

**UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER  
FACULTES DE MEDECINE**

---

ANNEE 2014

2014 TOU3 1583

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE  
MEDECINE SPECIALISEE CLINIQUE**

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Clara GROSSET-JANIN**

le 10 octobre 2014

**METABOLISME DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE DANS LA  
SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE**

Directeur de thèse : Docteur Pascal CINTAS

**JURY**

Monsieur le Professeur Vincent LARRUE	Président
Monsieur le Professeur Thierry LEVADE	Assesseur
Monsieur le Professeur Jérémie PARIENTE	Assesseur
Monsieur le Docteur Pascal CINTAS	Assesseur
Madame le Docteur Elizabeth CAUSSE	Suppléant



**TABLEAU du PERSONNEL HU**  
**des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier**  
**au 1<sup>er</sup> septembre 2013**

**Professeurs Honoraires**

Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Y	Professeur Honoraire	Mme PUEL J.
Doyen Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire	M. GOUZI
Professeur Honoraire	M. COMMANAY	Professeur Honoraire associé	M. DUTAU
Professeur Honoraire	M. CLAUX	Professeur Honoraire	M. PONTONNIER
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. PASCAL
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.
Professeur Honoraire	M. GEDEON	Professeur Honoraire	M. BAYARD
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE
Professeur Honoraire	M. RIBAUT	Professeur Honoraire	M. FABIE
Professeur Honoraire	M. SARRASIN	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. DUFFAUT
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. GALINIER	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. BASTIDE	Professeur Honoraire	M. BONAFE
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. GAUBERT	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES F.
Professeur Honoraire	M. GUILHEM	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. JOURNAL
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	M. GARRIGUES	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. BARRET
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. GUIRAUD	Professeur Honoraire	M. RIBOT
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. DEL SOL
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. ABBAL
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE	Professeur Honoraire	M. DURAND
Professeur Honoraire	M. PONTONNIER	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHWEITZER
Professeur Honoraire	M. CARTON	Professeur Honoraire	M. RAILHAC

**Professeurs Émérites**

Professeur JUSKIEWENSKI	Professeur J.L. ADER
Professeur LARROUY	Professeur Y. LAZORTHES
Professeur ALBAREDE	Professeur L. LARENG
Professeur CONTE	Professeur F. JOFFRE
Professeur MURAT	Professeur J. CORBERAND
Professeur MANELFE	Professeur B. BONEU
Professeur LOUVET	Professeur H. DABERNAT
Professeur SARRAMON	Professeur M. BOCCALON
Professeur CARATERO	Professeur B. MAZIERES
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL	Professeur E. ARLET-SJAU
Professeur COSTAGLIOLA	Professeur J. SIMON

**P.U. - P.H.**

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ADOUE D.	Médecine Interne, Gériatrie
M. AMAR J.	Thérapeutique
M. ARNE J.L. (C.E)	Ophthalmologie
M. ATTAL M. (C.E)	Hématologie
M. AVET-LOISEAU H	Hématologie, transfusion
M. BLANCHER A.	Immunologie (option Biologique)
M. BONNEVILLE P.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. BOSSAVY J.P.	Chirurgie Vasculaire
M. BRASSAT D.	Neurologie
M. BROUSSET P. (C.E)	Anatomie pathologique
M. BUGAT R. (C.E)	Cancérologie
M. CARRIE D.	Cardiologie
M. CHAP H. (C.E)	Biochimie
M. CHAUVEAU D.	Néphrologie
M. CHOLLET F. (C.E)	Neurologie
M. CLANET M. (C.E)	Neurologie
M. DAHAN M. (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DEGUINE O.	O. R. L.
M. DUCOMMUN B.	Cancérologie
M. FERRIERES J.	Epidémiologie, Santé Publique
M. FRAYSSE B. (C.E)	O.R.L.
M. (ZOPET J. (C.E)	Bactériologie-Virologie
Mme LAMANT L.	Anatomie Pathologique
M. LANG T.	Biostatistique Informatique Médicale
M. LANGIN D.	Nutrition
M. LAUGUE D.	Médecine Interne
M. LIBLAU R.	Immunologie
M. MAGNAVAL J.F.	Parasitologie
M. MALVAUD B.	Urologie
M. MANSAT P.	Chirurgie Orthopédique
M. MARCHOU B.	Maladies Infectieuses
M. MONROZIES X.	Gynécologie Obstétrique
M. MONTASTRUC J.L. (C.E)	Pharmacologie
M. MOSCOVICI J.	Anatomie et Chirurgie Pédiatrique
Mme MOYAL E.	Cancérologie
Mme NOURHASHEMI F.	Gériatrie
M. OLIVES J.P. (C.E)	Pédiatrie
M. OSWALD E.	Bactériologie-Virologie
M. PARINAUD J.	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.
M. PERRET B. (C.E)	Biochimie
M. POURRAT J.	Néphrologie
M. PRADERE B.	Chirurgie générale
M. QUERLEU D.(C.E)	Cancérologie
M. RASCOL O.	Pharmacologie
M. RISCHMANN P. (C.E)	Urologie
M. RIVIERE D. (C.E)	Physiologie
M. SALES DE GAUZY J.	Chirurgie Infantile
M. SALLES J.P.	Pédiatrie
M. SERRE G. (C.E)	Biologie Cellulaire
M. TELMON N.	Médecine Légale
M. VINEL J.P. (C.E)	Hépatogastro-entérologie

**P.U. - P.H.**

2ème classe

Mme BEYNE-RAUZY O.	Médecine Interne
M. BIRMES Ph.	Psychiatrie
M. BROUCHET L.	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. BUREAU Ch.	Hépatogastro-entéro
M. CALVAS P.	Généraliste
M. CARRERE N.	Chirurgie Générale
Mme CASPER Ch.	Pédiatrie
M. CHAIX Y.	Pédiatrie
Mme CHARPENTIER S.	Thérapeutique, méd. d'urgence, addic
M. COGNARD G.	Neuroradiologie
M. DE BOISSEZON X.	Médecine Physique et Réadapt. Fond
M. FOURCADE O.	Anesthésiologie
M. FOURNIE B.	Rhumatologie
M. FOURNIE P.	Ophthalmologie
M. GEERAERTS T.	Anesthésiologie et Réanimation chir.
Mme GENESTAL M.	Réanimation Médicale
M. LAROCHE M.	Rhumatologie
M. LAUWERS F.	Anatomie
M. LEBON B.	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. MAZIERES J.	Pneumologie
M. MOLINIER L.	Epidémiologie, Santé Publique
M. PARANT O.	Gynécologie Obstétrique
M. PARENTE J.	Neurologie
M. PATHAK A.	Pharmacologie
M. PAUL C.	Dermatologie
M. PAYOUX P.	Biophysique
M. PAYRASTRE B.	Hématologie
M. PORTIER G.	Chirurgie Digestive
M. PERON J.M.	Hépatogastro-entérologie
M. RECHER Ch.	Hématologie
M. RONCALLI J.	Cardiologie
M. SANS N.	Radiologie
Mme SELVES J.	Anatomie et cytologie pathologiques
M. SOL J-Ch.	Neurochirurgie

**P.U.**

M. OUSTRIC S. Médecine Générale

**P.U. - P.H.**  
Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. AGAR Ph.	Pédiatrie
M. ALRIC L.	Médecine Interne
M. ARLET Ph. (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL J.F.	Physiologie
Mme BERRY I.	Biophysique
M. BOUTAÛT F. (C.E)	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
M. BUSCAIL L.	Hépatogastro-Entérologie
M. CANTAGREL A.	Rhumatologie
M. CARON Ph. (C.E)	Endocrinologie
M. CHAMONTIN B. (C.E)	Thérapeutique
M. CHAVOIN J.P. (C.E)	Chirurgie Plastique et Reconstructive
M. CHIRON Ph.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme COURTADE SAÏDI M.	Histologie Embryologie
M. DELABESSE E.	Hématologie
Mme DELISLE M.B. (C.E)	Anatomie Pathologique
M. DIDIER A.	Pneumologie
M. ESCOURROU J. (C.E)	Hépatogastro-Entérologie
M. FOURTANIER G. (C.E)	Chirurgie Digestive
M. GALINIER M.	Cardiologie
M. GERAUD G.	Neurologie
M. GLOCK Y.	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GRAND A. (C.E)	Epidémiol. Eco. de la Santé et Prévention
Mme HANARE H.	Endocrinologie
M. LAGARRIGUE J. (C.E)	Neurochirurgie
M. LARRUE V.	Neurologie
M. LAURENT G. (C.E)	Hématologie
M. LEVADET.	Biochimie
M. MALECAZE F. (C.E)	Ophthalmologie
Mme MARTY N.	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP P.	Maladies Infectieuses
M. PESSEY J.J. (C.E)	O. R. L.
M. PLANTE P.	Urologie
M. RAYNAUD J-Ph.	Psychiatrie Infantile
M. REME J.M.	Gynécologie-Obstétrique
M. RITZ P.	Nutrition
M. ROCHE H. (C.E)	Cancérologie
M. ROSTAING L. (C.E)	Néphrologie
M. ROUGE D. (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU H.	Radiologie
M. SALVAYRE R. (C.E)	Biochimie
M. SAMI E.K. (C.E)	Anesthésiologie Réanimation
M. SCHMITT L. (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD J.M.	Pharmacologie
M. SERRANO E. (C.E)	O. R. L.
M. SOULIE M.	Urologie
M. SUC B.	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER M.T.	Pédiatrie
M. VELLAS B. (C.E)	Gériatrie

**P.U. - P.H.**  
2ème classe

M. ACCADBLE D.F.	Chirurgie Infantile
Mme ANDREU S.	Epidémiologie
M. ARBUS Ch.	Psychiatrie
M. BERRY A.	Parasitologie
M. BONNEVILLE F.	Radiologie
M. BROUCHET L.	Chir. Thoracique et cardio-vasculaire
M. BUIAN L.	Uro-Antiologie
Mme BURJA-RIVIERE A.	Médecine Vasculaire
M. CHAYNES P.	Anatomie
M. CHAUFOUR X.	Chirurgie Vasculaire
M. CONSTANTIN A.	Rhumatologie
M. DELOBEL P.	Maladies Infectieuses
M. COURBON	Biophysique
M. DAMBRIN C.	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DE BOISSEZON X.	Médecine Physique et Réadaptation
M. DECRAMER S.	Pédiatrie
M. DELORD JP.	Cancérologie
M. ELBAZ M.	Cardiologie
M. GALINIER Ph.	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STÓWHAS I.	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET A.	Anatomie Pathologique
M. GOURDY P.	Endocrinologie
M. GROLLEAU RAOUX J.L.	Chirurgie plastique
Mme GUMBAUD R.	Cancérologie
M. HUYGHE E.	Urologie
M. KAMAR N.	Néphrologie
M. LAFOSSE JM.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. LEGUEVAQUE P.	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARQUE Ph.	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MAZEREELW J.	Dermatologie
M. MINVILLE V.	Anesthésiologie Réanimation
M. MUSCARI F.	Chirurgie Digestive
M. OTAL Ph.	Radiologie
M. ROLLAND Y.	Générat
M. ROUX F.E.	Neurochirurgie
M. SAILLER L.	Médecine Interne
M. SOULAT J.M.	Médecine du Travail
M. TACK I.	Physiologie
M. VAYSSIERE Ch.	Gynécologie Obstétrique
M. VERGEZ S.	O.R.L.
Mme URD-COSTE E.	Anatomie Pathologique

M.C.U. - P.H.		M.C.U. - P.H.	
M. APOIL P. A.	Immunologie	Mme ABRAVANEL F.	Bactériologie, Virologie Hygiène
Mme ARNAUD C.	Epidémiologie	Mme ARCHAMBAUD M.	Bactériologie, Virologie Hygiène
M. BIETH E.	Génétique	M. BES J.C.	Histologie - Embryologie
Mme BONGARD V.	Epidémiologie	M. CMBUS J.P.	Hématologie
Mme CASPAR BAUGUIL S.	Nutrition	Mme CANTERO A.	Biochimie
Mme CASSANG S.	Parasitologie	Mme CARFAGNA L.	Pédiatrie
Mme CONCINA D.	Anesthésie-Réanimation	Mme CASSOL E.	Biophysique
M. CONGY N.	Immunologie	Mme CAUSSE E.	Biochimie
Mme COURBON	Pharmacologie	M. CHASSANG N.	Génétique
Mme DAMASE C.	Pharmacologie	Mme CLAVE D.	Bactériologie Virologie
Mme de GLISEZENSKY I.	Physiologie	M. CLAVEL C.	Biologie Cellulaire
Mme DELMAS C.	Bactériologie Virologie Hygiène	Mme COLLIN L.	Cytologie
Mme DE-MAS V.	Hématologie	M. CORRE J.	Hématologie
M. DUBOIS D.	Bactériologie Virologie Hygiène	M. DEDOIT F.	Médecine Légale
Mme DUGUET A.M.	Médecine Légale	M. DELPLA P.A.	Médecine Légale
Mme DULY-BOUHANICK B.	Thérapeutique	M. EDOUARD T.	Pédiatrie
M. DUPUI Ph.	Physiologie	Mme ESQUIROL Y.	Médecine du Travail
Mme FAUVEL J.	Biochimie	Mme ESCOURROU G.	Anatomie Pathologique
Mme FILLAUX J.	Parasitologie	Mme GALINIER A.	Nutrition
M. GANTET P.	Biophysique	Mme GARDETTE V.	Epidémiologie
Mme GENNERO I.	Biochimie	M. GASQ D.	Physiologie
Mme GENOUX A.	Biochimie et biologie moléculaire	Mme GRARE M.	Bactériologie Virologie Hygiène
M. HAMDI S.	Biochimie	Mme GUILBEAU-FRUGIER C.	Anatomie Pathologique
Mme HITZEL A.	Biophysique	Mme INGUENEAU C.	Biochimie
M. IRIART X.	Parasitologie et mycologie	M. LAHARRAGUE P.	Hématologie
M. JALBERT F.	Stomato et Maxillo Faciale	M. LEANDRI R.	Biologie du dével. et de la reproduction
M. KIRZIN S.	Chirurgie générale	M. LEPAGE B.	Biostatistique
Mme LAPEYRE-MESTRE M.	Pharmacologie	M. MARCHEIX B.	Chirurgie Cardio Vasculaire
M. LAURENT C.	Anatomie Pathologique	Mme MAUPAS F.	Biochimie
Mme LE TINNER A.	Médecine du Travail	M. MIEUSSET R.	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LOPEZ R.	Anatomie	Mme PERQUET B.	Nutrition
M. MONTOYA R.	Physiologie	Mme PRADDAUDE F.	Physiologie
Mme MOREAU M.	Physiologie	M. RIMAUHO J.	Anatomie et Chirurgie Générale
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire	M. RONGIERES M.	Anatomie - Chirurgie orthopédique
M. PILLARD F.	Physiologie	Mme SOMMET A.	Pharmacologie
Mme PRERE M.F.	Bactériologie Virologie	M. TRACZUK J.	Immunologie
Mme PUISSANT B.	Immunologie	M. VALLET P.	Physiologie
Mme RAGAB J.	Biochimie	Mme VEZZOSI D.	Endocrinologie
Mme RAYMOND S.	Bactériologie Virologie Hygiène		
Mme SABOURDY F.	Biochimie		
Mme SAUNE K.	Bactériologie Virologie		
M. SOLER V.	Ophthalmologie		
M. TAFANI J.A.	Biophysique		
M. TREINER E.	Immunologie		
Mme TREMOLLIERES F.	Biologie du développement		
M. TRICOIRE J.L.	Anatomie et Chirurgie Orthopédique	M. BISMUTH S.	M.C.U. Médecine Générale
M. VINCENT C.	Biologie Cellulaire	Mme ROUGE-BUGAT ME.	M.C.U. Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr STILLMUNKES A.  
Dr BRILLAC Th.  
Dr ABITTEBOUL Y.

Dr ESCOURROU B.  
Dr BISMUTH M.  
Dr BOYER P.  
Dr ANE S.

## REMERCIEMENTS

**Monsieur le Professeur Vincent Larrue,**

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Neurologie

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury, j'en suis très honorée.

Merci de votre implication dans la formation des internes et de la grande qualité de l'enseignement que vous nous dispensez au quotidien. Votre culture de la neurologie, votre sagesse et votre rigueur sont un modèle pour moi.

Je vous prie de bien vouloir recevoir ma plus sincère gratitude et mon profond respect.

**Monsieur le Professeur Thierry Levade,**

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Biochimie

Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger à ce jury de thèse.

Merci pour votre bienveillance et votre disponibilité pour l'élaboration de ce travail.

Soyez assuré de mon profond respect.

**Monsieur le Professeur Jérémie Pariente,**

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Neurologie

Votre présence dans ce jury est un honneur pour moi.

Merci pour la qualité de la formation dont vous nous gratifiez. Cela restera un grand regret pour moi de ne pas avoir pu profiter plus de la richesse de votre enseignement, en particulier concernant la cognition.

Veuillez bien recevoir ma respectueuse considération.

**Madame le Docteur Elizabeth Causse,**

Maître de Conférences des Universités

Praticien Hospitalier

Biochimie

Je vous remercie de m'avoir offert votre aide précieuse pour la réalisation de ce travail. Votre appui a été indispensable à l'organisation de ce projet.

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

Soyez assurée de mon profond respect et de toute ma gratitude.

**Monsieur le Docteur Pascal Cintas,**

Praticien Hospitalier

Neurologie

Merci de m'avoir offert ce sujet de thèse et de m'avoir apporté ton soutien à chaque étape de la réalisation de ce projet.

Merci pour ton implication auprès des malades et au sein du Centre SLA.

Merci pour ta disponibilité, ton calme et ta gentillesse. Tu nous impressionnes tous les jours par l'étendue de ton savoir que tu nous transmets patiemment entre deux consultations, pendant une EMG, au détour d'un café ou devant une glace à la mangue à l'internat...

Merci Pascal.

Sans oublier,

**Jean-François Benoist** et **Apolline Imbard**, les biochimistes de Robert-Debré, sans qui ce travail n'aurait pas été réalisable. Merci pour votre disponibilité et votre aide précieuse pour l'interprétation des résultats.

**Frédérique Sabourdy** pour son aide et sa gentillesse. Merci également aux **techniciens** responsables des chromatographies des acides aminés qui m'ont toujours bien accueillie lors de mes nombreux passages à l'IFB.

**Nathalie Nasr** pour m'avoir accordé du temps pour vérifier mes statistiques afin que je puisse présenter des résultats cohérents.

**Les Professeurs Christian Confavreux** et **Sandra Vukusic**, pour m'avoir fait découvrir la neurologie, en cours tout d'abord, puis lors de mon stage d'externat, et pour m'avoir donné les premiers l'envie de faire cette spécialité. Vous m'avez ensuite accueillie dans votre service pour un intermède estival, et c'est « chez vous » que je continue l'aventure l'année prochaine. Merci.

**Nelly** pour m'avoir prise « sous ton aile », mais aussi pour ton implication inlassable dans la formation des internes, quotidienne, au lit des malades.

Les neurologues qui m'ont formée pendant ces 4 années toulousaines, par ordre d'apparition dans ma vie d'interne : **Monsieur Larrue, Lionel, Alain, Nathalie, Nelly, Rachel, Marie, Luc, Pascal, Mathieu, Mihaela, Monsieur Malbec, Fabienne, Christine, Angélique, Marion, Anne, Blandine, Nicolas, Jean-François, Jérémie, Marie-Christine et Michel.**

Petite mention spéciale à Rachel pour cette fameuse garde de Noël, et à Angélique, Marie, Luc, Michel et Marie-Christine pour avoir supporté le stress de ce dernier semestre (et Pascal bien sûr!).

Les Lyonnais : **Sandra, Steph, Amandine, Françoise, Géraldine et Romain** qui m'accueillent dans quelques semaines...

Les psychiatres, **Charlotte, Zoulikha et Madame Deramond** pour ce semestre détendu à Marchant.

Les neuroradiologues, qui nous accueillent à bras ouvert dans leur salle d'interprétation borgne, et qui nous forment avec plaisir : **Fabrice, Vanessa, Muriel, Fred, Isabelle, Philippe, Annick, Hervé, Manuela, Sophia, Anne-Christine, Monsieur Cognard.**

Les « filles » du Centre SLA pour leur accueil et leur bonne humeur : **Isa G, Véro, Isa B, Emilie, Danielle**, et ... **Jérémy** qui désormais fait concurrence à Pascal au sein de l'équipe !

Les formidables équipes soignantes de **Neuro 43, Neuro 41, Neuro A et B, soins intensifs, 101-102.** Mention spéciale pour les infirmières du **B4** qui ont réalisé les bilans à rallonge des patients pour cette étude. Sans oublier les **manips' EEG et EMG** avec qui nous avons vécu l'arrivée au PPR!

Mes cointernes de neuro : **Julia** avec qui j'ai fait mes premiers pas en Neuro 43 puis ma voisine de psychiatrie, **Aude** avec qui j'ai partagé mes deux semestres les plus difficiles (et à qui je dois mes graphiques...), **Marie L et Jonathan** les soutiens indéfectibles, **Emilie** ma copine de promo, l'impressionnante **Delphine**, **Marie B** mon double en neuroradio, mais aussi les « anciens » qui m'ont apporté leur aide au début **Laure, Line, Virginie, Nawel**, et les plus jeunes qui n'hésitent pas à venir à la rescousse en cette fin d'internat **Fleur, Julie, Paul, Cédric, Raphaël, Vincent et Florence**.

Les amis rencontrés à Toulouse : **Aurore** bien sûr, **Anaïs et Benoît, Lucie et Gurbuz, Cyrielle et Max, Marie M, David, Matthieu, Christophe, Caro et Damien, Marine, Charline** et les autres...

Les amis de fac : **Fanny, Floriane, Louise, Emilie**, mais aussi la bande de Santards (ou ex) **Kévin et Charlotte, Montlao et Charlotte** (merci les stats !), **Jimmy et Wanda, Engué et Noémie, Chacal et Angèle, Nico, Olivier, Lolo et Caro, Laureline** et les autres...

**Sophie et Philippe** que nous retrouverons bientôt du côté de la Haute-Savoie j'espère...

Les amies de toujours : **Marianne, Mag, Laureline, Céline, Leïla et Claire**.

**Mathilde**, ce serait trop long de détailler : MERCI.

La famille : **Andrée et Mamie**, les deux grands-mères dynamiques, **Papy** qu'il ne fallait pas décevoir, les oncles, les tantes et les cousins. Grosse pensée pour **Benoît**.

Mes sœurs **Anaïs et Margaux** (thank you for the translation !) et mes parents **Evelyne et Jean-Paul**, bien sûr.

Et bien entendu **Mathias**.

UNIVERSITÉ PAUL SABATIER  
FACULTÉ DE MÉDECINE TOULOUSE-PURPAN

## *Serment d'Hippocrate*

*Sur ma conscience, en présence de mes maîtres et de mes condisciples,  
je jure d'exercer la médecine suivant les lois de la morale,  
de l'honneur et de la probité.*

*Je pratiquerai scrupuleusement tous mes devoirs envers les malades,  
mes confrères et la société.*

## Table des matières

I. INTRODUCTION.....	14
II. CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	16
A. La Sclérose Latérale Amyotrophique.....	16
1. Généralités.....	16
2. Physiopathologie .....	23
3. Traitement .....	31
B. Métabolisme des folates et de l’homocystéine.....	34
1. Généralités.....	34
2. Grandes lignes du métabolisme de l’homocystéine .....	37
3. Facteurs influençant l’homocystéinémie.....	40
4. Pathogénie de l’homocystéine et des folates .....	42
C. Pathologies neurologiques liées aux folates et à l’homocystéine.....	44
1. Homocystéine et risque cardiovasculaire .....	44
2. Carences vitaminiques et malformations fœtales .....	44
3. Déficit en folates intracérébral .....	45
4. Troubles de la reméthylation.....	46
D. Implication des folates et homocystéine dans les pathologies neurodégénératives et psychiatriques.....	47
1. Maladie d’Alzheimer.....	47
2. Maladie de Parkinson .....	49
3. Chorée de Huntington .....	50

4.	Troubles psychiatriques.....	50
E.	Folates et homocystéine dans la Sclérose Latérale Amyotrophique .....	51
1.	Première étude.....	51
2.	Etudes in vitro, sur modèles animaux.....	52
3.	Etudes chez l'Homme .....	55
4.	Etudes génétiques .....	57
5.	Etudes métabolomiques.....	58
6.	Implication de la méthionine .....	58
F.	Hypothèse de travail.....	59
III.	MATERIELS ET METHODES .....	60
A.	Schéma de l'étude .....	60
B.	Population.....	60
1.	Nombre de sujets nécessaires .....	60
2.	Patients atteints de SLA .....	60
3.	Témoins.....	61
C.	Evaluation clinique.....	62
D.	Bilan biologique sanguin.....	63
1.	Bilan standard.....	63
2.	Bilan dans le cadre de l'étude.....	64
E.	Etude du liquide cérébro-spinal.....	65
1.	Technique .....	65
2.	Bilan standard.....	65
3.	Bilan dans le cadre de l'étude.....	65

F.	Electroneuromyographie .....	66
G.	Analyses statistiques.....	66
H.	Financement .....	67
I.	Aspects légaux.....	67
IV.	RESULTATS .....	68
A.	Population.....	68
1.	Patients .....	68
2.	Témoins.....	70
B.	Electroneuromyographie .....	71
C.	Biologie.....	73
1.	Analyses standards .....	73
2.	Dosages plasmatiques dans le cadre de l'étude .....	73
3.	Dosages dans le LCS dans le cadre de l'étude .....	76
4.	Corrélations .....	77
V.	DISCUSSION .....	80
A.	Objectif principal.....	80
1.	Données générales.....	80
2.	Cohérence avec la littérature .....	80
3.	Absence de diminution de la méthionine .....	81
4.	Limites.....	81
B.	Objectifs secondaires.....	82
1.	Homocystéine : reflet de l'agressivité de la maladie ? .....	82
2.	Homocystéine et atteinte cognitive .....	83

C.	Intérêt de la supplémentation en folates ? .....	84
D.	Elévation de la glutamine .....	85
E.	Limites et points forts .....	86
F.	Récapitulatif .....	87
G.	Ouverture.....	88
VI.	CONCLUSION .....	89
VII.	ABREVIATIONS .....	90
VIII.	ANNEXES .....	92
IX.	BIBLIOGRAPHIE .....	109

## I. INTRODUCTION

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative rare entraînant une dégénérescence sélective des motoneurones. Elle se caractérise par une atteinte centrale et périphérique, motrice, progressive, se traduisant par une faiblesse motrice, une amyotrophie, des fasciculations et un syndrome pyramidal, ainsi qu'une atteinte bulbaire puis une atteinte respiratoire qui conduit au décès dans les 2 à 5 ans généralement. La plupart des cas sont sporadiques, mais il existe 10% de cas familiaux, qui dans 20% des cas sont liés à des mutations du gène de la Superoxyde dismutase 1 (SOD1).

Les mécanismes physiopathologiques de la SLA ne sont pas bien connus. De nombreuses études ont déterminé l'implication de dysfonctions mitochondriales et de phénomènes d'apoptose dont l'origine reste incertaine.

Il n'existe actuellement aucun traitement étiologique ni curatif. Un des axes de recherche concernant la SLA est donc l'étude de biomarqueurs permettant un diagnostic précoce et pouvant éventuellement être à l'avenir des cibles thérapeutiques.

Le rôle du métabolisme des folates et notamment de l'homocystéine a été soulevé récemment par plusieurs études [*Zoccollella et al. 2010 Amyotroph Lateral ScI*].

Ainsi, une élévation de l'homocystéinémie associée à une baisse des folates dans le sang, de même qu'une élévation de l'homocystéine dans le liquide cérébro-spinal (LCS) chez les patients SLA a été notée. L'homocystéine présente des propriétés neurotoxiques par un effet sur les récepteurs glutamatergiques et peut induire une dysfonction mitochondriale et une apoptose. Le métabolisme de l'homocystéine est étroitement lié à celui de la méthionine par transméthylation/reméthylation, et implique directement les folates et plus particulièrement au niveau cérébral le 5 méthyl-tétrahydrofolate (5-MTHF).

Des études chez le modèle murin de SLA (SOD1) chez la souris ont montré une baisse de 5-MTHF dans le LCS aux stades précoces et asymptomatiques de la maladie, bien avant que les anomalies de l'homocystéine n'apparaissent. Ces résultats semblent suggérer l'implication directe des troubles du métabolisme intracérébral des folates et de l'homocystéine dans la physiopathologie de la SLA [*Zhang et al. 2010*]. Cependant, une seule étude chez l'homme a mis en évidence une élévation de l'homocystéine dans le LCS [*Valentino et al. 2010*]. Aucune étude n'a confirmé ces données et n'a exploré complètement la voie métabolique des folates au sein du cycle Homocystéine/Méthionine.

Nous proposons donc une étude physiopathologique visant d'une part à confirmer l'élévation de l'homocystéine dans le LCS des patients SLA, et d'autre part à étudier les autres métabolites impliqués dans ce cycle, afin d'examiner avec plus de précisions les voies métaboliques mises en jeu dans la maladie.

## II. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

### A. La Sclérose Latérale Amyotrophique

#### 1. Généralités

##### a. Définition

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), décrite pour la première fois en 1874 par Jean-Martin Charcot qui lui a donné son nom, est aussi connue outre-Atlantique sous le nom de maladie de Lou Gehrig, du nom d'un joueur de baseball renommé décédé de cette pathologie en 1941. Il s'agit d'une maladie neurodégénérative touchant les motoneurones et survenant à l'âge adulte.

Elle appartient au spectre des maladies du motoneurone, incluant également la Sclérose Latérale Primitive et l'Atrophie Musculaire Progressive.

Elle est caractérisée par une dégénérescence progressive des motoneurones centraux et périphériques.

Le terme « Sclérose Latérale » renvoie à la fermeté de la palpation des colonnes latérales de la moelle épinière mise en évidence lors de l'autopsie des patients atteints de cette affection, en rapport avec la gliose qui suit la dégénérescence des faisceaux cortico-spinaux. Les symptômes cliniques sont alors en lien avec l'atteinte du premier motoneurone, c'est-à-dire le motoneurone central, et se manifestent par un syndrome pyramidal avec des réflexes ostéotendineux vifs, la présence d'un signe de Babinski ou de Hoffman et des signes de spasticité.

Le terme « Amyotrophique » renvoie à l'atrophie musculaire, en rapport avec l'atteinte du deuxième motoneurone, c'est-à-dire le motoneurone périphérique au niveau de la corne antérieure de la moelle épinière et les noyaux moteurs du bulbe. Cette atteinte se manifeste par des fasciculations et une faiblesse musculaire [Rowland *et al.* 2001].

