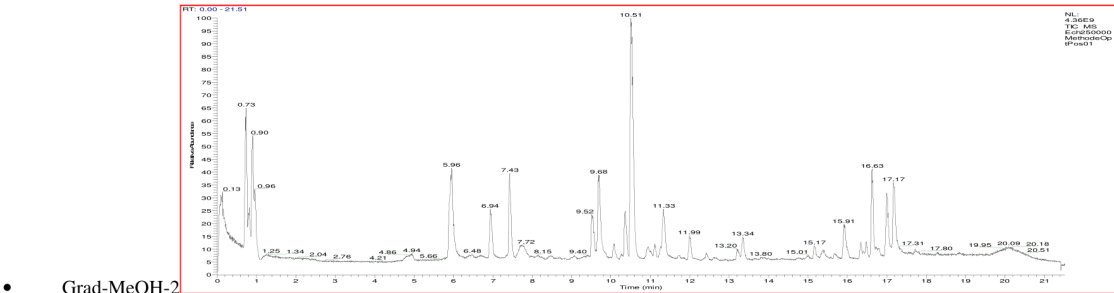
B (ACN)	Grad-ACN-1	Time (min)	0.0	1.5	2.5	13.0	15.0	19.0	19.5	21	
		A (%)	100.0	100.0	55.0	50.0	0.0	0.0	100.0	100.0	
		B (%)	0.0	0.0	45.0	50.0	100.0	100.0	0	0	
	Grad-ACN-2	Time (min)	0.0	13.0	15.0	15.5	19.0				
		A (%)	100.0	0.0	0.0	100.0	100.0				
		B (%)	0.0	100.0	100.0	0.0	0.0				
	Grad-ACN-3	Time (min)	0.0	2.0	12.0	16.0	22.0	22.5	24		
		A (%)	100.0	100.0	50.0	0.0	0.0	100	100		
		B (%)	0.0	0.0	50.0	100.0	100.0	0	0		
B (MeOH)	Grad-MeOH-1	Time (min)	0.0	2.0	6.0	10.0	12.0	21	23	24	26
		A (%)	99.9	99.9	75.0	20.0	10.0	0.1	0.1	99.9	99.9
		B (%)	0.1	0.1	25.0	80.0	90.0	99.9	99.9	0.1	0.1
	Grad-MeOH-2	Time (min)	0.0	2.0	7.0	15.0	18.0	18.5	21		
		A (%)	100.0	100.0	50.0	0.0	0.0	100	100		
		B (%)	0.0	0.0	50.0	100.0	100.0	0	0		



Annexes



Grad-MeOH-1



Grad-MeOH-2

Annexes

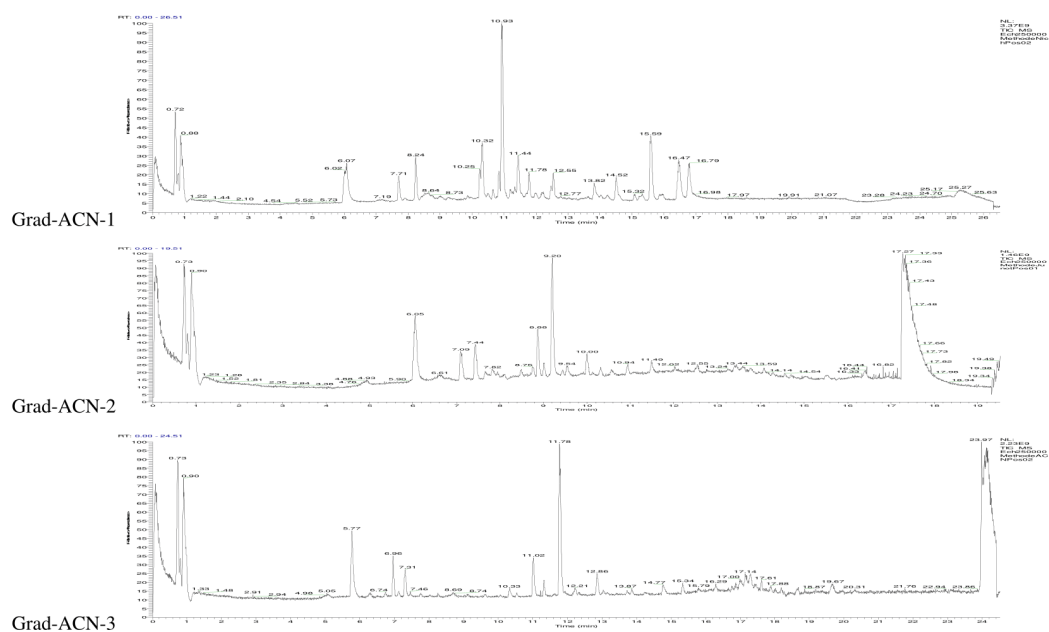


Fig. S4 Full scan acquisition resulting in the typical total ion current plots (TIC) obtained from LC-MS using different LC-gradients

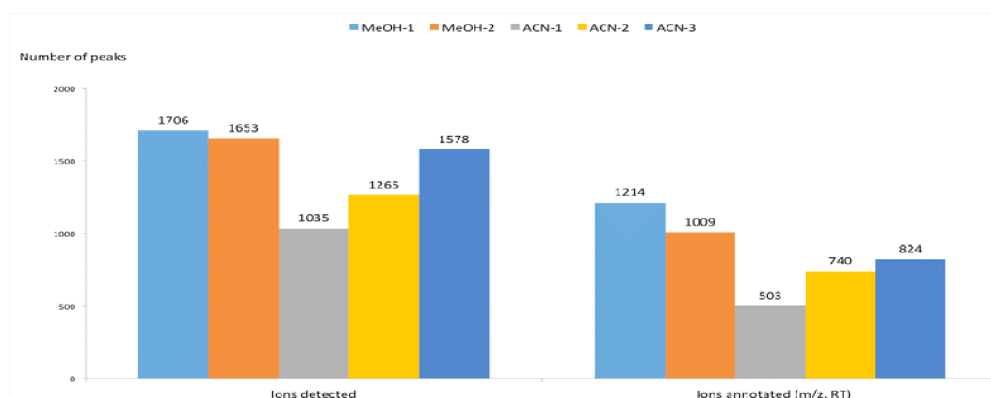


Fig. S5 Number of ions detected and ions annotated in positive mode for each gradient condition (see Appendices, Table A.4). The mobile phases were 0.1% (vol/vol) formic acid in water (mobile phase A) and 0.1% (vol/vol) formic acid in methanol (MeOH-1, MeOH-2) or acetonitrile (ACN-1, ACN-2, ACN-3) (mobile phase B)