En cas d'atteinte isolée du premier motoneurone, on parle de sclérose latérale primitive, et en cas d'atteinte isolée du deuxième motoneurone, on parle d'atrophie musculaire spinale. Ces syndromes représentent 10% des maladies du motoneurone débutant à l'âge adulte, et sont considérés comme des variantes de la SLA, car à l'autopsie, il existe une atteinte des deux motoneurones en histologie.

La SLA provoque une paralysie progressive de l'ensemble de la musculature squelettique des membres, du tronc et de l'extrémité céphalique. L'évolution est fatale en moyenne dans les 2 à 5 ans, le plus souvent par une atteinte respiratoire ou par complications liées aux troubles de la déglutition ou au décubitus.

## b. Epidémiologie

Il s'agit d'une pathologie rare, dont l'incidence en Europe est évaluée à 2.08/100 000 habitants (IQR 1.47-2.43) soit environ 15 000 nouveaux cas/an [Chio et al. 2013].

Il existe une prédominance chez les hommes, avec un ratio de 1.5/1 en moyenne [Alonso et al 2009].

L'incidence est très faible en dessous de 40 ans, puis augmente rapidement après cet âge pour atteindre un pic entre 65 et 75 ans. La durée d'évolution semble liée à la forme clinique de la maladie, aux signes initiaux, à l'âge de début des troubles, au délai séparant le début des symptômes et le diagnostic, à la vitesse de progression des symptômes, à l'atteinte respiratoire et à l'utilisation de l'aide à la ventilation [Chio et al. 2009].

Sur le plan géographique, on connaît des zones de haute prévalence, en particulier sur l'île de Guam dans l'Océan Pacifique, la péninsule de Kii au Japon et la Nouvelle-Guinée Occidentale, où la prévalence de la SLA est 50 fois supérieure à la moyenne mondiale.

Cette maladie est sporadique. Cependant, dans 5 à 10% des cas, il existe une hérédité familiale, le plus souvent sur un mode autosomique dominant, le phénotype restant pourtant très proche des formes sporadiques. Dans 20% des formes familiales, une mutation de la Superoxyde Dismutase 1 (SOD1) est mise en évidence, mais au sein de ces formes, une grande hétérogénéité clinique a été rapportée. Récemment, une expansion d'hexanucléotides sur le gène c9ORF72 a été découverte. Ce variant génétique représenterait à lui seul 40 % des formes familiales.

Aucune association entre un facteur de risque exogène et la survenue d'une SLA sporadique n'a été identifiée à ce jour.

## c. Aspects cliniques

La forme spinale est la forme la plus commune (environ deux tiers des patients). Elle débute aux membres supérieurs dans 30 à 40 % des cas. Le déficit musculaire s'installe le plus souvent en distalité avec une raideur ou une maladresse pour certains mouvements. Progressivement s'installe une amyotrophie, en particulier des espaces interosseux. L'atteinte est souvent asymétrique au

début et se bilatéralise au cours de l'évolution. Le patient se plaint souvent de crampes. Les fasciculations sont caractéristiques de la maladie, leur présence dans des muscles encore sains cliniquement est habituelle. Il existe un syndrome pyramidal qui tranche avec cette atteinte périphérique clinique : hyperréflexie tendineuse, réflexe palmo-mentonnier présent et exagéré, plus rarement signe de Babinski ou de Hoffman, trépidation épileptoïde du pied.

La forme de début bulbaire concerne environ 20% des patients, elle est plus fréquente chez les femmes. Elle est liée à la dégénérescence des noyaux bulbaires mais aussi à la paralysie pseudo-bulbaire liée au syndrome pyramidal. Elle se manifeste par une dysarthrie, des troubles de la déglutition, une dysphonie. La langue s'atrophie et on peut noter des fasciculations à sa surface. Il existe une vivacité du réflexe massétérin.

Toutefois, l'évolution des atteintes tend à se généraliser, et la distinction entre ces deux formes n'est pas toujours évidente au moment du diagnostic.

L'atteinte respiratoire arrive en général plus tardivement dans l'évolution. Elle se manifeste par une dyspnée d'effort, une toux inefficace, puis une orthopnée. Elle est responsable d'une hypoventilation alvéolaire qui conduit généralement à la mise en place de mesures de suppléance, de type ventilation non invasive le plus souvent.

Une atteinte cognitive est fréquemment retrouvée : environ 50% des patients ont des résultats déficitaires aux tests neurocognitifs, 15 % des patients présentant d'ailleurs les critères de démence fronto-temporale [Lomen et al. 2003].

Des signes négatifs existent en revanche: il n'y a pas de troubles sensitifs classiquement, pas de troubles oculo-moteurs, de troubles sphinctériens ni d'escarre.

Des formes plus rares et particulières ont également été décrites [Couratier et al. 2014]:

- « flail arm » : tableau de diplégie aux membres supérieurs sans atteinte des membres inférieurs ni d'atteinte bulbaire.
- « flail leg » : tableau de paraplégie.
- Forme pseudo-polynévritique : manifestations sensitives à la phase initiale, le plus souvent unilatérale au début, à type de paresthésies principalement. Le tableau se complète ensuite de fasciculations et d'un déficit moteur puis s'étend aux autres membres.
- Forme bulbaire isolée cliniquement.

- Forme monomélique : amyotrophie d'un seul segment de membre, d'évolution lente, débutant le plus souvent au cours de l'enfance et de l'adolescence.
- Forme à début respiratoire : la détresse respiratoire est alors au premier plan, voire isolée, et se manifeste le plus souvent par un tableau d'insuffisance respiratoire aiguë.
- Forme associée à une démence de type frontal.
- Forme dite « SLA plus » : tableau classique de SLA associé à des signes extra-pyramidaux, cérébelleux, une atteinte oculomotrice ou sensitive objective.

L'ensemble de ces tableaux semble former un continuum, et la Sclérose Latérale Amyotrophique que l'on pensait une maladie bien définie est de plus en plus considérée comme un large ensemble recouvrant des phénotypes et possiblement des étiologies différentes.

#### d. Examens complémentaires

L'examen clinique par un médecin spécialiste fait correctement le diagnostic dans 95% des cas. [Rowland 1998]. Néanmoins, en l'absence de tests spécifiques de la SLA et devant la difficulté de diagnostic de certaines pathologies pouvant mimer cette maladie, il est préférable de compléter l'examen clinique par des explorations supplémentaires, et en premier lieu l'électroneuromyographie (ENMG).

##### (1) Electroneuromyographie

Le but de cet examen est de confirmer l'atteinte du motoneurone périphérique, de montrer l'extension à des localisations épargnées cliniquement et d'éliminer certains diagnostics différentiels.

Les vitesses de conduction nerveuse motrices et sensibles sont habituellement normales. La perte en motoneurones peut en revanche être responsable d'une baisse d'amplitude des potentiels moteurs.

La détection est particulièrement importante et indispensable pour l'exploration d'une SLA. La définition d'une atteinte du motoneurone exige la présence de signes de dénervation active et chronique. La dénervation active est définie par la présence de fibrillations et de potentiels lents de dénervation. La présence de fasciculations au repos, caractéristique de la maladie fait partie dans cette affection des critères de dénervation active bien que de signification différente. A l'effort, le tracé reflète la perte en unités motrices. Il existe une augmentation d'amplitude et de durée des

potentiels d'unité motrice, voire de véritables « potentiels géants ». Les segments symptomatiques sont bien entendus examinés, mais l'examen s'attachera à définir la diffusion des anomalies neurogènes par une étude systématique des 4 territoires requis pour le diagnostic : la face, le tronc, les membres supérieurs, les membres inférieurs.

L'altération des conductions sensibles est très inhabituelle et incite à rechercher une neuropathie.

La présence de blocs de conduction n'est pas classique dans la SLA, et doit faire évoquer en premier lieu une neuropathie motrice multifocale, un des diagnostics différentiels de la maladie les plus fréquents.

En cas de doute diagnostique avec une myasthénie, une stimulation répétitive peut être réalisée à la recherche d'un décrétement. Il faut noter qu'un léger décrétement habituellement inférieur à 15% peut être observé dans la SLA en raison de l'immaturation de la réinnervation collatérale.

## (2) Imagerie cérébrale et médullaire

Une Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) cérébrale ou médullaire est souvent réalisée dans le cadre du diagnostic différentiel, bien que non indispensable.

Dans la SLA, on constate fréquemment des hypersignaux ronds et symétriques suivant les voies cortico-spinales (cortex frontal, corona radiata, capsule interne, pont), reflétant l'atteinte du faisceau pyramidal. Néanmoins, ces hypersignaux sont parfois visibles chez les sujets sains, ils ne sont donc pas spécifiques. On peut noter un hyposignal linéaire au niveau du cortex moteur, qui pourrait correspondre à des dépôts ferriques témoignant de la dégénérescence neuronale. Des hypersignaux de la substance blanche sous-corticale au niveau du gyrus pré-central ont également été décrits. En spectroscopie, une réduction du N-acétyl-aspartate (NAA) a été rapportée dans le cortex moteur, en rapport avec la perte motoneuronale dans cette région.

L'IRM cérébrale permet surtout d'éliminer une lacune ou une tumeur, en particulier dans les formes bulbaires pures.

L'IRM médullaire permet elle aussi de diagnostiquer des pathologies pouvant mimer une SLA : myélopathie cervicale, ischémie médullaire, maladie d'Hirayama et syringomyélie notamment.

### (3) Etude du liquide cérébro-spinal par ponction lombaire

Cet examen est également réalisé dans le cadre du diagnostic différentiel (syndrome paranéoplasique, lymphome, méningite), il est le plus souvent normal. Dans environ 40% des cas, une hyperprotéinorachie peut être rapportée. Une élévation de l'indice de barrière est fréquemment notée.

#### e. Critères diagnostiques de SLA

Le diagnostic est donc parfois difficile en raison de l'hétérogénéité phénotypique et surtout de l'absence de marqueur paraclinique qui signerait la maladie.

Des critères formels ont ainsi été rédigés afin de diminuer l'errance diagnostique, permettant un diagnostic plus précoce et donc une prise en charge adaptée plus tôt. Ces critères ont également l'intérêt d'homogénéiser les essais cliniques et de rendre les études comparables. Trois conférences successives, en 1994 (critères El Escorial) puis en 1998 (critères d'Airlie House) et enfin en 2006 (critères d'Awaji) ont ainsi permis d'établir différents stades de certitude diagnostique [Guennoc et al. 2012].

#### (1) Critères El Escorial (1990)

La première conférence s'est tenue à l'El Escorial en Espagne en 1990 et a abouti à la rédaction de la première classification diagnostique, basée principalement sur les données cliniques, à savoir l'existence de signes cliniques d'atteinte du neurone moteur central (NMC) et du neurone moteur périphérique (NMP), et le nombre de régions anatomiques dans lesquelles sont objectivées ces atteintes (régions bulbaire, cervicale, dorsale, lombaire)[Brooks et al. 1994]. **(ANNEXE 1)**

Ainsi, quatre stades de certitudes diagnostiques ont été décrits:

- SLA définie/certaine : signes d'atteinte du NMC et du NMP dans au moins 3 régions anatomiques.
- SLA probable : signes d'atteinte du NMC et du NMP dans 2 régions anatomiques.
- SLA possible : signes d'atteinte du NMC et du NMP dans une seule région, OU atteinte du NMC seul dans 2 régions.
- SLA suspectée : signes d'atteinte du NMP seul dans 2 territoires.

## (2) Critères d'Airlie House (1998)

Quelques années plus tard, ces critères furent modifiés afin d'en améliorer la sensibilité : il s'agit des critères de l'El Escorial révisés ou critères de l'Airlie House [Traynor et al. 2000; Brooks et al. 2000]. **(ANNEXE 2)**

Ces critères donnent plus de place à l'ENMG en confirmant l'existence d'une atteinte du NMP dans une région anatomique en présence de signes de dénervation active et de signes de dénervation chronique dans deux muscles spinaux d'innervation radiculaire et tronculaire différentes, ou dans un muscle bulbaire ou thoracique.

Cela a permis de définir une forme intermédiaire entre la forme « possible » et la forme « probable » : la forme « probable étayée par des explorations complémentaires » lorsqu'il existe des signes ENMG d'atteinte du NMP dans au moins deux régions. La forme suspecte a en revanche été retirée de la classification.

## (3) Critères d'Awaji (2006)

Enfin, la dernière conférence s'est tenue à Awaji au Japon en 2006 [De Carvalho 2008]. Cette nouvelle classification a encore renforcé le poids de l'ENMG dans le diagnostic, en acceptant l'existence d'une atteinte du NMP sur les données cliniques ou neurophysiologiques qui deviennent équivalentes. **(ANNEXE 3)**

Par ailleurs, la présence de potentiels de fasciculations associée à des signes de réinnervation chronique suffit désormais au diagnostic d'atteinte du NMP, l'enregistrement de potentiels de fibrillation ou de potentiels lents de dénervation n'étant plus forcément nécessaire. Ces nouveaux critères valorisent donc la présence de fasciculations dans la SLA, en considérant qu'elles témoignent d'un processus de dénervation active.

Ces nouveaux critères semblent avoir une meilleure sensibilité, tout en conservant une spécificité diagnostique forte, aucune étude ne signalant de faux positifs après utilisation des critères d'Awaji.

#### (4) En résumé

Le diagnostic requiert donc :

- La présence d'une atteinte du motoneurone périphérique clinique ou électrophysiologique,
- La présence d'une atteinte du motoneurone central clinique ou paraclinique,
- La progression du syndrome moteur à une ou plusieurs régions (cliniquement ou à l'interrogatoire)
- L'absence d'arguments électrophysiologiques, radiologiques ou pathologiques pour une autre affection.

#### f. Histopathologie

L'association d'une atteinte bilatérale et symétrique des cornes antérieures, de la voie pyramidale et des noyaux bulbaires est la forme la plus habituelle de cette affection. L'atteinte des cornes antérieures est constante, avec une perte neuronale massive, le plus souvent observée à tous les niveaux (cervical, lombaire, bulbaire). Cette diminution du nombre de motoneurones, s'accompagne d'une dégénérescence neuronale et d'une gliose astrocytaire qui sont typiques de la SLA. En fin d'évolution, on observe une diminution significative des fibres myélinisées dans les faisceaux cortico-spinaux en rapport avec une dégénérescence wallérienne.

A l'échelle microscopique, on observe une atrophie du neurone, caractérisée par une contraction du cytoplasme. Des altérations du cytosquelette et l'accumulation de neurofilaments au niveau des axones ont été rapportées. Des inclusions intraneuronales peuvent être visualisées dans les neurones lésés et la glie, il s'agit des corps de Bunina qui représenteraient une accumulation anormale de matériel protéique. D'autres inclusions, notamment d'ubiquitine, sont présentes, mais le sont également dans d'autres pathologies neurodégénératives, faisant suspecter l'existence d'un spectre commun de maladies neurodégénératives [Hirano, 1996]. Enfin, des vacuoles de mitochondries ayant dégénéré ont été mises en évidence dans les axones et les dendrites de neurones atteints. Des anomalies structurelles des mitochondries ont également été décrites [Menzies et al. 2002].

## 2. Physiopathologie

### a. Généralités

Le processus de dégénérescence neuronale des maladies du motoneurone est complexe. Certaines mutations génétiques sont impliquées, notamment dans les formes de SLA familiales, mais

on en sait moins sur les facteurs environnementaux et génétiques impliqués dans les formes sporadiques de la maladie.

Notre connaissance de la physiopathologie de la SLA repose actuellement essentiellement sur les explorations réalisées à partir de modèles murins de mutation de SOD1 qui ont permis d'étudier plus précisément les mécanismes de dégénérescence du motoneurone. La découverte d'autres gènes, et notamment de c9orf72, remet en question la généralisation de ces découvertes à toutes les formes de SLA, familiales ou sporadiques.

Cependant, même lorsque l'on considère uniquement les travaux sur les mutations de SOD1, il s'avère que plusieurs mécanismes s'intriquent, faisant évoquer une origine plurifactorielle à la maladie. Il semble donc exister une interaction complexe entre des facteurs génétiques et moléculaires, tels le stress oxydatif, l'agrégation de protéines, la toxicité glutamatergique, les dysfonctions mitochondriales, l'altération du transport axonal, l'inflammation de cellules non neuronales, la dysfonction de certaines voies de signalisation. L'ensemble de ces facteurs peut ainsi conduire à l'installation d'une mort cellulaire programmée semblable à l'apoptose [Shaw et al. 2005].

## b. Génétique

Environ 10 % des cas de SLA sont familiaux, et des mutations sont identifiées dans 75% des cas.

En 1993, Rosen et al ont décrit plusieurs mutations du gène codant pour la Superoxyde Dismutase 1 (SOD1) [Rosen et al. 1993]. Ces mutations sont responsables de 20% des cas familiaux de SLA, mais aussi de 5% des cas sporadiques. A l'heure actuelle, plus de 160 mutations de ce gène ont été décrites, presque toutes sont dominantes.

Les mutations de TAR DNA-binding protein (TDP-43) représentent 5% des cas familiaux. TDP 43 est reconnu comme un composant majeur des agrégats de protéines cytoplasmiques chez presque tous les patients présentant une SLA sporadique, bien que l'on ne connaisse pas bien la manière dont ces agrégats déclenchent la neurodégénérescence dans la SLA.

De même, des mutations FUS (fused in sarcoma) comptent pour 5% des cas familiaux et 1% des cas sporadiques. Elles sont notamment responsables de forme à début précoce (avant 40 ans).

Enfin, une expansion de 6 bases nucléotidiques (GGGGCC) sur la partie non codante du gène c9ORF72 a été découverte en 2011 et a remis en question l'ensemble des connaissances que la communauté scientifique avait de la SLA. En effet, ce variant génétique représente à lui seul 40% des formes familiales et 7% des formes sporadiques de SLA. D'autre part, cette expansion d'hexanucléotides est aussi retrouvée chez les patients présentant une démence fronto-temporale

(DFT) isolée [Chio et al. 2012]. Cette découverte fait donc suspecter que la SLA et la DFT appartiennent au même spectre de maladies neurodégénératives. Sur le plan clinique, ces patients présentent plus souvent un début bulbaire et des troubles cognitifs de type DFT.

Par ailleurs, il semble que la SLA apparaisse dans des familles touchées par d'autres pathologies neurodégénératives. Une augmentation significative de démence chez les apparentés au 1<sup>er</sup> degré de SLA a été rapportée [Majoor-Krahauer et al. 1994]. De même, il semble qu'il existe des associations SLA-maladie de Parkinson [Qureshi et al. 1996].

Quoi qu'il en soit, une seule mutation peut conduire à des présentations cliniques variées et à l'inverse, des phénotypes cliniques semblables peuvent résulter de mutations différentes, suggérant donc l'implication de plusieurs mécanismes dans la pathogenèse de la maladie.

### c. Facteurs environnementaux et immunitaires

De nombreux facteurs environnementaux ont été recherchés, sans que soient décelées avec certitude des relations de causes à effets. L'hypothèse des métaux lourds, tels l'arsenic ou le mercure, a été soulevée, sans qu'aucune preuve scientifique n'ait été apportée. De même, les hypothèses d'une infection virale ou d'une infection à prions ont été plusieurs fois émises devant la survenue de cas isolés, et n'ont pas été confirmées. L'exposition au tabac est le seul facteur ayant montré une association significative, bien que modeste, avec la maladie [Gil et al. 2007].

L'implication du sport, lorsqu'il est pratiqué à haut niveau notamment, a été soulevée, mais les études se contredisent [Hamidou et al. 2014].

Le rôle de l'auto-immunité a également été exploré. En effet, la mise en évidence de complexes immuns circulants, d'une plus grande fréquence d'un type HLA et l'association à des maladies auto-immunes ont été rapportées. Cependant, différentes études se sont contredites et actuellement, on ne peut affirmer si ces marqueurs immunologiques sont impliqués dans la pathologie ou s'il s'agit juste d'épiphénomènes. Par ailleurs, ni les immunothérapies ni les immunosuppresseurs n'ont montré leur efficacité. Cette théorie reste donc controversée [Pagani et al. 2011].

#### d. Mécanismes moléculaires

##### (1) SOD

La superoxyde dismutase à cuivre-zinc 1 (SOD 1) est une métalloenzyme de 153 acides aminés, qui contient un atome de cuivre essentiel à l'activité de la SOD et un atome de zinc qui stabilise sa structure. Cette protéine est abondante dans le système nerveux central (environ 1% des protéines cellulaires du cerveau), mais elle est également présente dans d'autres régions de l'organisme. Elle est présente surtout dans le cytosole, et à moindre mesure dans les mitochondries au niveau de l'espace intermembranaire. Sa fonction principale est de catalyser la conversion des radicaux libres superoxydes intracellulaires, produits de la phosphorylation oxydative mitochondriale, en peroxyde d'hydrogène qui sont ensuite éliminés par d'autres enzymes. Pour cette raison, cette enzyme est une partie importante du système de défense contre les radicaux libres en empêchant la toxicité du superoxyde de se manifester.

La plupart des mutations sont responsables de substitution d'acides aminés, et même des modifications mineures peuvent affecter sévèrement la structure de la SOD et donc sa fonction [Shaw et al. 2005 ; Rotunno et al. 2013].

Son effet toxique serait lié à un gain de fonction qui proviendrait d'un mauvais repliement de la SOD, et génèrerait des radicaux libres. D'autre part, en raison de ce mauvais repliement, la SOD peut s'agréger en une structure insoluble qui perturbe les fonctions normales protéosomiques, interrompt les systèmes de transport axonal et les fonctions vitales de la cellule.

##### (2) Stress oxydatif

Le gain de fonction toxique de SOD1 serait impliqué dans le stress oxydatif. En effet, les mutations altérant la structure de SOD 1 seraient responsables d'un accès anormal de substrats anormaux au site actif cuivre de l'enzyme, conduisant à la production de radicaux libres tels le peroxy-nitrite et les radicaux hydroxyl.

Les effets du stress oxydatif dans les neurones peuvent être cumulatifs et l'altération cellulaire par des radicaux libres est une cause majeure de détérioration liée à l'âge de la fonction neuronale dans les maladies neurodégénératives.

### (3) Excitotoxicité et homéostasie du calcium

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majeur du SNC. Il se lie aux récepteurs NMDA et aux récepteurs AMPA sur la membrane post-synaptique. L'activation excessive de ces récepteurs par le glutamate, que l'on appelle excitotoxicité, peut induire une neurodégénérescence par des mécanismes incluant des perturbations de l'homéostasie du calcium intracellulaire et la production excessive de radicaux libres. Ces radicaux libres vont induire des lésions des organelles intracellulaires et activer les médiateurs pro-inflammatoires. Les modifications du taux de calcium intracellulaire et/ou de sa distribution à l'intérieur de la cellule sont ainsi responsables d'altérations structurales puis d'une dégénérescence des organelles et enfin d'une véritable désintégration de la cellule [Shaw et al. 2005, Adalbert et al. 2002].

Les neurones moteurs semblent particulièrement sensibles à la toxicité par l'activation des récepteurs de surface AMPA. La présence de mutant SOD1 augmente la sensibilité des motoneurones à la toxicité du glutamate, et est responsable d'altérations de l'expression des récepteurs AMPA et de la diminution de l'expression du transporteur de recapture du glutamate EAAT2.

### (4) Dysfonctions mitochondriales

La mitochondrie a de multiples fonctions : elle est la principale source d'énergie (génère l'ATP), elle a un rôle pivot dans le métabolisme intermédiaire et le maintien de l'homéostasie du calcium, et enfin, elle joue un rôle central dans la mort cellulaire par apoptose. La détérioration liée à l'âge de la fonction mitochondriale est considérée comme un facteur potentiellement important du début tardif des maladies neurodégénératives [Hervias et al. 2006].

L'implication de dysfonctions mitochondriales dans la maladie est étayée par la constatation d'altérations morphologiques des mitochondries au sein des motoneurones. Cette dysfonction mitochondriale semble être multifactorielle. On constate l'accumulation de mutant SOD 1 dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Cette accumulation induirait la génération de radicaux libres intracellulaires [Vehvilainen et al. 2013]. Par ailleurs, la mitochondrie permet avec le réticulum endoplasmique la régulation du calcium intracellulaire : une altération de cette fonction perturbe l'homéostasie du calcium intracellulaire et induit une apoptose précoce [Tan et al. 2014].

Il semble exister une diminution de l'activité des enzymes mitochondriales dans les motoneurones des patients SLA, semblable à celle observée chez les patients présentant des altérations de l'ADN mitochondrial. Il se pourrait donc que le stress oxydatif constaté dans la SLA soit

responsable de mutations de l'ADN mitochondrial induisant des modifications de l'activité des enzymes mitochondriales [Borthwick et al. 1999].

#### (5) Atteinte des neurofilaments

Les neurofilaments forment un composant majeur du cytosquelette des neurones, ils ont des fonctions importantes comme le maintien de la forme et du calibre de l'axone, ainsi que le transport axonal.

Dans la SLA, il existe une accumulation et un assemblage anormal des neurofilaments, qui pourrait être responsable de perturbations du transport axonal.

#### (6) Agrégation de protéines

Des agrégats protéiques, notamment de SOD1, ont été mis en évidence dans la SLA. Leur pouvoir pathogène n'est pas bien élucidé mais il existe plusieurs hypothèses concernant le mécanisme par lequel ces agrégats seraient toxiques : séquestration d'autres protéines requises pour le fonctionnement normal de la cellule, diminution de la disponibilité de protéines chaperon nécessaires à d'autres protéines intracellulaires, réduction de l'activité du protéasome nécessaire au turnover normal des protéines, inhibition de la fonction d'organelles spécifiques (comme les mitochondries ou les protéasomes).

#### (7) Cascades inflammatoire et rôle des cellules non neuronales

Certaines études génétiques impliquant des modèles de souris ont montré que l'expression de SOD1 seule dans les neurones était insuffisante pour causer la dégénérescence du motoneurone et que la participation de cellules non neuronales était indispensable. La mort des motoneurones dépend donc en partie de la glie et des autres types cellulaires présents dans son voisinage [Pehar et al. 2005]

La microglie joue un rôle important de surveillance immune au niveau du SNC. Lors d'une agression du SNC, l'activation de la microglie permet une action rapide sur les neurones et la macroglie (astrocytes et oligodendrocytes) en libérant des molécules cytotoxiques (réactifs oxydés, protéases, cytokines pro-inflammatoires, glutamate...). Dans la SLA, il semble exister une activation et une prolifération de la microglie dans les régions touchées par une perte neuronale [Kamawata et al. 1992].

## (8) Apoptose

L'apoptose est la mort programmée de la cellule. Des molécules clés contribuent au contrôle de l'apoptose : la famille des caspases qui sont des enzymes protéolytiques qui orchestrent la destruction de la cellule et la famille des Bcl2 qui sont des facteurs anti-apoptotiques, qui préviennent l'activation protéolytique des caspases.

Dans la SLA, ont été mises en évidence des modifications structurelles des motoneurones évocatrices d'apoptose. Il existe une augmentation de l'activité des caspases dès le début de la mort des motoneurones, et une inhibition expérimentale des caspases entraîne un allongement de la vie des souris SOD1 [Li et al. 2000]. De même, l'augmentation de l'expression de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl 2 ralentit la maladie et augmente l'espérance de vie des souris mutées [Kostic et al. 1997].

### e. Atteinte spécifique des motoneurones

Une des énigmes de cette maladie réside dans le fait que seuls certains neurones sont vulnérables au processus de neurodégénérescence. En effet, SOD1 est ubiquitaire, mais ce sont les motoneurones qui sont atteints lorsque la protéine est mutée. Il est probable que la taille des cellules, la sensibilité à l'excitotoxicité mais aussi certaines propriétés mitochondriales prédisposent à la neurodégénérescence [Shaw et al. 2005].

### f. En résumé

La physiopathologie dans les formes liées à une mutation de SOD1 semble un peu mieux comprise. Il existe une toxicité acquise du mutant SOD1 qui affecte à la fois les neurones et la glie. Cette toxicité entraîne des dysfonctions sévères au sein de la cellule, induisant la génération de radicaux libres, une dégradation du transport axonal, des perturbations de l'homéostasie du calcium, des fonctions mitochondriales et du protéasome ainsi que des altérations de la structure du cytosquelette. D'autre part, la présence de SOD1 mutée augmente la sensibilité des neurones à l'excitotoxicité et induit elle-même des perturbations des fonctions des organelles intra-cellulaires. L'ensemble de ces anomalies entraînerait une activation de la microglie qui pourrait contribuer à la mort des motoneurones en déclenchant l'apoptose via l'activation des caspases [Bruijn et al. 2004] (**Figure 1**).

En ce qui concerne les formes non liées à une mutation de SOD1, on peut imaginer que la cascade d'évènements soit grossièrement semblable, mais déclenchée par une autre cause,

généétique ou environnementale. Les mécanismes dans les autres formes génétiques, et notamment dans les formes liées à *c9orf72*, doivent donc désormais être étudiés [Turner et al. 2013].