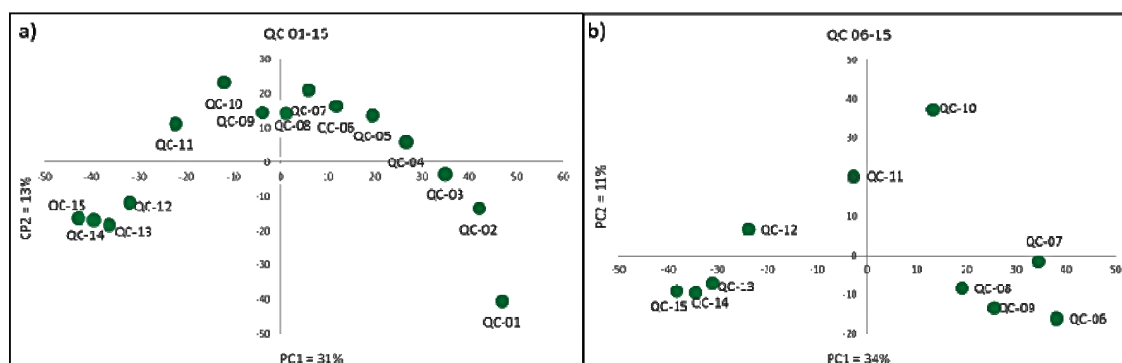


Fig. S6 Stability of chromatographic C18 column, after 15 QC injections studied by PCA score plot from 1653 detected ions by ESI+ (a), and in the PCA score plot (b) where the 5th first QC injections were deleted of the analyze

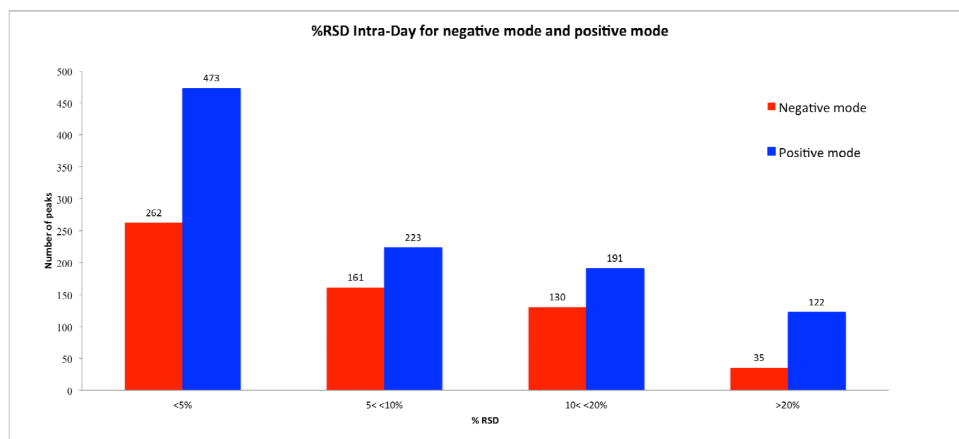


Fig. S7 Comparison of distribution of relative standard deviations of peak areas for 15 injections of QC sample. Precision of LC-HRMS for ESI+ for 1009 ions annotated, in blue, and ESI- for 588 ions annotated, in red. Intra-day precision (n=5) in terms of %RSD determined on QC samples

Annexe 3 : Informations supplémentaires de l'article n°4

Madji Hounoum Blandine *et al.* “*NSC-34 motor neuron-like cells are unsuitable as experimental model for glutamate-mediated excitotoxicity*” *Frontiers in Molecular Neuroscience*, (2016)10:11, pp118

Appendix

NSC-34 motor neuron-like cells are unsuitable as experimental model for glutamate-mediated excitotoxicity

Blandine Madji Hounoum¹, Patrick Vourc'h^{1,2}, Romain Felix³, Philippe Corcia^{1,4}, Franck Patin^{1,2}, Maxime Guéguinou³, Marie Potier-Cartreau³, Christophe Vandier³, Cédric Raoul⁵, Christian R Andres^{1,2}, Sylvie Mavel¹, Hélène Blasco^{1,2*}

Table A1. Primer sequences used for RT-PCR p 3

Table A2. Composition of Physiological Saline Solution p 4

Figure A1. RT-PCR on total RNA isolated from mouse brain used as positive control for optimal and specific amplification of glutamate receptor subunits GluA1-4 GluN1, GluN2A-D and GluN3A p 5

Figure A2. SDS-PAGE western blot analysis of lysates from mice brain (positive control), differentiated NSC-34 (NSC-34_D) and non-differentiated NSC-34 carried out using antibodies against GluN2A glutamate receptor subunit p 6

Table A3. Relative quantification of glutamate receptor subunit gene expression in NSC-34_D. – (no expression), + to +++ (weak to high expression) p 7

Figure A3: (A) Morphological characterization of primary motor neuron culture. Immunostaining of motor neuron cells for β III-tubulin indicated in green, p75NTR in red, nuclei stained with DAPI in blue, and merged channel (scale bar: 50 μ M). (B) Glutamate dependent calcium entry into motor neurons at 5, 12 and 13 DIV (Days In Vitro). Representative fluorescence measurement of Ca²⁺ entry after acute application of glutamate (100 μ M) in motor neurons. Glutamate was added at the time indicated by the arrow.