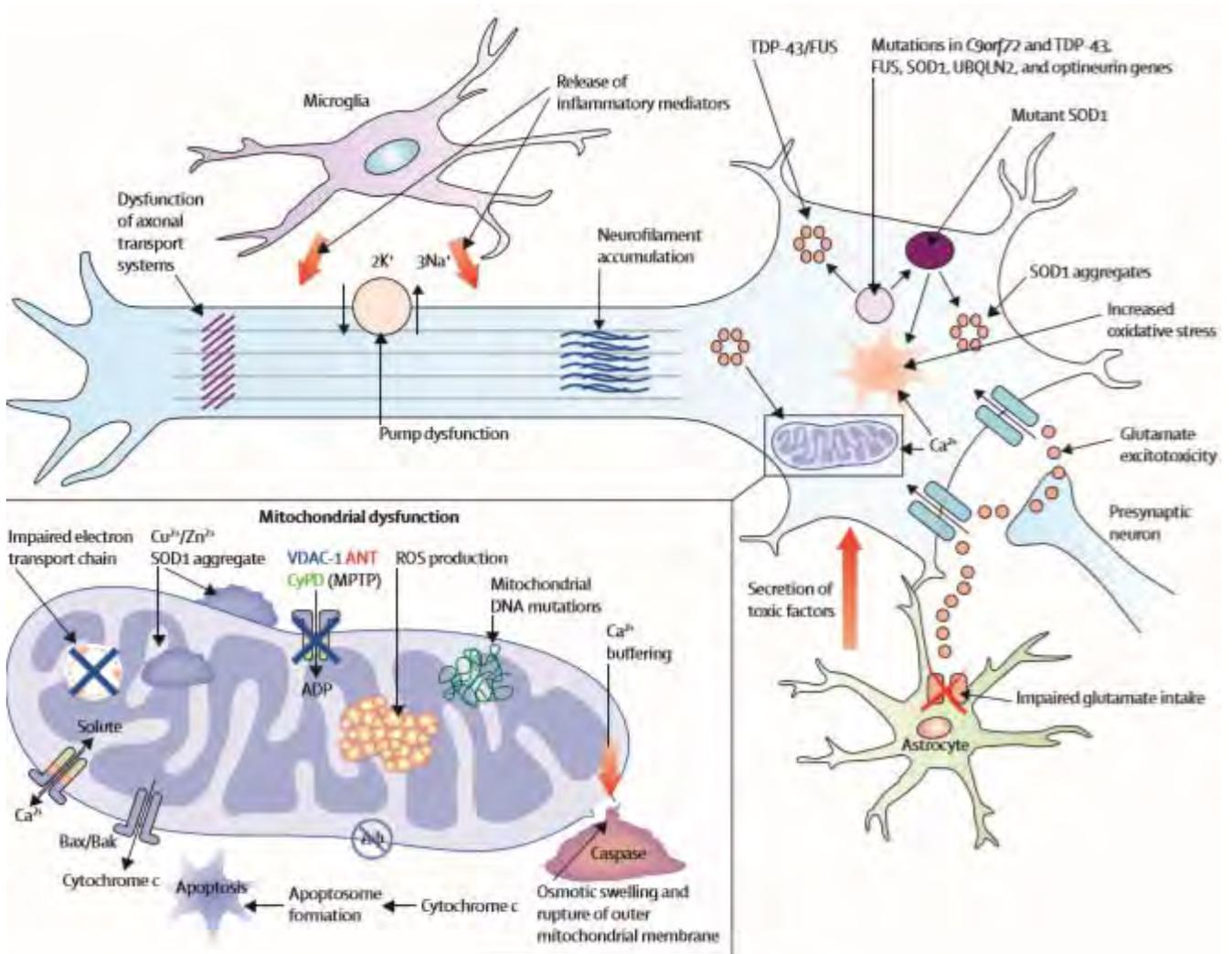


Figure 1: Mécanismes impliqués dans la neurodégénérescence dans la SLA. D'après Turner et al, *Lancet Neurol* 2013

### 3. Traitement

#### a. Médicamenteux

A l'heure actuelle, le riluzole (Rilutek®), un inhibiteur de la libération pré-synaptique du glutamate, est le seul traitement ayant une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la SLA. Ce traitement a montré une prolongation de la survie des patients de l'ordre de 6 mois dans deux essais thérapeutiques [*Bensimon et al. 1994, Lacomblez et al. 1996 ; Miller et al. 2007*].

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.

#### b. Non médicamenteux

La prise en charge pluridisciplinaire est essentielle, au sein d'équipes regroupant des neurologues, des pneumologues, des kinésithérapeutes, des infirmiers, des diététiciens, des ergothérapeutes, des orthophonistes et des psychologues. Cette prise en charge globale au sein d'équipes spécialisées augmente la survie et la qualité de vie des patients [*Van den Berg et al. 2005*].

La prise en charge respiratoire est bien souvent nécessaire. En effet, l'atteinte respiratoire est liée à une dégénérescence des centres respiratoires mais aussi à l'atteinte neuromusculaire. Elle peut se manifester diversement : hypoxie nocturne ou hypoventilation alvéolaire et hypercapnie. La ventilation non-invasive permet bien souvent d'améliorer la qualité de vie des patients. Dans de rares cas, la trachéotomie peut également être envisagée.

La prise en charge nutritionnelle est également centrale. En effet, il existe souvent un amaigrissement qui peut être d'origine mixte : diminution des apports en raison de la faiblesse ou d'une dysphagie, mais aussi hypermétabolisme. La pose d'une gastrostomie est parfois rendue nécessaire, lorsque les apports oraux sont insuffisants.

La prise en charge psychologique du patient et des aidants est enfin essentielle du fait de l'aggravation progressive du tableau et de l'évolution inéluctable de la maladie vers le décès.

### c. Perspectives thérapeutiques

La recherche de nouveaux traitements médicamenteux continue et un certain nombre de molécules sont en cours d'essai. Ces traitements ciblent différents mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la SLA : excitotoxicité liée au glutamate, accumulation de SOD1, dysfonction mitochondriale, atteinte musculaire [Zinman et al. 2011] (**Figure 2**).

Par ailleurs, l'avènement de la thérapie cellulaire et de la thérapie génique fait naître un espoir chez les patients atteints de SLA.

Au moins deux essais de thérapie cellulaire sont en cours, l'un avec des cellules souches mésenchymateuses autologues, l'autre avec des cellules souches fœtales injectées directement dans la moelle épinière après un protocole d'immunosuppression [Sreedharan et al. 2013].

L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens pour rendre silencieux le gène SOD1 a été testé avec succès chez le rat. Une étude pilote a été réalisée chez l'humain par perfusion intra-thécale de cet oligonucléotide montrant que ce traitement est bien toléré [Miller et al 2013].

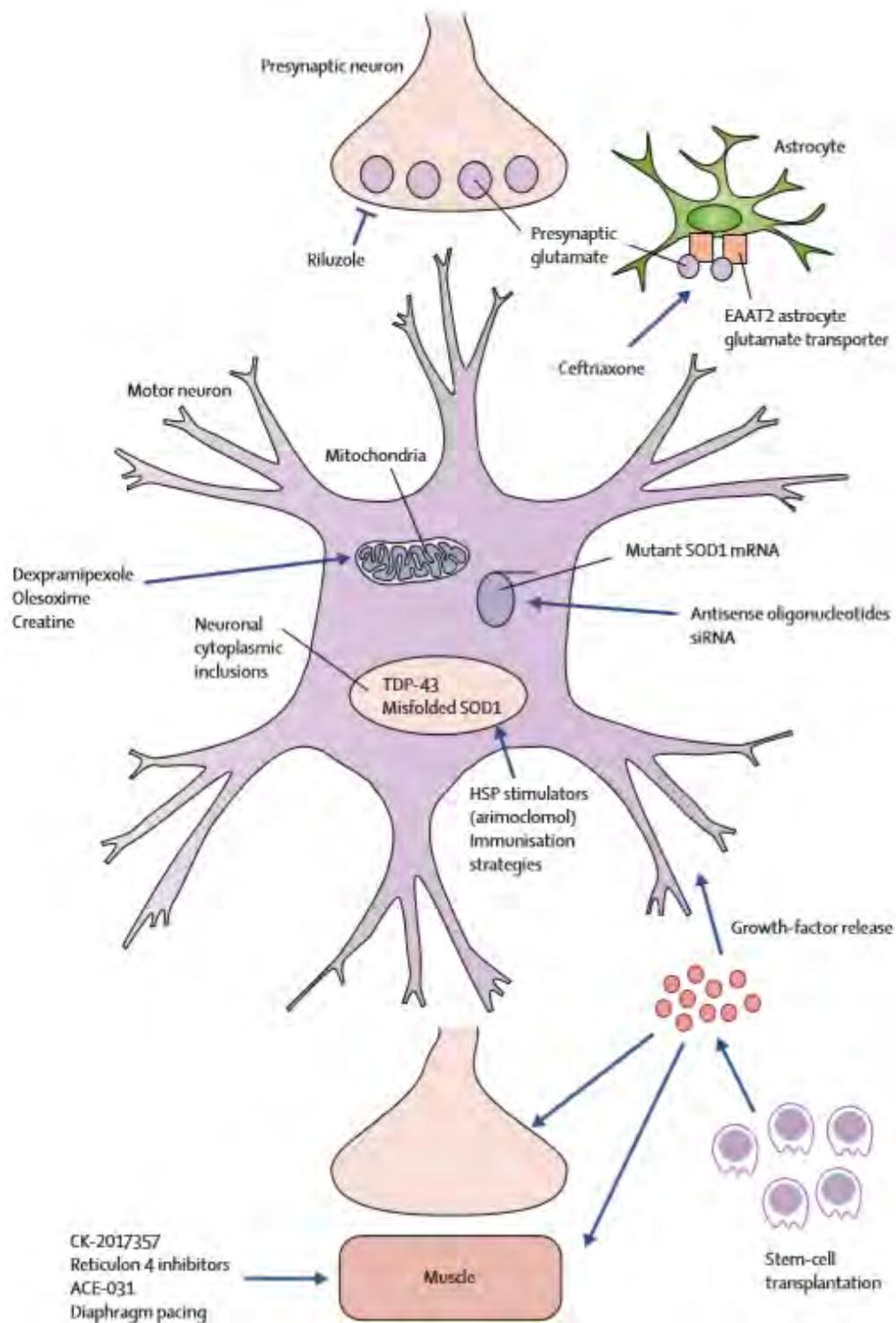


Figure 2: Nouvelles cibles thérapeutiques dans la SLA. D'après Zinman et al, Lancet Neurol 2011

## B. Métabolisme des folates et de l'homocystéine

### 1. Généralités

#### a. Homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé soufré non protéique, dont la concentration dans le plasma se situe entre 5 et 10  $\mu\text{mol/L}$ . Elle n'excède pas 15  $\mu\text{mol/L}$  chez le sujet sain normalement. Seuls 1 à 2% de l'homocystéine sont libres sous forme réduite, car 20% sont libres sous formes oxydées (cysteinylhomocystéine, homocystine) et 80% sont liées aux protéines (albumine surtout). On estime que la concentration en homocystéine dans le sérum est 20 à 100 fois plus élevée que dans le LCS.

L'homocystéine est à l'intersection de trois voies métaboliques :

- la transméthylation, qui permet la formation de l'homocystéine à partir de la méthionine, en créant un groupe méthyl,
- la reméthylation, qui permet la formation de méthionine en récupérant un groupe méthyl des folates,
- et la transsulfuration qui permet la formation de cystéine.

#### b. Méthionine

L'homocystéine est donc étroitement liée à la méthionine, un acide aminé soufré essentiel chez l'homme qui est apporté par l'alimentation. La méthionine joue un rôle important dans la synthèse des protéines puisque toutes les chaînes protéiques démarrent par l'incorporation d'une méthionine en position N-terminale.

Les apports nutritionnels normaux en méthionine ne couvrent pas les besoins en groupe méthyl, indispensables pour de nombreuses réactions biochimiques. La synthèse de novo de méthionine est donc indispensable. Elle est rendue possible grâce aux dérivés du folates par le processus de reméthylation.

Ensemble, la reméthylation et la transméthylation forment le cycle de la méthionine.

#### c. Folates

La vitamine B9, ou acide folique, est une vitamine hydrosoluble. C'est le précurseur métabolique d'une coenzyme, le tétra-hydro-folate (THF), impliquée dans la synthèse des bases nucléiques

(purines et pyrimidines) constituant les acides nucléiques nécessaires à la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Il doit auparavant être réduit en dihydrofolate (DHF) par la folate réductase, puis en THF par la dihydrofolate réductase. Le THF reçoit ensuite un groupe méthylène d'un des 3 donneurs de carbone (sérine le plus souvent, glycine, formaldéhyde) pour former le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate. **(Figure 3).**

L'acide folique est exclusivement apporté par l'alimentation, en particulier les légumes verts, les foies, le jaune d'œuf et certaines céréales.

Le 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) est le dérivé biologiquement actif de l'acide folique. La vitamine B9 provenant de l'alimentation est transformée en 5-MTHF puis absorbée au niveau de l'intestin grêle. Elle est ensuite principalement stockée dans les hématies, sa forme circulante étant environ vingt fois inférieure à sa forme érythrocytaire. Le 5-MTHF peut ensuite passer la barrière hémato-encéphalique via le récepteur des folates  $\alpha$  (FR $\alpha$ ) à la surface des cellules épithéliales des plexus choroïdes, puis l'épendyme, toujours via le même récepteur, jusqu'aux neurones. A l'intérieur des neurones, seule une petite fraction des folates participe aux différentes fonctions métaboliques, la majeure partie étant stockée sous la forme de polyglutamate dans le cytoplasme et la mitochondrie.

Les réserves cérébrales de folates sont peu importantes, aux alentours de 100 jours de besoins normaux.

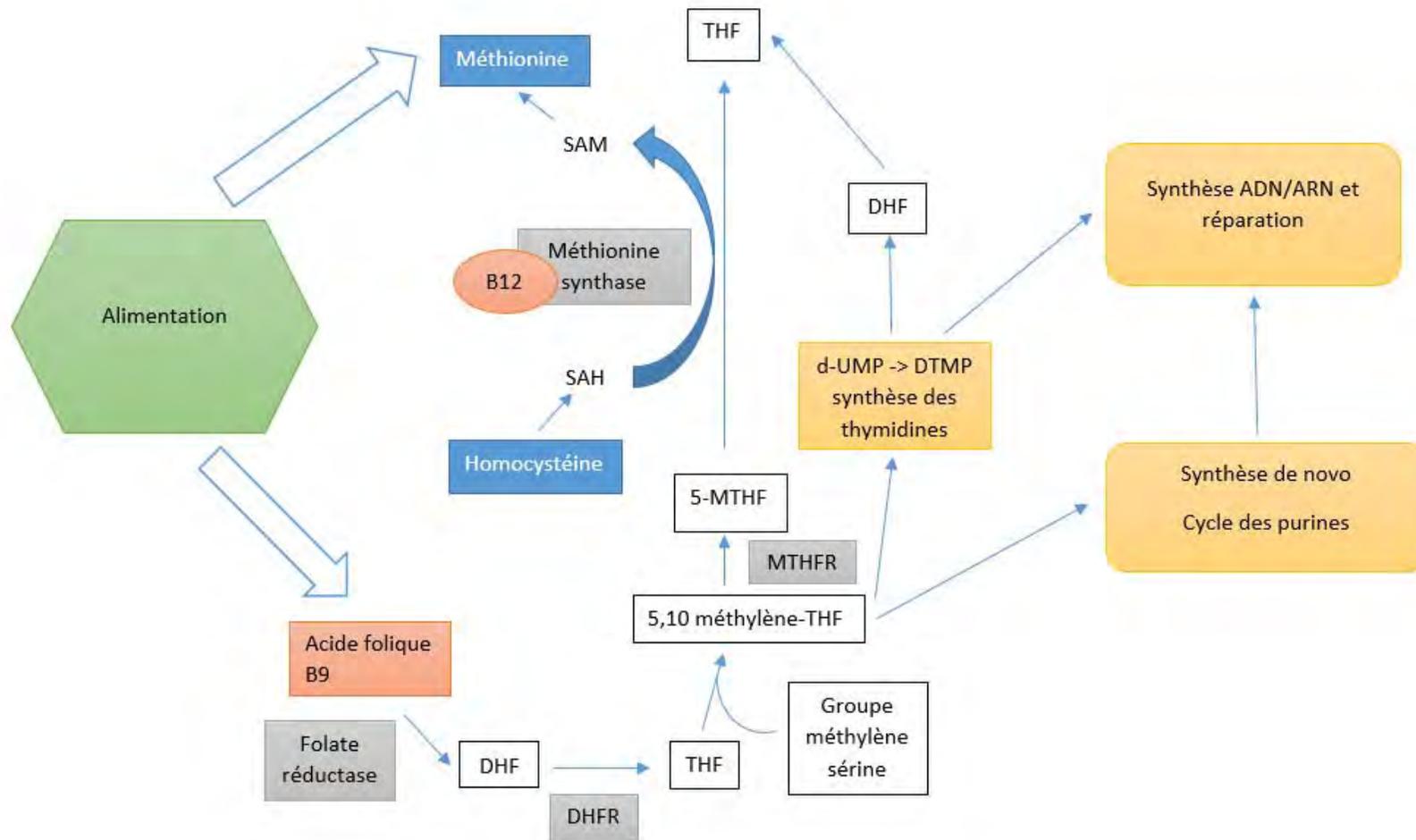


Figure 3 : Cycle des folates

## 2. Grandes lignes du métabolisme de l'homocystéine

### a. La transméthylation

La Méthionine est activée en S-adénosylméthionine (SAM) par une enzyme, la Méthionine adénosyltransferase. La SAM est le principal donneur biologique de groupe méthyl via une centaine de méthyltransférases, dont les principales sont la guanidinoacétate-méthyltransférase (GAMT), la glycine N-méthyltransférase (GNMT) et la phosphatidyléthanolamine-méthyltransférase (PEMT). (**Figure 4**).

La S-adénosyl-homocystéine (SAH), produit de ces transferts de méthyl, est ensuite hydrolysée en homocystéine et adénosine grâce à la S-adénosyl-homocystéine hydrolase (SAHH). Cette série de réactions est appelée la transméthylation et se déroule dans toutes les cellules de l'organisme. Elle permet le passage de la méthionine à l'homocystéine en donnant un groupe méthyl, ce qui permet notamment la méthylation de l'ADN, de l'ARN et des protéines, qui assure un rôle de régulation dans le contrôle de l'expression des gènes. Ces réactions de méthylation sont utiles pour la synthèse de nombreux composants : neurotransmetteurs, créatinine et phosphatidylcholine notamment.

La transméthylation SAM-dépendante existe dans la plupart des cellules de l'organisme, mais certaines méthyltransférases ne sont présentes que dans certains tissus : la GAMT permet la formation de créatine dans le foie en méthylant le guanidinoacétate, et la PEMT la synthèse de phosphatidylcholine, un composant membranaire cellulaire, à partir de phosphatidyléthanolamine dans le foie. La PEMT et la GAMT sont ainsi les enzymes contribuant le plus à la formation d'homocystéine, car elles représentent environ 85% des réactions de transméthylation dépendant de la SAM. La synthèse de créatine est d'ailleurs responsable à elle seule d'environ 75% de la formation d'homocystéine. Ainsi, le métabolisme hépatique a un rôle déterminant pour le taux plasmatique d'homocystéine [*Schalinske et al. 2012*].

La GNMT est une autre enzyme importante, elle catalyse la méthylation de la glycine pour générer la sarcosine. Cette réaction a surtout lieu dans le rein.

La méthylation de l'ADN est rendue possible par cette réaction de transméthylation. Il s'agit d'un processus épigénétique qui conditionne l'expression des gènes dans chaque cellule. Elle est particulièrement importante dans le développement du système nerveux car elle a un rôle clé dans l'orchestration de la prolifération des cellules souches neurales, puis de leur différenciation en neurones ou en cellules gliales. Elle permet une régulation complexe de l'expression des gènes et des fonctions des protéines. Or l'altération de la méthylation peut induire une mort cellulaire [*Mattson 2003 Ageing Res Rev*].

## b. La reméthylation

A l'inverse, la reméthylation permet de reméthyler l'homocystéine en méthionine via 2 enzymes : la betaine-homocystéine méthyl transférase (BHMT) et la Méthionine synthase (MS).

La Méthionine synthase est ubiquitaire. Elle utilise le 5-méthyl tétrahydrofolate (5-MTHF) comme donneur de groupe méthyl. Cette voie dépend donc des apports en folates, mais aussi de la vitamine B12, qui est un cofacteur de la MS.

En revanche, la BHMT n'est présente que dans certains tissus, le foie surtout, mais également le rein. Elle est d'ailleurs absente dans le cerveau. Cette voie de reméthylation est indépendante des vitamines. Elle permet la formation de diméthylglycine (DMG) à partir de la bétaine [Schalinske et al.2012].

## c. La transsulfuration

La transsulfuration permet la formation de cystéine, un acide aminé alimentaire, en transférant le groupement thiol de l'homocystéine à une molécule de sérine grâce à deux enzymes : la Cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) et la cystathionine  $\gamma$ -lyase (CGL).

La transsulfuration est importante pour le catabolisme de l'homocystéine, elle n'a lieu que dans certains organes : foie, rein intestin grêle et pancréas. La réaction de transsulfuration n'est pas bien connue dans le cerveau.

La cystéine peut ensuite servir de substrat de la gluconéogenèse via sa conversion en pyruvate, mais aussi servir à la synthèse du glutathion, un anti-oxydant. L'excès de cystéine est enfin oxydé en taurine et en sulfates inorganiques [Schalinske et al. 2012].

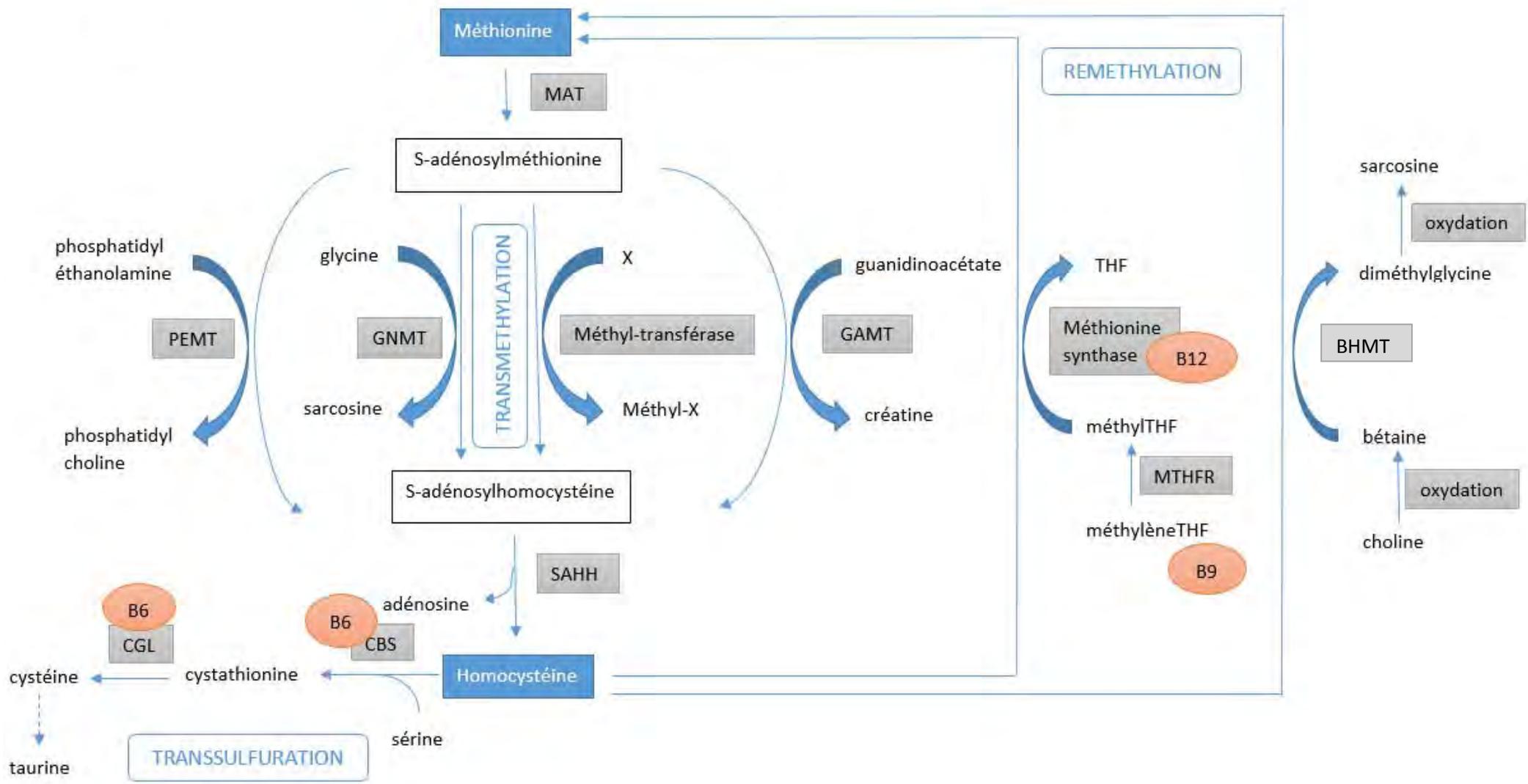


Figure 4 : Métabolisme de l'homocystéine et de la méthionine

Inspiré de Mudd (AJCN 2007)

### 3. Facteurs influençant l'homocystéinémie

#### a. Les carences vitaminiques

Le métabolisme de l'homocystéine est donc très dépendant des cofacteurs dérivés des vitamines.

En effet, la Méthionine synthase contient de la cobalamine (c'est-à-dire de la vitamine B12) dans son groupe prothétique, et tient son groupe méthyl de l'acide folique (vitamine B9).

D'autre part, les 2 enzymes de transsulfuration (CBS et CGL) contiennent du pyridoxal phosphate (vitamine B6) dans leur groupe prothétique.

On comprend ainsi qu'une carence en l'une de ces vitamines peut induire une hyperhomocystéinémie, car une telle carence empêche le fonctionnement habituel des enzymes transformant l'homocystéine en d'autres composés [Selhub et al. 1992, Selhub et al. 1993].

A l'inverse, la supplémentation vitaminique diminue la concentration plasmatique d'homocystéine.

#### b. Facteurs génétiques

Des mutations génétiques peuvent être responsables de déficit en certaines enzymes nécessaires au processus de reméthylation, transméthylation ou transsulfuration et alors être responsable de l'accumulation d'acides aminés, conduisant à des phénomènes pathologiques.

Les déficits en CBS et en MTHFR sont les plus fréquents et seront détaillés ci-après. La modification de l'expression ou de l'activité fonctionnelle de la CBS peut en effet affecter le taux d'homocystéine, car la CBS permet d'une part de convertir l'homocystéine en cystathionine, et d'autre part de créer du glutathion, un anti-oxydant. Une diminution de l'activité de la CBS entraîne donc une augmentation locale d'homocystéine.

#### c. Autres facteurs

Le vieillissement est un facteur d'élévation du taux d'homocystéine. Il est relativement stable jusqu'à la quatrième décennie, puis augmente rapidement, surtout après 70 ans [Diaz-Arrastia et al. 2000].

L'homocystéinémie est également plus élevée chez les hommes, sauf chez les très âgés.

La grossesse et le traitement hormonal substitutif diminuent au contraire le taux d'homocystéine.

L'insuffisance rénale est responsable d'une diminution de la clairance de l'homocystéine.

Certains traitements sont enfin connus pour entraîner une élévation de l'homocystéinémie : le méthotrexate, le 6-azauridine, l'acide nicotinique, mais aussi certains traitements anti-épileptiques.

#### d. Régulation du taux plasmatique d'homocystéine

Les activités de reméthylation et de transsulfuration sont coordonnées : quand une voie ne fonctionne pas, l'autre prend le relais : cela évite une accumulation d'homocystéine lorsqu'une voie métabolique est altérée.

Lors d'une alimentation normale, le métabolisme de l'homocystéine chez des sujets sains se divise entre la transsulfuration et la reméthylation. Lorsque l'apport en méthionine est normal, la molécule d'homocystéine est recyclée environ deux fois par la voie de reméthylation avant d'être catabolisée par la voie de la transsulfuration.

La capacité de l'organisme à adapter l'utilisation de l'homocystéine en fonction de l'apport en méthionine implique l'existence d'une régulation commune aux deux voies. Cette régulation commune va se faire par la SAM, qui en fonction de sa concentration, peut inhiber ou non la MTHFR, orientant ainsi l'homocystéine vers la voie de la transsulfuration ou de la reméthylation.

Lorsque l'apport en méthionine est élevé, il va en résulter une augmentation de la concentration intracellulaire de SAM ce qui inhibe la MTHFR et active la CBS pour permettre la dégradation de l'homocystéine.

À l'opposé, lorsque l'apport en méthionine est faible, la concentration en SAM n'est pas suffisante pour inhiber la MTHFR. La voie de reméthylation est alors favorisée et la CBS n'est pas stimulée.  
*[Stipanuk et al. 2011]*

Un autre mécanisme pour maintenir l'homocystéine basse dans la cellule est l'export de l'homocystéine à l'extérieur de la cellule, entraînant une hyperhomocystéinémie et une hyperhomocystéinurie.

## 4. Pathogénie de l'homocystéine et des folates

### a. Folates

Les folates sont nécessaires pour le développement normal du système nerveux central. Ils jouent un rôle important dans la neurogenèse et la mort cellulaire programmée. Les carences en folates peuvent diminuer la méthylation de l'ADN, et donc la transcription des gènes, induire des lésions des brins d'ADN, empêcher la réparation de l'ADN et ainsi entraîner des mutations génétiques ou déclencher l'apoptose. L'ensemble de ces mécanismes a donc une importance prépondérante dans la prolifération et la différenciation cellulaire, mais touche aussi les neurones post-mitotiques qui sont également très sensibles à la présence de folates, là encore en raison des altérations potentielles de l'ADN.

Les carences en folates peuvent également avoir des effets délétères sur la cellule, en induisant une accumulation d'homocystéine, potentiellement toxique. En effet, dans le cerveau la transsulfuration n'est pas active et il n'y a qu'une voie de reméthylation (la voie utilisant la bétaine n'existe pas), l'homocystéine dépend donc essentiellement des vitamines B9 et B12.

### b. Homocystéine

Trois grandes mécanismes de biotoxicité de l'homocystéine sont décrits [Petras et al. 2014].

Tout d'abord le stress oxydatif qui correspond à un déséquilibre entre la production de radicaux libres et celle d'anti-oxydants. Celui-ci est généré lors de l'oxydation du groupe thiol de l'homocystéine. Cette réaction d'oxydation peut concerner les protéines, les lipides et les acides nucléiques, et conduire notamment à une dysfonction endothéliale.

Des modifications des protéines de structure via l'homocystéinylation peuvent être en cause. Il s'agit de modifications post-translationnelles qui peuvent être responsables d'une activation immunitaire, de la dégradation de certaines protéines et d'une toxicité voire d'une mort cellulaire. Ce mécanisme serait d'ailleurs responsable d'une diminution de l'activité de la SOD, qui comme nous l'avons vu plus haut, a une importance dans la lutte contre l'oxydation et qui est impliquée dans la physiopathologie de la SLA.

Enfin, l'excitotoxicité est impliquée dans la pathogénie de l'homocystéine. En effet, l'homocystéine peut agir comme un agoniste du glutamate en se liant aux récepteurs NMDA, induisant un afflux excessif de calcium dans la cellule et la génération de réactifs oxygénés, toxiques pour le neurone. L'excitotoxicité est également impliquée dans la physiopathologie de la SLA.

### c. Effet de l'homocystéine et des folates sur les neurones

Des données expérimentales montrent que l'homocystéine peut sensibiliser les neurones à certains facteurs, suggérant un mécanisme par lequel l'homocystéine pourrait contribuer à la pathogenèse des maladies neurodégénératives [Kruman et al 2000]. En effet, l'exposition de neurones hippocampiques à l'homocystéine entraîne une apoptose de ces cellules, qui semblent d'ailleurs sélectivement vulnérables car les astrocytes et les cellules vasculaires exposées pendant plusieurs jours à l'homocystéine ne meurent pas. L'homocystéine induit une élévation rapide de la PolyADPribose Polymérase (PARP), une enzyme de réparation de l'ADN, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la caspase 3-like. Cette élévation induit également une augmentation de p53, une protéine associée à l'apoptose. On observe quelques heures après l'exposition à l'homocystéine une élévation des oxyradicaux mitochondriaux, qui sont le témoin d'une dysfonction mitochondriale et du stress oxydatif. Dans cette étude, Kruman et al ont montré que l'homocystéine sensibilise les neurones à la mort induite par des agressions oxydatives et le glutamate, d'où une augmentation de la vulnérabilité à l'excitotoxicité des neurones exposés à l'homocystéine.