Measurements of intracellular calcium were performed independently at 5, 12 and 13 DIV. All results for each time point (5, 12 and 13 DIV) were an average of three independent experiments (coverslips) with at least five cells per coverslip analyzed. P8

Table A4: Motor neuronal properties evaluated on NSC-34 cells compared to motor neurons in our study and the literature findings. MN, motor neurons; NSC-34_D, differentiated NSC-34 cells, + to ++++ (weak to high) p9

Table A1: Primer sequences used for conventional RT-PCR and RT-qPCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplified fragment (bp)
GluA1	ACCACTACATCCTCGCCAAC	TCACTTGTCTCCACTGCTG	145
GluA2	ATTTCTGGGTAGGGATGGTTC	AAAAGTGGGAGCAGAAAGCA	116
GluA3	CACCAACCAGAACACCACTG	GCATACACCCCTCTGGAGAA	123
GluA4	CATTTACCCAGATCCCTGT	GCCAGGTCTTCTGCACTTTC	150
GluN1	CGGCTCTTGGAAGATACAGC	GTGGGAGTGAAGTGGTCGTT	156
GluN2A	TTGTGGTGATCGTGCTGAAT	CTCCAAGGTGACAATGCTGA	155
GluN2B	TCCGAAGCTGGTGATAATCC	TCCTCCAAGGTAACGATGCT	162
GluN2C	AACCACACCTTCAGCAGCG	GACTTCTTGCCCTTGGTGAG	464
GluN2D	CGATGGCGTCTGGAATGG	AGATGAAAAGTGTGACGGCG	265
GluN3A	CCGCGGGATGCCCTACTGTTC	CCAGTTGTTTCATGGTCAGGAT	417
ChAT	CCAACCAAGCCAAGCAATCT	AAGGATAGGGGAGCAGCAACAA	114
P75	CAACCAGACCGTGTGTGAAC	CCAGTCTCCTCGTCCTGGTA	183
Actin	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	TGATCCACATCTGCTGGAAG	147

Annexes

Table A2: Composition of Physiological Saline Solution

Composition	Solution Ca ²⁺ 2 mM
NaCl	140 mM
KCl	4 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	2 mM
Hepes	10 mM
Glucose	11.1 mM
pH (adjusted with NaOHaq)	7.4
	total volume adjusted with H ₂ O

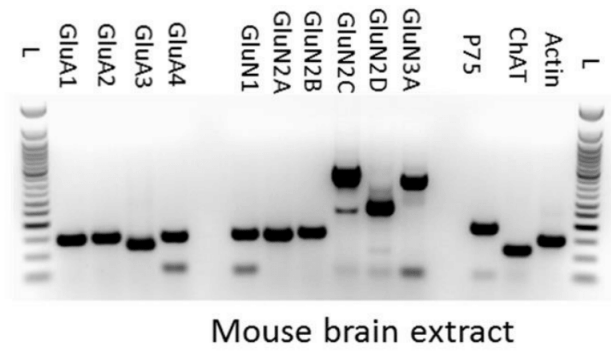
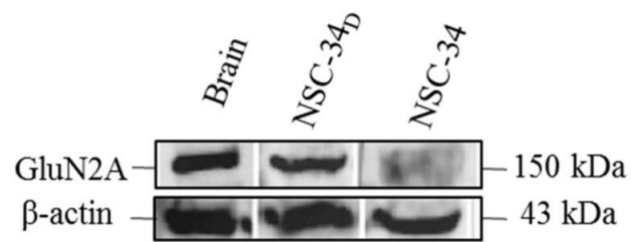


Fig. A1. RT-PCR on total RNA isolated from mouse brain used as positive control for optimal and specific amplification of glutamate receptor subunits GluA1, GluA2, GluA3, GluA4, GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D and GluN3A.

Figure A2: SDS-PAGE western blot analysis of lysates from mice brain (positive control), differentiated NSC-34 (NSC-34_D) and non-differentiated NSC-34 carried out using antibodies against GluN2A glutamate receptor subunit.



Annexes

Table A3: Relative quantification of glutamate receptor subunit gene expression in NSC-34_D.

– (no expression), + to +++ (weak to high expression)

	Mouse brain	MN	NSC-34	NSC-34 _D					
				Ham's F12		α -MEM		DMEM	
				+RA	-RA	+RA	-RA	+RA	-RA
GluA1	+++	+++	+	+	+	+	+	+	-
GluA2	+++	+++	-	+	+	+	-	+	-
GluA3	+++	+++	-	-	+	+	-	-	-
GluA4	+++	+++	-	+	+	+	+++	++	+++
GluN1	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	++	+++
GluN2A	+++	+++	+	-	+++	+	++	-	++
GluN2B	+++	+++	-	-	-	-	+	-	-
GluN2C	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
GluN2D	+++	+++	+	++	+++	+++	++	++	+++
GluN3A	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
ChAT	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
P75	+++	+++	++	++	+++	++	+++	++	+++
Actin	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++

Figure A3: (A) Morphological characterization of primary motor neuron culture. Immunostaining of motor neuron cells for β III-tubulin indicated in green, p75NTR in red, nuclei stained with DAPI in blue, and merged channel (scale bar: 50 μ M). (B) Glutamate dependent calcium entry into motor neurons at 5, 12 and 13 DIV (Days In Vitro). Representative fluorescence measurement of Ca^{2+} entry after acute application of glutamate (100 μ M) in motor neurons. Glutamate was added at the time indicated by the arrow. Measurements of intracellular calcium were performed independently at 5, 12 and 13 DIV. All results for each time point (5, 12 and 13 DIV) were an average of three independent experiments (coverslips) with at least five cells per coverslip analyzed.