En 2002, une étude [Ho et al. 2002] a examiné les mécanismes par lesquels l'homocystéine induit une neurotoxicité en culture. Elle a mis en évidence une élévation du calcium dans le cytosole, une augmentation de la production de radicaux libres, ainsi qu'une hyperphosphorylation de tau et une augmentation de l'apoptose. En 2003, le même auteur [Ho et al. 2003] a étudié l'effet d'une privation en folates sur des neurones en culture. On observe là encore des modifications: augmentation du calcium dans le cytosole, augmentation des radicaux libres, de la phospho-tau et de l'apoptose. La génération d'homocystéine consécutive à la privation en folates contribue par ailleurs à ces phénomènes, et l'ajout d'un inhibiteur de la formation de l'homocystéine empêche l'augmentation des radicaux libres et du calcium, même en l'absence de folates. La carence en folates perturbe également la production de glutathion, un anti-oxydant endogène.

Ainsi, les carences en folates et l'homocystéine peuvent endommager voire détruire les neurones en culture et augmenter leur vulnérabilité par des mécanismes métaboliques, excitotoxiques et oxydatifs. Ces mécanismes sont d'ailleurs ceux impliqués dans les maladies neurodégénératives.

Les carences en folates et l'homocystéine compromettent également l'activité de la glutathion peroxydase et diminuent le taux de vitamines A, C et E dans les tissus, suggérant qu'ils compromettent les réserves d'antioxydants à de nombreux niveaux [Mattson et al, 2003].

## C. Pathologies neurologiques liées aux folates et à l'homocystéine

### 1. Homocystéine et risque cardiovasculaire

Depuis une vingtaine d'années, il est établi que l'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque cardiovasculaire indépendant pour les maladies coronariennes, cérébrovasculaires, vasculaires périphériques et les thromboses veineuses, même pour une élévation plasmatique modérée (entre 15 et 20  $\mu\text{mol/l}$ ) [Eikelboom et al. 1999; Bostom et al. 1999]. Il semble que l'hyperhomocystéinémie soit en particulier reliée à une atteinte microvasculaire, se manifestant principalement par des infarctus lacunaires et de la leucoaraïose [Fassbender et al. 1999; Evers et al. 1997]. Les mécanismes physiopathologiques de cette atteinte ne sont pas bien connus : l'homocystéine pourrait induire des altérations oxydatives des cellules endothéliales en culture par un mécanisme impliquant la génération de peroxyde d'hydrogène. L'exposition de ces cellules à l'homocystéine entraîne une surexpression de facteurs qui attirent les monocytes, contribuant ainsi à la formation de plaques d'athérosclérose [Hankey et al. 1999 ; Welch et al. 1998].

Cependant, les essais de supplémentation en folates ont été décevants et bien qu'ils aient permis une diminution de l'homocystéinémie, ils n'ont pas permis une diminution du risque cardiovasculaire de manière significative [Toole et al. 2004 ; Clarke et al. 2010].

### 2. Carences vitaminiques et malformations fœtales

L'importance des folates dans la nutrition est établie : les femmes enceintes carencées en folates ont un risque plus élevé d'avoir des bébés présentant une absence de fermeture du tube neural (spina bifida, méningocèle, encéphalocèle, anencéphalie), par anomalies de la prolifération et de la différenciation des cellules neurales [Smithells et al. 1976]. Ainsi, les cellules cérébrales embryonnaires privées de folates ne peuvent plus proliférer et les cellules nouvellement créées à partir des cellules progénitrices meurent par apoptose.

Les carences en vitamine B12 pendant la grossesse sont responsables d'une élévation de l'homocystéine chez le fœtus et d'une augmentation du risque pour l'enfant de développer des troubles du développement du système nerveux central. Dans l'enfance, le déficit en vitamine B12 peut induire des tableaux de régression psycho-motrice, de neuropathie sensitive, d'hypotonie

sévère, de crises comitiales, d'apathie, en rapport le plus souvent avec un défaut de myélinisation [Guerra-Shinohar et al. 2002].

### 3. Déficit en folates intracérébral

Les déficits cérébraux en folates sont des pathologies neuropsychiatriques où l'on met en évidence une diminution du 5-MTHF dans le LCR sans carences en folates dans le sang périphérique. Elles sont rares, avec une prévalence estimée à 1/6000 enfants [Ramaekers et al. 2013].

La cause la plus répandue de ces syndromes est la présence d'anticorps sériques bloquant le récepteur des folates  $\alpha$  (FR $\alpha$ ) présents au niveau des cellules épithéliales des plexus choroïdes, empêchant le passage du 5-MTHF à travers ces plexus. Les autres causes, moins fréquentes, sont les mutations de FOLR-1, les dysfonctions mitochondriales et les troubles innés du métabolisme des folates.

La présence d'anticorps maternels anti-FR est associée à des anomalies de fermeture du tube neural, et la présence de ces anticorps chez l'un des parents ou les deux augmente le risque d'autisme chez les enfants. Cependant, la présence d'un faible taux d'anticorps n'est pas forcément pathologique chez les adultes, la prévalence estimée chez l'adulte sain pouvant aller jusqu'à 15% dans certaines populations.

Les syndromes de carences cérébrales en folates attribués à la présence d'anticorps FR débutent le plus souvent très tôt dans l'enfance, dans les quatre à six mois après la naissance. Ils se manifestent par des problèmes d'agitation, d'irritation et de troubles du sommeil, puis une diminution de la croissance du périmètre crânien, un retard de développement voire une régression des acquis. A partir d'un an, on peut noter une hypotonie et une ataxie, puis l'installation d'un syndrome pyramidal. Ensuite peuvent apparaître une épilepsie, des mouvements anormaux et des troubles visuels. D'autres phénotypes peuvent être rencontrés : des formes spastiques ataxiques sans troubles cognitifs, mais aussi des autismes infantiles. A l'adolescence, on peut voir apparaître des formes dystoniques ou schizophréniques.

Les autres syndromes de carences en folates intracérébrales ont des phénotypes hétérogènes, avec des âges de début différents. Récemment, un cas de déficit en folates intracérébral ayant débuté à l'âge adulte a été décrit : la patiente de 58 ans présentait un tableau de troubles mnésiques et de myoclonies, qui s'est amendé après une supplémentation vitaminique [Sadighi et al. 2012].

Le traitement consiste en l'administration d'acide folinique à fortes doses pendant 6 à 12 mois, le plus tôt possible. En effet, les carences en folates survenant à des stades critiques du développement de l'enfant affectent la maturation structurelle et fonctionnelle du cerveau. La détection précoce de ces carences est donc primordiale pour permettre le diagnostic de ces pathologies potentiellement curables.

#### 4. Troubles de la reméthylation

Il s'agit de déficits héréditaires rares d'enzymes impliquées dans la reméthylation de l'homocystéine en méthionine : déficit en MTHFR, méthionine synthase réductase, méthionine synthase. Ces déficits entraînent un déficit en méthionine, une élévation de l'homocystéinémie, sans augmentation de l'excrétion urinaire d'acide méthylmalonique [Schiff et al. 2011].

Le tableau clinique varie en fonction de l'âge de début et surtout de la sévérité du déficit enzymatique. La pathogénie de ces mutations peut s'expliquer par deux mécanismes :

- Une diminution de la synthèse de la méthionine, responsable d'une diminution de la production de SAM entraînant une hypomyélination du système nerveux central.
- Une hyperhomocystéinémie, responsable de la survenue d'accidents vasculaires cérébraux.

L'histoire naturelle semble montrer deux profils selon l'âge de début. Lorsque le déficit est néonatal, il existe une détérioration neurologique aiguë avec un retard staturo-pondéral et une hypotonie globale qui conduisent rapidement au décès ou laissent de lourdes séquelles neurocognitives. Lorsque la maladie débute dans l'enfance, on assiste à une évolution triphasique : développement normal, puis microcéphalie et retard psycho-moteur non spécifique, et enfin aggravation aiguë avec des troubles respiratoires.

Il semble que la correction précoce du déficit en méthionine via la supplémentation en méthionine, bétaine et vitamines B9, B12, B6 soit efficace, que ce soit sur le contrôle des paramètres biologiques ou sur l'amélioration clinique.

## D. Implication des folates et homocystéine dans les pathologies neurodégénératives et psychiatriques

L'augmentation du stress oxydatif, des altérations de l'ADN et le déclenchement des voies apoptotiques sont impliquées dans la pathogenèse de toutes les maladies neurodégénératives majeures, incluant les maladies d'Alzheimer (MA) et de Parkinson (MP), la chorée de Huntington (CH) et la sclérose latérale amyotrophique. D'autres facteurs spécifiques à chacune de ces maladies sont bien entendu également impliquées (altération d'une protéine précurseur de l'amyloïde dans la MA, accumulation de toxines dopaminergiques dans le Parkinson, expansion de polyglutamine dans la protéine huntingtine dans la CH).

### 1. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par une accumulation d'agrégats insolubles de protéines  $\beta$ -amyloïde sous la forme de plaques et par une dégénérescence puis une mort des neurones, se manifestant par un enchevêtrement d'agrégats fibrillaires de protéine tau. La plupart des cas sont sporadiques, mais il existe également des familles de patients atteints de MA, notamment par mutation de la protéine précurseur de l'amyloïde et la préséniline. L'A $\beta$  semble jouer un rôle central dans la dysfonction et la mort des neurones induisant un stress oxydatif et rompant l'homéostasie du calcium intracellulaire.

On connaît des facteurs de risque non modifiables, tels l'âge, le niveau d'éducation et les facteurs génétiques, mais des facteurs modifiables ont également été mis en cause, telle l'homocystéine.

En effet, des études sur modèles expérimentaux et humains suggèrent un rôle de l'homocystéine dans le processus pathologique. Il semble d'ailleurs que l'homocystéine potentialise la toxicité de la protéine  $\beta$ -amyloïde [Ho et al. 2001, White et al. 2001].

Les patients atteints de MA ont des taux plasmatiques d'homocystéine plus élevés qu'une population de témoins, après ajustement sur les facteurs confondants, notamment l'âge et les pathologies cérébro-vasculaires [Clarke et al. 1998]. Cela a pu être confirmé dans une méta-analyse [Beydoun et al. 2014], avec une augmentation significative du risque de Maladie d'Alzheimer (RR 1.93, 95% CI 1.5-2.49) chez les patients présentant des taux plasmatiques d'homocystéine élevés.

Cette élévation pourrait d'ailleurs être présente avant le début clinique de la maladie. En effet, une étude prospective [Seshadri et al 2002] a mis en évidence une élévation de l'homocystéine plusieurs années avant que ne se développe la symptomatologie démentielle.

En revanche, dans le LCS, l'augmentation de l'homocystéine n'est pas si évidente et les résultats sont différents d'une étude à l'autre. Il n'y a pas de différence entre les malades et les contrôles dans deux études [Smach et al. 2011; Linnebank et al. 2010]. Elle est corrélée à l'âge des patients, et n'est donc pas augmentée de manière significative lorsqu'elle est comparée à des témoins de même âge dans une autre étude [Serot et al. 2005]. Cependant, elle est plus élevée chez les patients souffrant d'une MA que chez les témoins dans une quatrième étude [Isobe et al. 2005]. Il existe également une diminution significative du taux de folates dans le LCS des patients atteints de MA [Serot et al. 2001; Smach et al. 2011].

D'autre part, il semble exister un lien entre atrophie cérébrale et homocystéine : le volume hippocampique est inversement corrélé au taux d'homocystéine chez des patients considérés comme cognitivement normaux [Williams et al. 2002]. Le volume cortical et le volume de l'hippocampe sont également inversement corrélés à l'homocystéinémie [Den Heije et al. 2003]. L'atrophie cérébrale est enfin associée à l'hyperhomocystéinémie et induit un déclin cognitif concernant principalement la mémoire épisodique [De Jager, 2014]. De même, des taux plasmatiques bas de folates sont associés à une atrophie du cortex cérébral [Snowdon et al. 2000].

A l'inverse, il semble que les vitamines B9 et B12 soient des facteurs protecteurs du risque de déclin cognitif [Kado et al. 2005, Mooijaart et al. 2005]. Toutefois, des revues récentes de la littérature pointent des problèmes méthodologiques, et ne permettent pas de conclure finalement à une efficacité de la supplémentation en vitamine B9 et B12 dans la MA. Ainsi, devant l'absence de preuve suffisante d'efficacité sur le déclin cognitif, la supplémentation en acide folique ou en vitamine B12 n'est pour l'instant pas recommandée chez les patients présentant des troubles cognitifs [Morris et al 2012].

Sur le plan physiopathologique, il semble exister une interaction synergique entre les carences en folates et l'homocystéine d'une part, et d'autres facteurs tels l'A $\beta$  d'autre part [Kruman et al. 2002]. L'influence combinée du stress oxydatif, de la prédisposition génétique et des carences en folates pourrait induire une neurodégénérescence, sous certaines conditions, alors qu'un seul de ces facteurs pris isolément n'est pas suffisant. Cette dégénérescence des neurones serait en rapport avec une perturbation de la synthèse des purines et de la thymidine, et une accumulation d'ADN

endommagé, liée au moins en partie aux perturbations du métabolisme des folates et de l'homocystéine.

## 2. Maladie de Parkinson

Dans la maladie de Parkinson (MP), les neurones de la substance noire dégèrent sélectivement, induisant des difficultés à contrôler les mouvements. Ces neurones utilisent la dopamine comme neurotransmetteur, et sont particulièrement sensibles au stress oxydatif et à certaines toxines environnementales, comme la rotenone, un pesticide. La plupart des formes sont sporadiques, mais des atteintes génétiques existent, avec des mutations codant pour le gène de la Parkine et l' $\alpha$ -synucléine.

Une élévation de l'homocystéine plasmatique chez les Parkinsoniens a été documentée [Kuhn et al. 1998], en particulier chez ceux traités par L-dopa [Hu et al. 2013; Blandini et al. 2001]. Cette élévation est notamment présente chez les patients présentant une mutation répandue (C677T) de la MTHFR [Yasui et al. 2000]. Cependant, ces constatations sont tirées d'études sur des patients symptomatiques, et on ne sait donc pas dans quelle mesure les folates et l'homocystéine participent au processus neurodégénératif [Mattson et al. 2002].

Chez les patients traités par L-Dopa, une des explications de l'élévation de l'homocystéine peut être expliquée pharmacologiquement par la méthylation de la L-Dopa via la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), une enzyme notamment présente dans le cerveau : cette réaction libère la SAH, qui est ensuite hydrolysée par la S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH) et forme alors l'homocystéine. Le traitement par L-dopa pourrait induire une déplétion en groupe méthyl et ainsi causer une élévation de l'homocystéine, suggérant que ce traitement pourrait accélérer le processus neurodégénératif. Une revue de la littérature semble d'ailleurs montrer un rôle potentiel de la L-dopa en lien avec l'hyperhomocystéinémie sur les troubles cognitifs et la démence dans l'évolution de la MP [Zoccolela 2010 Curr Med].

Lors d'expériences sur des modèles animaux de MP carencés en folates ou supplémentés en homocystéine, Duan et al. ont mis en évidence une élévation marquée de la sensibilité des neurones dopaminergiques à une toxine appelée MPTP qui détruit sélectivement les neurones dopaminergiques de la substance noire, se traduisant par une atteinte motrice sévère. Par ailleurs, l'homocystéine et les carences en folates sensibilisent les neurones dopaminergiques en culture à la mort induite par le rotenone et le fer, deux agents impliqués dans la pathogenèse de la MP [Duan et al. 2002].

Ainsi, les carences en folates et l'hyperhomocystéinémie pourraient, en sensibilisant les neurones dopaminergiques aux toxiques environnementaux, précipiter le début voire accélérer la progression de la maladie.

### 3. Chorée de Huntington

La CH est une maladie héréditaire caractérisée par l'expansion de triplets CAG sur le gène de la huntingtine. Les patients présentent une dégénérescence des neurones dans le striatum, responsables d'une altération des contrôles des mouvements.

Il existe une élévation significative du taux plasmatique d'homocystéine chez les patients traités pour une chorée de Huntington, en comparaison à des sujets contrôles et des sujets atteints de CH non traités [Andrich et al. 2004]. Dans la CH, les neurones striataux meurent précocement, sans que l'on connaisse exactement le mécanisme par lequel l'expansion de triplet induit la mort neuronale. Or on pense que les neurones striataux sont particulièrement vulnérables aux lésions induites expérimentalement par des neurotransmetteurs ou des acides aminés excitateurs. L'hypothèse de l'excitotoxicité a été soulevée, et Boutell en 1998 a montré que l'huntingtine interagissait avec la CBS. Il suggère donc que cette interaction empêche la CBS de fonctionner normalement, entraînant une élévation de l'homocystéine qui elle-même serait responsable de la mort des neurones striataux impliqués dans la maladie par le biais de l'excitotoxicité [Boutell et al 1998].

### 4. Troubles psychiatriques

#### a. Dépression

Certaines études ont mis en évidence une prévalence élevée de l'hyperhomocystéinémie et des carences en vitamine B9 chez les patients souffrant de dépression. Il semble également exister des troubles de la reméthylation chez ces patients [Bottiglieri et al. 2000]. La supplémentation vitaminique a pu montrer une efficacité chez certains de ces patients.

## b. Schizophrénie

Il existe une augmentation de l'homocystéine chez les patients schizophrènes [Levine et al. 2005], celle-ci n'est pas toujours associée à une carence en vitamine B9 ou B12 [Susser et al. 1998]. Cependant, la supplémentation en folates a été efficace chez les patients schizophrènes et présentant un syndrome dépressif dans un essai contrôlé en double aveugle [Godfrey et al. 1990].

## E. Folates et homocystéine dans la Sclérose Latérale Amyotrophique

### 1. Première étude

En 1984, pour la première fois, l'implication du cycle du folate est proposée par Yoshino pour expliquer la physiopathologie de la SLA [Yoshino et al. 1984].

En effet, une élévation d'un acide aminé sulfuré, la taurine, avait été mise en évidence dans le cortex et la moelle épinière de patients atteints de SLA. Or cette élévation ne pouvait pas être le fait d'une dégradation protéique liée à la dégénérescence motoneuronale car la taurine n'est pas un acide aminé protéique. L'hypothèse était donc que cette augmentation de la taurine pouvait être le reflet d'un dérèglement des acides aminés sulfurés dans la maladie. Par ailleurs, le contenu en ARN des motoneurons des patients SLA semblait diminué, et l'auteur cherchait donc une théorie pouvant à la fois expliquer la diminution de la synthèse des acides nucléiques et l'augmentation de la taurine dans la maladie.

Yoshino a donc formulé l'hypothèse d'une perturbation du cycle des folates, puisqu'il permet à la fois la synthèse des purines et pyrimidines, indispensables à la formation de l'ADN, et la synthèse de taurine à partir de cystéine, elle-même dérivée de l'homocystéine par la voie de la transsulfuration. Cette théorie semblait accréditée par le fait qu'une diminution de THF avait été mise en évidence dans le cortex moteur sur des autopsies de patients SLA, ainsi qu'une diminution de l'activité de la 5-méthylTHF-homocystéine-méthyltransférase (correspondant en fait à la méthionine synthase) chez les patients SLA, bien que non statistiquement significative.

## 2. Etudes in vitro, sur modèles animaux

Il a fallu attendre les années 2000, pour qu'à nouveau la question de l'implication de l'homocystéine et des folates se pose. Les publications se sont tout d'abord intéressées à l'effet de l'homocystéine in vitro, et notamment sur des modèles animaux puisque la découverte des mutations génétiques impliquant la SOD a permis la création de modèles expérimentaux de la SLA.

Ainsi, Sung propose pour la première fois en 2002 d'étudier l'effet de l'homocystéine sur des motoneurones mutés pour la SOD 1 (G93A), faisant l'hypothèse que l'homocystéine aurait un rôle précipitant dans la mort cellulaire de motoneurones déjà vulnérables aux agressions cytotoxiques en raison de la mutation SOD1 [Sung et al. 2002].

L'étude a montré que l'homocystéine induit une cytotoxicité significative, dose-dépendante, sur des motoneurones mutés pour SOD1, même pour une concentration physiologique (10  $\mu\text{mol/l}$ ). Elle démontre que cette cytotoxicité implique la production de radicaux libres médiée par le cuivre (qui est exposé par un changement conformationnel de la SOD mutante), responsable d'un gain de fonction toxique. Cette toxicité est inhibée grâce à l'utilisation d'un anti-oxydant (le trolox) et par un chélateur du cuivre.

Ces résultats suggèrent donc que l'homocystéine est un facteur précipitant, probablement modulé par l'âge (puisque sa concentration augmente avec l'âge) dans certaines formes familiales de SLA, puisque ces formes se développent rarement avant la cinquième décennie alors que la mutation génétique est présente depuis la naissance.

En 2003, Chung a réalisé une étude immunohistochimique pour évaluer la distribution de l'homocystéine dans le système nerveux central de souris transgéniques, mutées pour SOD 1 [Chung et al. 2003].

Les examens ont mis en évidence une intense réactivité des astrocytes dans la moelle épinière des souris transgéniques à 18 semaines (âge où elles étaient cliniquement symptomatiques), à des anticorps polyclonaux de lapins anti-homocystéine, alors que les cellules gliales des souris contrôles et des souris mutées présymptomatiques n'en présentaient pas. Chez les souris mutées, cette réactivité était diffuse, mais notable surtout au niveau de la corne antérieure. Elle était également présente dans le tronc cérébral et dans les noyaux cérébelleux, mais aussi intensément dans les hippocampes, les cellules pyramidales de la région CA1-3 et les cellules granulaires du gyrus denté.

Ces résultats suggèrent une implication des astrocytes dans la pathogenèse de la SLA, bien que leur implication fonctionnelle ne soit pas claire. Ils sont en effet impliqués dans les mécanismes anti-oxydants, leur atteinte par l'homocystéine pourrait être le reflet d'un mécanisme de détérioration par le biais des radicaux libres dans la SLA.

En s'appuyant sur ces deux dernière études, Zhang a fait l'hypothèse que l'homocystéine était impliquée dans la SLA, et qu'une supplémentation en acide folique et vitamine B12 pourrait induire une diminution de l'homocystéine, fournissant ainsi une forme de neuroprotection aux souris mutées SOD1. Ce protocole étudiait des paramètres biologiques tels l'homocystéinémie et des paramètres histopathologiques avec le comptage des cellules de la corne antérieure. La population de souris mutées était divisée en quatre groupes, recevant soit une solution saline, soit une supplémentation en folates, soit une supplémentation en vitamine B12, soit les deux vitamines [Zhang et al. 2008].

L'étude a montré que la supplémentation en acide folique, seul ou en association à la vitamine B12, protégeait le motoneurone en diminuant l'apoptose des motoneurones grâce à la diminution des facteurs pro-apoptotiques (tels PARP et la caspase 3), et en augmentant le taux d'une protéine anti-apoptotique (BCI 2). Cette supplémentation inhibe la production de facteurs inflammatoires (tels TNF $\alpha$ ) et l'activation de la microglie et des astrocytes chez les souris transgéniques SOD1. Elle induit une diminution significative de l'homocystéinémie et retarde l'apparition de la maladie, prolongeant la survie des souris traitées.

Ces résultats suggèrent donc qu'une diminution de l'homocystéine par supplémentation en folates associée ou non à la vitamine B12 permet de diminuer l'inflammation et de ralentir la progression de la maladie, impliquant donc un potentiel thérapeutique. L'homocystéine serait impliquée dans la physiopathologie de la SLA en favorisant l'activation de l'apoptose des motoneurones.

En 2010, la même équipe [Zhang et al. 2010] fit l'hypothèse que les folates et leur cycle de transméthylation étaient altérés précocement dans l'évolution de la maladie chez les patients SLA, conduisant à une accumulation d'homocystéine en fin d'évolution. Quatre groupes de souris mutées SOD1 ont été étudiées, afin d'évaluer quatre stades différents de la maladie : précoce, pré-symptomatique (atteinte histologique isolée et modérée), symptomatique (atteinte motrice clinique et diminution significative du nombre de motoneurones) et terminal (perte d'au moins 70% des motoneurones dans la moelle épinière). Chez toutes les souris, un dosage plasmatique de l'acide

folique et du 5-MTHF était réalisé, puis l'ensemble de ces dosages était réalisé dans le cortex et la moelle épinière après sacrifice. L'homocystéinémie était également étudiée.

Cette étude a mis en évidence une diminution de l'acide folique dans le plasma, la moelle épinière et le cortex chez des souris SOD1 au stade terminal de SLA, ainsi qu'une diminution de 5-MTHF aux stades précoce et asymptomatique dans ces 3 sites, présente également aux stades symptomatique et terminal. L'homocystéine plasmatique est augmentée de manière significative uniquement aux stades symptomatique et terminal. La perte en motoneurones n'est vraiment significative qu'à ces deux derniers stades.

Cette baisse de 5-MTHF semble donc précéder l'atteinte des motoneurones et l'augmentation de l'homocystéinémie, suggérant que l'hyperhomocystéinémie tardive serait la conséquence d'un déficit en 5-MTHF présent dès le stade précoce. Le 5-MTHF serait donc un marqueur précoce de la SLA. L'implication d'enzymes intervenant dans le cycle des folates telles la MTHFR pourrait alors en être en cause.

Par ailleurs, Hemendinger a étudié la toxicité de l'homocystéine sur des cellules hybrides dérivées d'un motoneurone de neuroblastome *in vitro* (cellules couramment utilisées dans les études thérapeutiques dans la SLA), ainsi que l'éventuel effet protecteur conféré par le MTHF et la méthylcobalamine [Hemendinger et al. 2011].

Cette étude confirme que l'homocystéine est toxique pour le motoneurone à des concentrations millimolaires, en induisant une activation de la caspase 3/7 et une apoptose, par un mécanisme indépendant de la génération de radicaux libres. Cette apoptose est inhibée par la méthylcobalamine, avec une diminution de l'activité de la caspase 3/7, alors que l'introduction de THF ne diminue pas l'apoptose.

L'ensemble de ces résultats suggère effectivement une implication de l'homocystéine et du cycle des folates dans la physiopathologie de la SLA. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue que ces études sont réalisées chez l'animal, mais surtout qu'elles sont réalisées sur des modèles animaux présentant un seul type de mutation génétique, et dont l'extrapolation aux formes non génétiques doit se faire avec précaution.

### 3. Etudes chez l'Homme

Ainsi, en 2008, Zoccolella a cherché à déterminer s'il existait bien une élévation de l'homocystéine plasmatique chez les patients SLA, en essayant de corrélérer l'homocystéinémie au phénotype clinique de SLA [Zoccolella et al. 2008].

Cette étude monocentrique a réuni 62 patients SLA et 88 contrôles appariés en âge et en sexe, à qui ont été dosées l'homocystéine ainsi que les vitamines B9 et B12. Elle a mis en évidence une élévation de l'homocystéine dans le plasma des patients SLA en comparaison aux contrôles (médiane = 11.2 vs 9.7  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p=0.0004$ ), s'accompagnant d'une diminution des folates plasmatiques (médiane = 4.4 vs 5.8  $\text{ng/ml}$ ,  $p=0.0003$ ), mais sans différence significative pour la vitamine B12. La régression logistique multivariée a révélé une association directe entre le taux d'homocystéine et la présence d'une SLA, après ajustement sur l'âge, le sexe et le taux de vitamines, avec un Odd Ratio à 6.4 (IC 95% 2.2-19.1,  $p=0.0008$ ) lorsqu'on compare le premier et le troisième tertile des résultats ( $\text{Hcy} < 9.2 \mu\text{mol/l}$  vs  $\text{Hcy} > 11.6 \mu\text{mol/l}$ ). La corrélation entre l'homocystéinémie et le phénotype clinique n'a pas montré d'association significative, seule l'observation d'une tendance à l'élévation de l'homocystéine chez les patients diagnostiqués précocement s'est dégagée, non significative elle aussi.

Ces résultats mettent donc en évidence une élévation de l'homocystéine chez les patients SLA. Bien qu'elle soit faible en valeur absolue, (différence de 2  $\mu\text{mol/l}$  entre les deux médianes), elle est significative et nous savons par des données expérimentales qu'une élévation même modeste de l'homocystéine peut induire un stress oxydatif et altérer l'ADN. La mesure de l'homocystéine étant unique, il n'y a pas d'évaluation possible de la relation temporelle entre homocystéine et SLA : il est donc difficile de conclure quant à l'implication de l'homocystéine dans la SLA chez l'Homme : cause ou conséquence ?

Valentino a voulu confirmer cette élévation de l'homocystéine dans le sang et mesurer pour la première fois le taux d'homocystéine dans le LCS des patients SLA [Valentino et al. 2010].

Cette étude a ainsi rassemblé 69 patients SLA de forme sporadique et 55 contrôles. Elle a montré elle aussi une élévation de l'homocystéinémie chez les patients SLA (médiane = 12.4 vs 7.26  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0.001$ ), mais surtout une élévation de l'homocystéine dans le LCS des patients SLA en comparaison aux contrôles (médiane = 0.46 vs 0.24  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0.001$ ), cette élévation étant indépendante du taux plasmatique. Ces élévations de l'homocystéine dans le sang et le LCS ne semblaient pas corrélées au site de début des symptômes, à l'âge de début ni au sexe.

L'homocystéine ne traversant pas librement la barrière hémato-encéphalique, l'homocystéine présente dans le LCS est directement le reflet de la balance métabolisme/catabolisme au niveau du système nerveux central. Cependant, cette étude ne permet pas de se prononcer sur l'explication de cette élévation : excès de métabolisme ou défaut de catabolisme ? Par ailleurs, là encore, il n'y a pas d'évaluation temporelle des dosages. Néanmoins, l'étude semble confirmer que l'homocystéine est un candidat intéressant comme biomarqueur de la maladie. Enfin, on note dans cette étude comme dans celle de Zoccollella une grande dispersion des taux d'homocystéine plasmatique dans le LCS, pouvant traduire une grande hétérogénéité entre les malades, et donc l'implication d'autres facteurs dans la physiopathologie de la SLA.

Enfin, l'équipe de Levin en 2010 a voulu évaluer les taux d'homocystéine et d'acide méthylmalonique (AMM) dans trois maladies neurodégénératives : la SLA, la maladie de Parkinson (MP) et la Paralyse Supranucléaire Progressive (PSP). Comme nous avons pu le voir plus haut, il semble exister une élévation de l'homocystéine dans plusieurs maladies neurodégénératives, en particulier chez les Parkinsoniens, et notamment ceux traités par L-dopa. En revanche, aucune étude n'a été menée dans la population des PSP [Levin *et al.* 2010]. L'AMM est étroitement lié au métabolisme de l'homocystéine. En effet, l'AMM est formé à partir de la cystéine, elle-même provenant de l'homocystéine par la voie de la transsulfuration. Il est connu pour être neurotoxique [Kruman *et al.* 2000], mais n'a jamais réellement été exploré dans le cadre des maladies neurodégénératives.