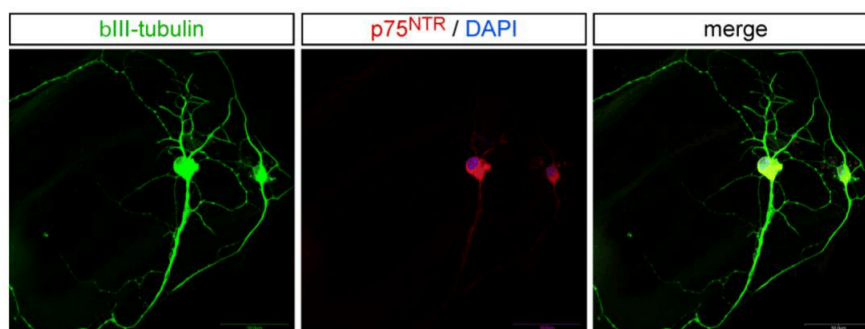
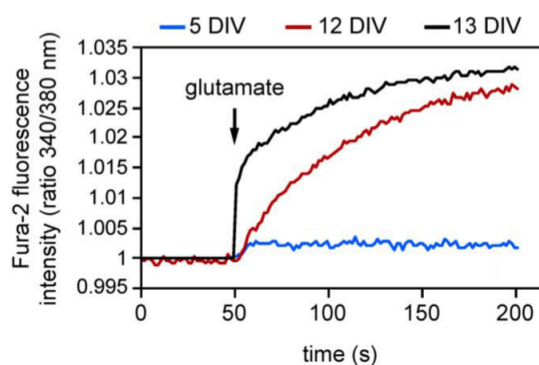
A**B**

Table A4: Motor neuronal properties evaluated on NSC-34 cells compared to motor neurons in our study and the literature findings about NSC-34 cells. MN, motor neurons; NSC-34_D, differentiated NSC-34 cells, + to ++++ (weak to high).

MN properties		MN	NSC-34 _D	NSC-34	Literature
Growth factor receptors	P75NTR	++	+++	++	Turner et al. (2004), Matusica et al. (2008)
Cholinergic markers	ChAT	+	+	+	Rembach et al. (2004), Maier et al. (2013)
Glutamate receptor subunits	GluA1	+++	+	+	Eggett et al. (2000), Rembach et al (2004)
	GluA2	+++	+	-	Eggett et al. (2000), Rembach et al (2004); Liu et al (2015)
	GluA3	+++	+	-	Eggett et al. (2000), Rembach et al (2004)
	GluA4	+++	+	-	Eggett et al. (2000), Rembach et al (2004)
	GluN1	+++	++++	+	Eggett et al. (2000)
	GluN2A	+++	++	+	Eggett et al. (2000)
	GluN2B	+++	-	-	Eggett et al. (2000)
	GluN2D	+++	++++	+	Eggett et al. (2000)
Ca ²⁺ influx		++++	+	-	Eggett et al. (2000), Liu et al (2015)
Glutamate sensitivity		++++	+	-	Maier et al. (2013), Durham et al. 1992, Liu et al (2015)

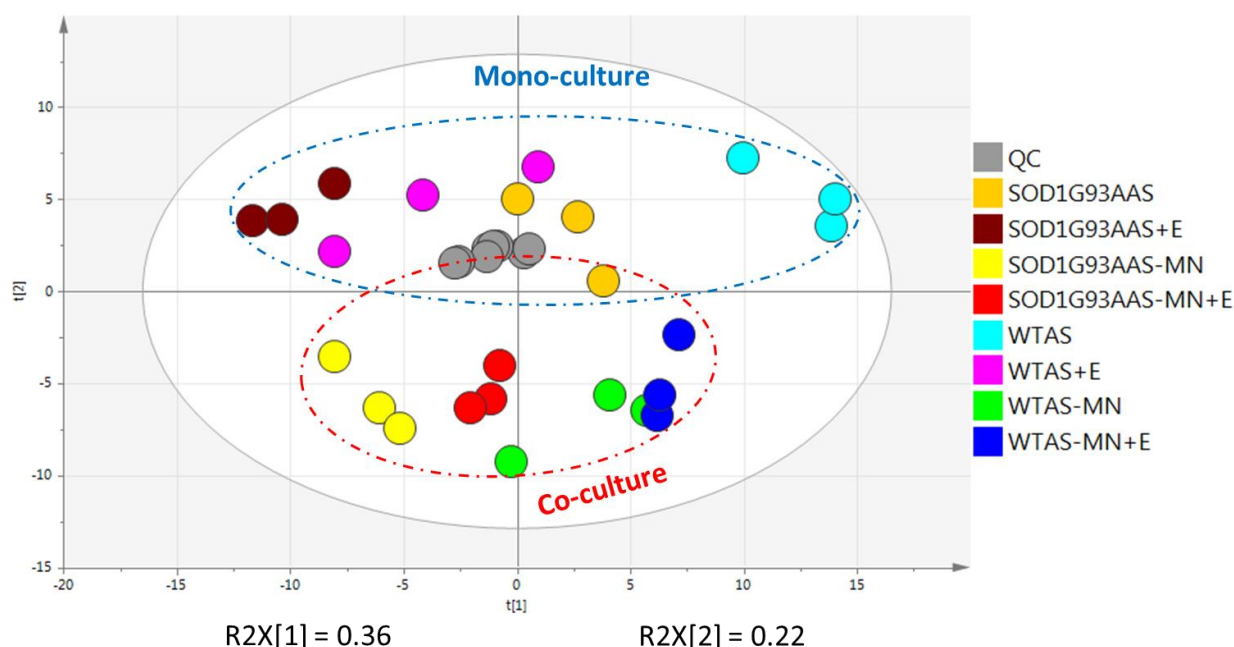
Annexe 4 : Informations supplémentaires de l'article n°5

Madji Hounoum Blandine *et al.* “*Wildtype motoneurons, ALS-linked SOD1 mutation and glutamate profoundly modify astrocytes metabolism and lactate shuttling*” Soumis dans *Glia*

Supplementary data

Wildtype motoneurons, ALS-linked *SOD1* mutation and glutamate profoundly modify astrocytes metabolism and lactate shuttling

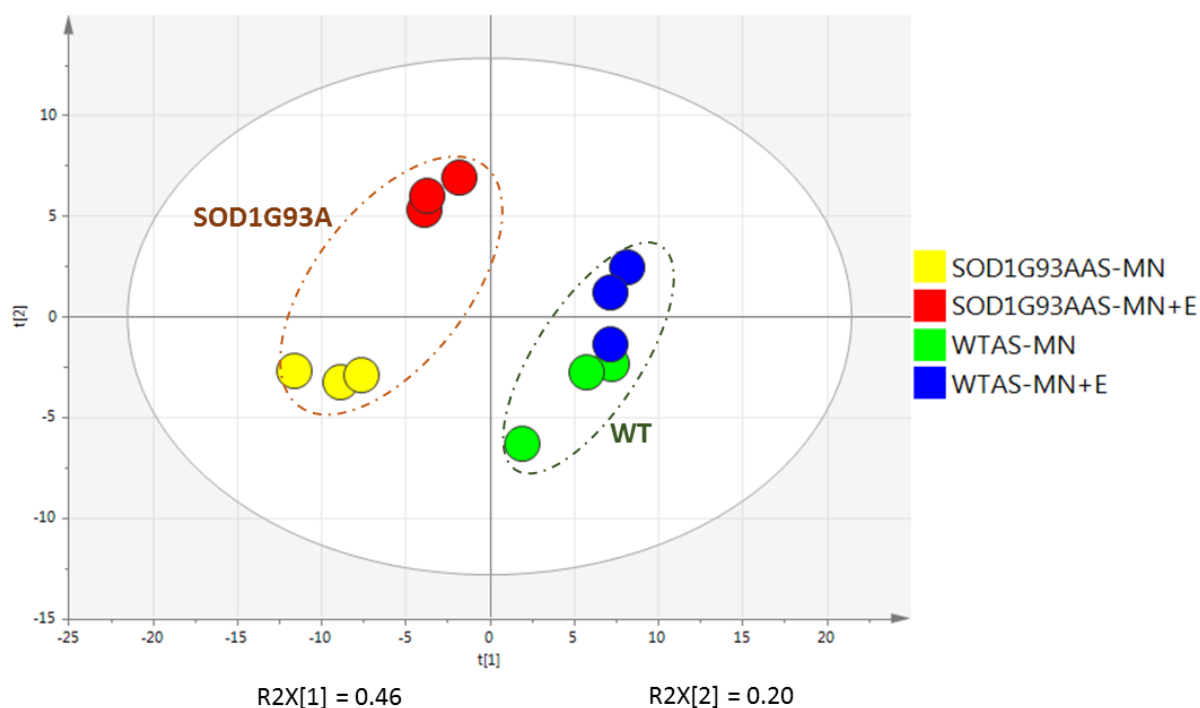
Figure S1: Principal component analysis (PCA) score plot of principal component 1 (PC 1) versus PC 2 for intracellular LC-HRMS analysis of quality controls (QCs) and astrocyte extracts. Astrocytes expressing (or not) a *SOD1*^{G93A} mutation, in monoculture or co-cultured with wildtype motoneurons and exposed (or not) to glutamate.



Quality controls (QC), wildtype astrocytes in mono-culture (WTAS), wildtype astrocytes in mono-culture exposed to glutamate (WTAS + E), wildtype astrocytes co-cultured with wild type motoneurons (WTAS-MN), wildtype astrocytes co-cultured with motoneurons and exposed to glutamate (WTAS-MN + E), *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes in mono-culture (*SOD1*^{G93A}AS), *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes in mono-culture exposed to glutamate (*SOD1*^{G93A}AS + E), *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons (*SOD1*^{G93A}AS-MN), *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons and exposed to glutamate (*SOD1*^{G93A}AS-MN + E).

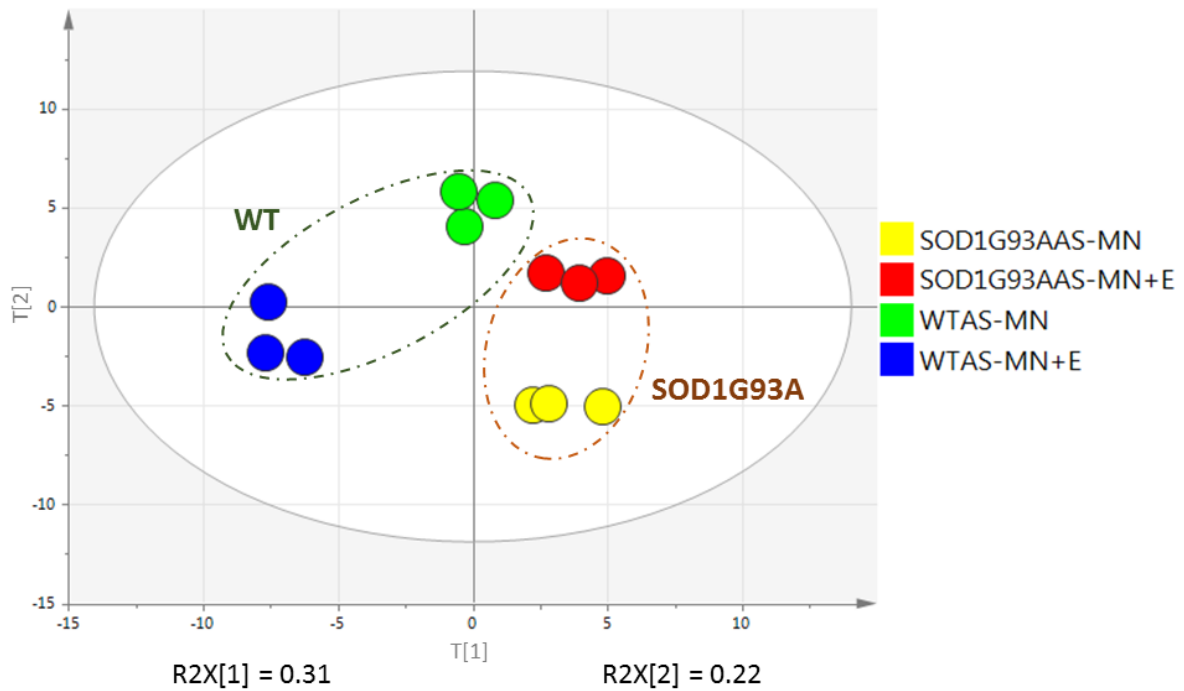
Figure S2: Principal component analysis (PCA) score plot of PC 1 *versus* PC 2 for (A)- intracellular LC-HRMS analysis and for (B)- extracellular media ^1H -NMR analysis of astrocytes expressing (or not) a $SOD1^{G93A}$ mutation, co-cultured with wildtype motoneurons and exposed (or not) to glutamate.