Les taux plasmatiques d'homocystéine, vitamines B9 et B12, ainsi que le taux d'AMM urinaire ont été mesurés dans 4 groupes comprenant : 41 patients MP, 22 PSP, 27 SLA et 30 sujets contrôles.

Les concentrations en vitamine B9 et B12 n'étaient pas différentes d'un groupe à l'autre. Les taux d'homocystéine étaient significativement élevés dans les 3 groupes de malades, sans différence significative entre ces 3 groupes : moyenne pour les patients atteints de MP 15.05  $\mu\text{mol/l}$ , ceux atteints de PSP 15.75  $\mu\text{mol/l}$ , ceux atteints de SLA 13.94  $\mu\text{mol/l}$ , alors que les témoins étaient en moyenne à 11.19  $\mu\text{mol/l}$ . De même, le ratio AMM/créatinine était significativement élevé dans les 3 groupes de malades, sans différences entre eux, en comparaison au groupe contrôle.

Ces résultats montrent donc que l'homocystéine et l'AMM sont élevés dans ces 3 maladies neurodégénératives, laissant supposer qu'ils participent ensemble au processus neurodégénératif, ou au moins qu'ils en sont le marqueur. Ce processus impliquerait donc l'ensemble du métabolisme de l'homocystéine. D'autre part, il existe dans l'évolution de ces trois pathologies des patients qui présentent une démence. L'homocystéine étant également élevée chez les patients souffrant de

maladie d'Alzheimer, on peut se poser la question de son implication dans le développement des troubles cognitifs.

#### 4. Etudes génétiques

Devant cette association forte entre élévation de l'homocystéine et SLA, plusieurs études de génétique ont recherché une relation entre des mutations d'enzymes pouvant entraîner une hyperhomocystéinémie et la survenue de la maladie. Elles se sont en particulier intéressées à la MTHFR, et notamment au polymorphisme C677T, nommé variant thermolabile car l'enzyme qu'il crée réduit drastiquement son activité lorsque la température augmente, conduisant alors à une accumulation d'homocystéine, en particulier lorsque l'apport en folates est bas. Ce variant est d'ailleurs la cause génétique la plus répandue d'hyperhomocystéinémie [Stanger et al. 2003].

En 2011, une étude bicentrique (Ulm et Zurich) a comparé la fréquence de 7 variants de gènes connus pour être impliqués dans le métabolisme de l'homocystéine (MTHFR, DHFR, CBS, méthionine synthase, transcobalamine 2 et RFC1 Reduced Folate carrier) chez 162 patients présentant une SLA de forme sporadique, et 162 témoins appariés pour l'âge et le sexe [Künhlein et al. 2011].

Le variant MTHFR c.677C>T était significativement associé à la maladie, avec 6% de témoins homozygotes contre 13% de patients (OR=2.26, p=0.02). Aucun des autres variants n'a montré de différence significative entre les 2 groupes.

Ces résultats suggéraient donc une association entre ce variant thermolabile et la survenue d'une SLA sporadique.

Cependant, en 2012, l'équipe de Ricci a voulu rechercher cette mutation dans la population italienne, en étudiant 450 SLA et 700 contrôles appariés pour l'âge et le sexe.

L'étude n'a montré aucune différence significative de distribution du variant c.677C>T entre les patients et les contrôles dans la population italienne [Ricci et al. 2012].

Cette différence de résultats peut s'expliquer par le fait que la présence du variant dans la population générale suit un gradient Nord-Sud et est donc disparate d'un pays à l'autre. En effet la fréquence de l'allèle T dans la population de Künhlein était très basse (28%, avec une fréquence d'homozygotes de 6%) alors qu'en Italie elle est beaucoup plus élevée (44%, avec une fréquence d'homozygotes de 18%). Les auteurs expliquent que les apports en folates sont bien différents dans ces deux pays, et on sait que l'effet du variant thermolabile est particulièrement important lorsque le

taux de folates est bas. Ainsi, les populations présentant un ou deux allèles T et ayant des apports en folates suffisants n'ont pas forcément une élévation de l'homocystéinémie et ne subissent donc pas les répercussions de cette élévation.

En 2012, une équipe turque [Sazci et al. 2012] a elle-aussi étudiée le polymorphisme C667T chez 437 patients présentant une SLA sporadique et 439 contrôles sains.

Là encore, l'étude n'a pas mis en évidence de différence significative entre la population de patients et de témoins pour le variant c.677C>T., sauf dans le sous-groupe des femmes.

L'ensemble de ces études ne semble donc pas apporter de preuves d'une implication formelle d'un variant de la MTHFR dans la physiopathologie de la SLA.

## 5. Etudes métabolomiques

La métabolomique s'est considérablement développée depuis les années 2000. Cette technique permet l'analyse exhaustive de l'ensemble des métabolites (molécules de petite masse moléculaire) présents dans un organite, une cellule, un fluide biologique ou un organe. Elle permet ainsi d'identifier et de quantifier de nombreux métabolites puis de réaliser des profils qui peuvent être comparés entre deux individus ou deux populations.

Cette technique a donc été utilisée dans plusieurs études pour la recherche de marqueurs métaboliques de la SLA dans le sang ou le LCS [Rozen et al. 2005 ; Kumar et al. 2010 ; Blasco et al. 2010; Wuolikainen et al. 2011; Blasco et al. 2013]. Dans chacune de ces études, une signature métabolique de la SLA a été mise en évidence, permettant de classer avec peu d'erreurs les patients SLA entre eux (ceux sous riluzole et ceux sans traitement, ceux présentant des formes familiales et ceux présentant des formes sporadiques par exemple).

## 6. Implication de la méthionine

La méthionine n'a jamais été étudiée spécifiquement dans la SLA. Quelques résultats sont accessibles dans des études analysant l'ensemble des acides aminés dans le sang et le LCS [Perry et al. 1990; Camu et al. 1993 ; Ilzecka et al. 2003]. Ces trois études mettent en évidence une diminution de la méthionine dans le sang. L'étude de Perry ne montre pas en revanche de perturbations des

taux de méthionine dans le LCS. En métabolomique, une étude [Wuolikainen et al. 2011] a identifié la méthionine dans le LCS, qui est diminuée chez les patients SLA.

L'ensemble de ces données montre une tendance à la diminution de la méthionine chez les patients SLA. Ceci est donc compatible avec un trouble de la reméthylation et fait suspecter l'existence d'un trouble du métabolisme des folates et de l'homocystéine.

## F. Hypothèse de travail

Il semble donc au travers de ces études, que des perturbations du cycle du folate soient responsables d'une élévation de l'homocystéine dans le sang et le LCS chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique. Cependant l'analyse de l'homocystéine est indissociable des deux grandes voies métaboliques dont elle est le carrefour, et qui impliquent d'une part le cycle des folates et de la méthionine, d'autre part la cystéine par la voie de la transsulfuration.

Nous proposons donc dans cette étude préliminaire d'étudier les taux des folates, de l'homocystéine et des différents acides aminés dans le sang et le LCS des patients atteints de SLA. En effet, à notre connaissance, aucun auteur n'a étudié simultanément l'homocystéine, les folates et les acides aminés dans le sang et le LCS chez l'Homme dans la SLA. L'évaluation clinique et l'examen électromyographique compléteront ces analyses.

Nous faisons l'hypothèse qu'il existe une diminution de 5-MTHF dans le LCS des patients SLA, qui serait responsable d'une élévation de l'homocystéine et d'une diminution de sa reméthylation en méthionine.

L'objectif principal de ce travail sera donc d'analyser les différents métabolites intervenant dans le cycle du folate et de l'homocystéine dans le sang et le LCS chez des patients SLA au moment du diagnostic.

Les objectifs secondaires seront de déterminer les corrélations cliniques et électrophysiologiques potentielles en rapport avec les anomalies biologiques observées.

### III. MATERIELS ET METHODES

#### A. Schéma de l'étude

Il s'agit d'une étude pilote, épidémiologique, prospective, observationnelle, monocentrique conduite au CHU de Toulouse, incluant des patients atteints de SLA, au moment du diagnostic de leur affection.

La mise en œuvre d'une technique sensible d'analyse du 5-MTHF dans le LCS nécessitant l'établissement de normes, un groupe de témoins ne présentant pas de pathologie neurologique évolutive a été utilisé. Les échantillons des témoins ont également servi pour comparer les taux d'homocystéine et des acides aminés dans le LCS avec ceux des patients.

#### B. Population

##### 1. Nombre de sujets nécessaires

S'agissant d'une étude préliminaire, il est difficile de calculer le nombre de sujets nécessaires. Notre objectif était d'inclure entre 15 et 20 patients atteints de SLA et entre 8 et 15 témoins.

##### 2. Patients atteints de SLA

###### a. Recrutement

Les patients atteints de SLA ont été recrutés lors de leur première consultation au Centre de Référence de la SLA du CHU de Toulouse, au moment où le diagnostic a été formellement posé. Les inclusions ont eu lieu du mois d'avril au mois d'août 2014.

#### b. Critères d'inclusion

- Patients atteints de SLA, au moment du bilan diagnostique
- Diagnostic certain ou probable selon les critères d'Airlie House (1998)

#### c. Critères d'exclusion

- Age < 18 ans, >85 ans
- Patient sous curatelle ou tutelle
- Autre pathologie neurodégénérative
- Traitement ou pathologie connus pour interférer avec le métabolisme des folates :
  - Hypothyroïdie
  - Syndrome inflammatoire
  - Insuffisance rénale, Insuffisance hépatique
  - Diabète
  - Comorbidité vasculaire (artériopathie oblitérante des membres inférieurs, infarctus du myocarde récent, accident vasculaire cérébral récent (<3 mois))
  - Supplémentation vitaminique (B6, B9, B12)
  - Diurétiques, fibrates, statines, L-dopa, théophylline, phénytoïne, méthotrexate, azathioprine
    - Impossibilité d'obtenir un recueil de données prospectif

### 3. Témoins

#### a. Recrutement

Les témoins ont été recrutés dans l'ensemble des services de Neurologie du CHU de Toulouse (Hôpitaux de Rangueil et de Purpan). Les inclusions ont eu lieu du mois d'avril au mois d'août 2014.

### b. Critères d'inclusion

- Patients hospitalisés, pris en charge en neurologie, et bénéficiant d'une ponction lombaire pour un autre motif qu'une suspicion de SLA.

### c. Critères d'exclusion

- Age < 18 ans, >85 ans
- Patient sous curatelle ou tutelle
- Traitement ou pathologie connus pour interférer avec le métabolisme des folates
- Identification sur le bilan d'une pathologie neurologique
- Impossibilité d'obtenir un recueil de données prospectif.

## C. Evaluation clinique

L'évaluation clinique a été réalisée lors de l'hospitalisation pour la réalisation de la ponction lombaire. Celle-ci s'est divisée en deux parties.

Des données d'anamnèse ont tout d'abord été recueillies, permettant de renseigner les antécédents personnels et familiaux (avec la réalisation d'un arbre généalogique), les comorbidités, les traitements en cours et l'histoire de la maladie. L'ALSFRS (Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale : **ANNEXE 4**), a été remplie avec l'aide de chaque patient. Cette échelle apprécie l'atteinte bulbaire, l'atteinte fonctionnelle des membres et les fonctions ventilatoires. Elle comporte 12 items, chacun gradué de 4 (fonction normale) à 0 (incapacité à réaliser la fonction testée). Elle est donc un bon moyen d'évaluer la gravité de l'atteinte.

L'examen clinique permettait ensuite la recherche de critères cliniques de diagnostic de SLA par un examen neurologique complet : recherche d'un syndrome pyramidal, de fasciculations, d'une amyotrophie et d'une faiblesse musculaire en réalisant un testing musculaire complet selon l'échelle MRC (**ANNEXE 5**). L'évaluation de la spasticité était cotée selon l'échelle d'Ashworth (**ANNEXE 6**). Cet examen clinique était également l'occasion de rechercher des anomalies atypiques (troubles sensitifs, atteinte oculo-motrice, syndrome extra-pyramidal notamment) ainsi que des complications

de la maladie grâce à un examen général complet (infection pulmonaire et signes de phlébite par exemple).

L'atteinte bulbaire a été évaluée en réalisant le score de Norris bulbaire (**ANNEXE 7**). Elle comporte 13 items qui apprécient la mastication, la déglutition, la parole, la toux, la ventilation et le comportement émotionnel, avec une cotation allant de 0 (absence de fonction) à 3 (fonction normale) pour chaque élément.

L'atteinte cognitive a été dépistée par la réalisation d'une Batterie Rapide d'Efficiences Frontales (BREF) (**ANNEXE 8**), car un bilan neuropsychologique plus complet n'était pas réalisable dans le cadre de l'étude.

Le dépistage d'une atteinte pulmonaire était basé sur les données de l'interrogatoire, permettant notamment de réaliser une cotation sur l'échelle de Borg (**ANNEXE 9**), ainsi que l'examen clinique. En cas de suspicion d'un retentissement respiratoire de la maladie, le bilan pouvait être complété par une exploration fonctionnelle respiratoire plus poussée (spirométrie, pression inspiratoire maximale, SNIP test) voire une consultation pneumologique spécialisée.

## D. Bilan biologique sanguin

L'ensemble du bilan devait être réalisé lors de l'hospitalisation initiale, au moment de la ponction lombaire, selon les modalités habituelles transmises par chaque laboratoire du CHU de Toulouse. Exceptionnellement, en raison de difficultés de prélèvements, certaines prises de sang ont été effectuées quelques semaines après la ponction lombaire, lors de la venue des patients en hôpital de jour de Neurologie pour 6 patients.

L'ensemble du bilan sanguin a été réalisé chez tous les patients SLA inclus dans l'étude. Les témoins n'étaient pas concernés par cette partie du protocole.

### 1. Bilan standard

Il comprend un ionogramme sanguin, un bilan hépatique, un hémogramme, une créatininémie.

Le dépistage de pathologies interférant avec le métabolisme des folates a nécessité le dosage de l'hémoglobine glyquée et de la TSH.

La recherche de diagnostics différentiels a motivé la réalisation des sérologies VIH, hépatites B et C, syphilis et Lyme, ainsi qu'une immunoelectrophorèse des protéines plasmatiques.

Enfin, un bilan de dénutrition comprenant le dosage de l'albumine et la préalbumine a été réalisé.

## 2. Bilan dans le cadre de l'étude

### a. Vitamines B9 / Folates

Le dosage des vitamines B9 sériques a été réalisé après prélèvement sur sang périphérique sur tube sec par une technique de chimiluminescence (ROCHE – Analyseur Cobas 8000).

Le dosage des vitamines B9 érythrocytaires a été réalisé après prélèvement sur sang périphérique sur tube EDTA K3 par technique d'électrochimiluminescence (ROCHE – Analyseur Cobas 8000).

### b. Vitamines B12 / Cobalamine

Le dosage des vitamines B12 a été réalisé après prélèvement sur sang périphérique sur un tube sec, par une technique d'électrochimiluminescence (ROCHE – Analyseur Cobas 8000).

### c. Homocystéine

Le dosage de l'homocystéine a été réalisé après prélèvement sur sang périphérique sur un tube sec SST avec séparateur de sérum, après un transport dans la glace, selon une technique enzymatique (ROCHE- Cobas c).

### d. Chromatographie des acides aminés

La chromatographie des acides aminés a été réalisée après prélèvement sur sang périphérique, le matin, à jeun, sur un tube hépariné.

Le plasma des patients a été soumis à une étape de déprotéinisation en présence d'acide sulfosalicylique. Les concentrations des acides aminés plasmatiques ont été déterminées par chromatographie liquide échangeuse d'ions (Jeol JLC-500/V, JEOL, Tokyo, Japan). Après réaction avec

la ninhydrine, les acides aminés ont été détectés à 570nm et 440nm. L'analyse des données et les calculs de concentrations ont été réalisés à l'aide du logiciel Jeol Workstation version 3.45.

## E. Etude du liquide cérébro-spinal

### 1. Technique

Le liquide cérébro-spinal a été recueilli après protocole d'asepsie habituel par ponction lombaire aux espaces L3-L4 ou L4-L5.

### 2. Bilan standard

L'étude biochimique ainsi que l'analyse cytologique du LCS ont été réalisées au CHU de Toulouse. Dans le cadre du diagnostic différentiel, la réalisation d'une isoélectrofocalisation du LCS a été demandée.

### 3. Bilan dans le cadre de l'étude

#### a. Généralités

Les prélèvements ont été réalisés chez les patients atteints de SLA et les témoins inclus dans l'étude. Les tubes ont toujours été prélevés dans le même ordre afin que les résultats soient comparables d'un patient à l'autre.

L'ensemble des prélèvements a été plongé dans la glace immédiatement au lit du patient, puis traité immédiatement ou congelé dans les 15 minutes à  $-80^{\circ}$  si les analyses étaient réalisées ultérieurement.

Les analyses de l'homocystéine et du 5-MTHF dans le LCS ont été confiées au Laboratoire de Biochimie du Dr Jean-François Benoist à l'hôpital Robert Debré à Paris. Les prélèvements ont été stockés au congélateur à  $-80^{\circ}$  pendant quelques semaines, puis envoyés dans de la carboglace à Paris. Les envois puis les analyses ont été rassemblés en deux séries de prélèvements afin de réduire la variabilité inter-groupe.

### b. Chromatographie des acides aminés

La chromatographie a été réalisée avec une méthode HPLC par échange d'ions au CHU de Toulouse au fur et à mesure des inclusions des patients.

Elle a été réalisée selon la technique de chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse à l'Hôpital Robert Debré de Paris.

### c. 5-MTHF et homocystéine

Une technique de chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse a été réalisée pour ces deux dosages.

## F. Electroneuromyographie

L'électroneuromyographie a été effectuée pour chaque patient par le même examinateur, neurologue exerçant au sein du Centre de Référence de la SLA du CHU de Toulouse, sur une machine de type Natus®. Une étude systématique des conductions nerveuses motrices dans les territoires sciatiques poplités externes (SPE), sciatiques poplités internes (SPI), ulnaires et médians a été réalisée. L'étude des conductions sensitive intéressait les territoires musculo-cutanés, saphènes externe, ulnaires et médians. L'examen était bilatéral. Une étude en détection a complété l'exploration par une analyse de muscles d'innervation bulbaire, cervicale, thoracique et lombaire.

## G. Analyses statistiques

Une analyse descriptive de la population a été menée. Les variables qualitatives sont décrites par l'effectif des catégories et leur pourcentage. Les variables quantitatives sont décrites par leur moyenne et leur écart-type ou par leur médiane et l'intervalle interquartile.

Au vu de la petite taille de notre effectif, un test de Mann Whitney a été réalisé pour comparer les moyennes des taux de 5-MTHF, de l'homocystéine dans le sang et le LCS et des différents acides aminés dans le LCS.

Les corrélations ont été étudiées en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson.

Le risque de première espèce est fixé à 5 %.

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS®. Les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism®.

## H. Financement

L'Association de Neurologie a financé l'envoi des prélèvements à Paris.

Le laboratoire du Dr Jean-François Benoist a gracieusement offert les analyses réalisées à Paris.

Le reste du bilan biologique a été pris en charge par la Sécurité Sociale des patients puisqu'il rentrait dans le cadre du diagnostic différentiel de la SLA.

## I. Aspects légaux

L'étude a été validée par le Comité d'Ethique et de Recherche du CHU de Toulouse le 11 avril 2014 (numéro de projet 17-0214) (**ANNEXE 10**).

Une information écrite a été remise aux patients et aux témoins concernant les modalités de l'étude, et leur consentement a été recueilli par écrit avant le début des explorations (**ANNEXES 11, 12 et 13**).

## IV. RESULTATS

### A. Population

#### 1. Patients

Quatorze patients atteints de SLA (9 hommes, 5 femmes) ont été évalués au moment du diagnostic de leur pathologie et ont bénéficié d'un examen clinique, d'une électromyographie et d'analyses biologiques effectuées dans le sang et le LCS. Tous remplissaient les critères de SLA certaine ou probable selon Airlie House. Une patiente a dû être exclue de l'ensemble des analyses statistiques car elle suivait une supplémentation en folates depuis plusieurs semaines.

L'âge moyen des patients au moment du diagnostic est 65.6 ans ( $\pm 12.2$ ). La grande majorité des patients présente une forme de début spinal (77%). Une patiente a une forme de début bulbaire, et deux patients ont un tableau plus rare (atrophie musculaire spinale et forme « flail arm »).

Deux patients (15%) présentent très probablement une forme génétique puisque pour chacun, au moins un ascendant direct a développé une SLA. Une enquête génétique est donc en cours, dont les résultats ne sont pas encore connus.

Le délai entre le début des symptômes et l'affirmation du diagnostic de SLA est en moyenne de 11 mois ( $\pm 5$ ), ce qui est comparable à la littérature [Nzwalo et al. 2014 ; Paganoni et al. 2014].

Le score ALSFRS, reflétant la sévérité du tableau clinique et son impact dans la vie quotidienne, est en moyenne de 40 (sur 48 points possibles), avec des valeurs s'étendant entre 24 et 47. L'atteinte motrice est reflétée par la cotation MRC, cotée sur 220, qui s'élève en moyenne à 203, mais aussi par la moyenne des amplitudes motrices en ENMG, représentant la perte axonale, qui atteint en moyenne 5.3 mV. Le score de Norris bulbaire moyen est de 35 (sur 39 points), les valeurs s'étalant entre 25 et 39. Seuls 4 patients présentent une spasticité clinique, qui reste modérée sur l'échelle d'Ashworth (entre 1 et 2). 46% des patients présentent une atteinte respiratoire subjective. Celle-ci reste cependant discrète voire modérée selon l'échelle de Borg.

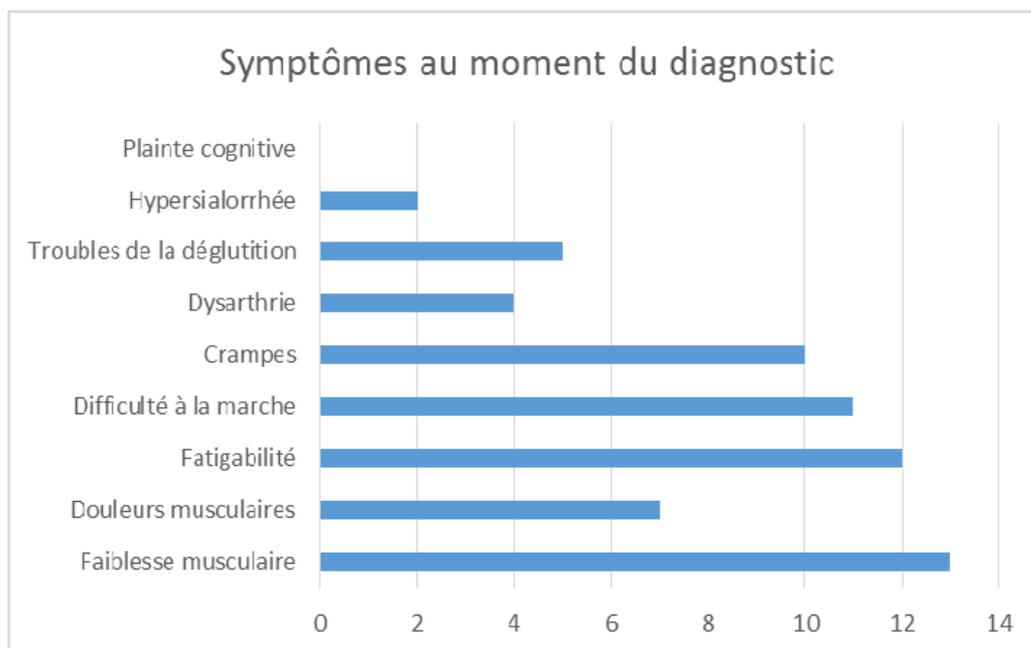
L'ensemble de ces données permet de confirmer que cet effectif est représentatif de la population SLA au moment du diagnostic : âge de début, délai entre le début des symptômes et le diagnostic, formes spinales prédominantes et stade clinique modéré.

L'ensemble de ces résultats est récapitulé dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1: Récapitulatif des caractéristiques démographiques des patients.**

Variables		Patients (n=13)
<b>Age moyen (années)</b>		65.6 ± 12.2
<b>Ratio hommes/femmes</b>		9/4
<b>Délai diagnostique moyen (mois)</b>		11 ± 5
<b>Antécédents familiaux de SLA</b>		2
<b>Forme clinique</b>	Début spinal	10 (77%)
	Début bulbaire	1 (8%)
	Atrophie musculaire spinale	1 (8%)
	Flail arm	1 (8%)
<b>Critères d'Airlie House</b>	SLA cliniquement certaine	6 (46%)
	SLA cliniquement probable	4 (31%)
	SLA cliniquement probable étayée par des examens paracliniques	3 (23%)
<b>Score ALSFRS moyen (sur 48)</b>		40 ± 6
<b>Score de Norris bulbaire moyen (sur 39)</b>		35 ± 5
<b>Score de BREF moyen (sur 18)</b>		14 ± 4
<b>Cotation MRC totale moyenne (sur 220)</b>		203 ± 17.6

Les symptômes présents au moment du diagnostic sont détaillés dans le graphique ci-dessous. Ils reflètent principalement l'atteinte musculaire, qui se manifeste principalement par une faiblesse et des douleurs musculaires, des crampes et des difficultés à la marche. La présence d'une atteinte bulbaire est moins fréquente (38%), se manifestant principalement par des troubles de la déglutition et une dysarthrie. On remarquera qu'aucun patient ne se plaint de troubles cognitifs, mais ceux-ci sont pourtant très probablement présents, puisque les scores de BREF s'étendent entre 4 et 18, avec une moyenne de 14 ( $\pm 4$ ).



## 2. Témoins

Six témoins ont pu être recrutés, dont l'âge moyen est de 31.8 ans ( $\pm 9$ ). Le motif de leur hospitalisation en neurologie et le diagnostic finalement retenu sont décrits dans le **Tableau 2**. Tous ont une imagerie cérébrale et une cytochimie du LCS normales.

**Tableau 2: Caractéristiques cliniques des témoins.**

Témoins	Age	Motif d'hospitalisation	Diagnostic
1	25	Troubles sensitifs	Symptomatologie d'origine fonctionnelle
2	35	Céphalées et vertiges	Symptomatologie d'origine fonctionnelle
3	42	Troubles sensitifs	Symptomatologie d'origine fonctionnelle
4	23	Troubles sensitifs	AIT ?
5	42	Céphalées et hémiparésie	Migraine avec aura
6	23	Céphalées et hémiparésie	Migraine avec aura

## B. Electroneuromyographie

L'ENMG met en évidence une perte axonale motrice chez 54% des patients, que nous avons modélisée par la moyenne des amplitudes motrices recueillies sur les nerfs médians, cubitiaux, SPE et SPI. Lorsque la moyenne était inférieure à la limite inférieure (4 mV), elle était considérée comme pathologique.

Les vitesses de conceptions sensitives et motrices sont normales chez tous les patients.

Nous avons considéré qu'il existait une neuropathie axonale chez tout patient présentant une diminution d'amplitude du potentiel sensitif des deux saphènes externes et/ou des deux musculo-cutanés inférieure à la limite inférieure de la normale (5  $\mu$ V pour le musculo-cutané, 8 $\mu$ V pour le saphène externe, correspondant à -2DS) : quatre patients présentent donc selon ces critères une neuropathie sensitive axonale associée d'intensité modérée.

L'ensemble des patients réunit bien les critères EMG de SLA certaine ou probable, associant des signes de dénervation aiguë et des fasciculations d'une part, et des signes de dénervation chronique d'autre part dans au moins deux territoires, comme le montre le **Tableau 3**.

**Tableau 3: Tableau récapitulatif des données ENMG des patients SLA.**

	Bulbaire			Cervical			Dorsal			Lombaire		
	Nombre de muscles examinés	Nb de muscles avec dénervation active	Nb de muscles avec dénervation chronique	Nombre de muscles examinés	Nb de muscles avec dénervation active	Nb de muscles avec dénervation chronique	Nombre de muscles examinés	Nb de muscles avec dénervation active	Nb de muscles avec dénervation chronique	Nombre de muscles examinés	Nb de muscles avec dénervation active	Nb de muscles avec dénervation chronique
<b>2</b>	1	0/1	1/1	2	2/2	2/2	1	0/1	1/1	2	fasciculations	2/2
<b>3</b>	1	0/1	1/1	2	1/2	2/2	1	0/1	1/1	2	fasciculations	2/2
<b>4</b>	1	0/1	1/1	2	1/2	2/2	1	0/1	1/1	2	2/2	2/2
<b>5</b>	1	1/1	1/1	2	2/2	2/2	1	1/1	1/1	2	2/2	2/2
<b>6</b>	1	1/1	1/1	2	2/2	2/2	1	1/1	1/1	2	2/2	2/2
<b>7</b>	1	0/1	1/1	2	2/2	2/2	1	1/1	1/1	2	2/2	2/2
<b>8</b>	1	1/1	1/1	5	5/5	5/5	1	1/1	1/1	2	2/2	2/2
<b>9</b>	1	0/1	1/1	3	1/3	3/3	1	0/1	0/1	2	2/2	2/2
<b>10</b>	1	1/1	1/1	2	2/2	2/2	1	1/1	1/1	2	2/2	2/2
<b>11</b>	1	1/1	1/1	1	1/1	1/1	1	1/1	1/1	1	1/1	1/1
<b>12</b>	1	fasciculations	1/1	2	fasciculations	2/2	1	fasciculations	1/1	2	fasciculations	2/2
<b>13</b>	1	fasciculations	1/1	2	fasciculations	2/2	1	fasciculations	1/1	2	fasciculations	2/2
<b>14</b>	1	1/1	1/1	2	2/2	2/2	1	1/1	1/1	2	2/2	2/2
<b>Moyennes</b>	<b>1</b>	<b>6 /13</b>	<b>13 /13</b>	<b>2</b>	<b>21/29</b>	<b>29/29</b>	<b>1</b>	<b>7 /13</b>	<b>12/13</b>	<b>2</b>	<b>17/25</b>	<b>25/25</b>

## C. Biologie

### 1. Analyses standards

Le bilan biologique standard est normal pour l'ensemble des patients. Il n'y a notamment pas de syndrome inflammatoire, ni de perturbations du bilan hépatique ou de la fonction rénale qui pourraient gêner l'interprétation du dosage de l'homocystéine. De même, aucun patient ne présente d'hypothyroïdie ni de diabète déséquilibré après réalisation de la TSH et de l'hémoglobine glyquée.

Les dosages de l'albumine et de la préalbumine sont normaux chez tous les patients, ainsi que l'indice de masse corporelle. Aucun patient ne présente donc un état de dénutrition pouvant expliquer d'éventuelles carences, même si certains ont perdu du poids dans les mois précédant le diagnostic.