A)



Wildtype astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons (WTAS-MN), wildtype astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons and exposed to glutamate (WTAS-MN + E), $SOD1^{G93A}$ mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons ($SOD1^{G93A}$ AS-MN), $SOD1^{G93A}$ mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons and exposed to glutamate ($SOD1^{G93A}$ AS-MN + E).

B)



Culture media from co-culture of wildtype astrocytes with wildtype motoneurons (WTAS-MN, green), wildtype astrocytes co-cultured with motoneurons and exposed to glutamate (WTAS-MN + E, blue), *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons (*SOD1*^{G93A}AS-MN, yellow), *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons and exposed to glutamate (*SOD1*^{G93A}AS-MN + E, red).

Table S1: List of metabolites identified by a) LC-HRMS and by b) ¹H-NMR analysis

Metabolite	Analytical platform	Human metabolome database ID
2-Methylglutaric acid	LC-HRMS	HMDB00422
2-Methylmaleic acid	LC-HRMS	HMDB00634
3-Hydroxyphenylacetic acid	LC-HRMS	HMDB00440
4-Acetamidobutanoic acid	LC-HRMS	HMDB03681
4-Guanidinobutanoate	LC-HRMS	HMDB03464
4-Hydroxy-3-methoxyphenylglycol sulfate	LC-HRMS	HMDB03332
4-hydroxyphenylpyruvic acid	LC-HRMS	HMDB00707
5'-Methylthioadenosine	LC-HRMS	HMDB01173
5-Hydroxy-L-tyrosine	LC-HRMS	HMDB00450
6-Hydroxydopamine	LC-HRMS	HMDB01537
Acetyl-L-carnitine	LC-HRMS	HMDB00201
Adenosine	LC-HRMS	HMDB00050
Adipic acid	LC-HRMS	HMDB00448
Adrenaline	LC-HRMS	HMDB00068
Aminoadipic acid	LC-HRMS	HMDB00510
AMP	LC-HRMS	HMDB00045
Biotin	LC-HRMS	HMDB00030
cAMP	LC-HRMS	HMDB00058
Carnitine	LC-HRMS	HMDB01467
Catechol	LC-HRMS	HMDB00957
Cholic acid	LC-HRMS	HMDB00619
Cinnaldehyde	LC-HRMS	HMDB03441
Cinnamic acid	LC-HRMS	HMDB00567
Citric acid	LC-HRMS	HMDB00094
Creatinine	LC-HRMS	HMDB00562
dCDP	LC-HRMS	HMDB01245
Deoxycarnitine	LC-HRMS	HMDB01161
Dethiobiotin	LC-HRMS	HMDB03581
dGMP	LC-HRMS	HMDB01044
DHA	LC-HRMS	HMDB02183
Diethanolamine	LC-HRMS	HMDB03091
Dihydroxyacetone-phosphate	LC-HRMS	HMDB01473
Dihydroxyphenylacetic acid	LC-HRMS	HMDB01336
Ethylmalonic acid	LC-HRMS	HMDB00622
Folic acid	LC-HRMS	HMDB00121
Fumaric acid	LC-HRMS	HMDB00134
Gamma-glutamylthreonine	LC-HRMS	HMDB29159
Gamma-glutamyltyrosine	LC-HRMS	HMDB11741
Glutaric acid	LC-HRMS	HMDB00661
Glutathione	LC-HRMS	HMDB00125

Annexes

Glycerophosphocholine	LC-HRMS	HMDB00086
Heptanoic acid	LC-HRMS	HMDB00666
Hippuric acid	LC-HRMS	HMDB00714
Hydroxyphenyllactic acid	LC-HRMS	HMDB00755
Indole	LC-HRMS	HMDB00738
Indole-3-acetic acid	LC-HRMS	HMDB00197
Inosine	LC-HRMS	HMDB00195
L-Arginine	LC-HRMS	HMDB00517
L-Glutamic acid	LC-HRMS	HMDB00148
L-Kynurenine	LC-HRMS	HMDB00684
L-Methionine	LC-HRMS	HMDB00696
L-Proline	LC-HRMS	HMDB00162
Lumichrome	LC-HRMS	Ø
Malic acid	LC-HRMS	HMDB00744
Methyl-acetoacetate	LC-HRMS	HMDB00310
N-Acetyl-aspartic acid	LC-HRMS	HMDB00812
N-AcetylLeucine	LC-HRMS	HMDB11756
N-Acetyl-L-phenylalanine	LC-HRMS	HMDB00512
N-Acetyl-L-serine	LC-HRMS	HMDB02931
NAD	LC-HRMS	HMDB00902
Nicotinamide	LC-HRMS	HMDB01406
Palmitic acid	LC-HRMS	HMDB00220
Pantothenic acid	LC-HRMS	HMDB00210
Phenylacetaldehyde	LC-HRMS	HMDB06236
Phenylacetic acid	LC-HRMS	HMDB00209
Phenylpyruvic acid	LC-HRMS	HMDB00205
Phosphorylcholine	LC-HRMS	HMDB01565
Putrescine	LC-HRMS	HMDB01414
Pyridoxal-5'-phosphate	LC-HRMS	HMDB01491
Retinoic acid	LC-HRMS	HMDB01852
Retinol	LC-HRMS	HMDB00305
Riboflavin	LC-HRMS	HMDB00244
Sarcosine	LC-HRMS	HMDB00271
Sorbitol	LC-HRMS	HMDB00247
Sphinganine	LC-HRMS	HMDB00269
Suberic acid	LC-HRMS	HMDB00893
Succinic acid	LC-HRMS	HMDB00254
Trimethylamine	LC-HRMS	HMDB00906
Tryptamine	LC-HRMS	HMDB00303
UMP	LC-HRMS	HMDB00288
Uridine	LC-HRMS	HMDB00296
Urocanic acid	LC-HRMS	HMDB00301
Xanthine	LC-HRMS	HMDB00292
3-Hydroxybutyric acid	LC-HRMS and NMR	HMDB00357
Creatine	LC-HRMS and NMR	HMDB00064