En ce qui concerne les diagnostics différentiels, les sérologies syphilitiques et des borrélioses sont négatives, sauf pour 2 patients dont les résultats témoignent d'une infection ancienne guérie. L'ensemble des sérologies pour le VIH sont négatives.

Seule une ponction lombaire a été traumatique, mais les tubes destinés aux chromatographies des acides aminés et à l'analyse du 5-MTHF ont été prélevés en dernier. Quatre patients ont une protéinorrachie modérément élevée de manière isolée, inférieure à 0.70 g/l, compatible avec le diagnostic. De même, l'indice de barrière est élevé chez six patients.

### 2. Dosages plasmatiques dans le cadre de l'étude

L'ensemble des dosages sanguins n'a été réalisé uniquement chez les patients. Pour 7 patients, certains prélèvements n'ont pu être réalisés au moment de l'inclusion pour des problèmes organisationnels : les prises de sang ont donc été réalisées lors d'une hospitalisation en hôpital de jour dans les deux à trois mois qui ont suivi l'inclusion. Pour deux patients, le dosage des vitamines B9 érythrocytaires n'a pu être effectué en raison de difficultés techniques. Pour deux patients, les données concernant la chromatographie des acides aminés dans le sang sont malheureusement manquantes.

Les médianes des vitamines B9 sériques et globulaires ainsi que de la vitamine B12 sont dans les normes, de même que leurs intervalles interquartiles respectifs (**Tableau 4**). Seul un patient présente une carence en folates, à la fois sur le dosage sérique et érythrocytaire, sans carence en vitamine B12 associée. Un patient présente une carence en B12 isolée, et deux patients sont au-delà de la norme pour ce dosage.

Cinq patients présentent une hyperhomocystéinémie (supérieure à 15  $\mu\text{mol/L}$ ) (**Figure 5**). La médiane et la moyenne restent dans les normes du laboratoire, mais sont proches de la limite supérieure de la normale, l'étalement des valeurs est donc centré par la valeur extrême supérieure de la norme, confirmant la tendance à une augmentation de l'homocystéine plasmatique retrouvée dans la littérature chez les patients SLA La médiane de notre groupe de patients, qui s'élève à 13.2  $\mu\text{mol/L}$ , est comparable aux médianes relevées dans l'étude de Zoccoella (11.2  $\mu\text{mol/L}$ ) et dans celle de Valentino (12.4  $\mu\text{mol/L}$ ) alors qu'elles avaient de plus gros effectifs (respectivement 62 et 65 patients).

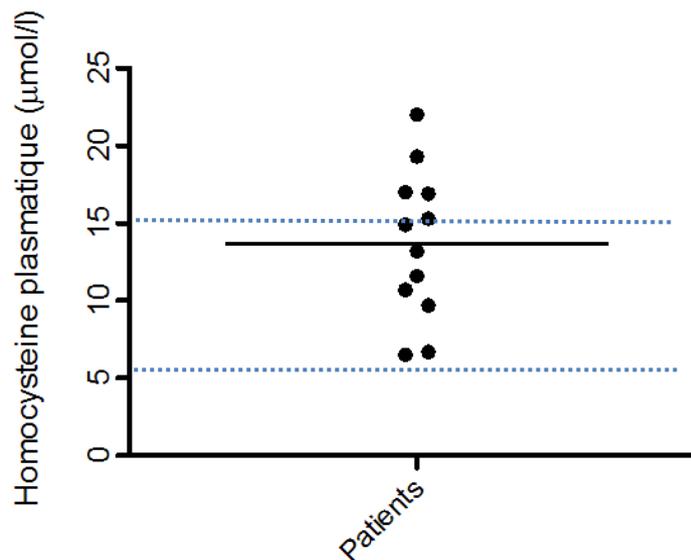


Figure 5: Concentrations de l'homocystéine dans le sang des patients.

La barre horizontale matérialise la moyenne des valeurs (13,6  $\mu\text{mol/L}$ ). Les valeurs normales du laboratoire s'étendent entre 5 et 15  $\mu\text{mol/L}$ .

**Tableau 4: Résultats des dosages plasmatiques concernant les vitamines B9 sériques et érythrocytaires, les vitamines B12 et l'homocystéine chez 13 patients SLA.**

	Médianes	Moyennes	Intervalles interquartiles	Normes du laboratoire
Vitamines B9 sériques (en ng/mL)	7.66	7.71	6.08-8.97	>5.38
Vitamines B9 globulaires (en ng/mL)	693	728	627-848	523-1257
Vitamines B12 (en ng/L)	405	476	365-580	191-663
Homocystéine plasmatique (en $\mu\text{mol/L}$ )	13.2	13.6	10.7-16.9	<15

La chromatographie des acides aminés dans le sang semble montrer un profil particulier, avec une élévation de la glutamine. Il existe également une discrète élévation de la lysine et de la 3-méthyl-histidine dans une moindre mesure. En revanche, la méthionine reste tout-à-fait dans les normes, il ne semble n'y avoir d'ailleurs aucune tendance particulière (ni élévation, ni diminution). Les dosages de la glycine et la sérine, impliquées dans le cycle des folates, restent eux-aussi parfaitement normaux. (Tableau 5)

**Tableau 5 : Résultats de la chromatographie des acides aminés dans le sang chez 13 patients SLA pour la méthionine, la sérine, la glycine, la glutamine, la lysine et la 3-méthyl-histidine.**

	Médianes	Moyennes	Intervalles interquartiles	Normes du laboratoire
Méthionine (en $\mu\text{mol/L}$ )	24	26	22-26	17-36
Sérine (en $\mu\text{mol/L}$ )	114	123	111-141	80-153
Glycine (en $\mu\text{mol/L}$ )	252	259	242-279	160-323
Glutamine (en $\mu\text{mol/L}$ )	<b>671</b>	<b>693</b>	639-801	350-580
Lysine (en $\mu\text{mol/L}$ )	<b>234</b>	<b>237</b>	201-258	138-227
3-méthyl-Histidine (en $\mu\text{mol/L}$ )	<b>12</b>	<b>14</b>	9-21	0-7

### 3. Dosages dans le LCS dans le cadre de l'étude

L'ensemble des dosages a été effectué pour les patients et les témoins, une analyse comparative a donc pu être menée. En raison de problèmes techniques, le 5-MTHF dans le LCS n'a pu être rendu que pour 11 des 13 patients.

Nous observons une nette tendance à la baisse du 5-MTHF dans le LCS chez les patients, qui n'est cependant pas significative ( $p=0.149$ ) (**Figure 6**). Un témoin semble avoir un profil particulier se détachant du reste de la population des témoins, avec un taux de 5-MTHF très bas. Ce résultat diminue ainsi la différence observée entre nos deux groupes et donc la significativité de nos résultats. L'analyse détaillée du dossier de patient révèle que le diagnostic final retenu est celui d'une migraine avec aura. Un test de Fisher a été réalisé afin de comparer le taux de patients ayant un dosage inférieur à la norme inférieure de 5-MTHF chez les SLA et chez les contrôles, mais il ne met pas non plus en évidence de différence significative entre ces deux groupes ( $p=0.30$ ).

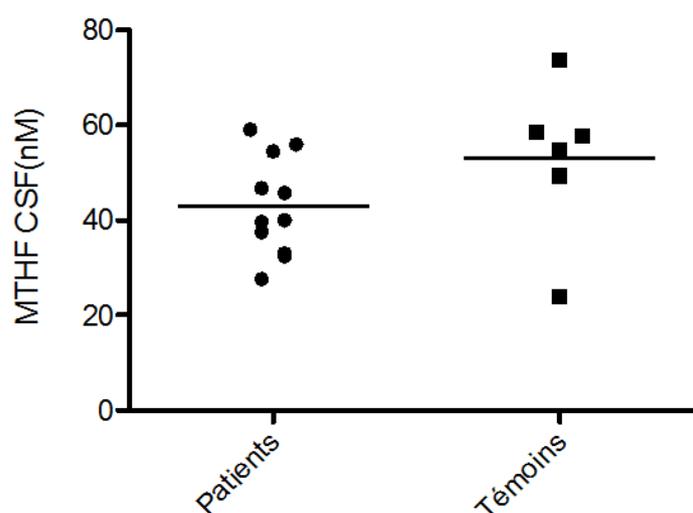
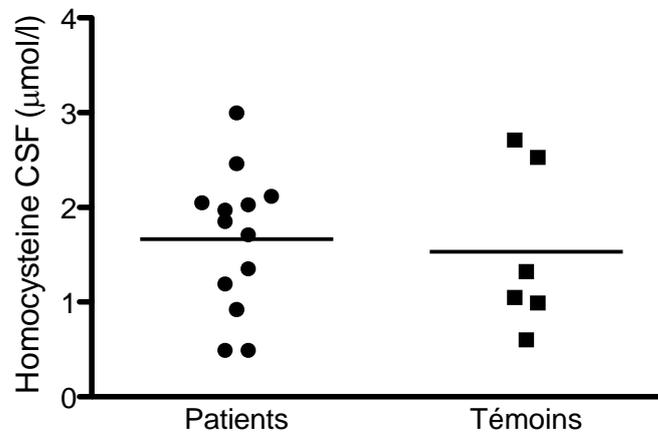


Figure 6: Concentrations de 5-MTHF dans le LCS des patients des témoins.

La barre horizontale matérialise la moyenne des valeurs dans chaque groupe.  $p=0.149$  (Test de Mann-Whitney)

En revanche, aucune différence significative n'est observée concernant le taux d'homocystéine dans le LCS entre les patients et les témoins ( $p= 0.693$ ) (**Figure 7**).



**Figure 7: Concentrations de l'homocystéine dans le LCS des patients SLA et des témoins.**

La barre horizontale montre la moyenne des valeurs dans chaque groupe.  $p=0.69$  (test de Mann-Whitney)

En ce qui concerne les acides aminés dans le LCS, nous n'observons aucune différence significative quel que soit le métabolite testé, en dehors de la glycine qui est significativement plus élevée chez les témoins ( $p= 0.026$ ). Cependant, cette différence est attribuable aux témoins : pour 3 d'entre eux, les dosages dépassent très nettement la norme, les patients SLA ayant des valeurs qui restent parfaitement dans la fourchette édictée par le laboratoire.

Nous observons une tendance à la baisse de la sérine ( $p=0.103$ ) et à l'augmentation de la phénylalanine ( $p=0.143$ ). Nous notons qu'aucune différence n'est observée pour le dosage de la méthionine ( $p=0.25$ ).

#### 4. Corrélations

Comme cela est attendu, le taux sérique de vitamine B9 est corrélé au taux érythrocytaire de B9 et au 5-MTHF dans le LCS (respectivement  $r=0.6$ ,  $p=0.049$  ;  $r=0.7$ ,  $p=0.016$ ). Il semble également lié au dosage en vitamine B12 ( $r=0.55$ ,  $p=0.052$ ) et être inversement relié à l'homocystéinémie ( $r= -0.55$ ,  $p=0.051$ ), mais les résultats ne sont pas statistiquement significatifs, probablement du fait de la petite taille de notre population.

Les taux de 5-MTHF dans le LCS et de vitamine B9 érythrocytaire ou de vitamine B12 dans le sang ne paraissent pas reliés (respectivement  $p=0.23$  et  $p=0.21$ ). En revanche, il semble qu'il existe une corrélation négative entre le 5-MTHF et l'homocystéine plasmatique bien que non significative ( $r=-0.46$ ,  $p=0.15$ ), mais qu'il n'existe aucun lien avec l'homocystéine dans le LCS ( $p=0.49$ ), ce qui pourtant était attendu [Smith et al. 2012]. L'homocystéine plasmatique et l'homocystéine dans le LCS ne sont d'ailleurs pas corrélées ( $p=0.56$ ), mais ceci était déjà le cas dans l'étude de Valentino. Il n'y a pas non plus de corrélation entre le 5-MTHF et la méthionine, que ce soit dans le sang ou le LCS (respectivement  $p=0.21$  et  $p=0.77$ ).

Les taux de 5-MTHF ne sont pas corrélés à l'âge des patients ( $p=0.31$ ) ni au sexe ( $p=0.50$ ) ou à la gravité clinique, reflétée d'une part par le score ALSFRS ( $p=0.62$ ) et d'autre part par la moyenne des amplitudes motrices qui représente la perte axonale ( $p=0.25$ ). La présence d'une neuropathie axonale n'est pas reliée à un taux bas de 5-MTHF ( $p=1$ ).

Il semble en revanche exister une relation positive bien que non statistiquement significative entre le 5-MTHF et l'atteinte cognitive, reflétée par le score de BREF ( $r=0.5$ ,  $p=0.11$ ). L'atteinte cognitive est par ailleurs nettement corrélée à l'homocystéine dans le LCS ( $r=0.75$ ,  $p=0.003$ ): plus la BREF est basse (et donc plus l'atteinte cognitive est sévère), plus l'homocystéine est basse dans le LCS (**Figure 8**). En revanche, il ne semble y avoir aucun lien entre l'homocystéinémie et l'atteinte cognitive ( $p=0.56$ ).

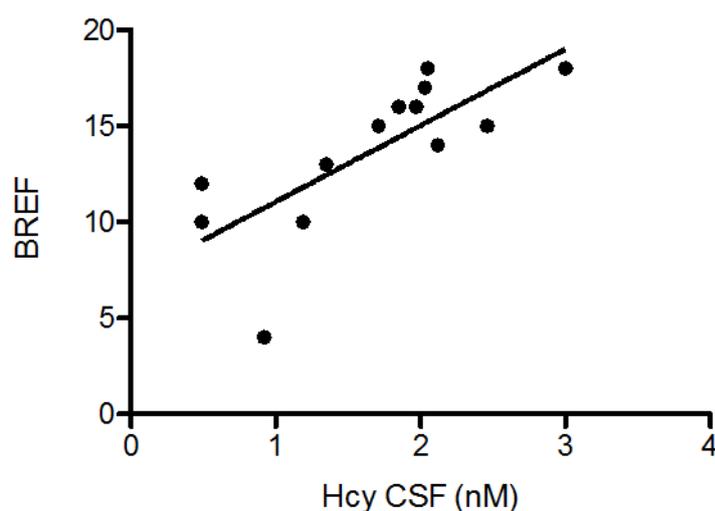
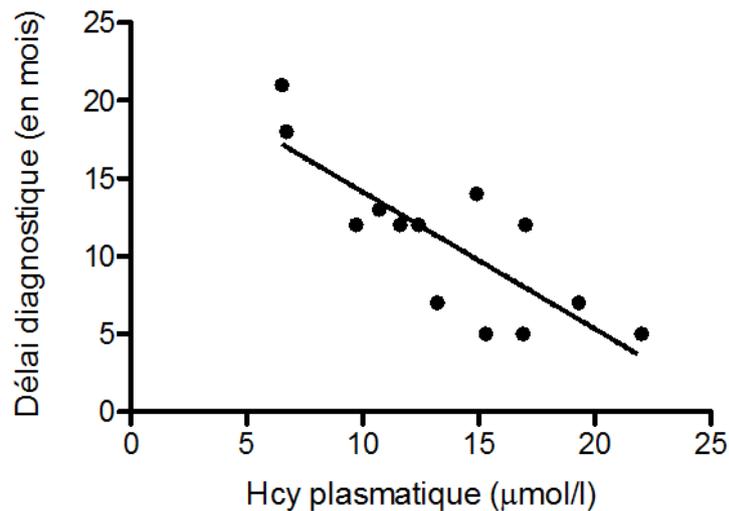


Figure 8: Corrélation entre l'Homocystéine dans le LCS et la BREF.  $r=0.75$ ,  $p=0.003$

Le délai entre le début des symptômes et le diagnostic est corrélé négativement à l'homocystéinémie ( $r = -0.8$ ,  $p = 0.0008$ ) (**Figure 9**), et il semble exister une tendance positive entre le délai diagnostique et le 5-MTHF ( $r = 0.47$ ,  $p = 0.14$ ) bien que non statistiquement significative. L'inclusion dans notre étude se faisant au moment du diagnostic, le délai diagnostique et la durée de la maladie sont identiques et nous ne pouvons donc pas savoir actuellement si cette corrélation est attribuable à l'un ou l'autre.



**Figure 9: Corrélation négative entre l'homocystéine plasmatique et le délai diagnostique.  $r = -0.8$ ;  $p = 0.0008$**

Le taux de glutamine dans le sang, que nous avons noté élevé chez la plupart de nos patients (9/11), n'est pas corrélé à celui du 5-MTHF ( $p = 0.43$ ), ni à l'homocystéine dans le sang ( $p = 0.25$ ) ou dans le LCS ( $p = 0.52$ ). Il n'est pas non plus corrélé au score ALSFRS ( $p = 0.34$ ), à l'atteinte cognitive ( $p = 0.2$ ) ni au délai diagnostique ( $p = 0.32$ ).

## V. DISCUSSION

### A. Objectif principal

#### 1. Données générales

Notre étude montre que le 5-MTHF dans le LCS a tendance à être abaissé dans la SLA, sans élévation de l'homocystéine dans le LCS ni modification des taux de méthionine dans le sang ou le LCS. On ne constate pas d'hyperhomocystéinémie, mais il existe une tendance à l'augmentation de l'homocystéine dans le sang comparable à celle observée dans la littérature.

Ces résultats ne sont donc pas parfaitement en adéquation avec l'hypothèse que nous avons formulée au début de ce travail.

#### 2. Cohérence avec la littérature

L'homocystéinémie moyenne du groupe de patients atteints de SLA est normale, bien qu'un tiers de patients présente une élévation de l'homocystéine. Le design de notre étude ne nous permettait pas de comparer ces taux à ceux de témoins « sains ». Il est cependant intéressant de constater que les valeurs observées pour l'homocystéinémie de nos patients sont semblables à celles observées dans les 2 études précédentes [Zoccolella et al. 2008, Valentino et al. 2010]. En effet, dans ces deux études une élévation de l'homocystéine chez les patients avait été observée en comparaison aux témoins, mais les valeurs moyennes restaient dans les normes : il n'existait donc pas d'hyperhomocystéinémie au sens propre. Ces anomalies restaient cependant intéressantes à noter car, comme nous l'avons vu plus haut, l'homocystéine induit in vitro une cytotoxicité significative, sur des motoneurones mutés pour SOD1, même pour une concentration physiologique (10  $\mu\text{mol/l}$ ) [Sung et al. 2003]. Ainsi, bien que notre étude ait un petit effectif et qu'aucune comparaison ne soit possible par rapport au groupe témoin, il n'en demeure pas moins que nos résultats sont cohérents avec ceux observés dans la littérature.

Il s'avère également que nous tendons à reproduire chez l'Homme les résultats obtenus par Zhang et son équipe sur un modèle animal de souris mutées SOD1 [Zhang et al. 2010]. Cette étude avait mis en évidence une diminution de 5-MTHF dès les stades précoces et asymptomatiques dans le plasma, la moelle épinière et le cortex. L'homocystéine plasmatique en revanche n'était

augmentée qu'aux stades symptomatiques et terminaux, au moment où la perte en motoneurones était vraiment significative. Cette baisse de 5-MTHF semble donc précéder l'atteinte des motoneurones et l'augmentation de l'homocystéinémie, suggérant que l'hyperhomocystéinémie tardive serait la conséquence d'un déficit en 5-MTHF présent dès le stade précoce. Dans notre étude, les patients ont été inclus au moment du diagnostic, donc en début de phase symptomatique: ils présentent donc une tendance à la baisse du 5-MTHF et à l'élévation de l'homocystéine plasmatique. Par ailleurs, l'homocystéine dans le LCS n'avait pas été dosée chez la souris, et par conséquent, l'absence de modification de l'homocystéine dans le LCS dans notre étude est difficilement interprétable.

### 3. Absence de diminution de la méthionine

L'absence de diminution de la méthionine est nette dans notre étude, que ce soit dans le sang ou dans le LCS. En l'absence d'étude ayant étudié ce métabolite précisément dans la SLA, il est difficile d'expliquer avec rigueur ce résultat. Nous pouvons néanmoins imaginer que cette diminution de la méthionine apparaît plus tardivement dans la maladie car elle est au bout de la voie métabolique de la reméthylation. Ainsi, il faut probablement que la carence en 5-MTHF soit plus marquée pour que la répercussion sur la méthionine soit nette, et ce d'autant plus que la méthionine est également apportée par l'alimentation, un phénomène de compensation par l'alimentation n'est donc pas exclu.

### 4. Limites

Notre observation d'une tendance à la diminution du 5-MTHF chez les patients en comparaison aux témoins doit être pondérée par le fait que les patients et les témoins n'ont pas le même âge : les témoins ont en moyenne 35 ans et les patient 66 ans. Or, nous savons que le 5-MTHF varie en fonction de l'âge [Smith et al. 2012]. Ce résultat mérite donc d'être confirmé dans une étude où patients et témoins seraient appariés pour l'âge. Nous noterons toutefois que dans notre étude, les taux de 5-MTHF ne sont pas corrélés à l'âge chez les patients.

D'autre part, deux témoins sont migraineux et des relations entre migraine et homocystéine ont pu être décrites. Une revue récente de la littérature semble montrer que le lien entre migraine et homocystéine plasmatique est très faible [Lippi et al. 2014]. En revanche, ce lien semble puissant

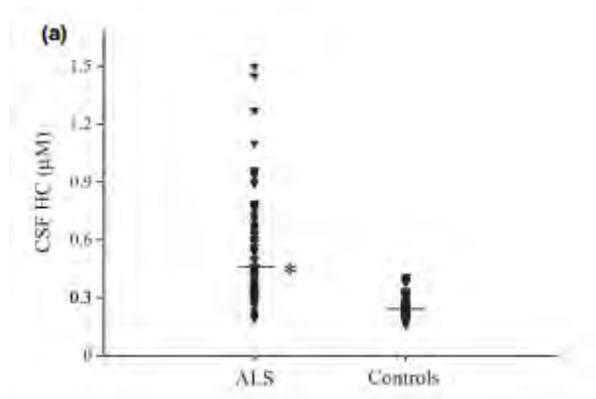
avec l'homocystéine dans le LCS [Isobe et al. 2010]. Un de ces deux témoins présente d'ailleurs les valeurs extrêmes des témoins pour certains dosages : le taux d'homocystéine dans le LCS est le plus élevé observé pour les témoins (2.73  $\mu\text{mol/l}$ ) alors que le 5-MTHF est le plus bas des témoins (23.95 nmol/l). La comparaison de nos patients avec ces témoins migraineux pourrait ainsi être biaisée.

## B. Objectifs secondaires

### 1. Homocystéine : reflet de l'agressivité de la maladie ?

Dans l'étude italienne [Zoccollella et al. 2008], seule l'homocystéine dans le sang avait été dosée. Il existait une élévation de l'homocystéine significative, qui n'était pas influencée par la durée de la maladie, mais était inversement corrélée au délai diagnostique. Les auteurs avaient donc fait l'hypothèse que l'élévation de l'homocystéine pouvait être associée à des formes de SLA plus agressives car évoluant plus rapidement, expliquant donc que le délai entre le début des symptômes et le diagnostic soit plus court dans ces formes. Dans notre étude, il existe une corrélation négative entre l'homocystéinémie et le délai entre le début des symptômes et le diagnostic. Cependant, comme nous l'avons précisé plus haut, on ne peut conclure quant à ce critère, car durée d'évolution de la maladie et délai diagnostique sont confondus chez nous, l'inclusion des malades se faisant au moment du diagnostic.

Dans l'autre étude analysant l'homocystéine plasmatique, l'homocystéine dans le LCS et la SLA [Valentino et al. 2010], les liens entre durée de la maladie, délai diagnostique et taux d'homocystéine n'ont pas été étudiés. On notait cependant une grande dispersion des résultats de l'homocystéine dans le LCS chez les patients, pour lesquels un grand nombre se recoupaient avec ceux des témoins (**Figure 10**). Aucune corrélation avec un pattern particulier de patients n'a pu être mise en évidence par les auteurs, en dehors d'un lien faible, non statistiquement significatif ( $p=0.11$ ), avec ceux présentant une progression rapide de leur maladie. Ce lien semblait exister également avec l'homocystéine dans le sang, mais n'était pas non plus significatif ( $p=0.14$ )



**Figure 10: Résultats de l'homocystéine dans le LCS dans l'étude de Valentino et al (2010), p <0.001**

Ainsi, l'élévation de l'homocystéine dans le sang et le LCS pourrait donc être le reflet de l'agressivité de la maladie, les patients ayant une élévation de l'homocystéine dans le sang et le LCS étant plus susceptibles de présenter une forme évoluant rapidement. Cette hypothèse n'est pas vérifiée à l'heure actuelle, puisque nous n'avons pas de notion du suivi évolutif de ces patients présentant une élévation de l'homocystéine.

Cette corrélation entre l'homocystéine plasmatique et le délai diagnostique peut également être interprétée d'une autre manière : l'homocystéinémie pourrait ainsi n'être élevée qu'à la phase initiale de la maladie et aurait tendance à décroître au cours de l'évolution. Néanmoins, nous l'avons vu plus haut, cette hypothèse ne concorde ni avec les résultats antérieurs constatés chez l'homme, ni avec ceux obtenus chez l'animal.

Le suivi clinique de nos malades permettra à distance de savoir si l'association statistiquement significative retrouvée dans notre étude entre le délai diagnostique et l'homocystéinémie est effectivement attribuable à la rapidité de progression de la maladie. Quoi qu'il en soit, l'homocystéinémie n'est pas reliée dans notre étude à la sévérité clinique au moment du diagnostic, puisqu'elle n'est pas corrélée à l'ALSFRS.

## 2. Homocystéine et atteinte cognitive

La gravité de la maladie, modélisée par le score ALSFRS et la perte axonale motrice à l'EMG semble indépendante du 5-MTHF et de l'homocystéine.

En revanche, l'atteinte cognitive est clairement reliée à l'homocystéine dans le LCS et notre étude montre également une tendance à la baisse du 5-MTHF chez les patients ayant un score bas à la BREF. Or, nous l'avons vu précédemment, l'élévation de l'homocystéinémie dans le LCS semble un facteur commun à plusieurs pathologies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et maladie de Parkinson) [Isobe et al. 2005]. Cette élévation n'est pourtant pas évidente dans le LCS des patients atteints de SLA. Il existe même une corrélation inverse intéressante entre les troubles cognitifs dans la SLA et l'homocystéine. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les formes de SLA sans démence et les formes associées à une atteinte cognitive frontale sont sous-tendues par des mécanismes physiopathologiques différents. Ainsi, les patients sans troubles cognitifs auraient des taux d'homocystéine plus élevés, se rapprochant des pathologies précédemment citées (maladies d'Alzheimer et de Parkinson), alors que l'homocystéine resterait basse chez les patients déficitaires sur le plan cognitif, reflétant la mise en jeu d'autres processus dans la physiopathologie de ces formes frontales. L'implication de l'homocystéine et de son métabolisme reste cependant à éclairer : l'homocystéine intervient-elle dans un processus initial de neurodégénérescence commun à l'ensemble de ces pathologies avant que d'autres facteurs plus spécifiques de chaque maladie n'interviennent, ou au contraire est-ce la conséquence de la neurodégénérescence, qui conduirait à une sorte de voie finale commune ? Ces constatations méritent d'être affinées par une étude exhaustive de la cognition grâce à un bilan neuropsychologique complet. Néanmoins, notre étude soulève la question de l'intérêt du dosage de l'homocystéine dans le LCS comme caractère discriminant d'une détérioration cognitive frontale.

### C. Intérêt de la supplémentation en folates ?

La mise en évidence de cette baisse des folates dans le système nerveux central nous fait nécessairement réfléchir à l'indication de la supplémentation périphérique en folates, comme cela a pu être essayé dans la maladie d'Alzheimer notamment [Durga et al. 2007].

Il est dans ce sens extrêmement intéressant de reprendre l'ensemble des résultats de la patiente que nous avons exclue initialement car elle suivait un traitement par acide folinique depuis plusieurs mois dans le cadre d'une leucémie lymphoïde chronique. En effet, le taux sérique de vitamines B9 reste bien dans la norme chez cette patiente (8.63 ng/mL), mais le taux érythrocytaire de B9 est bien plus élevé que chez les autres patients, bien que dans la norme (1039 ng/ml). Nous observons surtout pour cette patiente le taux le plus élevé de 5-MTHF parmi nos patients (61.65 nmol/l), confirmant l'efficacité de cette supplémentation périphérique sur les folates au niveau du

SNC. L'homocystéine est dans la norme, mais avec une valeur inférieure à la médiane et à la moyenne (11.4  $\mu\text{mol/l}$ ) de notre effectif, donc plutôt basse par rapport aux autres patients. Il peut bien entendu s'agir d'une coïncidence, mais nous notons que cette patiente présente une forme peu sévère (score ALSFRS = 43) et surtout un délai entre le début des symptômes et le diagnostic plutôt long (16 mois, contre 11 mois en moyenne dans notre étude). Ceci va dans le sens des constatations que nous avons faites plus haut où l'homocystéinémie semblait corrélée inversement au délai diagnostique.

Cela fait écho à l'étude de Zhang chez l'animal [Zhang et al. 2008], au cours de laquelle une supplémentation en acide folique et en vitamine B12 avait été entreprise dans le but d'obtenir une diminution de l'homocystéine. Cette étude avait montré que la supplémentation en acide folique, seul ou en association à la vitamine B12, diminuait l'apoptose des motoneurones. Elle induisait une diminution significative de l'homocystéinémie et retardait l'apparition de la maladie, prolongeant la survie des souris traitées. Ces résultats suggèrent donc qu'une diminution de l'homocystéine par supplémentation en folates permet de ralentir la progression de la maladie, fournissant ainsi une forme de neuroprotection.

Bien entendu, ces résultats doivent être interprétés avec précaution puisqu'ils ont été obtenus sur un modèle animal, mais l'étude de notre cas montre de manière intéressante que les effets métaboliques de cette supplémentation sont semblables chez l'Homme. Seule une étude bien conduite, contre placebo, randomisée en double aveugle, pourra le confirmer et surtout permettra d'analyser l'effet de cette supplémentation sur l'évolution de la maladie et du taux d'homocystéine.

## D. Elévation de la glutamine

L'analyse de l'ensemble des acides aminés dans le sang met en évidence une élévation de la glutamine. Celle-ci n'est pas corrélée à la prise de riluzole, un anti-glutamatergique que certains patients avaient débuté avant leur entrée dans l'étude ( $p = 0.33$ ). Cette élévation de la glutamine dans le sang a déjà été observée dans plusieurs études [Perry et al. 1990 ; Ilzecka et al. 2003], mais n'a pas été mise en évidence dans d'autres [Cecchi et al. 2014]. A l'inverse, une étude a montré une diminution de la glutamine dans la SLA [Kumar et al. 2010]. Plusieurs études se sont intéressées au profil d'acides aminés dans le sang et/ou le LCS dans la SLA. Aucun profil n'est semblable d'une étude à l'autre, il est donc bien difficile d'interpréter les anomalies constatées dans notre étude.