Annexes

D-Glucose	LC-HRMS and NMR	HMDB00122
Lactic acid	LC-HRMS and NMR	HMDB00190
L-Alanine	LC-HRMS and NMR	HMDB00161
L-Glutamine	LC-HRMS and NMR	HMDB00641
L-Histidine	LC-HRMS and NMR	HMDB00177
L-Leucine	LC-HRMS and NMR	HMDB00687
L-Lysine	LC-HRMS and NMR	HMDB00182
L-Phenylalanine	LC-HRMS and NMR	HMDB00159
L-Threonine	LC-HRMS and NMR	HMDB00167
L-Tryptophan	LC-HRMS and NMR	HMDB00929
L-Tyrosine	LC-HRMS and NMR	HMDB00158
L-Valine	LC-HRMS and NMR	HMDB00883
Pyroglutamic acid	LC-HRMS and NMR	HMDB00267
Acetic acid	NMR	HMDB00042
Choline	NMR	HMDB00097
Formic acid	NMR	HMDB00142
Glycine	NMR	HMDB00123
Isoleucine	NMR	HMDB00172
Nicotinic acid	NMR	HMDB01488
Pyruvic acid	NMR	HMDB00243

Table S2: Impact of *SOD1*^{G93A} expression on astrocytes metabolome: metabolites altered by *SOD1*^{G93A} expression in astrocytes and discriminating *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes from wildtype astrocytes, and pathways in which they were involved were reported. Discriminating metabolites were determined by OPLS-DA (VIP>1) and a fold change (FC) ≥ 2.

Pathways	Metabolites	Log2 (FC)
Histidine metabolism	Urocanic acid	↑ (2.26)
Purine metabolism	3'-5'cyclic AMP	↓ (-1.24)
Glycolysis or glycogenesis	Glucose	↑ (1.75)
Biotin metabolism	Dethiobiotin	↑ (1.16)
Sphingolipid metabolism	Sphinganine	↑ (1.01)
Glutathione metabolism	Glutathione	↓ (-1.48)
Pyrimidine metabolism	2'-Deoxycytidine 5'-diphosphate	↓ (-2.01)
	Uridine 5'-monophosphate	↓ (-9.10)
Lysine metabolism	Lysine	↓ (-1.10)
	Amino adipic acid	↓ (-2.84)
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	N-Acetyl-L-aspartic acid	↑ (1.11)
Retinol metabolism	Retinol	↑ (1.76)
Fatty acid biosynthesis or metabolism	Palmitic acid	↑ (2.19)
Glycerophospholipid metabolism	Diethanolamine	↓ (-1.42)
2-oxocarboxylic acid metabolism	2-Methylmaleic acid	↓ (-1.17)
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis		

↑ and ↓ denote higher and lower level, respectively in cells in *SOD1*^{G93A} mutant astrocytes compared to wildtype astrocytes. In brackets the log2 (fold change *SOD1*^{G93A}/WT

Table S3: Metabolic changes in extracellular media: **1-** impact of *SOD1^{G93A}* expression in astrocytes (comparison between media from mono-cultures containing wildtype astrocytes and those containing *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes), **2-** glutamate effects on co-culture media containing wildtype and *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes (comparison between media from co-cultures exposed (or not) to glutamate), and **3-** ALS condition impact on the co-culture (media from co-culture containing wildtype astrocytes were compared to those containing *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes exposed to glutamate). Metabolites discriminating culture media in each comparison were determined by OPLS-DA (VIP > 1) and a fold change ≥ 2 .

Metabolites	Log2 (FC)			
	1- <i>SOD1</i> impact	2-Glutamate impact		3-ALS impact
	<i>SOD1^{G93A}</i> mono-culture	WT co-culture + E	<i>SOD1^{G93A}</i> co-culture+E	<i>SOD1^{G93A}</i> co-culture+E
Nicotinic acid	↑ (0.51)		↑ (0.38)	
Lactic acid	↓ (-0.49)			↓ (-0.49)
Valine		↓ (-0.49)		
Tryptophan		↓ (-0.53)		
Pyroglutamic acid		↓ (-0.44)		
Phosphocholine	↓ (-0.71)	↓ (-0.65)		
3-Hydroxybutyric acid	↓ (-0.77)	↓ (-0.70)	↑ (0.61)	↓ (-0.54)

↑ and ↓ denote higher and lower level, respectively in culture media of each investigated condition relative to those of control condition. In brackets the log2 (fold change *SOD1*/WT, treated/untreated and *SOD1* treated/WT untreated).

Table S4: Impact of wildtype motoneurons on *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes. Metabolites altered by the presence of wildtype motoneurons and discriminating *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons from those in monoculture, and pathways in which they were involved. Discriminating metabolites were determined by OPLS-DA (VIP>1) and a fold change ≥ 2 .

Pathways	Metabolites	Log 2 (FC)
AminoacytRNA biosynthesis	Glutamic acid	↑ (1.91)
	Glutamine	↑ (1.08)
	Lysine	↑ (1.27)
Glutamine and glutamate metabolism	Glutamic acid	↑ (1.91)
	Glutamine	↑ (1.08)
Histidine metabolism	Glutamic acid	↑ (1.91)
	Urocanic acid	↓ (-1.76)
Lysine metabolism	Lysine	↑ (1.27)
	Aminoadipic acid	↑ (8.78)
	Deoxycarnitine	↑ (1.08)
	N-Acetyl-carnitine	↑ (1.52)
Arginine and proline metabolism	Glutamine	↑ (1.08)
	Glutamic acid	↑ (1.91)
	Creatine	↑ (2.55)
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	N-Acetyl-L-aspartic acid	↑ (1.38)
	Glutamic acid	↑ (1.91)
	Glutamine	↑ (1.08)
Glycolysis or Gluconeogenesis	Glucose	↑ (1.24)
	Dihydroxyacetone phosphate	↑ (1.12)
Phenylalanine metabolism	Phenylacetaldehyde	↑ (2.21)
	N-Acetylphenylalanine	↑ (1.94)
Tyrosine metabolism	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	↑ (12.39)
Purine metabolism	3'-5'cyclic AMP	↑ (2.08)
	Adenosine monophosphate	↑ (2.69)
	Adenosine	↑ (3.51)
	Inosine	↑ (4.48)
	2'-Deoxyguanosine monophosphate	5'- ↑ (3.28)
	Glutamine	↑ (1.08)
Retinol metabolism	Retinol	↑ (5.55)
Glutathione metabolism	Glutamic acid	↑ (1.91)
	Glutathione	↑ (2.82)
Glycerophospholipid metabolism	Docosahexaenoic acid (DHA)	↑ (1.85)
	Dihydroxyactone phosphate	↑ (2.05)
	Phosphocholine	↑ (1.95)