La glutamine est un acide aminé impliqué dans le métabolisme azoté, c'est un précurseur du glutamate et de l'ammoniac. Dans notre étude, le glutamate n'est pas augmenté ni diminué, que ce soit dans le sang ou le LCS. Nous n'avons pas d'explication à cette élévation isolée de la glutamine, qui n'intervient pas dans le métabolisme des folates et de l'homocystéine. Elle pourrait cependant être le reflet d'une autre voie métabolique impliquée dans la SLA.

## E. Limites et points forts

Notre étude, du fait de son caractère exploratoire, a de nombreuses limites, et en premier lieu la petite taille de son effectif. Celui-ci ne nous permet pas d'obtenir des résultats très significatifs. Cependant, il est intéressant de constater que les tendances observées dans notre étude reproduisent les résultats d'autres études obtenus avec des populations plus importantes.

L'absence de dosages plasmatiques chez les témoins est également une limite importante à l'interprétation des résultats. En effet, nous ne pouvons comparer les dosages plasmatiques de nos patients SLA qu'à la norme établie par le laboratoire, mais surtout, il est difficile d'interpréter les résultats des dosages dans le LCS des témoins sans les résultats plasmatiques (et notamment pour le 5-MTHF).

Le recrutement des témoins a d'ailleurs été notre principale difficulté car nous voulions des patients n'ayant pas de pathologie neurologique évolutive connue ou suspecte d'être liée à des troubles du métabolisme des folates ou de l'homocystéine. Les ponctions lombaires réalisées pour le bilan de troubles cognitifs, de pathologies inflammatoires, infectieuses ou d'AVC, qui représentent l'essentiel des indications en neurologie, étaient donc exclues. De même, nous avons décidé de ne pas utiliser le LCS provenant de l'évacuation d'hydrocéphalie à pression normale, car il semble exister également chez ces patients des perturbations du métabolisme de l'homocystéine [Sosvorova et al. 2014]. L'appariement des témoins pour l'âge n'était donc pas envisageable. Dans l'étude de Valentino, certains témoins avaient bénéficié d'une ponction lombaire pour le bilan de neuropathies (notamment de maladies de Charcot-Marie-Tooth), et de myélopathies cervicarthrosiques, qui ne sont pas des indications de ponction lombaire en France.

D'autre part, le 5-MTHF est un composé très fragile qui nécessite un conditionnement à -80° dans les 15 minutes après son prélèvement pour que son analyse soit fiable. Ces conditions de prélèvement ont rendu impossible l'inclusion de témoins en dehors des heures ouvrables.

Malheureusement, en raison de difficultés organisationnelles, quelques prélèvements n'ont pu être réalisés initialement, mais la plupart ont pu être organisés dans les semaines suivant l'inclusion, nous laissant peu de données manquantes.

La qualité principale de notre étude est le recueil prospectif des données, réalisé au moment du diagnostic et donc au début de la maladie chez tous les patients. Ce mode de recueil nous a permis d'avoir une évaluation clinique complète et une électromyographie comparable d'un patient à l'autre.

## F. Récapitulatif

Malgré la petite taille de notre population de patients et la faible puissance de notre analyse, nos résultats sont globalement cohérents avec l'ensemble des études publiées sur l'implication de l'homocystéine et des folates dans la SLA.

Ainsi, nous retrouvons des taux plasmatiques d'homocystéine plutôt élevés, bien que dans la norme, compatibles avec ceux publiés par d'autres auteurs. Nous mettons en évidence pour la première fois chez l'Homme une tendance à la baisse du 5-MTHF dans le LCS, cohérente avec les constatations faites chez l'animal. En revanche, nos résultats ne montrent pas d'élévation de l'homocystéine dans le LCS, à l'inverse de ce qui avait pu être montré récemment chez l'Homme.

L'absence d'élévation de l'homocystéine dans le LCS chez nos patients est probablement liée à la précocité du dosage dans la maladie. Cette élévation constatée dans d'autres études est en effet probablement liée à un phénomène tardif. De même, l'hypothèse que nous avons formulée initialement d'une diminution de la méthionine, malgré une tendance à la diminution du 5-MTHF, n'est pas vérifiée. Elle peut s'expliquer par des phénomènes de compensation liés à l'alimentation.

Notre étude permet d'écarter une perturbation majeure de la voie de la reméthylation. Elle pointe par contre un rôle probablement important du 5-MTHF dès les stades précoces. L'origine de cette baisse reste indéterminée mais soulève malgré tout l'intérêt d'une supplémentation en folates. L'équipe de Zhang a émis l'hypothèse que les mutations ou les modifications de l'activité de la SOD1 affectent l'activité de la MTHFR, ce qui expliquerait la diminution de 5-MTHF.

## G. Ouverture

Le suivi clinique et biologique de nos patients au long cours n'a pas été prévu dans l'étude initiale. Cependant, dans le cadre du Centre de Référence de la SLA, nous sommes amenés à revoir tous les patients sur le plan clinique. Il serait donc intéressant d'analyser plus en détail l'évolution de leur maladie dans les années à venir, et notamment de confirmer notre impression que les patients ayant une élévation de l'homocystéine sont ceux qui progressent le plus rapidement. Ceci pourrait en effet avoir des conséquences thérapeutiques, puisque si cette hypothèse était avérée, elle pourrait nous conduire à supplémenter précocement ces patients en folates.

Le suivi biologique de notre petite cohorte serait également intéressant, nous permettant notamment de voir si l'homocystéine plasmatique a tendance à augmenter chez un même patient au cours de la maladie, ce qui n'a jamais été étudié à notre connaissance. L'étude de l'évolution du 5-MTHF et de l'homocystéine dans le LCS au cours du temps serait particulièrement intéressante mais nécessite l'approbation des comités d'éthique.

## VI. CONCLUSION

Notre étude montre une tendance à la diminution du 5-MTHF dans le LCS des patients SLA, sans élévation de l'homocystéine dans le LCS ni diminution de la méthionine. L'implication de la voie de la reméthylation au sein du système nerveux central n'est donc pas évidente. Cela laisse suspecter l'implication d'autres voies telles que des modifications d'activité de la SOD1.

Cependant, nos résultats semblent confirmer qu'il existe une tendance à l'augmentation modérée de l'homocystéine dans le sang chez les patients atteints de SLA, déjà observée à plusieurs reprises. Cette élévation de l'homocystéine dans le sang est corrélée au délai diagnostique. Cette donnée mérite d'être explorée par des études ultérieures s'attachant à rechercher une corrélation avec une rapidité évolutive de la pathologie.

D'autre part, les taux d'homocystéine dans le LCS sont inversement corrélés à l'atteinte cognitive, faisant suspecter des mécanismes physiopathologiques communs à d'autres pathologies neurodégénératives (comme la maladie d'Alzheimer), pour lesquelles une élévation de l'homocystéine a déjà été mise en évidence. L'homocystéine dans le LCS pourrait être un marqueur de l'atteinte cognitive frontale.

L'ensemble de ces résultats nous invite à réfléchir à l'opportunité de la supplémentation en folates de ces patients, qui pourrait, en abaissant l'homocystéinémie et en restaurant un taux normal de 5-MTHF dans le SNC, permettre de ralentir la progression inéluctable de la maladie en protégeant les motoneurons de l'apoptose, comme cela a pu être montré chez l'animal. Cette perspective est d'autant plus enthousiasmante qu'il n'y a à l'heure actuelle aucun traitement curatif dans la SLA : tout traitement pouvant ralentir l'évolution de cette pathologie neurodégénérative doit donc être étudié.

Vu permis d'imprimer  
Le Doyen de la Faculté  
De Médecine Rangueil

E. SERRANO

*Le président de jury,*



**Pr Vincent LARRUE**  
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier  
N° RPPS : 10002864089  
Neurologie CHU Toulouse - Hôpital Pierre-Paul Riquet  
TSA 40031 - 31059 TOULOUSE CEDEX 9

## VII. ABREVIATIONS

ADN : Acide-Désoxyribo-Nucléique

ARN : Acide-Ribo-Nucléique

ALS FRS : Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale

AMM : Acide Méthyl-Malonique

AMPA : Acide propionique alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole

BREF : Batterie Rapide d'Efficienc Frontale

CBS : Cystathionine-Beta-Synthase

CGL : Cystathionine-Gamma-Lyase

CH : Chorée de Huntington

DFT: Démence fronto-temporale

DMG : Di-méthyl-glycine

ENMG : Electroneuromyographie

GAMT : Guanidino-Acétate-Méthyl-Transférase

GNMT : Glycine-N-Méthyl-Transférase

5-HIAA : 5-Hydroxy-Indol-Acetic Acid

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LCS : Liquide Cérébro-Spinal

MA : Maladie d'Alzheimer

MP : Maladie de Parkinson

MS : Méthionine synthase

NMc : Neurone Moteur central

NMp : Neurone Moteur périphérique

5-MTHF : 5-Méthyl-Tétra-Hydro-Folate

MTHFR : Méthyl-Tétra-Hydro-Folate Réductase

NAA : N-Acétyl-Aspartate

3-OMD: 3-O-Méthyl-Dopa

PEMT: Phospatidyl-Ethanolamine-Méthyl-Transférase

SAH : S-Adénosyl-Homocystéine

SAHH: S-Adénosyl-Homocystéine Hydrolase

SAM: S-Adénosyl-Méthionine

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SNC : Système Nerveux Central

SPE : sciatique poplitée externe

SPI : sciatique poplitée interne

SOD 1: Superoxyde Dismutase 1

THF: Tétrahydrofolate

## VIII. ANNEXES

ANNEXE 1 : Critères El Escorial 1990

ANNEXE 2 : Critères d’Airlie House

ANNEXE 3 : Critères d’Awaji

ANNEXE 4: ALS FRS

ANNEXE 5 : Echelle MRC

ANNEXE 6 : Echelle d’Ashworth

ANNEXE 7 : Score de Norris bulbaire

ANNEXE 8: BREF

ANNEXE 9: Echelle de Borg

ANNEXE 10 : Accord du Comité d’Ethique de la Recherche

ANNEXE 11 : Formulaire de Consentement éclairé

ANNEXE 12 : Notice d’information pour les patients SLA

ANNEXE 13 : Notice d’information pour les témoins

## ANNEXE 1: Critères d'El Escorial (1990)

<b>SLA certaine</b>	Signes d'atteinte des NMC et NMP : <ul style="list-style-type: none"><li>- dans la région bulbaire et deux régions spinales</li><li>- OU dans trois régions spinales</li></ul>
<b>SLA probable</b>	Signes d'atteinte des NMC et NMP dans au moins 2 régions, avec des signes d'atteinte des NMC plus hauts que les signes d'atteinte des NMP.
<b>SLA possible</b>	Signes d'atteinte des NMC et NMP dans une seule région, OU signes d'atteinte des NMC seuls dans 2 régions ou plus, OU signes d'atteinte des NMP plus hauts que les signes d'atteinte des NMC.
<b>SLA suspecte</b>	Signes d'atteinte des NMP dans 2 régions ou plus.

## ANNEXE 2: Critères d'Airlie House (1998)

<b>SLA cliniquement certaine</b>	Signes d'atteinte des NMC et NMP dans 3 régions : région bulbaire et 2 régions spinales OU 3 régions spinales.
<b>SLA cliniquement probable</b>	Signes d'atteinte des NMC et NMP dans au moins 2 régions, avec des signes d'atteinte des NMC plus hauts que les signes d'atteinte des NMP.
<b>SLA cliniquement probable étayée par des examens paracliniques</b>	<p>Signes d'atteinte des NMC et NMP dans une seule région, ET atteinte électromyographique des NMP sur au moins 2 membres, sans arguments biologiques ou radiologiques pour une autre étiologie.</p> <p>OU</p> <p>Signes d'atteinte des NMC dans une seule région, ET atteinte électromyographique des NMP sur au moins 2 membres, sans arguments biologiques ou radiologiques pour une autre étiologie.</p>
<b>SLA cliniquement possible</b>	<p>Signes d'atteinte des NMC et NMP dans une seule région, après exclusion des autres causes par neuro-imagerie, électrophysiologie et investigations biologiques.</p> <p>OU signes d'atteinte des NMC seuls dans 2 régions ou plus, après exclusion des autres causes par neuro-imagerie, électrophysiologie et investigations biologiques.</p> <p>OU signes d'atteinte des NMP au-dessus des signes d'atteinte des NMC, sans critères électromyographiques d'atteinte des NMP, après exclusion des autres causes par neuro-imagerie, électrophysiologie et investigations biologiques.</p>

### ANNEXE 3: Critères d'Awaji (2006)

<b>SLA certaine</b>	Signes cliniques ou ENMG d'atteinte des NMP et signes cliniques d'atteinte des NMC dans 3 territoires.
<b>SLA probable</b>	Signes cliniques ou ENMG d'atteinte des NMP et signes cliniques d'atteinte des NMC dans 2 territoires avec présence de signes d'atteinte des NMC au-dessus de l'atteinte des NMP.
<b>SLA possible</b>	Signes cliniques ou ENMG d'atteinte des NMP et signes cliniques d'atteinte des NMC dans 2 territoires,  OU signes cliniques d'atteinte des NMC dans 2 territoires,  OU signes clinique ou ENMG d'atteinte des NMP au-dessus de l'atteinte des NMC.

## ANNEXE 4: ALS FRS

<b>1 Parole</b>	<p>4 – normale            3 – perturbations détectables            2 – intelligible avec répétition            1 – utilise occasionnellement une communication non verbale            0 – perte de la parole</p>
<b>2 Salivation</b>	<p>4 – normale            3 – hypersialorrhée discrète avec bavage nocturne            2 – hypersialorrhée modérée mais permanente            1 – hypersialorrhée gênante            0 – bavage continu nécessitant l'utilisation d'un mouchoir</p>
<b>3 Déglutition</b>	<p>4 – alimentation normale            3 – quelques fausses routes            2 – consistance des aliments modifiée            1 – suppléments alimentaires            0 – alimentation parentérale exclusive</p>
<b>4 Écriture</b>	<p>4 – normale            3 – lente et imprécise mais compréhensible            2 – tous les mots ne sont pas compréhensibles            1 – tient un stylo mais incapable d'écrire            0 – incapable de tenir un stylo</p>
<b>5 Hygiène</b>	<p>4 – normale            3 – autonome mais avec efficacité diminuée            2 – assistance occasionnelle ou substitution            1 – assistance d'une tierce personne requise            0 – assistance permanente totale</p>
<b>6a Préparation des aliments</b>	<p>4 – normale            3 – lente et maladroit mais seul            2 – aide occasionnelle pour couper les aliments            1 – les aliments sont préparés mais mange seul            0 – doit être nourri</p>
<b>6b En cas de gastrostomie</b>	<p>4 – utilisation normalement autonome            3 – maladroit mais toutes les manipulations sont effectuées seul            2 – aide nécessaire pour la mise en place            1 – fournit une aide minimale aux soignants            0 – doit être nourri</p>
<b>7 Mobilisation au lit</b>	<p>4 – normale            3 – lenteur et maladresse mais autonome            2 – ajuste les draps avec difficulté            1 – peut bouger mais pas se retourner dans le lit            0 – dépendant</p>
<b>8 Marche</b>	<p>4 – normale            3 – difficultés de déambulation            2 – marche avec assistance            1 – mouvements sans déambulation            0 – pas de mouvement des jambes</p>

<b>9 Montée d'escaliers</b>	4 – normale 3 – lente 2 – fatigue 1 – aide nécessaire 0 – impossible
<b>10 Dyspnée</b>	4 – absente 3 – à la marche 2 – dans une ou plus des situations suivantes : repas, toilette, habillage 1 – au repos, difficultés respiratoires en position assise ou allongée 0 – difficulté importante, envisage l'utilisation d'un appareil de ventilation mécanique
<b>11 Orthopnée</b>	4 – absente 3 – quelques difficultés pour dormir la nuit en raison d'un souffle court, n'utilise habituellement pas plus de 2 oreillers 2 – besoin de plus de 2 oreillers pour dormir 1 – ne peut dormir qu'assis 0 – ne peut pas dormir
<b>12 Insuffisance respiratoire</b>	4 – absente 3 – utilisation intermittente d'une assistance ventilatoire 2 – utilisation continue d'une VNI la nuit 1 – utilisation continue d'une VNI jour et nuit 0 – ventilation mécanique invasive par intubation ou trachéotomie

## ANNEXE 5: Echelle MRC (Medical Research Council of Great Britain)

Permet de coter le déficit moteur sur une échelle de 0 à 5

5.	Force normale
4.	Capacité de lutter contre la pesanteur et contre une résistance
3.	Capacité de lutter contre la pesanteur mais non contre une résistance
2.	Possibilité de mouvement, une fois éliminée la pesanteur
1.	Ébauche de mouvement
0.	Aucun mouvement

## ANNEXE 6 : Echelle d'Ashworth

Permet de coter la spasticité sur une échelle de 0 à 4

0.	Pas d'augmentation du tonus.
1.	Légère augmentation du tonus musculaire avec simple « sensation d'accrochage » ou minime résistance en fin de course.
1+.	Légère augmentation du tonus musculaire avec simple « sensation d'accrochage » suivi d'une minime résistance au cours de la première moitié de la course musculaire.
2.	Augmentation importante du tonus musculaire durant toute la course musculaire mais le segment du membre reste facilement mobilisable.
3.	Augmentation considérable du tonus musculaire. Le mouvement passif est difficile.
4.	Hypertonie majeure. Mouvement passif impossible.

## ANNEXE 7 : Score de Norris bulbaire

<b>ECHELLE BULBAIRE</b>				
Cocher dans la case appropriée (une seule croix et une seule par ligne)	<b>fonction normale</b> <b>3</b>	<b>fonction altérée</b> <b>2</b>	<b>fonction minimale</b> <b>1</b>	<b>fonction nulle</b> <b>0</b>
1. souffler				
2. siffler				
3. gonfler les joues				
4. effectuer des mouvements de diduction de la mâchoire				
5. claquer la langue				
6. tirer la langue en avant				
7. mettre la langue sur le côté				
8. mettre la langue contre le palais				
9. tousser				
	<b>absente</b> <b>3</b>	<b>légère</b> <b>2</b>	<b>notable</b> <b>1</b>	<b>sévère</b> <b>0</b>
10. hypersialorrhée				
11. nasalisation				
	<b>normale</b> <b>3</b>	<b>légèrement bredouillée</b> <b>2</b>	<b>bredouillée</b> <b>1</b>	<b>inintelligible</b> <b>0</b>
12. parole				
	<b>normale</b> <b>3</b>	<b>aliments tendres</b> <b>2</b>	<b>aliments hachés</b> <b>1</b>	<b>aliments semi-liquides</b> <b>0</b>
13. déglutition				

## ANNEXE 8: BREF

Domaine	Instruction	Score
1. Similitudes (conceptualisation)	"De quelle façon sont-ils semblables?" "Une banane et une orange..." (en cas d'échec, dire au patient: "Une banane et une orange sont des...", ne pas comptabiliser, ne pas aider le patient pour les deux autres items) "Une table et une chaise..." "Une tulipe, une rose et une marguerite..."	3 réussies: 3 points 2 réussies: 2 points 1 réussie: 1 point Aucune: 0 point
2. Fluidité lexicale (flexibilité mentale)	"Dites le plus grand nombre de mots commençant par la lettre "S", n'importe quel mot sauf des noms propres ou des prénoms" Si le patient ne dit aucun mot durant les 5 premières secondes, dire "Par exemple, serpent...". S'il arrête durant 10 secondes, le stimuler en disant "n'importe quel mot commençant pas S..." Temps alloué: 60 secondes Correction: les mots répétés ou équivalents (sable et sable-mouvant) ainsi que les prénoms ou les noms propres ne sont pas comptés	10 mots et plus: 3 points 6 à 9 mots: 2 points 3 à 5 mots: 1 point 2 mots ou moins: 0 point
3. Séquences motrices (programmation)	"Regardez attentivement ce que je fais." L'examineur, assis en face du patient, exécute trois fois avec sa main gauche la série de Luria (poing – tranche – plat de la main). "Maintenant, avec votre main droite, faites la même chose, d'abord avec moi et ensuite seul." L'examineur exécute la série trois fois avec le patient et dit ensuite: "Maintenant, faites-le seul."	6 séries réussies seul: 3 points 3 séries réussies seul: 2 points 3 séries réussies avec l'examineur: 1 point Moins de 3 séries avec l'examineur: 0 point.
4. Consignes contradictoires (sensibilité à l'interférence)	"Tapez deux coups quand j'en tape un." Pour s'assurer que le patient a compris, une série de trois est exécutée: 1-1-1. "Tapez un coup quand j'en tape deux." Pour s'assurer que le patient a compris, une série de trois est exécutée: 2-2-2. Ensuite l'examineur tape 1-1-2-1-2-2-2-1-1-2.	Aucune erreur: 3 points Une ou deux erreurs: 2 points Plus de deux erreurs: 1 point 4 erreurs consécutives: 0 point
5. Go – No Go (contrôle inhibiteur)	"Tapez un coup quand je tape un coup." Pour s'assurer que le patient a compris, une série de trois est exécutée: 1-1-1. "Ne tapez pas quand je tape deux fois." Pour s'assurer que le patient a compris, une série de trois est exécutée: 2-2-2. Ensuite l'examineur tape 1-1-2-1-2-2-2-1-1-2.	Aucune erreur: 3 points Une ou deux erreurs: 2 points Plus de deux erreurs: 1 point 4 erreurs consécutives: 0 point
6. Comportement de préhension (autonomie environnementale)	"Ne prenez pas mes mains" L'examineur est assis en face du patient. Placez les mains du patient sur ses genoux, paume vers le haut. Sans dire un mot et sans regarder le patient, l'examineur place ses mains près de celles du patient et touche les paumes des deux mains pour vérifier s'il les prend spontanément. Si le patient les prend spontanément, l'examineur refait un essai après avoir dit: "Maintenant, ne prenez pas mes mains."	Ne prend pas les mains de l'examineur: 3 points Hésite et demande ce qu'il doit faire: 2 points Prend les mains sans hésitations: 1 point Prend les mains même au deuxième essai: 0 point

## ANNEXE 9: Echelle de Borg modifiée

Echelle fondée sur la description verbale de la dyspnée

<b>0</b>	Nulle
<b>0,5</b>	Très très discrète (à peine perceptible)
<b>1</b>	Très discrète
<b>2</b>	Discrète
<b>3</b>	Modérée
<b>4</b>	Légèrement intense
<b>5</b>	] Intense
<b>6</b>	
<b>7</b>	] Très intense
<b>8</b>	
<b>9</b>	Très très intense (presque maximale)
<b>10</b>	Maximale

## ANNEXE 10: Accord du Comité d'éthique de la recherche.



### COMITE D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE

Toulouse,

Le 11 Avril 2014

A l'attention de

Monsieur le Docteur Pascal CINTAS

Monsieur le Professeur Vincent LARRUE

Lors de la séance du 20 Février 2014, le comité d'éthique de la recherche des Hôpitaux de Toulouse a examiné le projet (n° 17 – 0214) intitulé « **Etude du métabolisme du folate et de l'homocystéine chez les patients atteints de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)** » que vous lui avez soumis en tant qu'investigateurs.

Etaient présents: Dr JM CONIL - Pr P PAYOUX – Pr JM LAFFOSSE - Mme MC VALLEJO –  
Mme N MARCILHAC - Dr F LORENZINI - Mme D ARAVIT - Dr ME LLAU - Mme N PEOCH -  
Pr F LAUWERS.

Après examen du dossier et des modifications demandées, **le comité émet un avis favorable à la mise en oeuvre de cette recherche.**

Je vous prie d'agréer Monsieur, l'assurance de ma considération distinguée.

**Dr Jean-Marie CONIL**

*Président du Comité d'Ethique de la Recherche des Hôpitaux de Toulouse*

*PH - Service de Réanimation - Hôpital de Rangueil*

*Département d'Anesthésie et de Réanimation – CHU Toulouse*

☎ 05 61 32 24 86 ou 05 61 32 27 99

✉ [conil.jm@chu-toulouse.fr](mailto:conil.jm@chu-toulouse.fr)

## ANNEXE 11: Formulaire de consentement éclairé

<b>Formulaire de consentement éclairé – Etude clinique</b>
--

De M., Mme, Mlle ..... (Nom, prénom)  
Demeurant ..... (Adresse)

Le Docteur ..... m'a proposé de participer à une étude clinique intitulée :  
« Etude du métabolisme du folate et de l'homocystéine chez les patients atteints de  
Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) »

J'ai reçu une notice d'information précisant les modalités de déroulement de cette  
étude et décrivant le but de l'étude, la méthodologie, la durée, les bénéfices et les  
contraintes.

Ma participation est totalement volontaire et je peux, si je le désire, interrompre ma  
participation à l'étude à tout moment, sans avoir à en préciser les raisons, et sans  
compromettre la qualité des soins qui me sont dispensés.

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs  
responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

***J'accepte librement et volontairement de participer à cette recherche dans les  
conditions précisées dans la notice d'information.***

Je pourrai à tout moment demander des informations complémentaires au Dr Pascal  
Cintas au 05 61 77 94 21.

Fait à .....  
Le ..... / ..... / .....

Signature du patient

Signature de l'investigateur

*Fait en deux exemplaires : un exemplaire est remis au patient, le second exemplaire est conservé par  
l'investigateur*

## ANNEXE 12: Notice d'information pour les patients SLA

<b>Notice d'information des patients</b>
--

Titre de la recherche : *Etude du métabolisme du folate et de l'homocystéine chez les patients atteints de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)*

Investigateur coordonnateur : Dr Pascal CINTAS  
Neurologie et Explorations Fonctionnelles du Système Nerveux  
Hôpital Pierre-Paul Riquet  
Place du Dr Baylac TSA 40 031  
31059 Toulouse Cedex 9  
Tel : 05-61-77-94-81

Etablissement : CHU de Toulouse.

Madame, Monsieur,

Votre médecin vient de vous diagnostiquer une Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Il s'agit d'une maladie touchant les neurones moteurs, responsable d'une faiblesse musculaire notamment.

**Nous vous proposons de participer à un protocole de recherche clinique visant à mieux connaître les mécanismes impliqués dans le développement de cette maladie.**

Ce protocole évalue l'implication de la Vitamine B9 (ou folate) et de ses dérivés dans la pathogénie de la SLA. Nous vous présentons ici les modalités de cette étude afin que vous puissiez décider de votre participation en toute connaissance de cause.

### **Pourquoi cette recherche?**

Etat actuel des connaissances: La SLA est une maladie neurodégénérative rare dont la cause n'est pas bien connue. Certaines études récentes ont montré que le métabolisme des folates (et de certains de leurs dérivés), notamment dans le liquide cérébro-spinal (LCS), pourrait être impliqué dans le développement de cette maladie. Ainsi, nous souhaitons doser ces marqueurs dans le sang et le LCS.

Hypothèse de la recherche: Nous faisons l'hypothèse qu'il existe un trouble du métabolisme des folates dans le LCR, sans déficit associé en folates dans le sang, chez les patients SLA. Ce déficit pourrait contribuer à la maladie.

Retombées attendues de la recherche: Si une anomalie du métabolisme des folates était mise en évidence, des nouvelles pistes de recherche thérapeutique pourraient être envisagées.

### **Comment va se dérouler cette recherche ?**

Les patients présentant une SLA bénéficient au moment du diagnostic :

- d'un examen clinique complet,
- d'analyses biologiques sanguines
- d'une ponction lombaire avec recueil du LCS,
- d'une électromyographie
- +/- d'une analyse de la fonction ventilatoire par EFR.

L'objectif de ces examens est de confirmer le diagnostic, en excluant d'autres diagnostics potentiels, et d'évaluer l'extension de la pathologie.

Vous bénéficierez donc du bilan usuel comme les autres patients.

**Si vous participez à l'étude, nous utiliserons le matériel biologique restant de votre analyse de LCS, afin de réaliser des analyses supplémentaires que nous enverrons dans un laboratoire spécialisé à Paris.**

Les données seront rendues anonymes et votre nom n'apparaîtra dans aucun document.

Contraintes: la participation à cette étude n'occasionnera pas de geste invasif supplémentaire. Elle nécessitera que vous lisiez attentivement la notice d'information et que vous remplissiez le formulaire de consentement.

Votre médecin (Dr Pascal Cintas, Tél : 05 61 77 94 21) est à votre disposition pour vous apporter toutes les précisions complémentaires que vous souhaitez.

Vous pourrez librement signer la feuille de consentement en double exemplaire, dont vous conserverez un exemplaire, le 2<sup>ème</sup> exemplaire est destiné au médecin investigateur.

## ANNEXE 13: Notice d'information pour les témoins

<b>Notice d'information des témoins</b>
---

Titre de la recherche : *Etude du métabolisme du folate et de l'homocystéine chez les patients atteints de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)*

Investigateur coordonnateur : Dr Pascal CINTAS  
Neurologie et Explorations Fonctionnelles du Système Nerveux  
Hôpital Pierre-Paul Riquet  
Place du Dr Baylac TSA 40 031  
31059 Toulouse Cedex 9  
Tel : 05-61-77-94-81

Etablissement : CHU de Toulouse.

Madame, Monsieur,

Dans le cadre des symptômes qui vous ont amené à consulter en neurologie, une ponction lombaire a été réalisée ce jour pour analyser votre liquide céphalo-spinal (LCS).

Le CHU de Toulouse mène actuellement un protocole de recherche clinique visant à mieux connaître les mécanismes impliqués dans le développement de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), une maladie neurodégénérative rare dont la cause n'est pas bien connue.

Dans le cadre de cette étude, nous comparons le LCS de patients atteints de cette maladie et le LCS de sujets témoins bénéficiant d'une ponction lombaire pour un autre motif.

**Nous vous demandons donc l'autorisation d'utiliser le matériel biologique restant de votre analyse de LCS, afin de réaliser des analyses supplémentaires que nous enverrons dans un laboratoire spécialisé à Paris.**

### **Comment va se dérouler cette recherche ?**

Les témoins bénéficient d'une ponction lombaire dans le cadre du bilan de leurs symptômes neurologiques. Le bilan diagnostique de leur pathologie sera donc réalisé suivant les pratiques habituelles.

**Si vous participez à l'étude, nous utiliserons le matériel biologique restant de votre analyse de LCS, afin de réaliser des analyses supplémentaires que nous enverrons dans un laboratoire spécialisé à Paris.**

Les données seront rendues anonymes et votre nom n'apparaîtra dans aucun document.

Contraintes: la participation à cette étude n'occasionnera pas de geste invasif supplémentaire. Elle nécessitera que vous lisiez attentivement la notice d'information et que vous remplissiez le formulaire de consentement.

Votre médecin (Dr Pascal Cintas Tél : 05 61 77 94 81) est à votre disposition pour vous apporter toutes les précisions complémentaires que vous souhaitez.

Vous pourrez librement signer la feuille de consentement en double exemplaire, dont vous conserverez un exemplaire, le 2<sup>ème</sup> exemplaire est destiné au médecin investigateur.

## IX. BIBLIOGRAPHIE

- [1] Adalbert R, Engelhardt JI, Siklós L. DL-Homocysteic acid application disrupts calcium homeostasis and induces degeneration of spinal motor neurons in vivo. *Acta Neuropathol.* 2002 May;103(5):428-36. PubMed PMID: 11935257.
- [2] Alonso A, Logroscino G, Jick SS, Hernán MA. Incidence and lifetime risk of motor neuron disease in the United Kingdom: a population-based study. *Eur J Neurol.* 2009 Jun;16(6):745-51. PubMed PMID: 19475756; PubMed Central PMCID: PMC3093130.
- [3] Andrich J, Saft C, Arz A, Schneider B, Agelink MW, Kraus PH, Kuhn W, Müller T. Hyperhomocysteinaemia in treated patients with Huntington's disease homocysteine in HD. *Mov Disord.* 2004 Feb;19(2):226-8. PubMed PMID: 14978683.
- [4] Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 1994 Mar 3;330(9):585-91. PubMed PMID: 8302340.
- [5] Beydoun MA, Beydoun HA, Gamaldo AA, Teel A, Zonderman AB, Wang Y. Epidemiologic studies of modifiable factors associated with cognition and dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* 2014 Jun 24;14:643. PubMed PMID: 24962204; PubMed Central PMCID: PMC4099157.
- [6] Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G. Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clin Chem.* 2001 Jun;47(6):1102-4. PubMed PMID: 11375298.
- [7] Blasco H, Corcia P, Pradat PF, Bocca C, Gordon PH, Veyrat-Durebex C, Mavel S, Nadal-Desbarats L, Moreau C, Devos D, Andres CR, Emond P. Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2013 Aug 2;12(8):3746-54. PubMed PMID: 23859630.
- [8] Blasco H, Corcia P, Moreau C, Veau S, Fournier C, Vourc'h P, Emond P, Gordon P, Pradat PF, Praline J, Devos D, Nadal-Desbarats L, Andres CR. 1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 2010 Oct 8;5(10):e13223. PubMed PMID: 20949041; PubMed Central PMCID: PMC2951909.
- [9] Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Shaw PJ, Turnbull DM. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann Neurol.* 1999 Nov;46(5):787-90. PubMed PMID: 10553999.
- [10] Bostom AG, Rosenberg IH, Silbershatz H, Jacques PF, Selhub J, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: the Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1999 Sep 7;131(5):352-5. PubMed PMID: 10475888.
- [11] Bottiglieri T, Laundry M, Crellin R, Toone BK, Carney MW, Reynolds EH. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000 Aug;69(2):228-32. PubMed PMID: 10896698; PubMed Central PMCID: PMC1737050.
- [12] Boutell JM, Wood JD, Harper PS, Jones AL. Huntingtin interacts with cystathionine beta-synthase. *Hum Mol Genet.* 1998 Mar;7(3):371-8. PubMed PMID: 9466992.
- [13] Brooks BR. 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.* 1994 Jul;124 Suppl:96-107. PubMed PMID: 7807156.

- [14] Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL, World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000 Dec;1(5):293-9. PubMed PMID: 11464847.
- [15] Buijn LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:723-49. PubMed PMID: 15217349.
- [16] Camu W, Billiard M, Baldy-Moulinier M. Fasting plasma and CSF amino acid levels in amyotrophic lateral sclerosis: a subtype analysis. *Acta Neurol Scand*. 1993 Jul;88(1):51-5. PubMed PMID: 8372631.
- [17] Cecchi M, Messina P, Airoldi L, Pupillo E, Bandettini di Poggio M, Calvo A, Filosto M, Lunetta C, Mandrioli J, Pisa F, Pastorelli R, Beghi E, Eurals Consortium. Plasma amino acids patterns and age of onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014 Sep;15(5-6):371-5. PubMed PMID: 24904978.
- [18] Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, White LA. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*. 2013;41(2):118-30. PubMed PMID: 23860588; PubMed Central PMCID: PMC4049265.
- [19] Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, Traynor BG, Eurals Consortium. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009 Oct-Dec;10(5-6):310-23. PubMed PMID: 19922118; PubMed Central PMCID: PMC3515205.
- [20] Chiò A, Borghero G, Restagno G, Mora G, Drepper C, Traynor BJ, Sendtner M, Brunetti M, Ossola I, Calvo A, Pugliatti M, Sotgiu MA, Murru MR, Marrosu MG, Marrosu F, Marinou K, Mandrioli J, Sola P, Caponnetto C, Mancardi G, Mandich P, La Bella V, Spataro R, Conte A, Monsurrò MR, Tedeschi G, Pisano F, Bartolomei I, Salvi F, Lauria Pinter G, Simone I, Logroscino G, Gambardella A, Quattrone A, Lunetta C, Volanti P, Zollino M, Penco S, Battistini S, ITALSGEN consortium, Renton AE, Majounie E, Abramzon Y, Conforti FL, Giannini F, Corbo M, Sabatelli M. Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72. *Brain*. 2012 Mar;135(Pt 3):784-93. PubMed PMID: 22366794; PubMed Central PMCID: PMC3286333.
- [21] Chung YH, Hong JJ, Shin CM, Joo KM, Kim MJ, Cha CI. Immunohistochemical study on the distribution of homocysteine in the central nervous system of transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation. *Brain Res*. 2003 Mar 28;967(1-2):226-34. PubMed PMID: 12650983.
- [22] Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1998 Nov;55(11):1449-55. PubMed PMID: 9823829.
- [23] Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE, Børnaa KH, Spence JD, Nygård O, Jamison R, Gaziano JM, Guarino P, Bennett D, Mir F, Peto R, Collins R, B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals. *Arch Intern Med*. 2010 Oct 11;170(18):1622-31. PubMed PMID: 20937919.
- [24] Couratier P, Marin B, Lautrette G, Nicol M, Preux PM. [Epidemiology, clinical spectrum of ALS and differential diagnoses]. *Presse Med*. 2014 May;43(5):538-48. PubMed PMID: 24703738.
- [25] de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H, Shefner J, Swash M. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol*. 2008 Mar;119(3):497-503. PubMed PMID: 18164242.
- [26] de Jager CA. Critical levels of brain atrophy associated with homocysteine and cognitive decline. *Neurobiol Aging*. 2014 Sep;35 Suppl 2:S35-9. PubMed PMID: 24927906.

- [27] den Heijer T, Vermeer SE, Clarke R, Oudkerk M, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Homocysteine and brain atrophy on MRI of non-demented elderly. *Brain*. 2003 Jan;126(Pt 1):170-5. PubMed PMID: 12477704.
- [28] Diaz-Arrastia R. Homocysteine and neurologic disease. *Arch Neurol*. 2000 Oct;57(10):1422-7. PubMed PMID: 11030793.
- [29] Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2002 Jan;80(1):101-10. PubMed PMID: 11796748.
- [30] Durga J, van Boxtel MP, Schouten EG, Kok FJ, Jolles J, Katan MB, Verhoef P. Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *Lancet*. 2007 Jan 20;369(9557):208-16. PubMed PMID: 17240287.
- [31] Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med*. 1999 Sep 7;131(5):363-75. PubMed PMID: 10475890.
- [32] Evers S, Koch HG, Grotemeyer KH, Lange B, Deufel T, Ringelstein EB. Features, symptoms, and neurophysiological findings in stroke associated with hyperhomocysteinemia. *Arch Neurol*. 1997 Oct;54(10):1276-82. PubMed PMID: 9341574.
- [33] Fassbender K, Mielke O, Bertsch T, Nafe B, Fröschen S, Hennerici M. Homocysteine in cerebral macroangiography and microangiopathy. *Lancet*. 1999 May 8;353(9164):1586-7. PubMed PMID: 10334261.
- [34] Gil J, Funalot B, Tornay F, Lacoste M, Couratier P. [Exogenous risk factors in sporadic ALS: a review of the literature]. *Rev Neurol (Paris)*. 2007 Nov;163(11):1021-30. PubMed PMID: 18033040.
- [35] Godfrey PS, Toone BK, Carney MW, Flynn TG, Bottiglieri T, Laundry M, Chanarin I, Reynolds EH. Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *Lancet*. 1990 Aug 18;336(8712):392-5. PubMed PMID: 1974941.
- [36] Guennoc AM, Camu W, Corcia P. [Awaji criteria: new diagnostic criteria for amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)*. 2013 Jun-Jul;169(6-7):470-5. PubMed PMID: 23261262.
- [37] Guerra-Shinohara EM, Paiva AA, Rondo PH, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. *BJOG*. 2002 Jul;109(7):784-91. PubMed PMID: 12135215.
- [38] Hamidou B, Couratier P, Besançon C, Nicol M, Preux PM, Marin B. Epidemiological evidence that physical activity is not a risk factor for ALS. *Eur J Epidemiol*. 2014 Jul;29(7):459-75. PubMed PMID: 24986107.
- [39] Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet*. 1999 Jul 31;354(9176):407-13. PubMed PMID: 10437885.
- [40] Hemendinger RA, Armstrong EJ 3rd, Brooks BR. Methyl Vitamin B12 but not methylfolate rescues a motor neuron-like cell line from homocysteine-mediated cell death. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 Mar 15;251(3):217-25. PubMed PMID: 21237187.
- [41] Hervias I, Beal MF, Manfredi G. Mitochondrial dysfunction and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2006 May;33(5):598-608. PubMed PMID: 16372325.
- [42] Hirano A. Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology*. 1996 Oct;47(4 Suppl 2):S63-6. PubMed PMID: 8858053.

- [43] Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis.* 2003 Oct;14(1):32-42. PubMed PMID: 13678664.
- [44] Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res.* 2002 Dec 1;70(5):694-702. PubMed PMID: 12424737.
- [45] Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem.* 2001 Jul;78(2):249-53. PubMed PMID: 11461960.
- [46] Hu XW, Qin SM, Li D, Hu LF, Liu CF. Elevated homocysteine levels in levodopa-treated idiopathic Parkinson's disease: a meta-analysis. *Acta Neurol Scand.* 2013 Aug;128(2):73-82. PubMed PMID: 23432663..
- [47] Iłzecka J, Stelmasiak Z, Solski J, Wawrzycki S, Szpetnar M. Plasma amino acids percentages in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Sci.* 2003 Nov;24(4):293-5. PubMed PMID: 14658054.
- [48] Isobe C, Murata T, Sato C, Terayama Y. Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci.* 2005 Aug 26;77(15):1836-43. PubMed PMID: 15935398.
- [49] Isobe C, Terayama Y. A remarkable increase in total homocysteine concentrations in the CSF of migraine patients with aura. *Headache.* 2010 Nov;50(10):1561-9. PubMed PMID: 20561069.
- [50] Kado DM, Karlamangla AS, Huang MH, Troen A, Rowe JW, Selhub J, Seeman TE. Homocysteine versus the vitamins folate, B6, and B12 as predictors of cognitive function and decline in older high-functioning adults: MacArthur Studies of Successful Aging. *Am J Med.* 2005 Feb;118(2):161-7. PubMed PMID: 15694902.
- [51] Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol.* 1992 Mar;140(3):691-707. PubMed PMID: 1347673; PubMed Central PMCID: PMC1886170.
- [52] Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 1997 Jul 25;277(5325):559-62. PubMed PMID: 9228005.
- [53] Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002 Mar 1;22(5):1752-62. PubMed PMID: 11880504.
- [54] Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci.* 2000 Sep 15;20(18):6920-6. PubMed PMID: 10995836.
- [55] Kuhn W, Roebroek R, Blom H, van Oppenraaij D, Przuntek H, Kretschmer A, Büttner T, Voitalla D, Müller T. Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. *Eur Neurol.* 1998 Nov;40(4):225-7. PubMed PMID: 9813406.
- [56] Kühnlein P, Jung H, Farkas M, Keskitalo S, Ineichen B, Jelcic I, Petersen J, Semmler A, Weller M, Ludolph AC, Linnebank M. The thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase is a possible risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 2011 Mar;12(2):136-9. PubMed PMID: 21128869.

- [57] Kumar A, Bala L, Kalita J, Misra UK, Singh RL, Khetrpal CL, Babu GN. Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chim Acta*. 2010 Apr 2;411(7-8):563-7. PubMed PMID: 20096678.
- [58] Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Powe L, Durrleman S, Delumeau JC, Meininger V. A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology*. 1996 Dec;47(6 Suppl 4):S242-50. PubMed PMID: 8959996.
- [59] Levin J, Bötzel K, Giese A, Vogeser M, Lorenzl S. Elevated levels of methylmalonate and homocysteine in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and amyotrophic lateral sclerosis. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2010;29(6):553-9. PubMed PMID: 20606437.
- [60] Levine J, Sela BA, Osher Y, Belmaker RH. High homocysteine serum levels in young male schizophrenia and bipolar patients and in an animal model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005 Sep;29(7):1181-91. PubMed PMID: 16115716.
- [61] Li M, Ona VO, Guégan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science*. 2000 Apr 14;288(5464):335-9. PubMed PMID: 10764647.
- [62] Linnebank M, Popp J, Smulders Y, Smith D, Semmler A, Farkas M, Kulic L, Cvetanovska G, Blom H, Stoffel-Wagner B, Kölsch H, Weller M, Jessen F. S-adenosylmethionine is decreased in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 2010;7(6):373-8. PubMed PMID: 20523031.
- [63] Lippi G, Mattiuzzi C, Meschi T, Cervellin G, Borghi L. Homocysteine and migraine A narrative review. *Clin Chim Acta*. 2014 Jun 10;433:5-11. PubMed PMID: 24613517.
- [64] Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, Kramer JH, Olney RK, Miller B. Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal?. *Neurology*. 2003 Apr 8;60(7):1094-7. PubMed PMID: 12682312.
- [65] Majoor-Krakauer D, Ottman R, Johnson WG, Rowland LP. Familial aggregation of amyotrophic lateral sclerosis, dementia, and Parkinson's disease: evidence of shared genetic susceptibility. *Neurology*. 1994 Oct;44(10):1872-7. PubMed PMID: 7936240.
- [66] Mattson MP. Methylation and acetylation in nervous system development and neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev*. 2003 Jul;2(3):329-42. PubMed PMID: 12726778.
- [67] Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing Res Rev*. 2002 Feb;1(1):95-111. PubMed PMID: 12039451.
- [68] Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 2003 Mar;26(3):137-46. PubMed PMID: 12591216.
- [69] Menzies FM, Ince PG, Shaw PJ. Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Int*. 2002 May;40(6):543-51. PubMed PMID: 11850111.
- [70] Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Jan 24;PubMed PMID: 17253460.
- [71] Miller TM, Pestronk A, David W, Rothstein J, Simpson E, Appel SH, Andres PL, Mahoney K, Allred P, Alexander K, Ostrow LW, Schoenfeld D, Macklin EA, Norris DA, Manousakis G, Crisp M, Smith R, Bennett CF, Bishop KM, Cudkowicz ME. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol*. 2013 May;12(5):435-42. PubMed PMID: 23541756; PubMed Central PMCID: PMC3712285.

- [72] Mooijaart SP, Gussekloo J, Frölich M, Jolles J, Stott DJ, Westendorp RG, de Craen AJ. Homocysteine, vitamin B-12, and folic acid and the risk of cognitive decline in old age: the Leiden 85-Plus study. *Am J Clin Nutr.* 2005 Oct;82(4):866-71. PubMed PMID: 16210718.
- [73] Morris MS. The role of B vitamins in preventing and treating cognitive impairment and decline. *Adv Nutr.* 2012 Nov 1;3(6):801-12. PubMed PMID: 23153734; PubMed Central PMCID: PMC3648704.
- [74] Mudd SH, Brosnan JT, Brosnan ME, Jacobs RL, Stabler SP, Allen RH, Vance DE, Wagner C. Methyl balance and transmethylation fluxes in humans. *Am J Clin Nutr.* 2007 Jan;85(1):19-25. PubMed PMID: 17209172.
- [75] Nzwalo H, de Abreu D, Swash M, Pinto S, de Carvalho M. Delayed diagnosis in ALS: the problem continues. *J Neurol Sci.* 2014 Aug 15;343(1-2):173-5. PubMed PMID: 24972820.
- [76] Pagani MR, Gonzalez LE, Uchitel OD. Autoimmunity in amyotrophic lateral sclerosis: past and present. *Neurol Res Int.* 2011;2011:497080. PubMed PMID: 21826267; PubMed Central PMCID: PMC3150148.
- [77] Paganoni S, Macklin EA, Lee A, Murphy A, Chang J, Zipf A, Cudkowicz M, Atassi N. Diagnostic timelines and delays in diagnosing amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014 Sep;15(5-6):453-6. PubMed PMID: 24981792.
- [78] Pehar M, Vargas MR, Cassina P, Barbeito AG, Beckman JS, Barbeito L. Complexity of astrocyte-motor neuron interactions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2005;2(3-4):139-46. PubMed PMID: 16909019.
- [79] Perry TL, Krieger C, Hansen S, Eisen A. Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Neurol.* 1990 Jul;28(1):12-7. PubMed PMID: 2375629.
- [80] Petras M, Tatarkova Z, Kovalska M, Mokra D, Dobrota D, Lehotsky J, Drgova A. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J Physiol Pharmacol.* 2014 Feb;65(1):15-23. PubMed PMID: 24622826.
- [81] Qureshi AI, Wilmot G, Dihenia B, Schneider JA, Krendel DA. Motor neuron disease with parkinsonism. *Arch Neurol.* 1996 Oct;53(10):987-91. PubMed PMID: 8859060.
- [82] Ramaekers V, Sequeira JM, Quadros EV. Clinical recognition and aspects of the cerebral folate deficiency syndromes. *Clin Chem Lab Med.* 2013 Mar 1;51(3):497-511. PubMed PMID: 23314536.
- [83] Ricci C, Penco S, Benigni M, Mosca L, Tarlarini C, Lunetta C, Giannini F, Corbo M, Battistini S. No association of MTHFR c677C>T variant with sporadic ALS in an Italian population. *Neurobiol Aging.* 2012 Jan;33(1):208.e7-8. PubMed PMID: 21868135.
- [84] Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993 Mar 4;362(6415):59-62. PubMed PMID: 8446170.
- [85] Rotunno MS, Bosco DA. An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Front Cell Neurosci.* 2013 Dec 16;7:253. PubMed PMID: 24379756; PubMed Central PMCID: PMC3863749.
- [86] Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 2001 May 31;344(22):1688-700. PubMed PMID: 11386269.
- [87] Rowland LP. Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1998 Oct;160 Suppl 1:S6-24. PubMed PMID: 9851643.
- [88] Rozen S, Cudkowicz ME, Bogdanov M, Matson WR, Kristal BS, Beecher C, Harrison S, Vouros P, Flarakos J, Vigneau-Callahan K, Matson TD, Newhall KM, Beal MF, Brown RH Jr, Kaddurah-Daouk R.

- Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease. *Metabolomics*. 2005;1(2):101-108. PubMed PMID: 18820733; PubMed Central PMCID: PMC2553219.
- [89] Sadighi Z, Butler IJ, Koenig MK. Adult-onset cerebral folate deficiency. *Arch Neurol*. 2012 Jun;69(6):778-9. PubMed PMID: 22371854.
- [90] Sazci A, Ozel MD, Emel E, Idrisoglu HA. Gender-specific association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012 Jul;16(7):716-21. PubMed PMID: 22385294.
- [91] Schalinke KL, Smazal AL. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Adv Nutr*. 2012 Nov 1;3(6):755-62. PubMed PMID: 23153729; PubMed Central PMCID: PMC3648699.
- [92] Schiff M, Benoist JF, Tilea B, Royer N, Giraudier S, Ogier de Baulny H. Isolated remethylation disorders: do our treatments benefit patients?. *J Inherit Metab Dis*. 2011 Feb;34(1):137-45. PubMed PMID: 20490923.
- [93] Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr*. 1992 Jan;55(1):131-8. PubMed PMID: 1728812.
- [94] Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA*. 1993 Dec 8;270(22):2693-8. PubMed PMID: 8133587.
- [95] Serot JM, Christmann D, Dubost T, Béne MC, Faure GC. CSF-folate levels are decreased in late-onset AD patients. *J Neural Transm*. 2001;108(1):93-9. PubMed PMID: 11261750.
- [96] Serot JM, Barbé F, Arning E, Bottiglieri T, Franck P, Montagne P, Nicolas JP. Homocysteine and methylmalonic acid concentrations in cerebrospinal fluid: relation with age and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005 Nov;76(11):1585-7. PubMed PMID: 16227558; PubMed Central PMCID: PMC1739416.
- [97] Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2002 Feb 14;346(7):476-83. PubMed PMID: 11844848.
- [98] Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005 Aug;76(8):1046-57. PubMed PMID: 16024877; PubMed Central PMCID: PMC1739758.
- [99] Smach MA, Jacob N, Golmard JL, Charfeddine B, Lammouchi T, Ben Othman L, Dridi H, Bennamou S, Limem K. Folate and homocysteine in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease or dementia: a case control study. *Eur Neurol*. 2011;65(5):270-8. PubMed PMID: 21474939.
- [100] Smith DE, Smulders YM, Blom HJ, Popp J, Jessen F, Semmler A, Farkas M, Linnebank M. Determinants of the essential one-carbon metabolism metabolites, homocysteine, S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and folate, in cerebrospinal fluid. *Clin Chem Lab Med*. 2012 Mar 24;50(9):1641-7. PubMed PMID: 22962226
- [101] Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child*. 1976 Dec;51(12):944-50. PubMed PMID: 1015847; PubMed Central PMCID: PMC1546171.
- [102] Snowdon DA, Tully CL, Smith CD, Riley KP, Markesbery WR. Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun study. *Am J Clin Nutr*. 2000 Apr;71(4):993-8. PubMed PMID: 10731508.

- [103] Sosvorová L, Bešťák J, Bičíková M, Mohapl M, Hill M, Kubátová J, Hampl R. Determination of homocysteine in cerebrospinal fluid as an indicator for surgery treatment in patients with hydrocephalus. *Physiol Res*. 2014 Sep 4;63(4):521-527. PubMed PMID: 24908094.
- [104] Sreedharan J, Brown RH Jr. Amyotrophic lateral sclerosis: Problems and prospects. *Ann Neurol*. 2013 Sep;74(3):309-16. PubMed PMID: 24038380.
- [105] Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M, DACH-LIGA Homocystein e.V. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 2003 Nov;41(11):1392-403. PubMed PMID: 14656016.
- [106] Stipanuk MH, Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inheret Metab Dis*. 2011 Feb;34(1):17-32. PubMed PMID: 20162368; PubMed Central PMCID: PMC2901774.
- [107] Sung JJ, Kim HJ, Choi-Kwon S, Lee J, Kim M, Lee KW. Homocysteine induces oxidative cytotoxicity in Cu,Zn-superoxide dismutase mutant motor neuronal cell. *Neuroreport*. 2002 Mar 25;13(4):377-81. PubMed PMID: 11930144.
- [108] Susser E, Brown AS, Klonowski E, Allen RH, Lindenbaum J. Schizophrenia and impaired homocysteine metabolism: a possible association. *Biol Psychiatry*. 1998 Jul 15;44(2):141-3. PubMed PMID: 9646897.
- [109] Tan W, Pasinelli P, Trotti D. Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1842(8):1295-301. PubMed PMID: 24568860; PubMed Central PMCID: PMC4074562.
- [110] Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, Sides EG, Wang CH, Stampfer M. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA*. 2004 Feb 4;291(5):565-75. PubMed PMID: 14762035.
- [111] Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman OM. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. *Arch Neurol*. 2000 Aug;57(8):1171-6. PubMed PMID: 10927797.
- [112] Turner MR, Hardiman O, Benatar M, Brooks BR, Chio A, de Carvalho M, Ince PG, Lin C, Miller RG, Mitsumoto H, Nicholson G, Ravits J, Shaw PJ, Swash M, Talbot K, Traynor BJ, Van den Berg LH, Veldink JH, Vucic S, Kiernan MC. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2013 Mar;12(3):310-22. PubMed PMID: 23415570.
- [113] Valentino F, Bivona G, Butera D, Paladino P, Fazzari M, Piccoli T, Ciaccio M, La Bella V. Elevated cerebrospinal fluid and plasma homocysteine levels in ALS. *Eur J Neurol*. 2010 Jan;17(1):84-9. PubMed PMID: 19659753.
- [114] Van den Berg JP, Kalmijn S, Lindeman E, Veldink JH, de Visser M, Van der Graaff MM, Wokke JH, Van den Berg LH. Multidisciplinary ALS care improves quality of life in patients with ALS. *Neurology*. 2005 Oct 25;65(8):1264-7. PubMed PMID: 16247055.
- [115] Vehviläinen P, Koistinaho J, Gundars G. Mechanisms of mutant SOD1 induced mitochondrial toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:126. PubMed PMID: 24847211; PubMed Central PMCID: PMC4023018.
- [116] Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 1998 Apr 9;338(15):1042-50. PubMed PMID: 9535670.

- [117] White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Cappai R. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem*. 2001 Mar;76(5):1509-20. PubMed PMID: 11238735.
- [118] Williams JH, Pereira EA, Budge MM, Bradley KM. Minimal hippocampal width relates to plasma homocysteine in community-dwelling older people. *Age Ageing*. 2002 Nov;31(6):440-4. PubMed PMID: 12446289.
- [119] 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 Apr 4;6(4):e17947. PubMed PMID: 21483737; PubMed Central PMCID: PMC3070699.
- [120] Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K. Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. *Neurology*. 2000 Aug 8;55(3):437-40. PubMed PMID: 10932284.
- [121] Yoshino Y. Possible involvement of folate cycle in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res*. 1984 Mar;9(3):387-91. PubMed PMID: 6204220.
- [122] Zhang X, Chen S, Li L, Wang Q, Le W. Decreased level of 5-methyltetrahydrofolate: a potential biomarker for pre-symptomatic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2010 Jun 15;293(1-2):102-5. PubMed PMID: 20334883.
- [123] Zhang X, Chen S, Li L, Wang Q, Le W. Folic acid protects motor neurons against the increased homocysteine, inflammation and apoptosis in SOD1 G93A transgenic mice. *Neuropharmacology*. 2008 Jun;54(7):1112-9. PubMed PMID: 18436268.
- [124] Zinman L, Cudkovicz M. Emerging targets and treatments in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2011 May;10(5):481-90. PubMed PMID: 21511200.
- [125] Zoccolella S, Lamberti SV, Iliceto G, Santamato A, Lamberti P, Logroscino G. Hyperhomocysteinemia in L-dopa treated patients with Parkinson's disease: potential implications in cognitive dysfunction and dementia?. *Curr Med Chem*. 2010;17(28):3253-61. PubMed PMID: 20666719.
- [126] Zoccolella S, Bendotti C, Beghi E, Logroscino G. Homocysteine levels and amyotrophic lateral sclerosis: A possible link. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010;11(1-2):140-7. PubMed PMID: 19551535.
- [127] Zoccolella S, Simone IL, Lamberti P, Samarelli V, Tortelli R, Serlenga L, Logroscino G. Elevated plasma homocysteine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008 Jan 15;70(3):222-5. PubMed PMID: 18195267.

ABSTRACT:

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a rare degenerative neurologic disease, whose pathophysiological mechanisms are not well known. They trigger a selective degeneration of motor neurons. The role played by the metabolism of folates, homocysteine in particular, was recently highlighted by several studies.

An exploratory study was undertaken with 13 patients suffering from ALS. Our main goal was to confirm the decrease in 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) and the increase in homocysteine in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients as the diagnosis was made. Secondary goals were to establish correlations with the phenotypes of the patients, and to analyse the potentially involved mechanisms.

We are revealing a downward trend of 5-MTHF in the CSF of ALS patients ( $p=0.14$ ), not significant, yet proven for 6 patients. However, it is neither combined with an increase in homocysteine in the CSF nor a decrease in methionine. Thus, the implication of a disorder in folates metabolism through remethylation in the central nervous system does not seem to be confirmed. This study gives rise to the implication of other metabolic pathways, requiring further explorations (i.e. the activity of SOD1). Moreover, our results seem to highlight homocysteine levels in the blood which are similar to those found in previous studies, and correlated to the lead time diagnosis. Surprisingly, we noticed the fact that homocysteine levels in the CSF were correlated to the cognitive function. Further studies are needed to demonstrate the potential interest in homocysteine in the CSF as a biomarker of the cognitive dysfunction in ALS.

The impact of the decrease in 5-MTHF in the CSF highlights the interest of folates supplements for patients suffering from ALS, on account of its anti-apoptotic role revealed for animals.

---

## **METABOLISME DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE DANS LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE**

---

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative rare, dont les mécanismes physiopathologiques ne sont pas bien connus, entraînant une dégénérescence sélective des motoneurons. Le rôle du métabolisme des folates et notamment de l'homocystéine a été soulevé récemment par plusieurs études.

Nous avons réalisé une étude exploratoire auprès de 13 patients atteints de SLA. Notre objectif principal était de confirmer la baisse du 5-MTHF et l'élévation de l'homocystéine dans le LCS des patients SLA au moment du diagnostic. Les objectifs secondaires étaient d'établir des corrélations avec le phénotype des patients et d'analyser les mécanismes éventuellement impliqués.

Nous montrons une tendance à la diminution du 5-MTHF dans le LCS des patients SLA, non significative ( $p=0.14$ ), mais avérée pour 6 patients. Cependant, celle-ci n'est pas associée à une élévation de l'homocystéine dans le LCS ni à une diminution de la méthionine. Ainsi, l'implication d'un trouble du métabolisme des folates par l'intermédiaire de la voie de la reméthylation au sein du système nerveux central ne semble pas confirmée. Cette étude soulève l'hypothèse de l'implication d'autres voies métaboliques nécessitant des explorations complémentaires (activité de la SOD notamment). Par ailleurs, nos résultats semblent mettre en évidence des taux d'homocystéine dans le sang similaires aux études antérieures, possiblement corrélés au délai diagnostique. De façon inattendue, nous avons observé que les taux d'homocystéine dans le LCS étaient corrélés à l'atteinte cognitive. D'autres études sont nécessaires afin de démontrer l'intérêt éventuel de l'homocystéine dans le LCS en tant que biomarqueur de l'atteinte cognitive dans la SLA.

L'incidence de la diminution du 5-MTHF dans le LCS soulève l'intérêt de la supplémentation en folates chez les patients atteints de SLA, en raison de son rôle anti-apoptique montré chez l'animal.

---

TITRE EN ANGLAIS: Metabolism of folates and homocysteine in amyotrophic lateral sclerosis

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

---

MOTS-CLES : Sclérose latérale amyotrophique, Folates, 5-MTHF, Homocystéine

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier

Faculté de médecine Toulouse-Purpan, 35 Allées Jules Guesde BP 7202 31073 Toulouse Cedex 7

---

Directeur de thèse : Pascal CINTAS