Annexes

	Glycerophosphocholine	↑	(2.05)
	Diethanolamine	↑	(2.12)
TCA cycle	Malic acid	↑	(1.55)
Fatty acid biosynthesis or metabolism	Palmitic acid	↓	(-2.10)
Primary bile acid biosynthesis	Cholic acid	↑	(1.89)
	Uridine	↑	(1.47)
Pyrimidine metabolism	Uridine 5'-monophosphate	↑	(11.94)
	2'-Deoxycytidine 5'-disphosphate	↑	(2.59)
	Glutamine	↑	(1.08)

↑ and ↓ denote higher and lower level, respectively in *SOD1^{G93A}* AS in co-culture compared to those in mono-culture. In brackets the log2 (fold change mono-/co-culture).

Table S5: Glutamate effects on wildtype and *SOD1^{G93A}* mutant astrocytes co-cultured with wildtype motoneurons: metabolites altered by glutamate exposure in wildtype astrocytes co-cultured, discriminating cells treated with glutamate from those without treatment, and, pathways in which they were involved. Discriminating metabolites were determined by OPLS-DA (VIP>1) and a fold change ≥ 2 .

Pathways	Metabolites	Log2 (FC)
<i>Glutamate effects on wildtype astrocytes</i>		
Biotin metabolism	Biotin	↑ (2.79)
Riboflavin metabolism	Riboflavin	↑ (1.66)
Purine metabolism	3'-5'cyclic AMP	↑ (1.03)
Fatty acid biosynthesis or metabolism	Palmitic acid	↑ (2.88)
Pyrimidine metabolism	Uridine	↓ (-1.40)
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvic acid	↓ (-1.01)
<i>Glutamate effects on SOD1^{G93A} mutant astrocytes</i>		
Glutamine and glutamate metabolism		
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	Glutamic acid	↑ (1.33)
Glutathione metabolism		
Glycolysis or glycogenesis	Lactic acid	↓ (-1.98)
Pyruvate metabolism		
	Glutamic acid	↑ (1.33)
Arginine and proline metabolism	Creatine	↓ (-1.17)
	Creatinine	↓ (-1.07)
Phenylalanine metabolism	Phenylacetaldehyde	↓ (-1.97)
Lysine metabolism	Deoxycarnitine	↓ (-1.08)
	L-Acetylcarnitine	↓ (-1.16)
Pyrimidine metabolism	Uridine	↓ (-1.20)

↑ and ↓ denote higher and lower level, respectively in cells treated with glutamate compared to those without treatment. In brackets the log2 (fold change treated/untreated)

Blandine MADJI HOUNOUM

Etude des altérations du métabolisme induites par le glutamate dans un modèle *in vitro* de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) par une approche métabolomique

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une perte sélective des motoneurones et impliquant les effets neurotoxiques des astrocytes. Le but de ce travail est d'explorer les altérations du métabolisme dans les astrocytes induites par des conditions associées à la SLA.

Nous avons dans un premier temps mis en place une méthodologie d'analyse spectrométrique (résonance magnétique nucléaire et spectrométries de masse) du métabolome cellulaire. Ensuite, nous avons invalidé les cellules NSC-34 comme modèle *in vitro* d'étude de l'excitotoxicité induite par le glutamate. Nous avons enfin étudié les altérations métaboliques dans les astrocytes primaires dans des conditions de la SLA et décrit plusieurs dysfonctionnements métaboliques dans ces cellules induits par l'expression de la mutation *SOD1^{G93A}*, par la présence des motoneurones sauvages et par l'exposition au glutamate. Ce travail met en évidence les relations métaboliques entre la SLA et le métabolisme énergétique cérébral.

Nos résultats contribuent à la compréhension des altérations métaboliques des astrocytes dans la SLA et pourraient aider à appréhender de nouvelles cibles thérapeutiques associées aux altérations métaboliques dans la SLA, afin de protéger les motoneurones des perturbations induites par le glutamate.

Mots Clés : SLA, empreinte métabolomique, glutamate, excitotoxicité, astrocytes, motoneurones, spectrométrie de masse

The selective degeneration of motoneuron that characterizes amyotrophic lateral sclerosis (ALS), implicates non-cell-autonomous effects of astrocytes. The aim of this work is to explore the metabolic status of astrocytes exposed to ALS-associated conditions, using metabolomics approach.

We first, developed a methodology for the analysis of cellular metabolome using different analytical technologies, and then we evaluated the relevance of differentiated NSC-34 as an *in vitro* model for glutamate excitotoxicity studies. Finally, we evaluated metabolic alterations in astrocytes in ALS-associated conditions and we described several metabolic dysfunctions in these cells induced by the expression of a *SOD1^{G93A}* mutation, the presence of wildtype motoneurons and glutamate exposition. These studies highlight major impacts of ALS on the brain energetic metabolism.

This work provides novel insight for understanding the metabolic dysfunction of astrocytes in ALS conditions and opens perspective of therapeutics targets though focus on these metabolic ways, in order to protect motoneurons from glutamate injury.

Keywords:: ALS, metabolomics profile, glutamate, excitotoxicity, astrocytes, motoneurons, mass spectrometry